

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA “SAPIENZA”

**Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia dell’Apparato Digerente, XXII Ciclo**

Direttore: Prof. Chiara Montesani

Dipartimento di Chirurgia Generale, Specialità Chirurgiche e Trapianti  
d’Organo “Paride Stefanini”

**Tesi Sperimentale** sulle possibili Applicazioni delle **Nanotecnologie alla Chirurgia Generale**: sviluppo di biomateriali protesici. Risultati preliminari dopo tre anni di sperimentazione.

## **“Nanotecnologie applicate alla chirurgia protesica dei difetti della parete addominale”**

**Relatore:**

**Prof. Paolo Negro**

**Candidato:**

**Dott Massimo Chiaretti**

**Anno accademico 2009-2010**

## Indice

|   |    |
|---|----|
| UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI ROMA "SAPIENZA" .....   | 1  |
| Dottorato di Ricerca in Fisiopatologia dell'Apparato Digerente, XXII Ciclo .....  | 1  |
| "nanotecnologie applicate alla chirurgia protesica dei difetti della parete addominale" .....   | 1  |
| 1 INTRODUZIONE .....  | 12 |
| 2 PROGETTO DELLA RICERCA .....  | 16 |
| 3 SVILUPPO ED ORGANIZZAZIONE DELLA RICERCA CLINICA.....   | 19 |
| <b>3.1- Identificazione del problema e formulazione delle ipotesi</b> .....   | 19 |
| 3.2- Revisione della letteratura .....  | 19 |
| 3.3- Good Clinical Practice .....   | 20 |
| 3.4- Benefici ragionevolmente previsti .....  | 21 |
| 3.5- Durata .....   | 22 |
| 3.6- Numero dei soggetti partecipanti ad ogni studio .....  | 22 |
| 3.7- Protocollo.....  | 23 |
| 4 DISEGNO DELLO STUDIO .....  | 23 |
| 5 MATERIALI E METODI .....  | 27 |
| 5.1- Materiali e metodi PRIMO esperimento.....  | 27 |
| Figura 1 Rappresentazione ideale di un nanotubo di carbonio a parete singola (SWCNT) formato da un foglio di grafene arrotolato. Si osservano delle impurità metalliche dentro e nella struttura reticolare esagonale provocando puntiformi interruzioni del reticolo. ....                                     | 27 |
| 5.1.1 Test in vitro .....   | 28 |
| 5.1.2 Coltura cellulare .....   | 29 |
| 5.1.3 Studio della proliferazione cellulare .....   | 29 |
| 5.1.4 Analisi statistica .....  | 30 |
| 5.1.5 Effetti Generali in vivo .....  | 30 |
| 5.1.6 Test di somministrazione ripetuto.....  | 31 |
| 5.1.7 MWCNT test di impianto .....  | 31 |
| 5.1.8 Assetto immunologico .....  | 32 |
| 5.1.9 Esame istologico .....  | 32 |
| 5.2- Materiali e metodi test in vitro SECONDO esperimento.....  | 33 |
| 5.2.1 Introduzione. ....  | 33 |
| Fig. 2: aspetto della superficie liscia-brillante-lucente del BP prima dell'impianto in ratto Sprague-Dawley maschio, da 340 gr in tasca sottofasciale. ....  | 34 |
| Fig. 3: aspetto della superficie ruvida e opaca del BP. ....  | 35 |
| Fig. 4: aspetto della rete tridimensionale costituita da MWCNT osservati con Microscopio elettronico a scansione (Scansion Electron Microscope -SEM) 30kV x30.00µm.....   | 36 |
| Fig. 5: aspetto della superficie ruvida-opaca del BP prima dell'impianto in ratto Sprague-Dawley maschio, da 340 gr in tasca sottofasciale. Il BP è costituito da una rete tridimensionale di MWCNT fotografata con Microscopio elettronico a scansione (Scansion Electron Microscope -SEM) 10kV x30.00µm ..... | 36 |
| Fig. 6: aspetto di una rete tridimensionale di MWCNT osservata della superficie liscia-lucente del BP, fotografata con Microscopio elettronico a scansione (Scansion Electron Microscope -SEM) 10kV x30.00µm.....   | 36 |
| Fig. 7: aspetto della superficie ruvida-opaca del BP osservata al SEM.....  | 36 |
| 5.2.2 Colture cellulari.....  | 37 |
| 5.2.3 Test sulla proliferazione cellulare .....   | 37 |
| 5.2.4 Analisi statistica .....  | 38 |
| 5.2.5 Materiali e Metodi della sperimentazione del BP in vivo secondo esperimento. ....   | 38 |
| 5.3- Materiali e metodi test in vitro TERZO esperimento mutagenicità .....  | 39 |
| 5.3.1 Reagenti .....  | 39 |
| 5.3.2 Terreno di coltura.....   | 39 |

|  |    |
|--|----|
| 5.3.3 S9-Sistema di Attivazione Metabolica.....  | 39 |
| Tab. 1: principali caratteristiche fisiche dei nanotubi di carbonio multiparete.....   | 40 |
| 5.3.4 Ceppi Batterici .....  | 40 |
| 5.3.5 Test di Citotossicità e Mutagenicità.....  | 40 |
| Tab. 2: Colonie ricombinanti di <i>S. typhimurium</i> TA 98, <i>S. typhimurium</i> TA 100 e <i>E. coli</i> ,<br>in presenza di MWCNT .....   | 42 |
| 5.3.6 Analisi statistica .....   | 42 |
| 5.4- Materiali e metodi test in vitro QUARTO esperimento biocompatibilità'.....  | 43 |
| 5.4.1 Studio della proliferazione cellulare .....  | 43 |
| 5.4.2 Materiali e metodi per la valutazione dei parametri ematochimici quarto esperimento<br>biocompatibilità' .....   | 44 |
| 5.4.3 Materiali e metodi per lo studio dei pesi corporei quarto esperimento biocompatibilità'.....   | 45 |
| Tab. 3: Tabella dei pesi corporei dei soggetti al ( $G_0$ ) e dopo 7, 14, 21, 28, 35 giorni dopo<br>l'intervento chirurgico.....   | 45 |
| 5.4.4 Materiali e metodi analisi statistica del quarto esperimento biocompatibilità.....   | 46 |
| 5.4.5 Materiali e metodi test di impianto in vivo quarto esperimento biocompatibilità.....   | 47 |
| 5.4.5.1 Tecnica chirurgica di impianto dei prototipi di protesi non riassorbibile confrontate<br>con Parietene Progrid® in modello animale (ratto) .....   | 47 |
| 5.4.5.2 Materiali impiantati.....  | 47 |
| FIG.8: Stabulazione di due soggetti, nel nostro studio abbiamo scelto ratti maschi<br>"Sprague Dawley" da 300-350 g per la loro docilità e identità genetica. ....   | 48 |
| 5.4.6 Metodi .....   | 49 |
| 5.4.7 Tecnica di induzione dell'anestesia .....  | 51 |
| Fig. 9: Inoculazione in fossa iliaca di sodio pentobarbitale in soluzione salina alla dose di<br>53 mg/Kg per via intraperitoneale. ....   | 51 |
| 5.4.8 Tecnica del prelievo ematico .....   | 52 |
| Figg. 10 e 11: il ratto anestetizzato viene adagiato su un materassino termico antistress sul<br>quale viene eseguito il prelievo ematico per puntura intracardiaca al sesto spazio<br>intercostale sinistro. ....   | 52 |
| Figg. 12 e 13: Ad ogni soggetto al quale si preleva il sangue vengono eseguiti alcuni<br>strisci su vetrino per l'esame parassitologico e la conta dei globuli a fresco, prima<br>dell'intervento, ogni 7gg per tutto il periodo dell'osservazione clinica ed infine, prima del<br>sacrificio..... | 52 |
| 5.4.9 Anatomia chirurgica.....   | 53 |
| 5.4.10 Tecnica per l'impianto di quadratino da BP 2x2 cm in una tasca sotto-cutaneo-<br>fasciale realizzata in regione dorsolombare .....  | 55 |
| Fig. 14: quadratino, sterilizzato in autoclave, di BP da 2 cm <sup>2</sup> confezionato in doppia busta.<br>.....  | 55 |
| Fig. 15: aspetto della superficie liscia e lucente del BP.....   | 55 |
| Fig. 16: tricotomia.....   | 55 |
| Fig. 17: preparazione del campo operatorio, incisione trasversale sul dorso da 2,5 cm di<br>lunghezza, approfondimento fino alla fascia muscolare.....   | 56 |
| Fig. 18: incisione trasversale sul dorso da 2,5 cm, approfondimento alla fascia muscolare.<br>.....  | 56 |
| Fig. 19: creazione di una tasca avascolare tra fascia muscolare e muscoli dorso-lombari<br>per il posizionamento della protesi, .....  | 56 |
| Fig. 20: protesi di BP che sta per essere impiantata.....  | 57 |
| Fig. 21: posizionamento della protesi in BP. ....  | 57 |
| Figg. 22 e 23: chiusura in duplice strato: profondo-fasciale, a punti staccati riassorbibili,<br>lo strato superficiale si chiude a punti staccati non riassorbibili.....  | 57 |

|   |    |
|---|----|
| 5.4.11 Tecnica d'allestimento del prototipo protesico in polipropilene, modificato con quadratini di BP disposti ai quattro angoli e fissati al supporto con punti trafissi in prolene 4/0USP ..... | 58 |
| Fig. 24: materiale protesico in polipropilene. ....   | 58 |
| Fig. 25: fase di ritaglio dei quadratini 2x2 cm. ....   | 58 |
| Fig. 26: quadrato di BP da 2x2 cm dal quale vengono ricavati quattro piccoli frammenti da 0,2x0,2 cm da applicare sulla rete di polipropilene.....  | 58 |
| Fig. 27: frammenti da 0,2x0,2 cm di BP da applicare sulla rete di polipropilene. ....   | 59 |
| Fig. 28: filo 6/0 USP di polipropilene, stesso materiale della rete, con il quale si applicano i quadratini di BP sui quattro angoli di rete. ....  | 59 |
| Fig. 29 e 30: applicazione dei quadratini di BP sui quattro angoli della rete in polipropilene. ....  | 59 |
| 5.4.12 Intervento sull'addome con impianto di polipropilene con angolari di ancoraggio in BP .....  | 60 |
| Fig. 31: tricotomia sull'addome. ....   | 60 |
| Fig. 32: lettino termico antistress.....  | 60 |
| Fig. 33: pacchetto sterile degli strumenti chirurgici. ....   | 60 |
| Fig. 34: animale pronto per essere operato in campo sterile.....  | 61 |
| Fig. 35: Fase iniziale dell'intervento.....   | 61 |
| Fig. 36: apertura della breccia chirurgica tra fascia e muscoli larghi della parete addominale anteriore.....   | 61 |
| Fig. 37: protesi in polipropilene da 2 cm <sup>2</sup> con quattro quadratini da 0,2 cm <sup>2</sup> suturati con prolene 6/0 USP ai quattro angoli .....   | 62 |
| Fig. 38: la protesi viene introdotta nella breccia tra fascia e muscoli larghi della parete addominale anteriore a simulare un intervento di plastica per laparocele addominale. ....               | 62 |
| Fig. 39: la protesi viene introdotta nella breccia tra fascia e muscoli larghi della parete addominale anteriore senza colla né punti di sutura per il fissaggio. ....                              | 62 |
| Fig. 40: la protesi viene adagiata sul piano muscolo-fasciale ben distesa e abbandonata senza necessità di fissaggio né con punti né con collante.....  | 63 |
| Fig. 41: chiusura della fascia a punti staccati in Vicryl®. ....  | 63 |
| Fig. 42: chiusura della fascia a punti staccati in Vicryl®. ....  | 63 |
| Fig. 43: chiusura del piano fasciale.....   | 64 |
| Fig. 44: chiusura della fascia a punti staccati in Vicryl®. ....  | 64 |
| Fig. 45: materassino termico antistress. ....   | 64 |
| 5.4.13 Tecnica per l'impianto di materiale protesico "self-gripping" (Parietene Progrid®).....  | 65 |
| Fig. 46: realizzazione della tasca avascolare per l'impianto rete protesica Parietene Progrid®.....   | 65 |
| Fig. 47: scollamento sottocutaneofasciale per l'impianto rete protesica Parietene Progrid®."self-gripping". ....  | 65 |
| Fig. 48: posizionamento rete protesica Parietene Progrid®."self-gripping" nella tasca avascolare dal lato pretrattato con poliglactina.....   | 65 |
| Fig. 49: chiusura della fascia muscolare sopra l'impianto rete protesica Parietene Progrid®."self-gripping". ....   | 66 |
| Fig. 50: completamento del piano profondo dell'impianto rete protesica Parietene Progrid®."self-gripping". ....   | 66 |
| Fig. 51: chiusura della breccia fasciale con Vicryl. ....   | 66 |
| Fig. 52: completamento della chiusura della fascia. ....  | 67 |
| Fig. 53: chiusura piano cutaneo. ....   | 67 |
| Fig. 54 e 55: chiusura ferita cutanea. ....   | 67 |
| 5.4.14 Tecnica di prelievo di preparati anatomici per l'esame microscopico.....   | 68 |

|   |           |
|---|-----------|
| Fig. 56: apertura della parete addominale dopo anestesia generale, pesata, prelievo ematico per esami di laboratorio e sacrificio in camera saturata di CO <sub>2</sub> .   | 68        |
| Fig. 57: approfondimento dell'incisione della linea alba.   | 68        |
| Fig. 58: apertura cavità addominale.  | 68        |
| Fig. 59: lussazione del lobo epatico destro.  | 69        |
| Fig. 60: prelievo del lobo epatico destro.  | 69        |
| Fig. 61: preparazione anatomica rene destro.  | 69        |
| Fig. 62: preparazione prelievo della milza.   | 70        |
| Fig. 63: prelievo del cuore.  | 70        |
| Fig. 64: prelievo del cervello.   | 70        |
| Fig. 65: prelievo del testicolo.  | 71        |
| Fig. 66: prelievo linfonodi mesenterici.  | 71        |
| Fig. 67: prelievo mesentere.  | 71        |
| Fig. 68: prelievo del sito d'impianto.  | 72        |
| Fig. 69: sito di impianto della rete fissata con quadratini di BP senza collanti e senza suture. Si osserva la lucentezza del peritoneo parietale, assenza di flogosi transparietale da corpo estraneo.                                       | 72        |
| Fig. 70: sito di impianto della rete fissata con quadratini di BP senza collanti e senza suture. Si osservi la lucentezza del peritoneo parietale, anche in corrispondenza del BP e l'assenza di flogosi transparietale da corpo estraneo.    | 72        |
| Fig. 71: sito di impianto della rete fissata con quadratini di BP senza collanti e senza suture. Si osservano per trasparenza i quadratini di BP e la lucentezza del peritoneo parietale per assenza di flogosi transparietale da BP.         | 73        |
| Fig. 72: sito di impianto della rete fissata con quadratini di BP senza collanti e senza suture.  | 73        |
| <b>5.5- Materiali e metodi QUINTO esperimento: misurazione della bioadesività del BP su modello animale (coniglio)</b>  | <b>74</b> |
| Fig. 73: schema dell'apparecchiatura elettromeccanica INSTRON 4502, con sensore e computer per la misurazione della bioadesività per il "peeling test a 90°".   | 74        |
| Figg. 74 e 75: preparazione dei pezzi anatomici di tessuto muscolare di coniglio su regolo di cartoncino presagomato  | 76        |
| Figg. 76 e 77: campione di pezzo anatomico di tessuto muscolare e campione di tessuto protesico, BP a sinistra e Progrid a destra.  | 76        |
| Figg. 78 e 79: INSTRON 4502 Universal Testing Machine è lo strumento di misura utilizzato, particolare della tastiera e del monitor.  | 77        |
| Figg. 80,81,82,83: monitoraggio, ancoraggio del campione chirurgico ed aspetto del tessuto che emerge dalla finestra di adesione.   | 77        |
| Fig. 84: preparazione dell'ancoraggio del campione protesico di BP alla pinza da strappo  | 78        |
| Figg. 85,86,87: monitoraggio pronto abbassamento della pinza verso il supporto in plexiglas per l'inizio del test   | 78        |
| <b>5.5.1 Metodo di misurazione della bioadesività "Peeling Test a 90°"</b>  | <b>79</b> |
| I test- Buckypaper 1° run: abbiamo studiato il comportamento del lato opaco-ruvido osservando e documentando una resistenza massima di quasi 1 N per cm <sup>2</sup> .  | 79        |
| Fig. 88,89,90,91: applicazione della protesi sul muscolo, progressione del sollevamento, aspetto della protesi a fine test. Presenza di guaina muscolare lacerata sulla protesi, strappata dal muscolo e rimasta adesa al supporto protesico. | 79        |
| Fig. 92: particolare della protesi sul muscolo che viene sollevamento di ben 1,5 cm dimostrando la grande capacità bioadesiva del supporto protesico.   | 79        |
| Figg. 93,94: distacco avvenuto e particolare della pinza con BP sul quale è rimasta adesa parte della fascia muscolare per la grande capacità bioadesiva del supporto protesico.  | 80        |

|                               |   |           |
|-------------------------------|---|-----------|
| II test- “Buckypaper 2° run”: | l’esperimento è stato ripetuto con identica modalità, sullo stesso campione di BP usato nel I test “Buckypaper 1° run”, perché parte del tessuto biologico, inopinatamente era rimasto adeso sul campione protesico ( <i>vedi</i> Figg. 93, 94) e abbiamo voluto verificare effetti e differenze. Tale campione è stato cimentato con un nuovo campione di tessuto muscolare di coniglio. Abbiamo documentato la netta riduzione della bioadesività del materiale protesico per saturazione dei siti superficiali ma il materiale ha comunque conservato una discreta bioadesività, comunque superiore a quella del Proprip vergine, di ben 0,2 N per cm <sup>2</sup> ..... | 80        |
| Fig. 95:                      | comportamento del lato liscio lucente. Si documenta una resistenza massimale di 0.8 N per cm <sup>2</sup> cioè 25% circa della tensione massimale misurata sul lato ruvido. La presente schermata è riportata in grafico in Fig.137, par. 6.5.4.....  | 80        |
| III test-BP lato liscio:      | Abbiamo studiato quindi il comportamento del lato liscio e lucente del materiale protesico osservando una resistenza di picco, allo strappo, di ben 0,8 N per cm <sup>2</sup> . Figg. 96, 97, 98, 99, 100,101: comportamento del lato lucente-liscio. Si documenta una resistenza massimale di 0.8 N per cm <sup>2</sup> .....  | 81        |
| IV test Parietene Progrip®:   | abbiamo studiato il comportamento di un campione da 2x2 cm di Progrip (polipropilene con una delle superfici ricoperta da poliglactina), materiale protesico commerciale self-gripping, utilizzato per il confronto per le proprietà bioadesive, applicato sul quinto campione di tessuto muscolare di coniglio documentando una resistenza, allo strappo, solamente di 0,01 N per cm <sup>2</sup> . Il test è stato documentato dalle sottostanti Fig.102, 103, 104, 105, 106, 107, 108.....   | 82        |
| Figg. 102, 103, 104, 105:     | comportamento della rete Parietene Progrip®. ....   | 82        |
| Figg. 106, 107, 108:          | documentano il comportamento del lato ruvido del Progrip. Si documenta una resistenza massimale di 0.1 N per cm <sup>2</sup> , in altre parole 1/100 della tensione massimale registrata con BP lato ruvido-opaco, 1/125 della tensione massimale registrata con BP lato liscio-lucente. ....   | 82        |
| V test-Progrip® 2:            | abbiamo infine studiato il comportamento dell’altra faccia, non ricoperta da poliglactina, solo in puro polipropilene, dello stesso campione di Progrip, cimentandolo con un sesto preparato anatomico standardizzato, documentando l’azzeramento della resistenza, allo strappo. Il test è stato eseguito con tecnica identica. Successivamente abbiamo fissato il polipropilene con colla di fibrina ( <i>vedi</i> Par. 6.5).....   | 82        |
| <b>6</b>                      | <b>RISULTATI</b> .....  | <b>83</b> |
| 6.1-                          | Risultati PRIMO esperimento .....   | 83        |
| 6.1.1                         | Studio della proliferazione cellulare. ....   | 83        |
| Tab. 4:                       | la coltura cellulare Caco-2, è stata trattata con MWCNT, aggiunti al mezzo di coltura alle concentrazioni da 0.001 a 0.1 mg/ml <sup>-1</sup> , dopo 24 e 72 ore dall’inizio dell’esperimento.....   | 83        |
| Fig. 109:                     | effetti di MWCNT sulla proliferazione delle cellule umane CaCo-2.....   | 83        |
| Fig. 110:                     | effetti di MWCNT sulla proliferazione delle cellule umane MCF-7. ....   | 84        |
| Tab. 5:                       | la coltura cellulare MCF-7, è stata trattata con MWCNT, aggiunti al mezzo di coltura alle concentrazioni da 0.001 a 0.1 mg/ml <sup>-1</sup> , dopo 24 e 72 ore dall’inizio dell’esperimento. ....   | 84        |
| Fig. 111:                     | effetti di MWCNT sulle cellule umane HA-SMC.....  | 85        |
| Tab. 6:                       | la coltura cellulare hSMC, è stata trattata con MWCNT, aggiunti al mezzo di coltura alle concentrazioni da 0.001 a 0.1 mg/ml <sup>-1</sup> , dopo 24 e 72 ore dall’inizio dell’esperimento. ....  | 85        |
| 6.1.2                         | Effetti generali del trattamento in VIVO in acuto.....  | 85        |
| Tab. 7:                       | mortalità nei 7 giorni dopo l’intervento. E’ stato osservato il decesso di un animale trattato a 40 mg/kg <sup>-1</sup> (33%) e uno (20%) nel gruppo trattato a 20 mg/kg <sup>-1</sup> . Nessun animale è deceduto nel gruppo di controllo. ....  | 86        |
| Tab. 8:                       | media dei pesi all’inizio del trattamento e dopo 7 giorni. ....   | 86        |

|   |    |
|---|----|
| Tab. 9: media dei pesi all'inizio del trattamento e dopo 7 giorni. ....   | 87 |
| 6.1.3 Valutazione immunologica .....  | 87 |
| Fig. 112: (A) intensa congestione dei setti alveolari, bolle enfisematose, atelectasia alveolare, emorragia endoalveolare, inondazione degli alveoli da parte di globuli rossi, ispessimento dei setti alveolari. (B) Vacuolizzazione del 60% dei glomeruli renali. Presenza di cilindri nei tubuli renali. (C) necrosi intestinale massiva, necrosi muscolare con residua area pigmentata (MWCNT). (D) reazione a cellule granulomatose giganti nel sito di impianto sotto la fascia muscolare, connesse a deposito di fibrina nel sito di impianto di 20mg di polvere di MWCNT.....   | 89 |
| 6.1.4 Effetti generali in vivo dopo somministrazione ripetuta.....  | 89 |
| 6.1.5 Analisi statistica .....  | 89 |
| Fig. 113: il profilo del diagramma del peso medio del gruppo "trattati" è incrementale, mentre la media dei pesi nel gruppo "controlli" ha avuto un profilo decrementale. ....  | 90 |
| 6.1.6 Test di impianto di MWCNT in polvere.....   | 90 |
| 6.1.7 Risultati dello studio istopatologico PRIMO esperimento .....   | 91 |
| 6.2- Risultati SECONDO esperimento.....   | 91 |
| 6.2.1 Risultati in VITRO.....   | 91 |
| Fig. 114 A e B: (A) mostra una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) nella proliferazione della linea cellulare Caco-2 al T0 ed al T24 FIG.6 (B) a causa della presenza del BP depositato sul fondo della capsula contenente la coltura cellulare, confrontata con la proliferazione delle colture cellulari di controllo analizzata con il t-test di Student per dati non appaiati.....   | 93 |
| Fig. 115 A e B: una riduzione della velocità di crescita statisticamente significativa ( $*p < 0.05$ ; $**p < 0.01$ ; $***p < 0.001$ ) è stata osservata anche nelle colture della linea cellulare MCF-7 al T0 (Fig.115 A) e al T24 (Fig.115 B) a causa della presenza del BP a confronto diretto con le colture cellulari di controllo senza BP analizzata con il t-test di Student per dati non appaiati.....   | 94 |
| Fig. 116A, 116B, 116C: Studio della proliferazione della linea cellulare HL-60, il BP posizionato sul fondo delle capsule contenenti le colture cellulari, osservate al T0 (Fig.116 A) e al T24 (Fig.116 B), a confronto con le colture di controllo prive del BP, le colture contenenti il BP hanno mostrato una riduzione della velocità di crescita che è risultata all'analisi statistica, altamente significativa ( $*p < 0.01$ ; $**p < 0.001$ ; $***p < 0.0001$ ). La Fig.116 C rappresenta il test sulla vitalità delle colture della linea cellulare HL-60 in presenza di BP. analizzata con il t-test di Student per dati non appaiati..... | 95 |
| Fig. 117 A e B: la presenza del BP nelle colture cellulari delle linee cellulari native non hanno evidenziato segni documentabili di citotossicità o riduzioni statisticamente significative nella velocità di proliferazione delle colture cellulari di cellule sane HA-SMC. ....  | 96 |
| Fig. 118 A e B: la presenza del BP nelle colture cellulari delle linee cellulari native non hanno evidenziato segni documentabili di citotossicità o riduzioni statisticamente significative nella velocità di proliferazione delle colture cellulari di cellule sane HF come sintetizzato nelle Figg. 118 A e B. ....  | 97 |
| 6.2.2 Sperimentazione in VIVO: effetti generali .....   | 98 |
| Tab. 10: peso corporeo dei soggetti al ( $G_0$ ) e dopo 7, 14, 21, 28, 35 giorni dopo l'intervento chirurgico.....  | 98 |
| Fig. 119: variazione del peso corporeo in ratti maschi Sprague-Dawley all'inizio dell'osservazione ed al momento del sacrificio alla 7a, 14a, 21a, 28a, 35a giornata postoperatoria dall'impianto di BP nel gruppo dei Trattati e della rete di polipropilene nei Controlli. All'inizio della sperimentazione I due gruppi erano omogenei riguardo al dato del peso corporeo medio ( $p=0.9$ ), mentre alla fine del periodo osservazionale, la differenza di peso è diventata statisticamente significativa ( $t=0,0001$ )......   | 99 |

|   |     |
|---|-----|
| Fig. 120: superficie ruvida opaca del BP a diretto contatto con il piano fasciale. In superficie si osserva la superficie liscia e lucente.....   | 99  |
| Fig. 121: superficie liscia del BP a diretto contatto con il piano fasciale. In superficie si osserva la superficie ruvida opaca .....  | 99  |
| 6.2.3 Risultati del test di impianto del BP in VIVO .....   | 100 |
| 6.3- Risultati TERZO esperimento sulla mutagenicità .....   | 101 |
| 6.3.1 Risultati sulla mutagenicità.....   | 101 |
| 6.4- Risultati QUARTO esperimento sulla biocompatibilità.....   | 103 |
| 6.4.1 Risultati sulla biocompatibilità in VITRO .....   | 103 |
| Fig. 122: rappresentazione del test sulla vitalità monitorizzata per 120 ore di esposizione delle colture della linea cellulare HL-60 alla presenza del BP. ....  | 104 |
| 6.4.2 Risultati QUARTO esperimento sulla biocompatibilità in VIVO.....  | 105 |
| 6.4.3 Risultati dei parametri ematochimici QUARTO esperimento biocompatibilità.....   | 106 |
| Tab. 11: elaborazione dei risultati degli esami ematochimici.....   | 106 |
| Fig. 123: variazione percentuale dei valori medi delle cellule ematiche.....  | 107 |
| Fig. 124: variazione percentuale dei valori medi dell'emoglobina.....   | 107 |
| Fig. 125: variazione percentuale dei valori medi dei globuli bianchi.....   | 108 |
| Fig. 126: variazione percentuale dei valori medi della creatinemia, nei controlli e trattati. ....  | 108 |
| Fig. 127: variazione percentuale dei valori medi dell'azotemia, nei controlli e trattati. .   | 109 |
| Fig. 128: variazione percentuale dei valori medi degli elettroliti, nei controlli e trattati.   | 109 |
| Fig. 129: variazione percentuale dei valori medi degli enzimi epatici, nei controlli e trattati. ....   | 110 |
| Fig. 130: variazione percentuale dei valori medi dell'assetto emocoagulativo, nei controlli e trattati. ....  | 110 |
| 6.4.4 Risultati statistici QUARTO esperimento biocompatibilità. Analisi statistica delle determinazioni emato-chimiche.....   | 111 |
| Tavola 12: statistica descrittiva delle determinazioni emato-chimiche. ....   | 111 |
| Tab. 13: t-Test per variabili indipendenti.....   | 121 |
| 6.4.5 Analisi statistica delle variazioni ponderali .....   | 142 |
| Tab. 14: media dei pesi dei controlli (1) e dei trattati (2) al tempo (w).....  | 142 |
| Tab. 15: composizione dei due gruppi statistici: controlli (1) e dei trattati (2) al tempo iniziale (w0). ....  | 142 |
| Tab. 16 studio statistico sull'incremento del peso corporeo nei due gruppi: controlli (1) e dei trattati (2) confrontato con la media dei pesi iniziali .....   | 143 |
| Tab. 17: studio statistico per la valutazione della significatività della variazione dell'incremento del peso corporeo, nei due gruppi: controlli (1) e dei trattati (2).....                               | 144 |
| Tab. 18: Valori percentuali delle medie degli incrementi del grafico in Fig. 119.....   | 144 |
| 6.5- Risultati QUINTO esperimento bioadesività .....  | 145 |
| 6.5.1 Risultati esperimento bioadesività .....  | 145 |
| 6.5.2 Prima prova BP lato ruvido su supporto biologico disidratato .....  | 145 |
| Fig. 131: il BP asciutto non aderisce alla fascia disidratata .....   | 145 |
| Fig. 132: il BP asciutto non aderisce al supporto disidratato.....  | 145 |
| 6.5.3 Prima prova BP lato ruvido su supporto biologico umido.....   | 146 |
| Fig. 133: forza di adesione del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia previa umidificazione della superficie fasciale con acqua. ....                          | 146 |
| Fig. 134, 135, 136: preparazione del test per lo studio della forza di adesione del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia umidificata con acqua di fonte. .... | 146 |

|   |     |
|---|-----|
| 6.5.4 Prima prova BP lato ruvido ripetuto con il BP del precedente esperimento, su nuovo supporto biologico idratato .....  | 147 |
| Fig. 137: ripetizione del test: forza di adesione del BP utilizzato nel precedente esperimento, applicato ad un nuovo campione di tessuto muscolare ricoperto della propria fascia. ....  | 147 |
| Fig. 138: ripetizione del test di bioadesività utilizzando lo stesso BP del precedente esperimento, applicato ad un nuovo campione di tessuto muscolare ricoperto della propria fascia. ....  | 147 |
| 6.5.5 Prima prova BP lato liscio-lucido .....   | 148 |
| Fig. 139: il grafico in colore rosso esprime la forza adesiva del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia dal lato liscio-lucido. ....   | 148 |
| Fig. 140, 141, 142, 143: misurazione della bioadesività del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia dal lato liscio-lucido. ....   | 149 |
| 6.5.6 Seconda prova BP lato ruvido su supporto biologico idratato con soluzione fisiologica .....   | 150 |
| Fig. 144: il grafico in colore rosso esprime la forza adesiva del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia inumidito con soluzione fisiologica. ....  | 150 |
| Fig. 145, 146: preparazione del test per lo studio della forza di adesione del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia reidratata. ....  | 151 |
| Fig. 147, 148: completamento del test per lo studio della forza di adesione del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia reidratata con soluzione fisiologica .....   | 151 |
| 6.5.7 Ripetizione del secondo test BP lato ruvido già utilizzato nel precedente esperimento su nuovo supporto biologico idratato con soluzione fisiologica .....  | 152 |
| Fig. 149: il grafico in colore rosso esprime la forza adesiva del BP già utilizzato nel precedente esperimento, applicato al nuovo campione di tessuto muscolare ricoperto della propria fascia inumidito con soluzione fisiologica. ....   | 152 |
| Fig. 150, 151, 152: test per lo studio della forza di adesione del BP utilizzato nel test precedente, applicato al nuovo campione biologico di tessuto muscolare ricoperto della propria fascia reidratata con soluzione fisiologica. Si osserva una capacità adesiva, ridotta rispetto al precedente test per la presenza di isole di tessuto lacerato dal precedente test che occupano parte della superficie bioadesiva del BP lato ruvido. .... | 153 |
| 6.5.8 Seconda prova BP lato liscio .....  | 154 |
| Fig. 153: Seconda prova BP lato liscio applicato a supporto biologico idratato. ....  | 154 |
| 6.5.9 Misurazione della bioadesività del self-gripping Parietene Progrid® Coated rivestito con poliglactina su una delle due superfici .....  | 155 |
| Fig. 154: misurazione della bioadesività del Parietene Progrid® lato Coated (PP), applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia dal lato pretrattato con POLIGLACTINA .....   | 155 |
| 6.5.10 Misurazione bioadesività di protesi non bioadesive, fissate con colla di fibrina Tissucol® .....   | 156 |
| 6.5.10.1 Misurazione bioadesività di INFINITY GORE® con colla di fibrina Tissucol®. ....  | 156 |
| Fig. 155: INFINITY GORE® Polytetrafluoroethylene not expanded (GPTFENE) hexagonale net. ....  | 156 |
| Fig. 156: INFINITY GORE® rete a maglie esagonali (Polytetrafluoroethylene not expanded) fissata con colla di fibrina (TISSUCOL®) su parete muscolare addominale di coniglio. ....   | 157 |
| 6.5.10.2 Misurazione bioadesività di CORDUROY GORE® con colla di fibrina Tissucol® .....  | 158 |

|  |            |
|--|------------|
| Fig. 157: Polytetrafluoroethylene expanded (GPTFEEX) CORDUROY® GORE® mesh.....   | 158        |
| Fig. 158: Polytetrafluoroethylene expanded (GPTFEEX) CORDUROY® GORE® mesh.....   | 159        |
| 6.5.10.3 Misurazione bioadesività DEL POLIPROPILENE fissato con colla di fibrina Tissucol®.....  | 160        |
| Fig. 159: misurazione della bioadesività del Parietene Progrid® DAL LATO NON RIVESTITO CON POLIGLACTINA, applicato al tessuto muscolare umido, ricoperto dalla propria fascia, FISSATO CON COLLA DI FIBRINA.....   | 160        |
| 6.5.10.4 Misurazione bioadesività del PTFE ESPANSO BARD® fissato con colla di fibrina Tissucol®.....   | 161        |
| Fig. 160: misurazione della bioadesività del Poli Tetra Fluoro Etilene Espanso Bard® applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia, fissato con colla di fibrina Tissucol®.....  | 161        |
| Fig. 161: aspetto del Poli Tetra Fluoro Etilene Espanso Bard® applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia, fissato con colla di fibrina Tissucol®.....   | 161        |
| 6.5.11 Test in vivo.....   | 162        |
| Fig. 162: peeling test eseguito sul preparato chirurgico del sito di impianto di un campione di BP applicato in regione parete addominale anteriore, in una tasca realizzata tra il piano sottocutaneo e la fascia muscolare.....  | 162        |
| Fig. 163: peeling test eseguito sul preparato chirurgico del sito di impianto di un campione di BP applicato sul peritoneo parietale dal lato ruvido e con il lato liscio a contatto con le anse intestinali.....  | 163        |
| Fig. 164: prove tensili di sforzo-deformazione del BP secco (in rosso) ed idratato (in bleu).....  | 163        |
| Tab. 19: prove tensili sforzo-deformazione (Peeling test a 90°) del BP secco come prodotto di fabbrica e del BP idratato, dopo sacrificio di coniglio femmina New Zealand da 2500 g, sulla quale è stato realizzato l'impianto di BP 2x2 cm <sup>2</sup> , in tasca muscolofasciale della parete addominale e in altro soggetto da 2565 g sul peritoneo parietale..... | 164        |
| 6.5.12 Sintesi dei risultati.....  | 165        |
| <b>7 DISCUSSIONE.....</b>  | <b>166</b> |
| <b>7.1- Discussione test PRIMO esperimento.....</b>  | <b>166</b> |
| 7.1.1- Discussione test in VITRO primo esperimento.....  | 166        |
| 7.1.2 Discussione test in VIVO primo esperimento.....  | 169        |
| 7.1.2.1 Sperimentazione della singola somministrazione.....  | 169        |
| 7.1.2.2 Sperimentazione della somministrazione ripetuta.....   | 169        |
| 7.1.2.3 Impianto di MWCNT.....   | 169        |
| 7.1.3 Studio dell'assetto immuologico dopo somministrazione di MWCNT.....  | 170        |
| 7.1.4 Studio istologico.....   | 170        |
| <b>7.2- Discussione risultati in vitro SECONDO esperimento.....</b>  | <b>171</b> |
| 7.2.1 Discussione risultati in VIVO secondo esperimento.....   | 174        |
| <b>7.3- Discussione risultati TERZO esperimento mutagenicità.....</b>  | <b>176</b> |
| <b>7.4- Discussione risultati QUARTO esperimento biocompatibilità'.....</b>  | <b>178</b> |
| 7.4.1 Discussione risultati quarto esperimento biocompatibilità' in VIVO.....  | 178        |
| 7.4.2 Discussione sull'analisi statistica delle determinazioni ematochimiche.....  | 179        |
| 7.4.3 Discussione sullo studio dei pesi corporei QUARTO esperimento biocompatibilità'.....   | 180        |
| Fig. 165: medie dei pesi nei controlli (1) e nei trattati (2) nel corso dell'osservazione protratta per 4 settimane (w).....   | 180        |
| <b>7.5 Discussione QUINTO esperimento bioadesività'.....</b>   | <b>182</b> |

|   |   |            |
|---|---|------------|
|   | Figg. 166 e 167: esame istologico di protesi espantata per neuropatia cronica e neurectomia inguinale ..... | 183        |
| 8 | <b>CONCLUSIONI</b> .....  | <b>184</b> |
|   | 8.1 Conclusioni PRIMO esperimento .....   | 184        |
|   | 8.2 Conclusioni, sommario e sviluppi del SECONDO esperimento.....   | 185        |
|   | 8.3 Conclusioni, sommario e sviluppi del TERZO esperimento mutagenicit .....                                | 188        |
|   | 8.4 Conclusioni, QUARTO esperimento biocompatibilit  .....  | 189        |
|   | 8.4.1 Conclusioni delle analisi statistiche quarto esperimento biocompatibilit  .....                       | 190        |
|   | 8.5 Conclusioni QUINTO esperimento bioadesivit  .....   | 191        |
| 9 | <b>BIBLIOGRAFIA</b> .....   | <b>194</b> |
|   | 9.1 Bibliografia PRIMO esperimento .....  | 194        |
|   | 9.2 Bibliografia SECONDO esperimento.....   | 197        |
|   | 9.3 Bibliografia TERZO esperimento mutagenicit  .....   | 200        |
|   | 9.4 Bibliografia QUARTO esperimento biocompatibilit  .....  | 210        |
|   | 9.5 Bibliografia QUINTO esperimento bioadesivit  .....  | 211        |

# 1 INTRODUZIONE

La chirurgia dei difetti della parete addominale (ernia inguinale, ernia ombelicale, ernia ventrale) utilizza materiali protesici con metodica “tension free” al fine di ridurre il rischio di recidiva erniaria, di migliorare il confort postoperatorio, ridurre il dolore, abbreviare la degenza ospedaliera ed accelerare la ripresa delle attività personali del Paziente. In tale ambito molti ricercatori stanno lavorando al fine di identificare un tessuto sintetico con il quale si possa realizzare la “Protesi Ideale”. Tra le caratteristiche che dovrebbero essere possedute dalla protesi ideale, la reazione infiammatoria di cicatrizzazione ed incorporazione da parte dei fibroblasti dovrebbe essere modulata e controllabile e comunque il più possibile vicina al processo cicatriziale fisiologico. Il vecchio ma ben noto polipropilene, potrebbe trovare una nuova vita se si potessero realizzare protesi più leggere, con reti più sottile, al fine di impiantare una minore quantità di materiale estraneo ma, comunque in grado di resistere alle sollecitazioni ed impedire la recidiva. I nuovi materiali dovrebbero quindi rispondere alle caratteristiche di leggerezza, resistenza, biocompatibilità, economicità, reazione infiammatoria controllabile, maggior confort per i pazienti e se possibile, riduzione dei tempi operatori per l’impianto. Altra caratteristica importante di una rete ideale, è quella di garantire il corretto e stabile posizionamento dell’impianto fin dal primo momento e per tutto il periodo di tempo necessario all’incorporazione nel tessuto infiammatorio cicatriziale. Tra i tantissimi materiali disponibili sottoposti all’attenzione della comunità scientifica, i nanoderivati del carbonio sono forse, attualmente, quelli più diffusamente studiati per la grande potenzialità e versatilità dimostrata. Scopo di questa ricerca è stato quello di verificare la possibilità di applicare le nanotecnologie e i nuovi bionanomateriali alla Chirurgia Generale. Nel lungo periodo intendiamo tentare di realizzare una nuova generazione di tessuti protesici di interesse Chirurgico, ed un nuovo materiale bioadesivo, sviluppati sulla base delle conoscenze e dei risultati

acquisiti nel corso di queste ricerche. Come il minatore che nel seguire il filone di rame s'imbatte in uno strato contenente oro, non lo ignora semplicemente perché non si tratta del metallo che sta estraendo dal filone, analogamente abbiamo trovato cose nuove ed importanti e le abbiamo quindi approfondite, ma non fanno parte della presente dissertazione e quindi i dati non sono stati riportati nel presente documento. Abbiamo potuto osservare e documentare l'elevata versatilità dei nanomateriali tra i quali, i nanotubi di carbonio multiparete (Multi Walled Carbon Nano Tubes-MWCNT) che sono stati studiati approfonditamente per quanto riguarda i loro effetti biologici e il Buckypaper (BP), una speciale conformazione dei MWCNT sotto forma di deposito in strato sottile. Il BP di MWCNT è un primo passo per la realizzazione di una nuova generazione di tessuti protesici che a parità di prestazioni biotensili e fisicochimiche possono essere almeno 10 volte più leggeri e bioadesivi, rispetto a quelli attualmente in commercio. Abbiamo scoperto, infatti, che le due superfici del BP hanno caratteristiche e proprietà biologiche diverse. Un lato è liscio e lucente e non manifesta spiccata bioadesività. Il lato opposto, opaco e ruvido, manifesta invece un'energica bioadesività descritta e documentata dal nostro gruppo di ricerca e oggetto di brevetto, approvato dall'Ufficio Brevetti dell'Università degli Studi di Roma "Sapienza". Tale bioadesività può essere sfruttata sia per realizzare dei supporti per fissare i comuni tessuti protesici in commercio ai tessuti viventi, sostituendo gli attuali metodi di ancoraggio, sia nell'impiego del BP tal quale, di profilo e dimensioni idonei alla funzione protesica. La ricerca si è articolata nel corso dei tre anni a disposizione per il Dottorato così come di seguito rappresentato: abbiamo iniziato con l'approfondita analisi sulla biotossicità dei nanomateriali, effettuate "in vitro" presso il Laboratorio del Dipartimento "Pietro Valdoni" dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza", sito in Via Scarpa, e di caratterizzazione presso l'Istituto di Fisica Nucleare (INFN) di Frascati, ai Laboratori del quale il sottoscritto Dottorando ha potuto accedere previa speciale autorizzazione. I MWCNT ed il BP sono stati caratterizzati all'infrarosso (IR), al microscopio elettronico a scansione (SEM) e al microscopio a trasmissione elettronica (TEM), prima e dopo sterilizzazione con varie metodiche al fine di impiantare materiali sterilizzati, per ridurre i fattori di confondimento. Presso lo stabulario

del Dipartimento di Farmacologia “Vittorio Ersparmer” dell’Università degli Studi di Roma “La Sapienza” sono stati eseguiti tests di biotossicità dei MWCNT “In vivo”, utilizzando 12 cavie da laboratorio e 2 ratti Sprague Dawley. I risultati di tali esperimenti, compresi quelli anatomopatologici sono stati pubblicati sulla rivista internazionale “Journal of Physics-Condensed Matters”. In una seconda fase ci siamo dedicati a studiare il Buckypaper (BP), una delle particolari conformazioni aggregative dei MWCNT. Abbiamo studiato la mutagenicità su batteri che ha prodotto una seconda pubblicazione sulla rivista internazionale “Toxicology”. Analogamente a quanto eseguito nel corso del primo ciclo, abbiamo studiato gli effetti citotossici di frammenti di BP su vari cloni cellulari e successivamente abbiamo eseguito impianti di BP tal quale, su 30 ratti maschi Sprague Dawley, realizzando il protocollo sperimentale presso lo stabulario di Via Scarpa, autorizzato dal Ministero della Salute, in accordo con il Servizio Veterinario per il benessere animale dell’Università di Roma “La Sapienza” e supervisionato dall’Istituto Superiore di Sanità (ISS). Tali risultati sono stati pubblicati sulla Rivista internazionale “Nanomedicine”. Nel terzo ciclo sperimentale abbiamo reiterato lo stesso protocollo, già autorizzato, realizzato nello stabulario dell’ISS eseguendo test ematochimici in vivo, per un totale di 3400 esami. Tali esami sono stati effettuati presso Appialab, un laboratorio analisi veterinarie privato di Roma, al fine di valutare l’interferenza del BP sia con il sistema immunitario che con tutti gli emuntori, su altri 30 ratti maschi Sprague-Dawley di taglia compresa fra i 200 ed i 550 grammi. Abbiamo, inoltre, valutato la tossicità sui parenchimi, nell’animale vivo e su tutti i visceri nel corso del successivo esame anatomopatologico eseguito dopo il sacrificio degli animali, scadenzati dai cronoprogramma di seguito riportati. In tali ratti sono stati impiantati campioni di polipropilene da 2 cm<sup>2</sup> ai cui angoli sono stati applicati quadratini da 2 mm<sup>2</sup> e fissati con un punto in polipropilene. Tali impianti sono stati confrontati con l’effetto prodotto da: impianti di BP da 2 cm<sup>2</sup>, impianti di Parietene-Progrip da 2 cm<sup>2</sup> e con impianti di polipropilene da 2 cm<sup>2</sup>. Settimanalmente, gli animali individuati secondo la tavola di randomizzazione, sono stati pesati, è stato eseguito il prelievo ematico e sacrificati, con espanto di tutti gli organi per gli esami anatomopatologico. Tale procedura si è protratta per 5

settimane, per studiare dettagliatamente il processo cicatriziale. In seguito, i campioni di BP prelevati dagli animali sacrificati, sono stati studiati per misurarne l'effetto bioadesivo, presso il laboratorio del Dipartimento di Chimica dell'Università degli Studi di Roma "La Sapienza". In un successivo esperimento, abbiamo comparato la forza bioadesiva del BP, con: protesi in polipropilene commerciale e varie protesi in PTFE espanso e non espanso, fissate ai tessuti biologici con colla di fibrina e contro polipropilene rivestito con acido polilattico (per conferire adesività - grip). I test di laboratorio hanno mostrato che il BP aderisce molto bene al substrato biologico. Per quanto riguarda i test di confronto tra biomateriali, abbiamo osservato preliminarmente che il BP provoca solamente una lieve reazione infiammatoria, da parte dei tessuti viventi, rispetto alla reazione infiammatoria cicatriziale provocata dal polipropilene. Il BP mostra una buona tollerabilità da parte dei soggetti impiantati. La mortalità in tutti i soggetti impiantati e nei controlli è stata nulla. Infine, Abbiamo studiato alla microscopia elettronica i rapporti tra il margine cicatriziale del tessuto vivente ed il BP nel punto di contatto.

## 2 PROGETTO DELLA RICERCA

La ricerca scientifica è un'attività che mira all'osservazione, alla descrizione ed infine alla comprensione degli eventi naturali basandosi sul metodo scientifico; inoltre si prefigge, come scopo, quello di poter intervenire e regolare uno o più fenomeni osservati. Dal punto di vista della metodologia, sono fondamentali il rispetto di regole imposte dal pensiero logico al fine di salvaguardare l'obiettività dei fenomeni oggetto dello studio. Uno dei punti basilari è la riproducibilità degli esperimenti, in altre parole, la possibilità che un dato fenomeno possa essere riproposto e studiato in tutti i laboratori del mondo. **L'esperimento è il fondamento del metodo scientifico.** Secondo Galileo, la natura è governata da leggi matematiche e la loro comprensione è possibile attraverso un rigoroso approccio sperimentale sulla base dell'osservazione dei fenomeni naturali stessi. In biologia e medicina i fenomeni osservabili non sono sempre esprimibili matematicamente e molte leggi sono di natura probabilistica. Pertanto, la scientificità di un'indagine biomedica ricorre ad un controllo empirico basato sulla ripetibilità, statisticamente significativa, delle osservazioni da parte di altri ricercatori. Solo nel 1866, con la pubblicazione dell'"Introduction à l'étude de la médecine expérimentale", si ha il primo tentativo di adottare questo metodo in ambito medico, ma una chiara definizione del metodo scientifico, nelle scienze umane, si avrà solo con la pubblicazione della Logica della scoperta scientifica di Popper. **All'interno della ricerca scientifica possono essere distinte due principali attività: la ricerca di base e la ricerca applicata,** di cui fa parte la ricerca traslazionale. **La ricerca di base,** chiamata anche ricerca pura o fondamentale, si pone come obiettivo primario: l'incremento delle conoscenze e la comprensione teorica delle relazioni che concorrono tra le diverse variabili presenti in un determinato processo. È una forma di ricerca meramente esplorativa, spesso guidata più dalla curiosità, dall'interesse e dall'intuito del ricercatore che dalla volontà pragmatica di intervenire su un determinato processo naturale per poterne modulare gli effetti ed ottenerne un'applicazione pratica. Nonostante ciò, la sua funzione di indagare i meccanismi fondamentali della biologia, generando nuove teorie, ha

costituito le fondamenta ed il presupposto indispensabile per ulteriori ricerche, concorrendo indirettamente ad inaspettate ricadute applicative. **La ricerca applicata**, di contro, è svolta allo scopo di trovare soluzioni pratiche a specifiche problematiche. Il suo scopo primario non è l'esclusivo avanzamento della conoscenza, ma la sua applicazione a fini pratici. E' normalmente, di tipo descrittivo e generalmente basata su precedenti ricerche di base. Ed è proprio in quest'ottica che si è sviluppato il presente studio. Spesso il confine tra ricerca di base e ricerca applicata non è così netto e il criterio per classificare una determinata ricerca è piuttosto definito dal presunto intervallo di tempo in cui la ricerca si dovrà sviluppare, prima di portare a ricadute applicative. La ricerca scientifica di base, quindi, costituisce un patrimonio determinante nel progresso della cultura scientifica. Nel corso degli anni, tale crescita è stata realizzata da ricerche condotte su modelli sperimentali semplici; infatti, la ricerca scientifica, e quindi anche in quella biologica, per indagare un problema complesso si avvale molto spesso di modelli più semplici, nel quale il fenomeno da indagare si presenti in modo particolarmente "puro" ed esemplare. Tradizionalmente, la ricerca di base risulta nettamente separata dalla pratica clinica, da una serie di ostacoli. La medicina traslazionale serve appunto per rimuovere questi ostacoli e rendere il trasferimento "bench to bedside" più rapido, sicuro ed efficiente. Tuttavia, questa opportunità scientifica potrà realizzarsi solo in seguito alla rimozione di quegli ostacoli teorico-pratici che hanno finora mantenuto separate l'attività di ricerca di base rispetto alla pratica clinica e attraverso la formazione di un continuum culturale e sperimentale fra la ricerca di base e la ricerca applicata. Lo scopo della ricerca traslazionale può essere riassunto nei seguenti punti:

- **Migliorare la prevenzione**
- **Migliorare la diagnostica**
- **Migliorare la prognosi**
- **Concepire ed applicare nuovi trattamenti**

e questo è il filone di ricerca in cui abbiamo lavorato, studiando nuovi materiali, verificandone la biocompatibilità e ipotizzandone l'applicabilità in **Chirurgia Generale**. Obiettivi così ambiziosi, e

conoscenze così estese richiedono la costituzione di team polispecialistico di ricercatori di diversa estrazione e competenza, in grado di interagire sinergicamente, capaci di sviluppare relazioni e nuove tecnologie, clinici dalla preparazione tecnica adeguata, in grado di trasferire le nuove applicazioni ai Pazienti. In tutto questo la brevettazione delle idee non va intesa come un metodo per far soldi ma come un concreto richiamo per gli imprenditori e le aziende, che per fare il loro mestiere hanno bisogno di nuove idee da portare sul mercato e noi, ricercatori, abbiamo bisogno di molti soldi per concretizzare i nostri sogni.

# **3 SVILUPPO ED ORGANIZZAZIONE DELLA RICERCA CLINICA**

## **3.1- Identificazione del problema e formulazione delle ipotesi**

L'ipotesi deve essere specifica, scientificamente dimostrabile e di rilevanza conoscitiva. Nella nostra vita professionale abbiamo avuto occasionalmente modo di raccogliere lamentele dei Pazienti, riguardo al discomfort derivato dal materiale protesico che, in alcuni casi, risulta essere apprezzabile alla palpazione, specialmente in Pazienti che successivamente all'intervento, dimagriscono. Lo stesso problema si riscontra con i mezzi di sintesi che si apprezzano per lungo tempo alla palpazione e le donne sono, in questa problematica particolarmente attente. Altro problema, occasionalmente osservato è la nevralgia da intrappolamento di terminazioni nervose presumibilmente nei nodi delle suture chirurgiche. La domanda che sorge spontanea è stata se esisteva la possibilità di migliorare, prevenire, ovviare a questi problemi tecnici. Un metodo alternativo che inizialmente mi è sembrato fantastico è il fissaggio della protesi con colla di fibrina, "Tissucol®". Dalla mia decennale esperienza in Pronto Soccorso, ho imparato che prima di somministrare le gammaglobuline antitetaniche, occorre chiedere il "Consenso Informato" del Paziente al quale bisognava spiegare che la somministrazione di sostanze biologiche, per quanto studiate e provate, poteva comunque, esporre il Paziente stesso al teorico ma possibile rischio di trasmissione di malattie infettive attualmente sconosciute e quindi non diagnosticabili. Alla luce di tali meditazioni, analogamente il collante, elimina il problema dell'intrappolamento delle terminazioni nervose, ma espone al rischio di trasmissione di malattia infettiva. Da qui, ragionando, ho cercato di immaginare un'alternativa in grado di risolvere il problema del fissaggio evitando le complicanze legate alle metodiche attualmente in uso.

## **3.2- Revisione della letteratura**

Consiste nella selezione e nello studio di ciò che è già stato pubblicato sull'argomento della ricerca e lo "Stato dell'Arte". Un incontro casuale con l'Ingegnere De Bellis (INFN) mi ha portato a Frascati dal Prof. Stefano Bellucci nel prestigioso Istituto Nazionale di Fisica Nucleare dove abbiamo cominciato a studiare i mattoni e la calce per fare le fondazioni del nostro grattacielo. In seguito, abbiamo sviluppato il progetto con la disposizione delle stanze, dei bagni, delle trombe per gli ascensori e delle scale. Quindi, abbiamo pensato ai rivestimenti e abbiamo iniziato la costruzione, trovando infinite difficoltà, ma anche tanto entusiasmo. Oltre la metafora, il progetto è il seguente: Studio delle proprietà dei nanotubi di carbonio a parete singola e multipla in ambito biologico, dalla esperienza di altri ricercatori, riportate in bibliografia, iniziando a sperimentarne gli effetti, non solo in vitro, come già era stato fatto, ma anche in vivo su topi da laboratorio di 20-25 gr, aprendo la nuova pista. Un altro importante incontro, ormai non più casuale, è stato quello con il Prof. Andrea Martinelli, esperto di polimeri e biomateriali del Dipartimento di Chimica della mia stessa Università.

### **3.3- Good Clinical Practice**

La good clinical practice (GCP) è uno standard internazionale di etica e qualità scientifica per progettare, condurre, registrare e relazionare gli studi clinici che coinvolgano soggetti viventi. Il rispetto degli standard della GCP garantisce pubblicamente non solo la tutela dei diritti, della sicurezza e del benessere dei soggetti che partecipano allo studio, in conformità con i principi stabiliti dalla dichiarazione di Helsinki, ma anche l'attendibilità dei dati relativi allo studio clinico. Prima che il nostro studio avesse inizio, sono stati valutati rischi ed inconvenienti prevedibili per gli animali impiegati nello studio, rispetto al beneficio atteso per l'Uomo. E' stata quindi sottoposta al "Ministero della Salute" la richiesta di autorizzazione all'esecuzione dello studio su animali, da condursi in assoluta conformità al protocollo con approvazione/parere favorevole di una commissione di revisione. Ogni procedura è stata eseguita secondo un cronoprogramma pre-

concordato con il Veterinario, preposto dall'Università degli Studi di Roma "Sapienza", al benessere animale, con il Direttore e con i tecnici di stabulario, con il laboratorio analisi chimico-cliniche e con l'anatomopatologo. Le procedure chirurgiche sono state eseguite sempre in anestesia generale cercando di ridurre al minimo lo stress per il soggetto, con campo operatorio sterile e strumentazione sterile, e previa accurata tricotomia e disinfezione cutanea come da protocollo prestabilito. I materiali impiantati sono stati tutti sterilizzati, come sull'Uomo, in doppia busta, in autoclave con controllo chimico e biologico di avvenuta sterilizzazione. Le informazioni relative allo studio sono state sempre registrate, trattate e conservate su appositi database computerizzati, protetti da password, note solo ai membri partecipanti alla sperimentazione, in modo tale da consentire un accurato controllo, resoconto, interpretazione con appositi programmi statistici e verifica. I soggetti trattati chirurgicamente con i diversi tipi di materiali a confronto, sono stati scelti secondo una tabella di randomizzazione.

### **3.4- Benefici ragionevolmente previsti**

La valutazione della tossicità dei materiali ha portato alla prima pubblicazione scientifica. Il passo successivo è stato quello di studiare se vi erano effetti mutageni, sempre in vitro ed in vivo su batteri ben conosciuti. Questo studio ha portato ad una successiva pubblicazione. Siamo, quindi, passati alla sperimentazione su Ratto, con l'obiettivo di passare attraverso fasi successive per Coniglio, Maiale ed infine Uomo. Nel ratto abbiamo impiantato un nuovo materiale solido che si ottiene dall'aggregazione dei nanotubi di carbonio (CNT): il **buckypaper (BP)**. Il BP preveniva la diffusione dei CNT nell'organismo, rimaneva in loco ed abbiamo scoperto tutta una serie di proprietà, sconosciute prima di allora, che hanno concretizzato prima un brevetto (Verbale di Deposito Domanda di Brevetto per Invenzione Industriale Roma, 28/12/2009 numero domanda: RM2009A000685), con l'approvazione della Commissione ad hoc istituita dall'Ufficio Brevetti dell'Università degli Studi di Roma "Sapienza" con decreto del Magnifico Rettore, e quindi la

pubblicazione del terzo lavoro. Abbiamo scoperto, infatti, che il BP ha grande potere adesivo, dimostrando proprio l'ipotesi di partenza: cercare un'alternativa agli attuali metodi di fissaggio chirurgico. Abbiamo quindi proceduto ad impiantare il BP su coniglio, presso lo stabulario dell'Istituto Superiore di Sanità (ISS), ed abbiamo quindi studiato in laboratorio, presso l'Istituto di Chimica dell'Università "Sapienza" di Roma QUANTO il BP realmente aderisca ai tessuti viventi. L'abbiamo anche confrontato con il migliore prodotto attualmente in uso, con le stesse indicazioni, ottenendo risultati, direi, sorprendenti. Abbiamo quindi completato il progetto iniziale rispondendo alle tre fatidiche domande:

- qual è il problema (vogliamo tessuti protesici più performanti)
- perché si pone (perché la gente si lamenta delle protesi impiantate)
- COME SI RISOLVE (studiando, come abbiamo fatto, altri materiali per verificare se è possibile realizzare un materiale migliore dell'esistente).

### **3.5- Durata**

La durata dei vari esperimenti è stata di 4-5 settimane ognuna in modo da poter studiare anatomico-patologicamente tutto il processo di cicatrizzazione e le reazioni dei tessuti viventi nel corso del tempo, alla presenza dei corpi estranei, valutando anche il comportamento metabolico dell'organismo, trattato con i vari materiali in studio, sia con indagini ematochimiche realizzate da un laboratorio analisi veterinarie, sia con esami per la valutazione della reattività del sistema immunitario a seguito dell'impianto.

### **3.6- Numero dei soggetti partecipanti ad ogni studio**

Ogni sperimentazione ha interessato gruppi da 25 soggetti. Nel primo esperimento abbiamo trattato topi da laboratorio Swiss CD1, maschi del peso di 27-32g, nel secondo abbiamo utilizzato ratti "Sprague Dawley", maschi del peso di 200g, nel quarto esperimento abbiamo utilizzato ratti

“Sprague Dawley”, maschi con pesi a partire da 300 g, nel quinto esperimento abbiamo iniziato a lavorare su animali di taglia maggiore: il coniglio adulto, femmina, New Zealand SPF (specific pathogen free) a partire da 3020 g di peso corporeo.

### **3.7- Protocollo**

La programmazione della ricerca è stata dettagliata: criteri di inclusione nello studio; metodi di raccolta ed analisi dei dati; tecniche di indagine utilizzate (esami di laboratorio, esami strumentali, ecc.); durata dello studio; stima del costo e così via; questi dettagli sono stati pre-concordati con tutti i Professionisti coinvolti, con un documento formale in cui si specifica il fine della ricerca, la sua attuazione, i motivi per cui è stata proposta ed il metodo di studio. Il protocollo è stato frutto di numerose rielaborazioni da parte dei componenti del gruppo di ricerca. I principi sono organizzati nella stesura del protocollo: le premesse sono descritte in modo sintetico e condivise dai partecipanti, le varie sezioni sono state compilate in maniera esauriente, è stata raccolta e studiata la bibliografia più recente, appropriata e completa.

## **4 DISEGNO DELLO STUDIO**

Abbiamo descritto, in ogni esperimento, il metodo usato, gli obiettivi, i materiali utilizzati, i risultati, la discussione dei risultati e le conclusioni. Dal punto di vista metodologico è ben chiara la suddivisione in studi di fase I, II, e III, sempre consequenziali. Per ora siamo alla fase II, avendo valutato *l'attività* (capacità del BP di indurre le modificazioni attraverso le quali si presume produca benefici), mentre nella fase III si misurerà *l'efficacia* (cioè la capacità del trattamento di indurre i benefici per ottenere i quali verrà applicato in soggetti di maggiore taglia e contestualmente, con altri esperimenti di biologia molecolare, avremo ben compreso il meccanismo intimo di funzionamento.

Cronoprogramma

I Ciclo

| 4.07.08        | 7.07.08   | 8.07.08   | 10.07.08 | 11.07.08    | 15.07.08          | 18.07.08       | 22.07.08          | 25/07/2008     | 1.08.08           | 05/08/08       | 5.08.08           | 8.08.08        | 12.08.08          | 15.08.08       |
|----------------|-----------|-----------|----------|-------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|-------------------|----------------|
| arrivo<br>topi | preli+int | preli+int | prelievo | preli+int   | preli+prel<br>org | preli+prel org |
| TOPO 1         | G0BPT1    |           |          |             | G7BPT1            |                |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 2         | G0BPT2    |           |          |             | G7BPT2            |                |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 3         | G0BPT3    |           |          |             | G7BPT3            |                |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 4         | G0BPT4    |           |          |             | G7BPT4            |                |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 5         | G0BPT5    |           |          |             | G7BPT5            |                |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 6         | G0BPT6    |           |          |             |                   |                | G14BPT6           |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 7         | G0BPT7    |           |          |             |                   |                | G14BPT7           |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 8         | G0BPT8    |           |          |             |                   |                |                   | G21BPT8        |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 9         |           | G0BPT9    |          |             |                   |                |                   | G21BPT9        |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 10        |           | G0BPT10   |          |             |                   |                |                   | G21BPT10       |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 11        |           | G0BPT11   |          |             |                   |                |                   |                |                   | G28BPT11       |                   |                |                   |                |
| TOPO 12        |           | G0BPT12   |          |             |                   |                |                   |                |                   | G28BPT12       |                   |                |                   |                |
| TOPO 13        |           | G0BPT13   |          |             |                   |                |                   |                |                   | G28BPT13       |                   |                |                   |                |
| TOPO 14        |           | G0BPT14   |          |             |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                | G35BPT14          |                |
| TOPO 15        |           | G0BPT15   |          |             |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                | G35BPT15          |                |
| TOPO 16        |           | G0BPT16   |          |             |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                | G35BPT16          |                |
| TOPO 17        |           |           | X        |             |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 18        |           |           | X        |             |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 19        |           |           | X        |             |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 20        |           |           | X        |             |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 21        |           |           | X deced  |             |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 22        |           |           |          | G0prolenT22 |                   | G7prolenT22    |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 23        |           |           |          | G0prolenT23 |                   |                |                   | G14prolenT23   |                   |                |                   |                |                   |                |
| TOPO 24        |           |           |          | G0prolenT24 |                   |                |                   |                |                   | G21prolenT24   |                   |                |                   |                |
| TOPO 25        |           |           |          | G0prolenT25 |                   |                |                   |                |                   |                |                   | G28prolenT25   |                   |                |
| TOPO 26        |           |           |          | G0prolenT26 |                   |                |                   |                |                   |                |                   |                |                   | G35prolenT26   |

| pesi        |           |           |                   |                                      |                       |                       |                       |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
|-------------|-----------|-----------|-------------------|--------------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------|---------------|
| Giovedì     | Giovedì   |           |                   | Giovedì                              |                       |                       | Giovedì               |                        |                        | Giovedì                |                        |                        | Giovedì                |           |               |
| 25/06/2009  | 9.07.09   |           |                   | 16.07.09                             |                       |                       | 23.07.09              |                        |                        | 30.07.09               |                        |                        | 06.08.09               |           |               |
| arrivo topi | peso      |           |                   | peso                                 |                       |                       | peso                  |                        |                        | peso                   |                        |                        | peso                   |           |               |
|             | proleneBP | VicrylCNT | parieteneProg     | proleneBP                            | VicrylCNT             | parieteneProg         | proleneBP             | VicrylCNT              | parieteneProg          | proleneBP              | VicrylCNT              | parieteneProg          | proleneBP              | VicrylCNT | parieteneProg |
| TOPO 1      | 315       |           |                   | 348                                  | soppresso 16.07.09 G7 |                       |                       |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 2      | 314       |           |                   | 347                                  | soppresso 16.07.09 G7 |                       |                       |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 3      | 300       |           |                   | 334                                  |                       |                       | 353                   | soppresso 23.07.09 G14 |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 4      | 307       |           |                   | 352                                  |                       |                       | 360                   | soppresso 23.07.09 G14 |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 5      | 312       |           |                   | 348                                  | soppresso 16.07.09 G7 |                       |                       |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 6      | 307       |           |                   | 349                                  |                       |                       | 358                   |                        |                        | 379                    |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 7      | 298       |           |                   | 335                                  |                       |                       | 349                   |                        |                        | 367                    |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 8      | 316       |           |                   | 360                                  |                       |                       | 376                   |                        |                        | 394                    | soppresso 30.07.09 G21 |                        |                        |           |               |
| TOPO 9      | 317       |           |                   | 362                                  |                       |                       | 372                   |                        |                        | 391                    | soppresso 30.07.09 G21 |                        |                        |           |               |
| TOPO 10     |           | 318       |                   |                                      | 366                   |                       |                       | 382                    |                        |                        | 401                    | soppresso 30.07.09 G21 |                        |           |               |
| TOPO 11     |           | 305       |                   |                                      | 361                   |                       |                       | 354                    | soppresso 23.07.09 G14 |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 12     |           | 313       |                   |                                      | 360                   | soppresso 16.07.09 G7 |                       |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 13     |           | 316       | deceduto 09.07.09 |                                      |                       |                       |                       |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 14     |           | 313       |                   |                                      | 352                   |                       |                       | 367                    |                        |                        | 379                    |                        |                        |           |               |
| TOPO 15     |           | 330       | deceduto 09.07.09 |                                      |                       |                       |                       |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 16     |           | 300       |                   |                                      | 333                   | soppresso 16.07.09 G7 |                       |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 17     |           | 307       |                   |                                      | 346                   |                       |                       | 371                    | soppresso 23.07.09 G14 |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 18     |           | 306       |                   |                                      | 342                   | soppresso 16.07.09 G7 |                       |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 19     |           |           | 310               |                                      |                       | 355                   | soppresso 16.07.09 G7 |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 20     |           |           | 326               |                                      |                       | 372                   | soppresso 16.07.09 G7 |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 21     |           |           | 305               |                                      |                       | 347                   |                       |                        | 363                    | soppresso 23.07.09 G14 |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 22     |           |           | 307               |                                      |                       | 353                   |                       |                        | 378                    | soppresso 23.07.09 G14 |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 23     |           |           | 309               |                                      |                       | 346                   |                       |                        | 365                    |                        |                        | 371                    | soppresso 30.07.09 G21 |           |               |
| TOPO 24     |           |           | 300               | deceduto 10.07.09 G0 manca istologia |                       |                       |                       |                        |                        |                        |                        |                        |                        |           |               |
| TOPO 25     |           |           | 318               |                                      |                       | 346                   |                       |                        | 362                    |                        |                        | 383                    | soppresso 30.07.09 G21 |           |               |
| TOPO 26     |           |           | 310               |                                      |                       | 341                   |                       |                        | 363                    |                        |                        | 370                    |                        |           |               |

## Cronoprogramma giugno 2009

| Cronoprogramma giugno 2009 |                |               |            |   |               |           |           |               |           |            |               |            |           |               |  |
|----------------------------|----------------|---------------|------------|---|---------------|-----------|-----------|---------------|-----------|------------|---------------|------------|-----------|---------------|--|
| Giovedì                    | G0             |               |            | G7  |               |           | G14       |               |           | G21        |               |            | G28       |               |  |
| 25/06/2009                 | 9.07.09        |               |            | 16.07.09                                  |               |           | 23.07.09  |               |           | 30/07/2009 |               |            | 06.08.09  |               |  |
| arrivo topi                | prelievo       |               |            | prelievo                                  |               |           | prelievo  |               |           | prelievo   |               |            | prelievo  |               |  |
|                            | striscio       |               |            | striscio                                  |               |           | striscio  |               |           | striscio   |               |            | striscio  |               |  |
| peso                       | peso           |               |            | peso                                      |               |           | peso      |               |           | peso       |               |            | peso      |               |  |
|                            | proleneBP      | parieteneProg | VicrylCNT  | proleneBP                                 | parieteneProg | VicrylCNT | proleneBP | parieteneProg | VicrylCNT | proleneBP  | parieteneProg | VicrylCNT  | proleneBP | parieteneProg | VicrylCNT                              |
| TOPO 1                     | proleneBP      |               |            | proleneBP                                 |               |           |           |               |           |            |               |            |           |               | soppresso 16.07.09 G7                  |
| TOPO 2                     | proleneBP      |               |            | proleneBP                                 |               |           |           |               |           |            |               |            |           |               | soppresso 16.07.09 G7                  |
| TOPO 3                     | proleneBP      |               |            |   |               |           | proleneBP |               |           |            |               |            |           |               | soppresso 23.07.09 G14                 |
| TOPO 4                     | proleneBP      |               |            |   |               |           | proleneBP |               |           |            |               |            |           |               | soppresso 23.07.09 G14                 |
| TOPO 5                     | proleneBP      |               |            | † 17.7.09                                 |               |           |           |               |           | proleneBP  |               |            |           |               | deceduto il 16.07.09                   |
| TOPO 6                     | proleneBP      |               |            |   |               |           |           |               |           | proleneBP  |               |            |           |               | 06-ago                                 |
| TOPO 7                     | proleneBP      |               |            |   |               |           |           |               |           |            |               |            | proleneBP |               | 06-ago                                 |
| TOPO 8                     | proleneBP      |               |            |   |               |           |           |               |           |            |               |            | proleneBP |               | soppresso 30.07.09 G21                 |
| TOPO 9                     | proleneBP      |               |            |   |               |           |           |               |           |            |               |            | proleneBP |               | soppresso 30.07.09 G21                 |
| TOPO 10                    |                | VicrCNT       |            |   |               |           |           | VicrCNT       |           |            |               |            |           |               | soppresso 30.07.09 G21                 |
| TOPO 11                    |                | VicrCNT       |            | ascesso sulla sede di impianto il 17.7.09 |               |           |           | VicrCNT       |           |            |               |            |           |               | soppresso 23.07.09 G14                 |
| TOPO 12                    |                | VicrCNT       |            |   | VicrCNT       |           |           |               |           |            |               |            |           |               | soppresso 16.07.09 G7                  |
| TOPO 13                    |                | VicrCNT       | †          |   |               |           |           |               |           |            |               |            |           |               | deceduto il 09.7.09 manca istologia    |
| TOPO 14                    |                | VicrCNT       |            |   |               |           |           |               |           |            | VicrCNT       |            |           |               | 06-ago                                 |
| TOPO 15                    | † 9.7.09 emorr |               |            |   |               |           |           |               |           |            |               |            |           |               | deced 09.07.09 x emorragia da prelievo |
| TOPO 16                    |                | VicrCNT       |            |   | VicrCNT       |           |           |               |           |            |               |            | VicrCNT   |               | soppresso 16.07.09 G7                  |
| TOPO 17                    |                | VicrCNT       |            |   |               |           |           |               |           |            |               |            | VicrCNT   |               | soppresso 23.07.09 G14                 |
| TOPO 18                    |                | VicrCNT       |            | † 16.07.09                                |               |           |           |               |           |            |               |            |           |               | soppresso 16.07.09 G7                  |
| TOPO 19                    |                |               | parietProg |   |               |           |           | parietProg    |           |            |               |            |           |               | soppresso 16.07.09 G7                  |
| TOPO 20                    |                |               | parietProg |   |               |           |           | parietProg    |           |            |               |            |           |               | soppresso 16.07.09 G7                  |
| TOPO 21                    |                |               | parietProg |   |               |           |           |               |           | parietProg |               |            |           |               | soppresso 23.07.09 G14                 |
| TOPO 22                    |                |               | parietProg |   |               |           |           |               |           | parietProg |               |            |           |               | soppresso 23.07.09 G14                 |
| TOPO 23                    |                |               | parietProg |   |               |           |           |               |           |            |               | parietProg |           |               | soppresso 30.07.09 G21                 |
| TOPO 24                    |                |               | parietProg | † 10.07.09                                |               |           |           |               |           |            |               |            |           |               | deceduto il 10.07.09 manca istologia   |
| TOPO 25                    |                |               | parietProg |   |               |           |           |               |           |            |               |            |           | parietProg    | soppresso 30.07.09 G21                 |
| TOPO 26                    |                |               | parietProg |   |               |           |           |               |           |            |               |            |           | parietProg    | 06-ago                                 |

# 5 MATERIALI E METODI

## 5.1- Materiali e metodi PRIMO esperimento

I MWCNT possono essere facilmente funzionalizzati per mezzo di gruppi chimici allo scopo di renderli carriers efficienti per gruppi chimici e per la somministrazione di farmaci [1–8]. Dai risultati preliminari sulla struttura fisica e chimica dei MWCNT [9–14], abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla scelta della migliore tecnica per la sterilizzazione dei MWCNT al fine di somministrare in vivo e in vitro materiali che non provocano confondimenti biologici rispetto ai fenomeni studiati. Abbiamo cercato di determinare la migliore tecnica in grado di ottenere la sterilizzazione senza modificazione strutturale e delle proprietà, riguardo alla riduzione dell'effetto bias [15–17–31–32] in ambito biologico e pubblicato i risultati.

*Figura 1 Rappresentazione ideale di un nanotubo di carbonio a parete singola (SWCNT) formato da un foglio di grafene arrotolato. Si osservano delle impurità metalliche dentro e nella struttura reticolare esagonale provocando puntiformi interruzioni del reticolo.*

Abbiamo realizzato la procedura di sterilizzazione versando della polvere di MWCNT in piccole buste di polietilene e quindi introducendo una bustina, insieme all'indicatore chimico di

sterilizzazione, in un'altra busta leggermente più grande e sigillata. Le buste sono state quindi sottoposte alla procedura di sterilizzazione in autoclave a 270°F (132° C) per 21 minuti sotto vuoto. Questo metodo controlla la temperatura più alta raggiunta e la durata del processo a tale temperatura. Inoltre l'indicatore chimico documenta l'avvenuta sterilizzazione segnalando l'eventuale non raggiungimento dell'obiettivo prefissato. Almeno una volta a settimana viene verificato il processo di sterilizzazione a vapore, posizionando nella camera di sterilizzazione provette con *Bacillus stearothermophilus* (microorganismo con spore particolarmente resistenti al calore, così da assicurare un ampio margine di sicurezza al processo di sterilizzazione). Se la sterilizzatrice lavora appropriatamente le spore, sono normalmente distrutte e non si sviluppano in coltura. Abbiamo ripetuto e verificato gli esperimenti degli studi preliminari su cloni cellulari [18–31–32], ed abbiamo realizzato esperimenti su nuove linee cellulari. Abbiamo quindi esteso la nostra esperienza anche in vivo utilizzando topi da laboratorio. Abbiamo sperimentato l'effetto di MWCNT in un gruppo di animali, con la somministrazione per via intraperitoneale unica e ripetendo la stessa somministrazione tutti i 7 giorni successivi. Abbiamo provato gli effetti dell'impianto dei MWCNT e determinato la tossicità, la sopravvivenza e le modificazioni del sistema immunitario. Infine abbiamo studiato l'effetto anatomico-patologico sui 2 gruppi A e B per capire se i MWCNT sono innocui o dannosi, se inoculati in un organismo vivente, oppure, come agente inquinante atmosferico [19–31–32], o un possibile veicolo di applicazione terapeutiche nel prossimo futuro. Si noti che i MWCNT che anche il nostro gruppo ha recentemente studiato, sono in grado di attraversare la barriera epiteliale dell'albero respiratorio [20].

### 5.1.1 Test in vitro

I MWCNT sono stati disciolti in acqua bidistillata e dispersi con centrifugazione e sonicazione per 15 minuti al fine di omogeneizzare la sospensione con la quale abbiamo saggiato le culture cellulari.

### 5.1.2 Coltura cellulare

Le cellule dell'adenocarcinoma coloretale umano Caco-2 e le cellule del cancro della mammella umana MCF-7 sono state ottenute dall'European Collection of Cell Cultures (ECACC). Inizialmente le cellule di muscolo liscio dell'arteria tiroidea (hSMC) sono state isolate mediante digestione con collagenasi tipo II e moltiplicate con passaggio da 4 a 8. Le cellule di muscolo liscio di arteria tiroidea umana hSMC, sono state identificate positivamente (>95%) con un anticorpo monoclonale muscolo specifico alpha-actina. Tutte le cellule, sono state seminate in contenitori da 25 cm<sup>2</sup> (Falcon; Becton Dickinson Laboratoryware; Franklin Lakes NJ, USA). Il mezzo di crescita è stato il Dulbecco modificato Eagle (DMEM) supplementato con 10% con siero di feto di vitello (FCS) e antibiotici (Penicillina 100 IU/ml, Streptomicina 100 µg ml<sup>-1</sup>, Gentamicina 200 µg ml<sup>-1</sup>) (soluzione standard). La coltura è stata mantenuta a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> in aria. Il mezzo di coltura è stato sostituito ogni terzo giorno. Le cellule sono state coltivate dopo trasferimento, previa rimozione con tripsina allo 0.05% e – EDTA 0.01%. La vitalità cellulare è stata valutata con il colorante Dye, metodo di esclusione Trypan Blue (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA).

### 5.1.3 Studio della proliferazione cellulare

Le cellule Caco-2, MCF- 7 e hSMC sono state seminate in 6 contenitori (Falcon, Becton Dickinson Laboratory ware) alla concentrazione di 1×10<sup>5</sup> cellule per contenitore in mezzo standard. Il giorno successivo le cellule sono state riseminate in mezzo standard contenente MWCNT alle concentrazioni comprese tra 0.001 fino a 0.1 mgml<sup>-1</sup>. I dischi sono stati incubati per 24 ore e 72 ore a 37°C in atmosfera al 5% CO<sub>2</sub>. Le cellule sono state quindi staccate dai fondi dei dischi, per tripsinizzazione e centrifugazione e quindi reinsemensate in PBS. La conta cellulare è stata eseguita con un analizzatore Beckman Coulter, Inc, e con una camera Thoma haemocytometer. Le colture sono state replicate due volte ognuna e ogni esperimento è stato ripetuto per tre volte.

#### 5.1.4 Analisi statistica

I dati sono espressi come deviazione standard (SD). I dati sono stati analizzati con *analysis of variance* (ANOVA) seguiti dal test di Bonferroni. Le differenze sono state considerate significative ad un livello di  $p < 0.05$ . Le analisi statistiche sono state eseguite usando il GraphPad InStat software (GraphPad Software, Inc; San Diego, CA, USA).

#### 5.1.5 Effetti Generali in vivo

Nell'esperimento in vivo, abbiamo utilizzato topi Swiss CD1 maschi del peso di 27-32g, acquistati dalla ditta Charles River (Calco-Lecco, Italy). Al fine di testare una soluzione stabile, abbiamo provato a disciogliere i MWCNT in vari veicoli. I MWCNT sono risultati insolubili in soluzione salina, anche dopo sonicazione per 90 minuti mentre sono solubili in acqua bidistillata formando una sospensione omogenea di MWCNT che è stata utilizzata per una prova in coltura cellulare (vedi il test *in vivo* 0 più sotto). Ciò probabilmente è dovuto al maggiore volume di soluzione necessario per il *test in vivo*, dove i MWCNT hanno una maggiore tendenza ad aggregarsi. La sospensione in metilcellulosa (MTC 0.5%) mostra una precipitazione di nanoparticelle. Infine abbiamo ottenuto una sospensione stabile utilizzando una miscela di Tween 80 (al 5%), PEG 400 (al 5%) and metilcellulosa (MTC 0.5%). I nanotubi sono stati dissolti in un volume di veicolo in modo tale da somministrare 1 ml di sospensione per 100g di peso corporeo per via parenterale per es.  $10 \text{ ml/kg}^{-1}$  di peso corporeo. Gli animali di controllo sono stati trattati solo con solvente. I MWCNT sono stati somministrati per via intraperitoneale alla concentrazione di 10, 20, 40  $\text{mg/kg}^{-1}$  di peso corporeo in gruppi di animali composti da 3-5 elementi. Dopo l'inoculazione di MWCNT gli animali sono stati esaminati con il test di Irwin [21]. Il test di Irwin si usa negli screening farmacologici per verificare gli effetti indotti dai nuovi farmaci. Dopo il trattamento, gli animali sono stati stabulati in una gabbia per 20 minuti ed osservati alla ricerca di ogni modificazione comportamentale. Gli animali, subito dopo, sono stati trasferiti sul tavolo, osservati e valutati per la ricerca di segni di patologia

emergente: tremori, convulsioni, pallore, cianosi, scosse oppure alterazioni delle funzioni fisiologiche (modificazioni del diametro pupillare, del tono muscolare, riflesso di raddrizzamento del dorso (opistotono). L'osservazione degli animali è susseguita per le successive 4h per controllare la mortalità immediata e, quindi, stabulati e monitorizzati per ulteriori 7 giorni per studiare gli effetti della tossicità ritardata. Dopo 7 giorni gli animali sono stati pesati e sacrificati in camera satura con CO<sub>2</sub> ed è stato eseguito l'esame necroscopico. Sono stati eseguiti campionature di tutti i visceri e parenchimi al fine di eseguire un esame istopatologico completo. Il trattamento degli animali è stato conforme ai principi della cura degli animali da laboratorio formulate dalla National Society for Medical Research and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (US Department of Health and Human Sciences, National Institute of Health, publication no. 80, 23 revised 1985).

#### 5.1.6 Test di somministrazione ripetuto

Al fine di evidenziare gli effetti dei MWCNT dopo somministrazione ripetuta un gruppo di 4 topi è stato sottoposto a infusione intraperitoneale giornaliera per 7 giorni con la dose di 5mg/kg<sup>-1</sup> in sospensione con Tween 80 al 2,5% e metilcellulosa (MTC) 0,5%. Il giorno dopo l'ultima somministrazione, gli animali sono stati pesati e sacrificati in camera saturata con CO<sub>2</sub>, è stato eseguito l'esame microscopico e la campionatura da tutti i visceri per l'esame istopatologico.

#### 5.1.7 MWCNT test di impianto

Al fine di valutare l'effetto dell'impianto di MWCNT abbiamo operato utilizzando due ratti Sprague Dawley da 300g, abbiamo eseguito un'anestesia generale con sodium pentobarbital in soluzione salina alla dose di 53 mg/kg<sup>-1</sup> per via intraperitoneale (i.p.) al volume di 1 ml/kg<sup>-1</sup> di peso corporeo. Nel *primo esperimento* è stata eseguita la tricotomia, la disinfezione cutanea ed una incisione trasversale sul dorso approfondita fino agli strati muscolari dopo aver inciso anche la fascia dorsale. E' stata quindi realizzata per via smussa una tasca tra fascia e muscolo lombare senza sanguinamento e sono stati introdotti 20 mg di MWCNT. La ferita è stata suturata in doppio strato

di cui quello profondo con punti riassorbibili, lo strato superficiale a punti staccati in seta. Il *secondo esperimento* è stato eseguito con la stessa tecnica, ma sono stati impiantati soltanto 5 mg di MWCNT.

### 5.1.8 Assetto immunologico

I topi da laboratorio sono animali geneticamente identici. Essi hanno identico assetto genetico e quindi reagiscono allo stesso stimolo nella stessa maniera. A causa della piccola taglia dei soggetti, il sangue deve essere prelevato per puntura della cavità cardiaca, e in ogni caso, la quantità prelevabile è insufficiente per l'esecuzione degli esami ematochimici. E' possibile però ovviare a questo problema mescolando il sangue dei soggetti dello stesso gruppo. Il gruppo A (trattati) è stato inoculato con MWCNT e solvente mentre il gruppo B (controlli) solo con il solvente. Entrambi i gruppi sono stati trattati alla concentrazione di 10 mg/pro Kg di peso corporeo. Abbiamo testato gli anticorpi ANA (anti-nuclear antibody), AMA (anti-mitochondrial antibody), ASMA (antismooth muscle antibody), ANTIRET (anti-reticolin antibody), APG (anti-gastric wall antibody), ENA (extractable antinuclear antigen), e NDNA (native deoxyribonucleic acid).

### 5.1.9 Esame istologico

Il nostro primo esperimento ha utilizzato 24 topi e 2 ratti. Abbiamo fissato i prelievi di tessuto in Formalina al 4% tampone fosfato, a pH 7.6, ed inclusi in paraffina e preparati a strati di 3  $\mu$ m di spessore. Le sezioni sono state colorate con Eosina-Ematossilina.

## 5.2- Materiali e metodi test in vitro SECONDO esperimento.

### 5.2.1 Introduzione.

Negli ultimi anni, sono stati pubblicati vari studi sulle potenziali applicazioni dei CNT in campo biomedico, come sensori, sonde, nella spettroscopia, nella diagnostica per immagini, nello studio delle cellule tumorali, come veicolanti per il rilascio controllato di farmaci, materiali impiantabili e strumentazione, attuatori [1], mezzi di contrasto per Risonanza Magnetica [31–38]. L'ostacolo principale è rappresentato dalla potenziale citotossicità. Altri studi hanno proposto il possibile impiego del BP per l'incapsulamento di isole pancreatiche di cellule di Langerhans per il trattamento del diabete mellito, incapsulamento di cellule modificate dalla terapia genica, presidi impiantabili per la modulazione del sistema immunitario o somministrazione di farmaci oppure ormoni.[4–24]. I materiali compositi mostrano di possedere proprietà quali conduttività, capacità elettrochimica, e proprietà meccaniche utilizzabili, ad esempio elettrodi impiantabili come sensori e come stimolatori, come ad esempio quelli degli elettrocardiografi [5] e per gli elettrostimolatori cardiaci. In ambito chirurgico, per quanto riguarda la chirurgia dell'ernia inguinale e della riparazione delle ernie incisionali e laparoceli, nuove ricerche stanno esplorando la possibilità di evitare e prevenire le complicanze associate alla sutura della rete ai piani muscolari sottostanti, [6–9], come ad esempio il tasso di recidive [10], il dolore cronico da intrappolamento di terminazioni nervose nelle suture [11] e la possibile trasmissione di malattie infettive, ancora sconosciute e quindi non diagnosticabili, dagli emocomponenti impiegati per il confezionamento delle colle chirurgiche a base di fibrina. Infatti, per ovviare alla neuropatia cronica da punti di sutura, i collanti biologici, recentemente introdotti nell'uso chirurgico, vengono sempre più impiegati e anche per quanto ci riguarda personalmente. Infatti, nell'attività professionale utilizziamo correntemente, con ottimo risultato, il Tissucol® Baxter Healthcare, Deezfield, Illinois. Il Buckypaper (BP) di Nanotubi di Carbonio Multiparete (Multi-Walled Carbon Nanotubes-MWCNT), ottenuto da NanoLab Inc, 55

Chapel Street, Newton, MA 02458 USA, è lo strumento più recentemente emerso alla ribalta delle conoscenze scientifiche, che il nostro gruppo di ricerca ha scoperto essere utilizzabile per fissare qualunque tipo di materiale protesico, già in commercio, ma anche per confezionare una nuova generazione di tessuti protesici, sia in associazione ai materiali già noti, sia tal quale come nuovo tessuto protesico, in grado di mantenere le stesse caratteristiche dei materiali noti ma in grado di evitare la neuropatia cronica e il possibile rischio connesso agli emoderivati contenuti nelle colle di fibrina. Inoltre il BP è sottilissimo e leggerissimo. Caratteristiche, in ambito chirurgico, favorevoli. Il BP è un nanoderivato a base di carbonio con caratteristiche chimico-fisiche e meccaniche note (flessibilità, ultra leggerezza, stabilità termica e chimica), possiede anche caratteristiche di semiconduttore per il trasporto di elettroni. Inoltre il BP ha due superfici con caratteristiche completamente diverse, di cui abbiamo scoperto, le proprietà con le nostre ricerche. Le tabelle 1 e 2 sintetizzano le caratteristiche fisiche, chimiche e meccaniche del BP. NanoLab costruisce fogli semirigidi di BP a partire da nanotubi di carbonio di vari formati e spessori preparati in relazione alle necessità di ricerca. Il BP è costituito dal 95% di BPD15L520, nanotubi di carbonio (CNT) fabbricati dalla stessa Impresa, ma può essere preparato anche con altro tipo di nanotubi, se necessario. I CNT sono sospesi in una soluzione surfactante non-ionica, come il Triton X-100 e Sodium lauryl solfato, che migliora la loro dispersione in soluzione acquosa. Questa sospensione può quindi essere posta in un contenitore a doppia camera e fatta filtrare su una membrana, sotto pressione positiva dal lato superiore e negativa sull'altro lato in modo da accelerare il transito del solvente dalla camera superiore alla camera inferiore, depositando i CNT sul filtro per rendere uniforme il film di CNT disteso sul filtro [19,20,21]. Dopo asciugatura, il film BP è rimosso dal supporto rimanendo consistente e semiflessibile, della consistenza e lavorabilità del cartoncino. La flessibilità e le caratteristiche di flusso sono ~50% della densità. I tests eseguiti dal gruppo di lavoro di Whitby, per NanoLab (il produttore) [22]

*Fig. 2: aspetto della superficie liscia-brillante-lucente del BP prima dell'impianto in ratto Sprague-Dawley maschio, da 340 gr in tasca sottofasciale.*

Gli studi dimostrano che il BP standard non permette il passaggio di particelle collidali con volume superiore a 50 nm. Le caratteristiche elettriche e la resistenza del BP sono stati misurati applicando elettrodi d'oro su una striscia di BP delle dimensioni di 3.3 mm di larghezza, 0.13 mm di spessore. Tra i due elettrodi distanti 7.8 mm, è stata misurata una resistenza di ~18 Ohm. La resistenza del BP è ~ 0.1 Ohm/cm<sup>-1</sup>. Importanti caratteristiche meccaniche del BP sono la lavorabilità con forbici, come il foglio di carta e la discreta flessibilità.

*Fig. 3: aspetto della superficie ruvida e opaca del BP.*

I CNT puri al 95.93 % del peso, all'analisi elementare mostrano la presenza di 1.65 % del peso in impurità metalliche costituite da Ferro e altri elementi sono presenti in tracce in quantità minore all'1% del peso. Abbiamo studiato BP con le caratteristiche di fabbricazione indicate al fine di ridurre, per quanto possibile, l'effetto bias (confondimento da parte di fattori di errore) sulla sperimentazione in vivo.

*Fig. 4 aspetto della rete tridimensionale costituita da MWCNT osservati con Microscopio elettronico a scansione (Scansion Electron Microscope -SEM) 30kV x30.00µm*

*Fig. 5: aspetto della superficie ruvida-opaca del BP prima dell'impianto in ratto Sprague-Dawley maschio, da 340 gr in tasca sottofasciale. Il BP è costituito da una rete tridimensionale di MWCNT fotografata con Microscopio elettronico a scansione (Scansion Electron Microscope -SEM) 10kV x30.00µm*

*Fig. 6: aspetto di una rete tridimensionale di MWCNT osservata della superficie liscia-lucente del BP, fotografata con Microscopio elettronico a scansione (Scansion Electron Microscope -SEM) 10kV x30.00µm*

*Fig. 7: aspetto della superficie ruvida-opaca del BP osservata al SEM*

### 5.2.2 Colture cellulari

Il carcinoma umano coloretale Caco-2, l'adenocarcinoma mammario MCF-7 e la leucemia a cellule HL-60 sono state ottenute dalla European Collection of Cell Cultures (ECACC). Cellule HA-SMC sono state isolate dall'arteria tiroidea umana e separate con trattamento con collagenasi tipo II ed utilizzate per il passaggio da 4 a 8, identificate (>95%) con anticorpo muscolo specifico per la alfa -actina e separate. I fibroblasti nativi da tessuto connettivo umano HF sono stati isolati dal derma fisiologico di un Paziente (operato di plastica per ernia inguinale) e trattato con collagenasi tipo II. Le linee Caco-2, MCF-7, HA-SMC, e HF, sono state seminate in capsule da 25-cm<sup>2</sup> (Falcon; Becton Dickinson Labware; Franklin Lakes NJ, USA) in mezzo di coltura Dulbecco modificato Eagle (DMEM) supplementato con Fetal Calf Serum (FCS) al 10% ed antibiotici (Penicillina 100 IU/ml, Streptomicina 100 µg/ml, Gentamicina 200 µg/ml). Le cellule della leucemia umana HL-60 sono state seminate in capsule di Petri da 25 cm<sup>2</sup> (Falcon) in mezzo di coltura RPMI 1640 supplementato con Fetal Calf Serum (FCS) al 10% ed antibiotici (Penicillina 100 IU/ml, Streptomicina 100 µg/ml, Gentamicina 200 µg/ml). Le colture sono state termostatate a 37°C in atmosfera di aria con CO<sub>2</sub> al 5%. Il mezzo di coltura delle linee cellulari Caco-2, MCF-7, HA-SMC, e HF è stato sostituito ogni terzo giorno e le colture sono state riseminate dopo mobilizzazione delle cellule con trattamento con tripsina 0.05% trypsin e 0.01% EDTA. Le cellule HL-60 sono state mantenute ad una bassa densità (inferiore a 1 x 10<sup>6</sup> cellule/ml) ed utilizzate negli esperimenti per il passaggio da 5 a 15 per prevenire la differenziazione. La vitalità cellulare è stata verificata previa colorazione con Trypan Blue (Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA) e metodo d'esclusione.

### 5.2.3 Test sulla proliferazione cellulare

Le linee cellulari Caco-2, MCF-7, HL-60, HA-SMC e HF, sono state seminate in 12-capsule da coltura (Falcon, Becton Dickinson Labware) a concentrazioni cellulari comprese tra 2 x 10<sup>4</sup> cellule/capsula e 4 x 10<sup>4</sup> cellule/capsula, in terreno di coltura standard. Sono quindi stati aggiunti frammenti di BP (0.1 cm<sup>2</sup>) sul fondo delle capsule al tempo zero (T<sub>0</sub>) e dopo 24 ore (T<sub>24</sub>) dall'inizio dell'osservazione. Le capsule sono state incubate, per la durata di 72 ore e 120 ore a 37°C in atmosfera di aria con CO<sub>2</sub> al 5%. Le cellule sono quindi state distaccate dal fondo della capsula per tripsinizzazione (eccetto le HL-60) centrifugate, e risospese in PBS. La conta cellulare è stata eseguita con contatore Beckman Coulter, Inc., e con un emocitometro Thoma. Poiché il contatore, non è in grado di distinguere tra cellule viventi e cellule morte, abbiamo utilizzato l'emocitometro Thoma dopo colorazione vitale con Trypan Blue. Le colture sono state replicate due volte per ogni obiettivo ed ogni esperimento è stato replicato tre volte.

#### 5.2.4 Analisi statistica

I dati sono stati espressi in media  $\pm$  standard deviation (SD). I dati sono stati analizzati statisticamente con un test di Student a due code per dati non appaiati. Le differenze sono state considerate significative con un  $p < 0.05$ . L'analisi statistica è stata eseguita con il software GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc.; San Diego, CA, USA) per personal computer.

#### 5.2.5 Materiali e Metodi della sperimentazione del BP in vivo secondo esperimento.

Allo scopo di studiare gli effetti dell'impianto del BP in vivo abbiamo trattato 25 ratti maschi "Sprague Dawley" da 340 g. Ho eseguito l'anestesia generale con una soluzione di 53 mg/Kg di sodio pentobarbitale in soluzione fisiologica Q.B. infusa per via intraperitoneale (IP) in fossa iliaca sinistra al volume di 1 ml/Kg di peso corporeo. L'intervento chirurgico è iniziato entro 5 minuti dall'inizio dell'anestesia generale. L'incisione chirurgica è stata eseguita, in questa sperimentazione, sul dorso, come nella precedente sperimentazione, mentre nelle successive sarà eseguita in fossa iliaca sinistra. L'incisione ha raggiunto la fascia che è stata scollata dal muscolo grande dorsale per realizzare una tasca in modo da impiantare il materiale protesico e studiarne gli effetti, come se si trattasse di chirurgia protesica, con lo stesso metodo e le stesse accortezze e cioè: tricotomia, disinfezione cutanea, tavolo sterile, teleria sterile, strumentazione sterile, guanti sterili e materiali protesici e di sintesi sterili. Nella tasca avascolare tra fascia e muscolo è stato collocato un quadratino da 2x2 cm di BP e la ferita è stata quindi suturata in due piani di cui quello profondo, a punti staccati in materiale riassorbibile, quello superficiale a punti staccati in seta nera. Lo stesso identico intervento è stato ripetuto su tutti i soggetti, compresi i controlli, in cui è stato impiantato puro e semplice polipropilene commerciale (Surgipro\*Mesh, Autosuture, lotto A8A631), sempre delle stesse dimensioni.

## 5.3- Materiali e metodi test in vitro TERZO esperimento mutagenicità

### 5.3.1 Reagenti

Le caratteristiche dei MWCNT dalla Sigma–Aldrich, Milano, Italia sono dichiarate dal produttore ed elencate in Tab. 1: MWCNT (Aldrich 659258) composto da nanotubi MW (almeno il 90%), con residui amorfi di carbone (contaminanti metallici, soprattutto ferro, inferiori a 0.1%). I MWCNT (Aldrich 659258) si disperdono in dimethylsulphoxide (DMSO). Il mutageno 2-nitrofluorene (2NF) (CAS numero 607-57-8; purezza 98%), 2- aminoantracene (2AA) (CAS numero 613-13-8; purezza 96%), sodium azide (SA) (CAS numero 26628-22-8; purezza >99.5%), methylmethane sulfonato (MMS) (CAS numero 66-27-3; purezza 99%), acquistato da Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). SA e MMS disciolti in acqua deionizzata, mentre CNT, 2NF e 2AA disciolti in DMSO (CAS numero 67-68-5; purezza >99.5%) (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA).

### 5.3.2 Terreno di coltura

Il brodo di coltura è stato acquistato da Oxoid (Basingstoke, Hampshire, England); l'agar batteriologico e nutriente da Sigma–Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA).

### 5.3.3 S9-Sistema di Attivazione Metabolica

L'attivatore è stato preparato al momento dell'uso: tampone fosfato (0.2M) 500:1, acqua deionizzata 130:1, KCl (0.33M) 100:1, MgCl<sub>2</sub> (0.1M) 80:1, S9 frazione 100:1, glucosio-6-fosfato (0.1M), 50:1 e NADP (0.1M) 40:1. La miscela durante il test è stata mantenuta in ghiaccio. La frazione S9, soprannatante post-mitocondriale di epatociti, è stato trattato con una miscela phenobarbital/naphthoflavone (PB/NF) per indurre gli enzimi microsomiali epatici, è stata acquistata da Moltax (Molecular Toxicology, Boone, NC, USA).

Tab. 1: principali caratteristiche fisiche dei nanotubi di carbonio multiparete

| Main characteristics of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) (Aldrich 659258). |                           |
|--|---------------------------|
| Dimensions (diameter × length)   | 110–170 nm × 5–9 μm       |
| Density (g/cm <sup>3</sup> )   | 1.35                      |
| Surface area (m <sup>2</sup> /g)   | 1.3 × 10 <sup>2</sup>     |
| Preparation method   | Chemical vapor deposition |

#### 5.3.4 Ceppi Batterici

*S. typhimurium* TA 98 (hisD3052gal biochl1008rfa1001 \_uvrBpKM101), *S. typhimurium* TA 100 (hisG56galbiochl1005rfa1004 \_uvrB pKM101) e *E. coli* WP2uvrA (trpE65\_uvrA), sono gentilmente stati forniti dal Research Toxicological Centre (Pomezia, Rome, Italy). Il genotipo dei ceppi è stato confermato dalla presenza accertata di marcatori specifici. Le colture di lavoro usate ad ogni esperimento, sono state ottenute dalle colture permanenti surgelate, dopo incubazione per 16 ore a 37°C, fino a raggiungere la concentrazione approssimativa di 1×10<sup>9</sup> batteri/ml. In ogni esperimento il numero di cellule vitali è stato definito in accordo con OECD (1997).

#### 5.3.5 Test di Citotossicità e Mutagenicità

Abbiamo preliminarmente testato la solubilità dei MWCNT in modo da ottenere la massima concentrazione priva di aggregati per i test successivi. Si definisce insolubilità la formazione di aggregati della sostanza in studio alle condizioni di sperimentazione, evidenti ad occhio nudo (OECD, 1997). I MWCNT precipitano, a concentrazioni superiori a 3,50 g/ml, (corrispondenti a 9.00 g/capsula), così abbiamo scelto la massima concentrazione possibile. Partendo da 9.00 g/capsula abbiamo preparato soluzioni seriate utilizzando un fattore di diluizione di 1:2. La citotossicità è stata valutata come riduzione del numero di colonie ricombinanti al cambiamento dell'ambiente auxotrofico (ambiente di fondo), a confronto con il controllo (Maron and Ames, 1983). A tale scopo una soluzione di MWCNT (50:1) è stata aggiunta per una nottata alla coltura (100:1) ed è stata aggiunta la miscela di attivatore metabolico S9, oppure il tampone fosfato (0.1M) (500:1). La miscela è stata preincubata in termostato a 37°C per 30 min, quindi è stato aggiunto agar

(2 ml) con istidina/biotina (0,5mM) al 10% per TA 98 e TA 100, e triptofano (0.5mM) al 10% per WP2*uvrA*. Infine una minima quantità è stata versata sul piatto di coltura. Dopo incubazione a 37°C per 48 h, i piatti sono stati esaminati. Le colonie ricombinanti Istidina- o Triptofano-independenti e le cellule vitali sono state rimosse ed è stato osservato il terreno di fondo. La mutagenicità dei MWCNT è stata testata a confronto con mutageni noti (controlli positivi): 2-nitrofluorene (2NF) (2µg/piatto per TA 98 senza S9), 2- aminoantracene (2AA) (1µg/piatto per TA 98 e TA 100 e 10µg/piatto per WP2*uvrA* con S9), sodium azide (SA) (1µg/piatto per TA 100 senza S9), methylmethanesulfonate (MMS) (500µg/piatto for WP2*uvrA* without S9). In ogni esperimento abbiamo incluso anche i piatti contenenti solo solvente (controllo negativo). Una soluzione di MWCNT (50:1) con aggiunta di miscela S9 o tampone fosfato (0.1M) (500:1) è stata aggiunta ad una coltura durante tutta la notte (100:1). La miscela è stata delicatamente centrifugata in tubo sterile e quindi, a 37°C, per 30 min. Dopo tale preincubazione 2 ml di agar sono stati aggiunti, con istidina/biotina (0.5mM) al 10% per TA 98 e TA 100, e triptofano (0.5mM) al 10% per WP2*uvrA*. La soluzione è stata delicatamente centrifugata e versata su un nuovo piatto di coltura. Le capsule sono state incubate a 37°C per 72 ore e quindi, esaminate. Sono state individuate colonie histidine- o tryptophan-independenti e contate le cellule vitali. Gli esperimenti sono stati ripetuti almeno due volte ad ogni concentrazione ed ogni concentrazione almeno provata per tre volte. I dati dei due esperimenti sono stati gabelati e graficati. Una risposta positiva nel test è stata definita come l'aumento (almeno il doppio rispetto al controllo) delle colonie istidina-triptofano indipendenti rispetto ai controlli in ogni coltura (Ames et al., 1975).

Tab. 2: Colonie ricombinanti di *S. typhimurium* TA 98, *S. typhimurium* TA 100 e *E. coli*, in presenza di MWCNT

| Spontaneous revertant colonies induced by MWCNTs to <i>S. typhimurium</i> (TA 98, TA 100) and <i>E. coli</i> (WP2 <i>uvrA</i> ) with and without metabolic activation (S9) (n = 6 plates). |  |                              |                               |                               |                              |                              |
|--|--|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Concentration ( $\mu\text{g}/\text{plate}$ )   | Number of revertant colonies (mean $\pm$ S.E.) |                              |                               |                               |                              |                              |
|  | TA 98  |                              | TA 100                        |                               | WP2 <i>uvrA</i>              |                              |
|  | -S9  | +S9                          | -S9                           | +S9                           | -S9                          | +S9                          |
| 0.01   | 34.7 $\pm$ 4.8                                 | 41.0 $\pm$ 1.2               | 132.0 $\pm$ 3.2               | 129.0 $\pm$ 4.0               | 44.3 $\pm$ 0.9               | 54.3 $\pm$ 3.5               |
| 0.05   | 34.0 $\pm$ 2.8                                 | 39.3 $\pm$ 1.8               | 122.0 $\pm$ 2.3               | 129.0 $\pm$ 4.6               | 42.0 $\pm$ 2.5               | 54.0 $\pm$ 5.9               |
| 0.13   | 23.1 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup>                    | 42.3 $\pm$ 2.3               | 126.7 $\pm$ 4.1               | 126.0 $\pm$ 3.5               | 41.7 $\pm$ 3.3               | 53.7 $\pm$ 5.8               |
| 0.23   | 22.9 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>                    | 40.0 $\pm$ 1.2               | 121.3 $\pm$ 4.1               | 128.3 $\pm$ 3.5               | 34.0 $\pm$ 3.5               | 54.0 $\pm$ 4.7               |
| 0.46   | 25.4 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup>                    | 39.7 $\pm$ 1.2               | 124.2 $\pm$ 2.5               | 123.0 $\pm$ 0.6               | 37.7 $\pm$ 1.7               | 53.0 $\pm$ 6.8               |
| 1.26   | 24.9 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>                    | 37.0 $\pm$ 1.5               | 111.7 $\pm$ 5.3               | 124.0 $\pm$ 3.1               | 44.0 $\pm$ 3.5               | 52.7 $\pm$ 4.9               |
| 2.30   | 25.4 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>                    | 37.3 $\pm$ 1.2               | 112.7 $\pm$ 8.2               | 126.0 $\pm$ 2.6               | 38.0 $\pm$ 1.0               | 52.0 $\pm$ 6.4               |
| 4.60   | 22.4 $\pm$ 1.4 <sup>a</sup>                    | 37.0 $\pm$ 0.6               | 116.7 $\pm$ 5.6               | 125.3 $\pm$ 3.2               | 38.3 $\pm$ 2.2               | 51.3 $\pm$ 3.8               |
| 9.0  | 23.3 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>                    | 38.3 $\pm$ 0.3               | 103.3 $\pm$ 5.7               | 127.3 $\pm$ 1.2               | 31.3 $\pm$ 3.2               | 50.7 $\pm$ 2.6               |
| Vehicle  | 34.3 $\pm$ 1.3 <sup>a</sup>                    | 42.0 $\pm$ 0.6 <sup>a</sup>  | 125.7 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup>  | 133.0 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>  | 44.7 $\pm$ 3.9 <sup>b</sup>  | 55.0 $\pm$ 5.6 <sup>a</sup>  |
| Mutagen  | 153.1 $\pm$ 4.7 <sup>c</sup>                   | 314.3 $\pm$ 9.8 <sup>d</sup> | 900.4 $\pm$ 24.7 <sup>e</sup> | 815.0 $\pm$ 26.7 <sup>d</sup> | 382.8 $\pm$ 8.0 <sup>f</sup> | 217.8 $\pm$ 7.6 <sup>g</sup> |

All values are expressed as mean  $\pm$  S.E.

<sup>a</sup> DMSO.  
<sup>b</sup> DMSO/H<sub>2</sub>O (1:1).  
<sup>c</sup> 2-Nitrofluorene (2  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ).  
<sup>d</sup> 2-Aminoanthracene (1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ).  
<sup>e</sup> Sodium azide (1  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ).  
<sup>f</sup> Methyl methane sulfonate (500  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ).  
<sup>g</sup> 2-Aminoanthracene (10  $\mu\text{g}/\text{plate}$ ).  
<sup>\*</sup>  $P < 0.01$  vs. vehicle (ANOVA + Dunnett's multiple comparison post test).

### 5.3.6 Analisi statistica

I valori sono espressi come media  $\pm$ D.S. Per verificare la significatività di una risposta positiva l'analisi della varianze unidirezionale (Oneway ANOVA) è stata seguita dal Dunnett's multiple comparison post test. E' stato considerato significativo un  $p < 0.05$ . L'analisi statistica è stata eseguita con il "Statistical Software GraphPad Prism"<sup>TM</sup> (Versione 4.00) (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

## 5.4- Materiali e metodi test in vitro QUARTO esperimento biocompatibilita'

Per eseguire gli esperimenti di citotossicità sulla line cellulare del cancro coloretale umano (**Caco-2**), cancro della mammella umana (**MCF-7**) e della leucemia promieleocitica umana (**HL-60**), sono state utilizzate le linee cellulari ottenute dalla Collezione Europea delle Colture Cellulari (European Collection of Cell Cultures-ECACC). Insieme alle cellule di muscolatura liscia (**HA-SMC**), isolate da arteria tiroidea umana mediante digestione con collagenasi tipo II ed identificate positivamente (>95%) mediante colorazione con anticorpo monoclonale specifico per l'alfa actina muscolare. Infine, sono stati isolati dal derma di un individuo sano fibroblasti (**HF**), isolati per digestione con collagenasi tipo II. In ogni esperimento, la conta cellulare è stata eseguita con un contatore ed analizzatore di calibro (Beckman Coulter, Inc.), e mediante un emocitometro di Thoma.

### 5.4.1 Studio della proliferazione cellulare

Abbiamo studiato l'effetto del BP sulla proliferazione della linea cellulare **Caco-2** collocando frammenti di BP sul fondo delle capsule contenenti le colture cellulari al T<sub>0</sub> e al T<sub>24</sub> (*vedi* Fig. 114 A e B). Ogni punto nei grafici corrisponde al valore medio  $\pm$  la deviazione standard dei valori ottenuti in tre diversi esperimenti condotti in duplicato con \*p<0.01 caso-controllo al *t*-test di Student per dati non appaiati. Abbiamo studiato l'effetto del BP sulla proliferazione della linea cellulare **MCF-7** collocando frammenti di BP sul fondo delle capsule contenenti le colture cellulari al T<sub>0</sub> (A) e al T<sub>24</sub> (B) (*vedi* Fig. 115 A e B). Ogni punto nei grafici, corrisponde al valore medio  $\pm$  la deviazione standard dei valori ottenuti in tre diversi esperimenti, condotti in duplicato con \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001, caso-controllo al *t*-test di Student per dati non appaiati, (*vedi* Fig. 115 A e B). Abbiamo studiato l'effetto del BP sulla proliferazione della linea cellulare **HL-60** (*vedi* Fig. 116 A, B e C) collocando frammenti di BP sul fondo delle capsule contenenti le colture cellulari al T<sub>0</sub> (A) e al T<sub>24</sub> (B) (*vedi* Fig. 116 A e B). La **Fig. 116** (C) rappresenta la vitalità cellulare della linee **HL-60** dopo 120 ore di coltura in presenza di frammenti BP collocate sul fondo della coltura al T<sub>0</sub> e

al T<sub>24</sub>. Ogni punto nei grafici corrisponde al valore medio  $\pm$  la deviazione standard dei valori ottenuti in tre diversi esperimenti, condotti in duplicato con \* p<0.001; \*\*p<0.0001, caso contro controllo al *t*-test di Student per dati non appaiati, (*vedi* Fig. 116 A, B e C). Abbiamo studiato l'effetto del BP sulla proliferazione della linea cellulare umana sana **HA-SMC** (*vedi* Fig. 117 A e B), collocando frammenti di BP sul fondo delle capsule contenenti le colture cellulari al T<sub>0</sub> (A) e al T<sub>24</sub> (B). Infine la (*vedi* Fig. 118 A e B) l'effetto del BP sulla proliferazione della linea cellulare umana sana **HF**. La procedura sperimentale per i test di proliferazione cellulare e di vitalità delle colture cellulari, alla presenza di BP, preparazione dei substrati e dei terreni sono descritti nel paragrafo "Materiali e Metodi del secondo esperimento" (*vedi* 5.2)

#### 5.4.2 Materiali e metodi per la valutazione dei parametri ematochimici quarto esperimento biocompatibilità

E' stato condotto uno studio su 76 emogrammi e sieri di ratto nel periodo compreso tra il 09/07/09 ed il 07/08/09. Il CBC (Emocromo completo con formula leucocitaria) e' stato eseguito con contaglobuli a impedenza elettrica (MEK 6108 NIHON KOHDEN) e con la contestuale valutazione dello striscio ematico corrispondente ad ogni campione di sangue prelevato, vetrino colorato con metodo di Diff-Quik per la conta leucocitaria differenziale, la morfologia cellulare e la ricerca di eventuali emoparassiti. Le determinazioni chimico-cliniche sono state effettuate con un analizzatore automatico random Global 300 su campioni di siero o plasma a seconda del tipo di determinazione. Per la determinazione della sodiemia e della potassiemia e' stato usato un fotometro a fiamma digitale DIGIFLAME C.

### 5.4.3 Materiali e metodi per lo studio dei pesi corporei quarto esperimento biocompatibilita'.

Per lo studio dei pesi corporei è stata usata una Bilancia elettronica Pasquini con pesata approssimata al gr. Sono state effettuate pesate settimanali secondo il seguente schema:

*Tab. 3: Tabella dei pesi corporei dei soggetti al (G<sub>0</sub>) e dopo 7, 14, 21, 28, 35 giorni dopo l'intervento chirurgico.*

| <i>Animals body weight (g)</i> |                |                 |                 |                 |                 |                 |                |                 |                 |                 |                 |
|--------------------------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Control animals                |                |                 |                 |                 |                 | Treated animals |                |                 |                 |                 |                 |
| G <sub>0</sub>                 | G <sub>7</sub> | G <sub>14</sub> | G <sub>21</sub> | G <sub>28</sub> | G <sub>35</sub> | G <sub>0</sub>  | G <sub>7</sub> | G <sub>14</sub> | G <sub>21</sub> | G <sub>28</sub> | G <sub>35</sub> |
| 268.2                          | 347.5          |                 |                 |                 |                 | 258.5           | 331.2          |                 |                 |                 |                 |
| 265.4                          |                | 375.1           |                 |                 |                 | 263.1           | 334.7          |                 |                 |                 |                 |
| 266.6                          |                |                 | 387.7           |                 |                 | 252.4           | 322.1          |                 |                 |                 |                 |
| 260.2                          |                |                 |                 | 411.8           |                 | 270.8           | 345.2          |                 |                 |                 |                 |
| 263.1                          |                |                 |                 |                 | 410.4           | 266.9           |                | 357.3           |                 |                 |                 |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 249.7           |                | 348.0           |                 |                 |                 |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 272.1           |                | 352.1           |                 |                 |                 |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 268.6           |                |                 | 372.1           |                 |                 |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 271.7           |                |                 | 406.6           |                 |                 |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 258.7           |                |                 | 414.7           |                 |                 |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 267.8           |                |                 |                 | 398.1           |                 |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 269.9           |                |                 |                 | 422.7           |                 |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 270.1           |                |                 |                 | 402.2           |                 |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 255.1           |                |                 |                 | 406.5           |                 |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 271.0           |                |                 |                 |                 | 428.9           |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 257.3           |                |                 |                 |                 | 413.0           |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 260.8           |                |                 |                 |                 | 418.9           |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 256.0           |                |                 |                 |                 | 447.2           |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 272.2           |                |                 |                 |                 | 421.2           |
|                                |                |                 |                 |                 |                 | 273.0           |                |                 |                 |                 | 436.8           |

#### 5.4.4 Materiali e metodi analisi statistica del quarto esperimento biocompatibilità

I dati dell'analisi statistica della sperimentazione in vitro sono stati espressi come la media dei valori  $\pm$  la deviazione standard. I dati sono quindi stati esaminati con il *t*-test di Student per dati non appaiati a due code e le differenze sono state considerate significative quando con  $p < 0.05$ . L'analisi statistica è stata eseguita con GraphPad InStat software (GraphPad Software, Inc.; San Diego, CA, USA). Per valutare le variazioni dei pesi dei ratti maschi Sprague-Dawley nell'esperimento in vivo, nel corso delle cinque settimane di osservazione abbiamo utilizzato il software statistico SPSS 13.0 per Windows (Northwestern University Information Technology (NUIT) SPSS Inc., 1800 Sherman Avenue Evanston, Illinois 60201). I dati sono quindi stati analizzati con il test di Kolmogorov – Smirnov ed il *t*-test di Student a due code per dati non appaiati. Abbiamo analizzato le percentuali delle variazioni dei pesi corporei fra il settimo giorno ed il giorno di inizio dell'osservazione, tra il 14° ed il 7°, tra 21° e 14°, ed infine tra il 28° ed il 21° ed abbiamo, quindi, riportato i dati in tabella esprimendo il tempo in settimane (weeks-w1, w2, w3, w4).

## 5.4.5 Materiali e metodi test di impianto in vivo quarto esperimento biocompatibilità

### 5.4.5.1 Tecnica chirurgica di impianto dei prototipi di protesi non riassorbibile confrontate con Parietene Progrid® in modello animale (ratto)

Abbiamo sperimentato nuovi materiali riassorbibili e non riassorbibili allo scopo di verificare se fosse possibile sostituire l'attuale materiale protesico di uso più frequente, il polipropilene:

A) con una nuova generazione di materiali biocompatibili riassorbibili che non lasci residui a medio termine, e altri materiali; B) biocompatibili, non riassorbibili, superleggeri. Lo scopo è quello di ridurre al minimo la quantità di materiali estranei impiantati nell'organismo umano, con le stesse caratteristiche fisicochimiche e di biocompatibilità rispetto ai materiali attualmente in uso nella chirurgia erniaria e dei laparoceli. Altro scopo della ricerca è quello di: C) verificare la possibilità di realizzare ancoraggi superleggeri e meno costosi di quelli in questo momento utilizzati, per fissare i tessuti protesici di interesse chirurgico: C<sub>1</sub>) evitando l'impiego dei comuni materiali di sintesi (per il rischio di intrappolamento delle terminazioni nervose tissutali e conseguente possibile neuralgia) oppure di C<sub>2</sub>) collanti biologici (per il possibile rischio di trasmissione di malattie ancora sconosciute veicolate dai materiali biologici stessi).

### 5.4.5.2 Materiali impiantati

La sperimentazione si è articolata in due cicli chirurgici, con l'impiego di due gruppi di 27 soggetti, ratti maschi di razza Sprague-Dawley da 300 g circa, forniti dalla Ditta Harlan di Udine-Italia. Nel primo ciclo l'impianto è stato eseguito in regione dorso lombare e, nel secondo ciclo di sperimentazione, l'impianto è stato eseguito sulla superficie ventrale, in regione fianco-fossa iliaca destra. Nel secondo ciclo abbiamo impiantato, in 9 casi un rettangolo di rete non riassorbibile in polipropilene da 2 cm<sup>2</sup> con ancoraggi tetragolari in Buckypaper (BP) da 0,2 cm<sup>2</sup>, fissati sul polipropilene con puntino trafisso, BP-rete di polipropilene. Altri 9 casi sono stati trattati con

rettangoli da 2 cm<sup>2</sup> di rete riassorbibile in acido polilattico, trattato con nanotubi di carbonio a parete singola, non funzionalizzati (SWCNT single wall carbon nanotubes), bloccati sulla rete con colla biologica “Tissucol®” allo scopo di evitarne la dispersione ambientale ed, infine, un terzo gruppo di ratti è stato trattato con impianti da 2 cm<sup>2</sup> di polipropilene trattato con acido ialuronico “Paretene Progrip®”,

*FIG.8: Stabulazione di due soggetti, nel nostro studio abbiamo scelto ratti maschi “Sprague Dawley” da 300-350 g per la loro docilità e identità genetica.*

una rete attualmente in commercio, che ha una superficie in polipropilene, e l'altra superficie trattata con materiale riassorbibile ruvido con la capacità di aggrapparsi discretamente ai tessuti biologici viventi. Gli esperimenti hanno, in entrambi i cicli, previsto una prima settimana di trasferimento, pesatura ed ambientazione dei soggetti. Dopo i primi sette giorni i soggetti sono stati pesati, sottoposti ad anestesia generale per via intraperitoneale, della durata massima di 10 minuti, realizzata per inoculazione attraverso la fossa iliaca sinistra, al volume di 1ml/Kg di peso corporeo con sodio pentobarbitale in soluzione salina alla dose di 53 mg/Kg. Sono quindi stati eseguiti: a) di prelievo ematico di 2,5 ml di sangue intero per puntura intracardiaca con striscio su vetrino per la conta dei globuli, b) intervento chirurgico per il posizionamento dell'impianto protesico con revisione dell'emostasi e chiusura della ferita chirurgica per piani con fili riassorbibili per fascia muscolare e sottocute, di seta per la chiusura della ferita cutanea. Tutti i soggetti sono stati ricontrollati a due ore dal risveglio dopo l'intervento chirurgico con il test di Irwin per l'osservazione del regolare decorso postoperatorio. Tutti i soggetti sono stati quindi rivalutati settimanalmente (tutti i giovedì) con pesata, prelievo ematico dopo anestesia generale per l'esecuzione degli esami ematochimici ed immunologici; ed ogni settimana abbiamo sacrificato 4 soggetti trattati (2 impiantati con rete riassorbibile trattata con SWCNT fissati con Tissucol®, 2 impiantati con BP e 2 controlli impiantati con Paretene Progrip. L'osservazione si è prolungata per quattro settimane e i soggetti sacrificati sono stati sottoposti al prelievo di campioni di tessuto su

tutti gli organi (cervello, cuore, polmone, fegato, rene, testicolo, milza, mesentere) e della sede di impianto, per lo studio anatomopatologico microscopico ed elettromicroscopico.

#### 5.4.6 Metodi

Nel primo ciclo della ricerca il sito anatomico per il posizionamento della protesi è stata la regione dorso-lombare per la maggiore semplicità tecnica di esecuzione. Nel secondo ciclo, acquisita maggiore padronanza della tecnica e dimestichezza nel trattare i soggetti, è stata utilizzata la sede addomino-inguinale destra, che meglio si adatta alla simulazione della tecnica chirurgica per l'intervento di chirurgia protesica per l'ernia o per il laparocele. Tecnicamente l'intervento è consistito nella realizzazione di un'incisione lineare della lunghezza di 2,5 cm, previa rasatura dell'area di interesse chirurgico. Attraverso l'incisione è stata raggiunta ed incisa la fascia muscolare realizzando quindi, in area avascolare, una tasca, tra la fascia ed il muscolo, abbastanza ampia dove inserire le protesi di dimensioni 2x2 cm. La fascia è stata quindi suturata con filo riassorbibile a punti staccati ed infine è stata chiusa la breccia cutanea, con punti staccati con filo non riassorbibile. Gli animali sono stati stabulati per quattro settimane al fine dello studio dei processi di cicatrizzazione con sacrificio a cadenza settimanale di due soggetti per gruppo, alimentati con dieta standardizzata, monitorizzando la reattività, le funzioni vitali ed i parametri ematochimici con i prelievi di sangue prima, durante e al termine dell'osservazione di ogni soggetto che si concludeva al momento del sacrificio. I parametri studiati sono: azotemia, glicemia, creatinina, Na, K, Ca, Cl, Mg, got, gpt, ggt, fosfatasi alcalina, bilirubina totale e frazionata, pt, ptt, fibrinogeno, antitrombina III, emocrito, t3, t4, tsh, ft3, ft4, ANA, ASMA, ANTI RET, APG, ENA (per valutare le modificazioni dell'assetto immunitario). I campioni ematochimici appena eseguiti, congiuntamente ai vetrini sono stati imballati e trasportati al laboratorio per l'esecuzione degli esami ematochimici. Gli animali sono stati sacrificati in camera satura con CO<sub>2</sub> rispettivamente al 7°, 14°, 21° e 28° giorno dalla data del posizionamento della rete protesica. Dopo il sacrificio, gli animali sono stati sottoposti al prelievo degli organi e del sito d'impianto. Tutti i campioni sono stati adeguatamente confezionati ed immersi in soluzione di Formalina al 4% tampone fosfato. I

campioni sono stati quindi affidati all'anatomopatologo, per eseguire lo studio microscopico. Lo studio microscopico ed ultramicroscopico dei siti d'impianto dei materiali protesici per la valutazione degli effetti sulla cicatrizzazione e la reazione dei tessuti nei siti d'impianto alla presenza dei materiali protesici sono ancora in corso, per questo motivo al momento della stesura del presente capitolo non si hanno i risultati. All'esame necroscopico, in ogni modo, macroscopicamente si può affermare di non aver osservato alcuna differenza nella reattività tissutale nei siti di impianto nei tre diversi tipi di protesi. Si è, infatti, osservata una discreta trasformazione fibrosa periprotetica già dalla prima settimana di osservazione con completa incorporazione delle protesi. La fibrosi, negli esami necroscopici eseguiti nelle settimane successive, è rimasta, almeno microscopicamente, della stessa estensione e consistenza e non ha provocato altre reazioni né in prossimità né a distanza perché tutti i visceri studiati e di cui sono stati eseguiti prelievi macrobiotici sono sembrati perfettamente normali. Da studi precedenti eseguiti e pubblicati dal nostro gruppo di ricerca i SWCNT sono già stati valutati per l'oncogenicità e la mutagenicità ma per quanto riguarda il BP non abbiamo ancora i risultati delle ricerche intraprese. Macroscopicamente nessuno dei campioni necroscopici prelevati ha mostrato trasformazione neoplastica. Gli effetti dell'impianto dei materiali protesici sul metabolismo dei soggetti è stato studiato con il set degli esami ematochimici riportati nell'apposito capitolo.

#### 5.4.7 Tecnica di induzione dell'anestesia

L'anestesia generale è stata eseguita dal Veterinario che si occupa del "Benessere Animale" in collaborazione con il Tecnico di Stabulario ed è stata realizzata per inoculazione, per via intraperitoneale mediante puntura in corrispondenza della fossa iliaca sinistra al volume di 1 ml/Kg di peso corporeo con sodio pentobarbitale in soluzione salina alla dose di 53 mg/Kg e della durata massima di 10 minuti,

*Fig. 9: Inoculazione in fossa iliaca di sodio pentobarbitale in soluzione salina alla dose di 53 mg/Kg per via intraperitoneale.*

#### 5.4.8 Tecnica del prelievo ematico

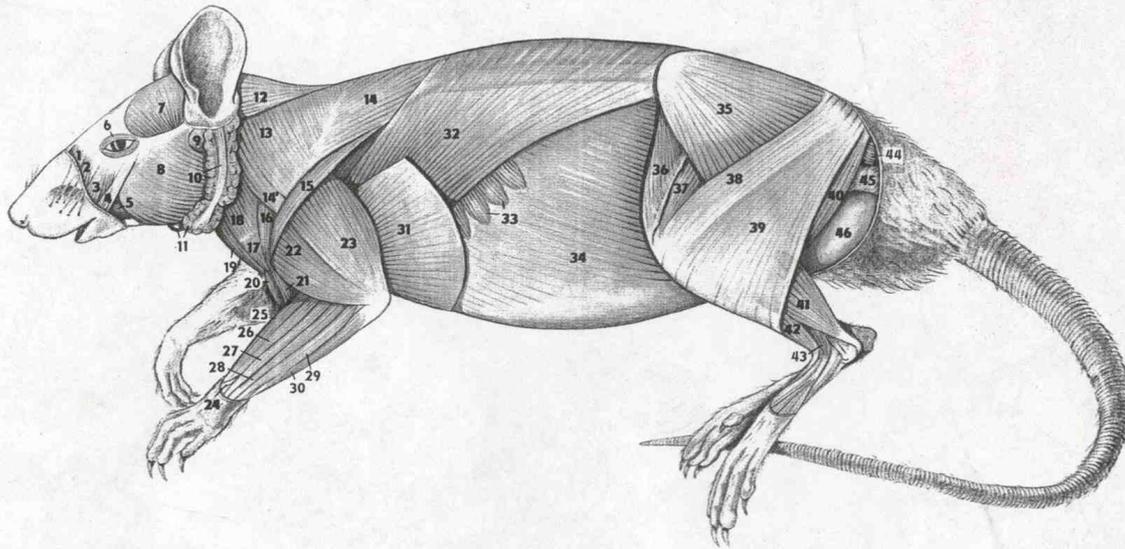
*Figg. 10 e 11: il ratto anestetizzato viene adagiato su un materassino termico antistress sul quale viene eseguito il prelievo ematico per puntura intracardiaca al sesto spazio intercostale sinistro.*

La metodica viene fisicamente eseguita dal Tecnico di Stabulario sotto il diretto controllo del Veterinario che soprintende al “Benessere animale” e consiste nella puntura intracardiaca al sesto spazio intercostale sinistro. Il volume ematico prelevabile non deve superare i 2,5 ml, pari allo 0.07% del volume ematico totale corporeo in un ratto di 400 gr che corrisponde approssimativamente, tra i 33,5 e i 40 ml. Eseguito il prelievo, il Tecnico passa la siringa al Medico di Laboratorio che esegue lo striscio su vetrino e inocula nelle corrispondenti provette il campione di sangue.

*Figg. 12 e 13: Ad ogni soggetto al quale si preleva il sangue vengono eseguiti alcuni strisci su vetrino per l'esame parassitologico e la conta dei globuli a fresco, prima dell'intervento, ogni 7gg per tutto il periodo dell'osservazione clinica ed infine, prima del sacrificio.*

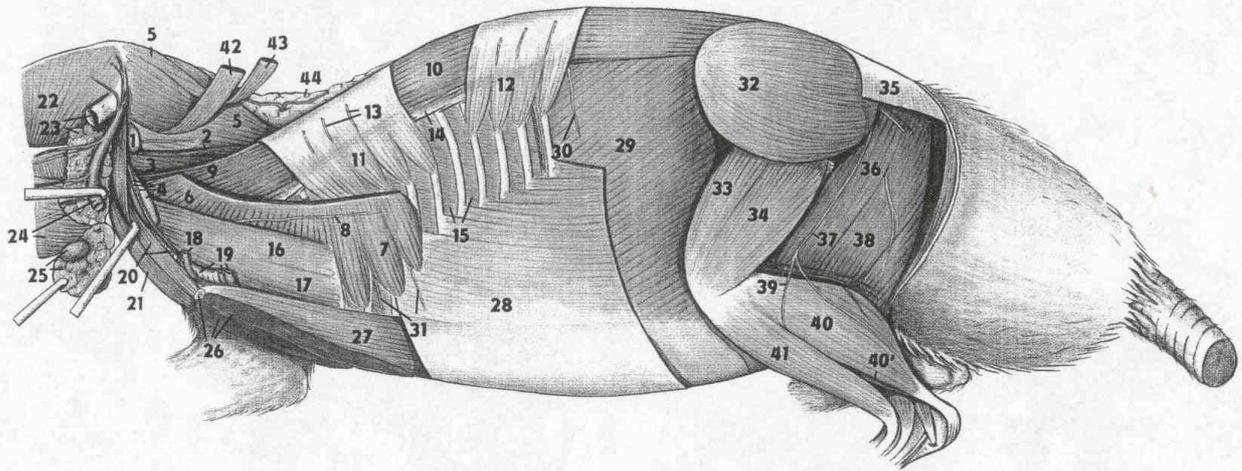
## 5.4.9 Anatomia chirurgica

### Superficial muscles of the body; cutaneous muscles removed **229 Rat**



- |   |   |  |
|---|---|--|
| 1 <i>m. levator nasolabialis</i> – nasolabial levator muscle  | 15 <i>pars scapularis</i> – scapular part   | 31 <i>m. cutaneus trunci</i> – cutaneous muscle of trunk                         |
| 2 <i>m. levator labii superioris</i> – levator muscle of upper lip  | 16 <i>pars acromialis</i> – acromial part   | 32 <i>m. latissimus dorsi</i> – latissimus dorsi muscle                          |
| 3 <i>m. caninus</i> – canine muscle   | 17 <i>m. cleidobrachialis pars clavicularis</i> – clavicular part (cleidobrachial muscle)         | 33 <i>m. serratus ventralis thoracis</i> – thoracic ventral serratus muscle      |
| 4 <i>m. zygomaticus</i> – zygomatic muscle  | 17, 18 <i>m. brachiocephalicus</i> – brachiocephalic muscle                                       | 34 <i>m. obliquus externus abdominis</i> – external oblique abdominal muscle     |
| 5 <i>m. buccinator pars buccalis</i> – buccal part of buccinator muscle                                   | 18 <i>m. cleidocephalicus pars mastoidea</i> – mastoid part of cleidocephalic muscle              | 35 <i>m. gluteus superficialis</i> – superficial gluteal muscle                  |
| 6 <i>m. orbicularis oculi</i> – orbicular ocular muscle   | 19 <i>m. sternocephalicus pars mastoidea</i> – mastoid part of sternocephalic muscle              | 36 <i>m. tensor fasciae latae</i> – tensor muscle of fascia lata                 |
| 7 <i>m. temporalis superficialis</i> – superficial temporal muscle  | 20 <i>m. biceps brachii</i> – brachial biceps muscle  | 37 <i>m. rectus femoris</i> – straight muscle of femur                           |
| 8 <i>m. masseter pars superficialis</i> – superficial part of masseter muscle                             | 21 <i>m. brachialis</i> – brachial muscle   | 38, 39 <i>m. biceps femoris</i> – femoral biceps muscle                          |
| 9 <i>glandula lacrimalis extraorbitalis</i> – extraorbital lacrimal gland                                 | 22, 23 <i>m. triceps brachii</i> – brachial triceps muscle  | 38 <i>portio cranialis</i> – cranial part  |
| 10 <i>m. parotidoauricularis, glandula parotis</i> – parotidoauricular muscle, parotid gland              | 22 <i>caput laterale</i> – lateral head   | 39 <i>portio caudalis</i> – caudal part  |
| 11 <i>glandula mandibularis, lymphonodus (ln.) mandibularis</i> – mandibular gland, mandibular lymph node | 23 <i>caput longum</i> – long head  | 40 <i>m. semitendinosus</i> – semitendinous muscle                               |
| 12 <i>m. cervicoauricularis</i> – cervicoauricular muscle   | 24 <i>m. abductor digiti I (pollicis) longus</i> – long abductor muscle of digit I (pollus-thumb) | 41 <i>m. gastrocnemius caput laterale</i> – lateral head of gastrocnemius muscle |
| 13, 14 <i>m. trapezius</i> – trapezius muscle   | 25 <i>m. extensor carpi radialis longus</i> – long radial extensor muscle of carpus               | 42 <i>m. tibialis cranialis</i> – cranial tibial muscle                          |
| 13 <i>pars cervicalis</i> – cervical part   | 26 <i>m. extensor carpi radialis brevis</i> – short radial extensor muscle of carpus              | 43 <i>m. extensor digitorum longus</i> – long extensor muscle of digits          |
| 14 <i>pars thoracica</i> – thoracic part  | 27 <i>m. extensor digitorum communis</i> – common extensor muscle of digits                       | 44 <i>m. bulboglandularis</i> – bulboglandular muscle                            |
| 14' <i>m. omotransversarius</i> – omotransverse muscle  | 28 <i>m. extensor digitorum lateralis</i> – lateral extensor muscle of digits                     | 45 <i>epididymis</i> – epididymis  |
| 15–17 <i>m. deltoideus</i> – deltoid muscle   | 29, 30 <i>m. extensor carpi ulnaris</i> – ulnar extensor muscle of carpus                         | 46 <i>testis</i> – testis  |

Muscles of a male trunk; deep layer after removal of the thoracic limbs, **257 Rat**  
view from the left side



- |   |   |   |
|---|---|---|
| 1 <i>ln. retropharyngeus</i> – retropharyngeal lymph node   | 16, 17 <i>m. scalanus dorsalis</i> – dorsal scalanus muscle   | 31 <i>rami cutanei laterales</i> – lateral cutaneous branches       |
| 2 <i>m. longissimus capitis</i> – longest muscle of head  | 16 <i>pars dorsalis</i> – dorsal part   | 32 <i>m. gluteus medius</i> – medial gluteal muscle                 |
| 3 <i>m. longissimus atlantis</i> – longest muscle of atlas  | 17 <i>pars ventralis</i> – ventral part   | 33 <i>m. rectus femoris</i> – straight femoral muscle               |
| 4 <i>ln. cervicalis profundus, v. jugularis interna, a. carotis communis, truncus vagosympathicus</i> – deep cervical lymph node, internal jugular vein, common carotid artery, vagosympathetic trunk | 18 <i>v. jugularis externa</i> – external jugular vein  | 34 <i>m. vastus lateralis</i> – lateral broad muscle                |
| 5 <i>m. splenius</i> – splenius muscle  | 19 <i>a. et v. subclavia, plexus brachialis</i> – subclavian artery and vein, brachial plexus                               | 35 <i>m. biceps femoris</i> – femoral biceps muscle                 |
| 6 <i>m. serratus ventralis cervicis</i> – cervical ventral serratus muscle  | 20 <i>m. cleidocephalicus pars mastoidea</i> – mastoid part of cleidocephalic muscle  | 36 <i>m. adductor</i> – adductor muscle                             |
| 7 <i>m. serratus ventralis thoracis</i> – thoracic ventral serratus muscle  | 21 <i>m. sternocephalicus pars mastoidea</i> – mastoid part of sternocephalic muscle  | 37 <i>n. ischiadicus</i> – ischiatic nerve                          |
| 8 <i>n. thoracicus longus</i> – long thoracic nerve   | 22 <i>m. temporalis superficialis</i> – superficial temporal muscle   | 38 <i>m. semitendinosus</i> – semitendinous muscle                  |
| 9 <i>m. longissimus cervicis</i> – longest cervical muscle  | 23 <i>glandula parotis, meatus acusticus externus cartilagineus</i> – parotid gland, external cartilaginous acoustic meatus | 39 <i>n. peroneus superficialis</i> – superficial peroneal nerve    |
| 10 <i>m. longissimus thoracis</i> – longest thoracic muscle   | 24 <i>m. masseter (pars superficialis), v. maxillaris</i> – masseter muscle (superficial part), maxillary vein              | 40 <i>m. gastrocnemius lateralis</i> – lateral gastrocnemius muscle |
| 11 <i>m. serratus dorsalis cranialis</i> – cranial dorsal serratus muscle   | 25 <i>ln. mandibularis, glandula mandibularis</i> – mandibular lymph node, mandibular gland                                 | 40' <i>m. soleus</i> – soleus muscle                                |
| 12 <i>m. serratus dorsalis caudalis</i> – caudal dorsal serratus muscle   | 26 <i>clavicula, mm. pectorales</i> – clavicle, pectoral muscles  | 41 <i>m. tibialis cranialis</i> – cranial tibial muscle             |
| 13 <i>rami cutanei dorsales nn. thoracicorum</i> – dorsal cutaneous branches of thoracic nerves   | 27 <i>mm. rectus thoracis et abdominis</i> – straight thoracic and abdominal muscles*                                       | 42 <i>m. rhomboideus capitis</i> – rhomboid muscle of head          |
| 14 <i>m. iliocostalis</i> – iliocostal muscle   | 28 <i>m. obliquus externus abdominis</i> – external oblique abdominal muscle  | 43 <i>m. rhomboideus thoracis</i> – rhomboid muscle of thorax       |
| 15 <i>mm. intercostales externi</i> – external intercostal muscles  | 29 <i>m. obliquus internus abdominis</i> – internal oblique abdominal muscle  | 44 <i>corpus adiposum nuchae</i> – nuchal adipose body**            |
|   | 30 <i>ramus cutaneus dorsolateralis</i> – dorsolateral cutaneous branch   |   |

\**m. rectus thoracis* has not been developed into an independent muscle

\*\**corpus adiposum multivesiculare s. hiberneticum* – multivesicular or hibernetic adipose body

#### 5.4.10 Tecnica per l'impianto di quadratino da BP 2x2 cm in una tasca sotto-cutaneo-fasciale realizzata in regione dorsolombare

*Fig. 14: quadratino, sterilizzato in autoclave, di BP da 2 cm<sup>2</sup> confezionato in doppia busta.*

*Fig. 15: aspetto della superficie liscia e lucente del BP.*

*Fig. 16: tricotomia.*

*Fig. 17: preparazione del campo operatorio, incisione trasversale sul dorso da 2,5 cm di lunghezza, approfondimento fino alla fascia muscolare.*

*Fig. 18: incisione trasversale sul dorso da 2,5 cm, approfondimento alla fascia muscolare.*

Nella Fig. 18 si può osservare l'incisione trasversale da 2,5 cm della cute e del sottocute, approfondimento fino alla fascia che viene incisa, scollata dal muscolo e quindi si procede a realizzare una tasca avascolare, tra fascia muscolare e muscoli dorso-lombari, per il posizionamento della protesi, chiusura in duplice strato: profondo fasciale a punti staccati riassorbibili, superficiale a punti staccati non riassorbibili.

*Fig. 19: creazione di una tasca avascolare tra fascia muscolare e muscoli dorso-lombari per il posizionamento della protesi,*

*Fig. 20: protesi di BP che sta per essere impiantata.*

*Fig. 21: posizionamento della protesi in BP.*

*Figg. 22 e 23: chiusura in duplice strato: profondo-fasciale, a punti staccati riassorbibili, lo strato superficiale si chiude a punti staccati non riassorbibili.*

#### 5.4.11 Tecnica d'allestimento del prototipo protesico in polipropilene, modificato con quadratini di BP disposti ai quattro angoli e fissati al supporto con punti trafissi in prolene 4/0USP

Abbiamo realizzato un prototipo protesico di nostra concezione, partendo da comune materiale protesico in polipropilene ritagliando quadratini  $2\text{cm}^2$  sui quali abbiamo applicato quattro piccoli frammenti di BP da  $0,2\text{cm}^2$  che sono stati suturati con fili di polipropilene, 6/0 USP, ai quattro angoli della rete da impiantare stesso materiale della rete, sui quattro angoli della protesi che volevamo testare.

*Fig. 24: materiale protesico in polipropilene.*

*Fig. 25: fase di ritaglio dei quadratini  $2 \times 2$  cm.*

*Fig. 26: quadrato di BP da  $2 \times 2$  cm dal quale vengono ricavati quattro piccoli frammenti da  $0,2 \times 0,2$  cm da applicare sulla rete di polipropilene.*

*Fig. 27: frammenti da 0,2x0,2 cm di BP da applicare sulla rete di polipropilene.*

*Fig. 28: filo 6/0 USP di polipropilene, stesso materiale della rete, con il quale si applicano i quadratini di BP sui quattro angoli di rete.*

*Figg. 29 e 30: applicazione dei quadratini di BP sui quattro angoli della rete in polipropilene.*

#### 5.4.12 Intervento sull'addome con impianto di polipropilene con angolari di ancoraggio in BP

*Fig. 31: tricotomia sull'addome.*

*Fig. 32: lettino termico antistress.*

*Fig. 33: pacchetto sterile degli strumenti chirurgici.*

*Fig. 34: animale pronto per essere operato in campo sterile.*

*Fig. 35: Fase iniziale dell'intervento.*

*Fig. 36: apertura della breccia chirurgica tra fascia e muscoli larghi della parete addominale anteriore.*

*Fig. 37: protesi in polipropilene da 2 cm<sup>2</sup> con quattro quadratini da 0,2 cm<sup>2</sup> suturati con prolene 6/0 USP ai quattro angoli*

*Fig. 38: la protesi viene introdotta nella breccia tra fascia e muscoli larghi della parete addominale anteriore a simulare un intervento di plastica per laparocèle addominale.*

*Fig. 39: la protesi viene introdotta nella breccia tra fascia e muscoli larghi della parete addominale anteriore senza colla né punti di sutura per il fissaggio.*

*Fig. 40: la protesi viene adagiata sul piano muscolo-fasciale ben distesa e abbandonata senza necessità di fissaggio né con punti né con collante.*

*Fig. 41: chiusura della fascia a punti staccati in Vicryl®.*

*Fig. 42: chiusura della fascia a punti staccati in Vicryl®.*

*Fig. 43: chiusura del piano fasciale.*

La Fig. 43 evidenzia il piano fasciale suturato e l'inizio della sutura del piano cutaneo con una serie di punti staccati documentati in Fig. 44. Al termine dell'intervento il soggetto viene adagiato per qualche minuto su un materassino termico (*vedi* Fig. 45) in modo da consentire un miglior recupero delle funzioni vitali e dello stato di coscienza dopo l'anestesia, sotto diretto controllo veterinario

*Fig. 44: chiusura della fascia a punti staccati in Vicryl®.*

*Fig. 45: materassino termico antistress.*

#### 5.4.13 Tecnica per l'impianto di materiale protesico "self-gripping" (Parietene Progrip®)

*Fig. 46: realizzazione della tasca avascolare per l'impianto rete protesica Parietene Progrip®.*

*Fig. 47: scollamento sottocutaneofasciale per l'impianto rete protesica Parietene Progrip®."self-gripping".*

*Fig. 48: posizionamento rete protesica Parietene Progrip®."self-gripping" nella tasca avascolare dal lato pretrattato con poliglactina.*

*Fig. 49: chiusura della fascia muscolare sopra l'impianto rete protesica Parietene Progrid®."self-gripping".*

*Fig. 50: completamento del piano profondo dell'impianto rete protesica Parietene Progrid®."self-gripping".*

*Fig. 51: chiusura della breccia fasciale con Vicryl.*

*Fig. 52: completamento della chiusura della fascia.*

*Fig. 53: chiusura piano cutaneo.*

*Figg. 54 e 55: chiusura ferita cutanea.*

#### 5.4.14 Tecnica di prelievo di preparati anatomici per l'esame microscopico

*Fig. 56: apertura della parete addominale dopo anestesia generale, pesata, prelievo ematico per esami di laboratorio e sacrificio in camera satura di CO<sub>2</sub>.*

*Fig. 57: approfondimento dell'incisione della linea alba.*

*Fig. 58: apertura cavità addominale*

*Fig. 59: lussazione del lobo epatico destro.*

*Fig. 60: prelievo del lobo epatico destro.*

*Fig. 61: preparazione anatomica rene destro.*

*Fig. 62: preparazione prelievo della milza.*

*Fig. 63: prelievo del cuore.*

*Fig. 64: prelievo del cervello.*

*Fig. 65: prelievo del testicolo.*

*Fig. 66: prelievo linfonodi mesenterici.*

*Fig. 67: prelievo mesentere.*

*Fig. 68: prelievo del sito d'impianto.*

*Fig. 69: sito di impianto della rete fissata con quadratini di BP senza collanti e senza suture. Si osserva la lucentezza del peritoneo parietale, assenza di flogosi transparietale da corpo estraneo.*

*Fig. 70: sito di impianto della rete fissata con quadratini di BP senza collanti e senza suture. Si osservi la lucentezza del peritoneo parietale, anche in corrispondenza del BP e l'assenza di flogosi transparietale da corpo estraneo.*

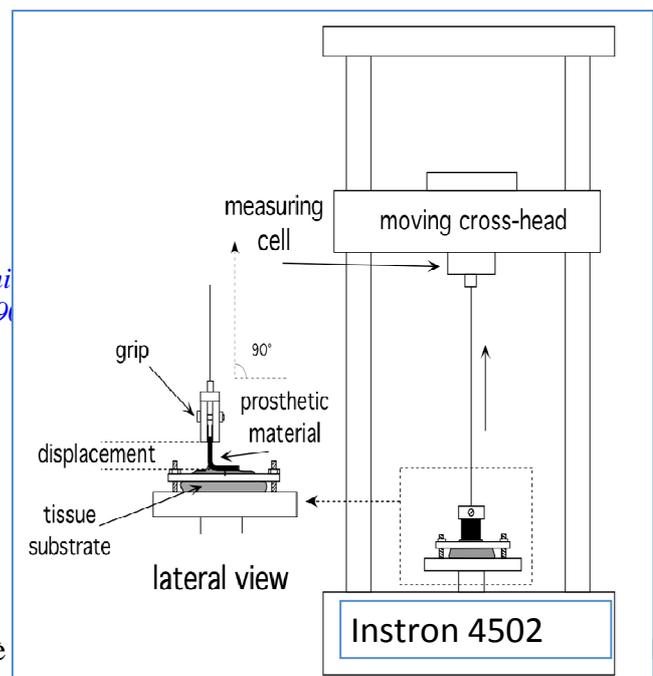
*Fig. 71: sito di impianto della rete fissata con quadratini di BP senza collanti e senza suture. Si osservano per trasparenza i quadratini di BP e la lucentezza del peritoneo parietale per assenza di flogosi transparietale da BP.*

*Fig. 72: sito di impianto della rete fissata con quadratini di BP senza collanti e senza suture.*

## 5.5- Materiali e metodi QUINTO esperimento: misurazione della bioadesività del BP su modello animale (coniglio)

Le prove di adesione sono state condotte posizionando ogni campione di materiale protesico, da testare, sul rispettivo supporto biologico e quindi misurando, con apposita apparecchiatura, la forza adesiva del campione in esame al supporto biologico. Abbiamo testato campioni di BP su entrambe le superfici e campioni di Parietene Progrid® presagomati in quadratini da 2 cm<sup>2</sup>. I supporti biologici sono stati preparati chirurgicamente, subito dopo il sacrificio degli animali, conigli adulte femmine, New Zealand da circa 3 Kg, in camera satura di CO<sub>2</sub>. Rettangoli di tessuto biologico delle dimensioni standardizzate di 5x3.5 cm di superficie e 2 cm di spessore, sono stati preparati con tessuto muscolare di rivestito della propria fascia, prelevandoli dalla parete addominale subito dopo sacrificio (vedi Figg. 74, 75, 76, 77). I campioni sono stati refrigerati a 4°C fino all'esecuzione dei tests, entro le 48 ore successive al sacrificio. Nello specifico, ogni preparato anatomico, adagiato su un rettangolo di cartoncino delle stesse dimensioni per facilitarne la manipolazione, è stato inserito nel supporto solidale allo strumento di misura (INSTRON 4502).

Fig. 73: schema dell'apparecchiatura elettromeccanica per la misurazione della bioadesività per il "peeling test a 90°"



Il supporto solidale allo strumento di misura è

spessore. Quella inferiore è fissata al basamento dello strumento misuratore, quella superiore si fissa alla lastra inferiore con 4 viti e la striscia di materiale biologico viene inserita nella fessura

compresa tra le due lastre. La lastra superiore presenta una fenestrazione da 2.5x2.5 cm, dalla quale, una volta serrate le viti di fissaggio sul campione inserito tra le due lastre di contenzione, sporge il tessuto biologico sul quale si applica, a diretto contatto, il quadratino di tessuto protesico del quale vogliamo misurare la bioadesività (*vedi* Figg. 78, 79, 80, 81, 82, 83). Un margine periferico da 3-4 mm della protesi in esame, è ancorato ad una molletta (*vedi* Figg. 84, 85, 86, 87), collegata ad un cavo d'acciaio lungo 18 cm, connessa con uno snodo cardanico ad una trave di sollevamento, collegata al sistema di misurazione in modo da assicurare una variazione di angolazione della trazione, durante la misurazione, trascurabile ( $\pm 6^\circ$ ) (*vedi* Fig. 73). Attivando il sistema di misurazione la barra di sollevamento si solleva verticalmente e a  $90^\circ$  rispetto alla superficie fasciale, sulla quale è fissato il materiale protesico. Lo strumento misura la resistenza alla trazione esercitata dalla traversa, trasmessa alla protesi aderente alla fascia muscolare, intesa come la quantità di forza adesiva che si oppone al sollevamento della traversa azionata dallo strumento, espressa in Newton (N), (*vedi* Fig. 78). La procedura descritta è nota come "peeling tests a  $90^\circ$ ". Abbiamo quindi ripetuto 5 volte, in duplicato, i test confrontando l'effetto bioadesivo delle due superfici del film di BP contro campioni confrontabili di Parietene Progrid. Le prove di adesione sono state condotte cimentando 5 campioni di materiali protesici della misura di 2x2 cm con 5 preparati anatomici identici da 5x3.5x2 cm di spessore. I preparati anatomici di muscolo obliquo esterno laterale di coniglio erano comprensivi della propria guaina muscolare fibrosa (*vedi* Figg. 74, 75, 76, 77). Ogni campione è stato bloccato su un supporto realizzato con due lastre sovrapposte di plexiglas di cui l'inferiore solidarizzato allo strumento di misura, costituente il piano sul quale è stato depositato il campione da esaminare. Il campione è stato bloccato in posizione dalla seconda lastra fenestrata in plexiglas, sovrapponendola al campione di tessuto muscolare. La finestra misura 2x2 cm (*vedi* Figg. 82, 131, 132) e la lastra sovrapposta al campione è solidarizzata con 4 grosse viti allo strumento di misura.

*Figg. 74 e 75: preparazione dei pezzi anatomici di tessuto muscolare di coniglio su regolo di cartoncino presagomato*

Il materiale protesico in studio, è sagomato con le stesse dimensioni della finestra sulla lastra in plexiglass e ancorato ad una apposita pinza (vedi Fig. 88), che attraverso un cavo d'acciaio (vedi Fig. 84) è collegata al sollevatore meccanico. Il materiale protesico è quindi adagiato sul tessuto animale esposto in finestra (vedi Fig. 83) e si dà il via al test, attivando il motore elettrico computerizzato che solleva a 90° il campione protesico. La forza di adesione è misurata in Newton per cm<sup>2</sup> ed il test eseguito è noto come **peeling tests** a 90° che misura la resistenza allo strappo del bioadesivo dalla superficie biologica.

*Figg. 76 e 77: campione di pezzo anatomico di tessuto muscolare e campione di tessuto protesico, BP a sinistra e Progrid a destra.*

*Figg. 78 e 79: INSTRON 4502 Universal Testing Machine è lo strumento di misura utilizzato, particolare della tastiera e del monitor.*

*Figg. 80,81,82,83: monitoraggio, ancoraggio del campione chirurgico ed aspetto del tessuto che emerge dalla finestra di adesione.*

*Fig. 84: preparazione dell'ancoraggio del campione protesico di BP alla pinza da strappo*

*Figg. 85,86,87: monitoraggio pronto abbassamento della pinza verso il supporto in plexiglas per l'inizio del test*

### 5.5.1 Metodo di misurazione della bioadesività “Peeling Test a 90°”

**I test- Buckypaper 1° run: abbiamo studiato il comportamento del lato opaco-ruvido osservando e documentando una resistenza massima di quasi 1 N per cm<sup>2</sup>.**

*Figg. 88,89,90,91: applicazione della protesi sul muscolo, progressione del sollevamento, aspetto della protesi a fine test. Presenza di guaina muscolare lacerata sulla protesi, strappata dal muscolo e rimasta adesa al supporto protesico.*

*Fig. 92: particolare della protesi sul muscolo che viene sollevamento di ben 1,5 cm dimostrando la grande capacità bioadesiva del supporto protesico.*

*Figg. 93,94: distacco avvenuto e particolare della pinza con BP sul quale è rimasta adesa parte della fascia muscolare per la grande capacità bioadesiva del supporto protesico.*

**II test- “Buckypaper 2° run”:** l’esperimento è stato ripetuto con identica modalità, sullo stesso campione di BP usato nel I test “Buckypaper 1° run”, perché parte del tessuto biologico, inopinatamente era rimasto adeso sul campione protesico (*vedi Figg. 93, 94*) e abbiamo voluto verificare effetti e differenze. Tale campione è stato cimentato con un nuovo campione di tessuto muscolare di coniglio. Abbiamo documentato la netta riduzione della bioadesività del materiale protesico per saturazione dei siti superficiali ma il materiale ha comunque conservato una discreta bioadesività, comunque superiore a quella del Proprip vergine, di ben 0,2 N per cm<sup>2</sup>.

*Fig. 95: comportamento del lato liscio lucente. Si documenta una resistenza massima di 0.8 N per cm<sup>2</sup> cioè 25% circa della tensione massima misurata sul lato ruvido. La presente schermata è riportata in grafico in Fig.137, par. 6.5.4.*

**III test-BP lato liscio: Abbiamo studiato quindi il comportamento del lato liscio e lucente del materiale protesico osservando una resistenza di picco, allo strappo, di ben 0,8 N per cm<sup>2</sup>.**

(vedi [Fig. 95](#))

*Figg. 96, 97, 98, 99, 100,101: comportamento del lato lucente-liscio. Si documenta una resistenza massima di 0.8 N per cm<sup>2</sup>*

**IV test Parietene Progrid®: abbiamo studiato il comportamento di un campione da 2x2 cm di Progrid (polipropilene con una delle superfici ricoperta da poliglactina), materiale protesico commerciale self-gripping, utilizzato per il confronto per le proprietà bioadesive, applicato sul quinto campione di tessuto muscolare di coniglio documentando una resistenza, allo strappo, solamente di 0,01 N per cm<sup>2</sup>. Il test è stato documentato dalle sottostanti Fig.102, 103, 104, 105, 106, 107, 108.**

*Figg. 102, 103, 104, 105: comportamento della rete Parietene Progrid®.*

*Figg. 106, 107, 108: documentano il comportamento del lato ruvido del Progrid. Si documenta una resistenza massima di 0.1 N per cm<sup>2</sup>, in altre parole 1/100 della tensione massima registrata con BP lato ruvido-opaco, 1/125 della tensione massima registrata con BP lato liscio-lucente.*

**V test-Progrid® 2: abbiamo infine studiato il comportamento dell'altra faccia, non ricoperta da poliglactina, solo in puro polipropilene, dello stesso campione di Progrid, cementandolo con un sesto preparato anatomico standardizzato, documentando l'azzeramento della resistenza, allo strappo. Il test è stato eseguito con tecnica identica. Successivamente abbiamo fissato il polipropilene con colla di fibrina (*vedi Par. 6.5*).**

# 6 RISULTATI

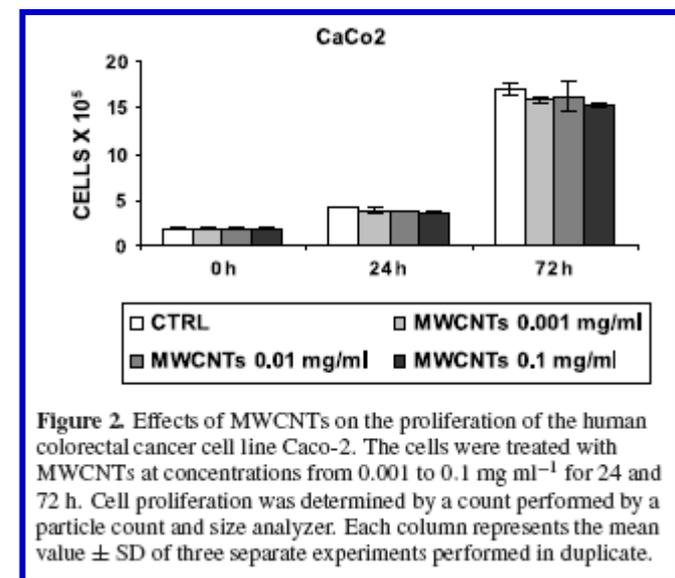
## 6.1- Risultati PRIMO esperimento

### 6.1.1 Studio della proliferazione cellulare.

| Human colorectal cancer cell line Caco-2 matched with MWCNT dilution from 0.001 to 0.1 mg ml <sup>-1</sup> concentration. |            |              |              |
|---|------------|--------------|--------------|
| CaCO2   |            |              |              |
| MWCNT dilution (mg ml <sup>-1</sup> )   | 0 h        | 24 h         | 72 h         |
| 0   | 1.8 ± 0.13 | 4.34 ± 0.037 | 16.99 ± 0.61 |
| 0.001   | 1.8 ± 0.13 | 3.96 ± 0.38  | 15.87 ± 0.33 |
| 0.01  | 1.8 ± 0.13 | 3.88 ± 0.027 | 16.19 ± 1.56 |
| 0.1   | 1.8 ± 0.13 | 3.75 ± 0.19  | 15.28 ± 0.14 |

*Tab. 4: la coltura cellulare Caco-2, è stata trattata con MWCNT, aggiunti al mezzo di coltura alle concentrazioni da 0.001 a 0.1 mg/ml<sup>-1</sup>, dopo 24 e 72 ore dall'inizio dell'esperimento.*

La linea cellulare del cancro del colon umano Caco-2, è stata trattata con MWCNT, aggiunti al mezzo di coltura alle concentrazioni da 0.001 a 0.1 mg/ml<sup>-1</sup>, per 24 e 72 h, che non hanno provocato alcuna modificazione nella velocità di crescita cellulare al confronto con la coltura di controllo (cellule non trattate) (Fig. 109 e Tab 4). Nella linea cellulare del carcinoma mammario, MCF-7, trattate con MWCNT, aggiunti al mezzo di coltura alle concentrazioni da 0.001 a 0.1 mg/ml<sup>-1</sup> per 24 e 72 h, è stata osservata una riduzione statisticamente significativa a confronto con



il gruppo di controllo in modo dose dipendente (vedi Fig. 110 e Tab. 5).

*Fig. 109: effetti di MWCNT sulla proliferazione delle cellule umane CaCo-2.*

Inoltre il numero delle cellule trattate con MWCNT per 24 h si è ridotto rispetto al numero di cellule contate al tempo 0, anche quelle esposte alla concentrazione di 0.1 mg/ml<sup>-1</sup> che è risultata statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ), (vedi Fig. 110 e Tab. 5).

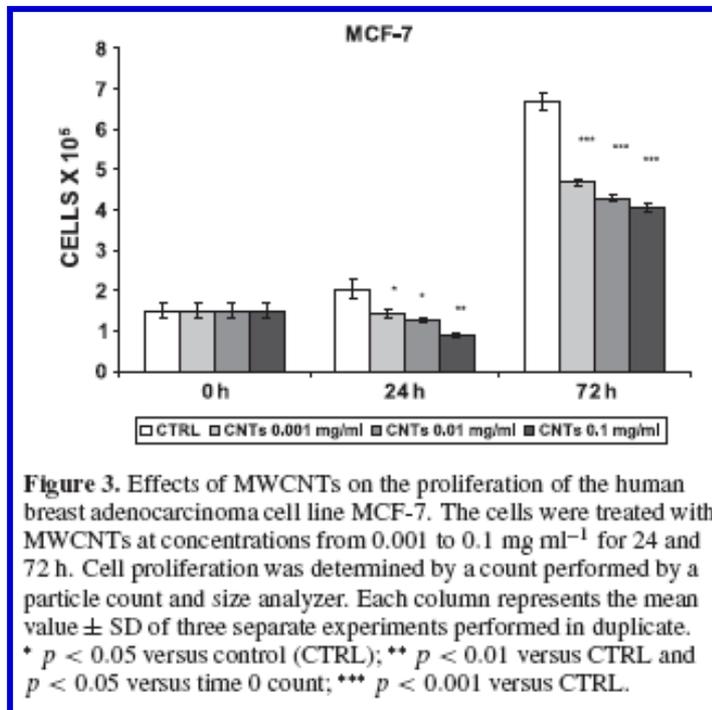


Fig. 110: effetti di MWCNT sulla proliferazione delle cellule umane MCF-7.

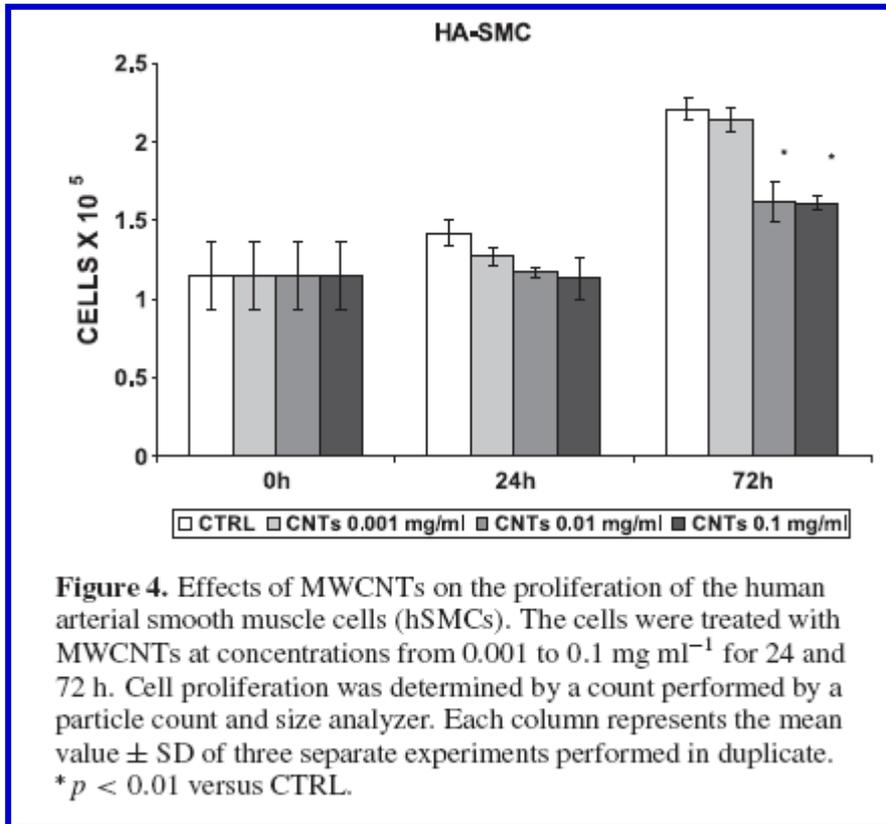
Human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 matched with MWCNT dilution from 0.001 to 0.1 mg ml<sup>-1</sup> concentration.

| MCF-7                                 |                |                  |                 |
|---------------------------------------|----------------|------------------|-----------------|
| MWCNT dilution (mg ml <sup>-1</sup> ) | 0 h            | 24 h             | 72 h            |
| 0                                     | 1.5 $\pm$ 0.18 | 2.02 $\pm$ 0.24  | 6.68 $\pm$ 0.23 |
| 0.001                                 | 1.5 $\pm$ 0.18 | 1.43 $\pm$ 0.1   | 4.68 $\pm$ 0.08 |
| 0.01                                  | 1.5 $\pm$ 0.18 | 1.27 $\pm$ 0.06  | 4.29 $\pm$ 0.05 |
| 0.1                                   | 1.5 $\pm$ 0.18 | 0.89 $\pm$ 0.054 | 4.05 $\pm$ 0.09 |

Tab. 5: la coltura cellulare MCF-7, è stata trattata con MWCNT, aggiunti al mezzo di coltura alle concentrazioni da 0.001 a 0.1 mg/ml<sup>-1</sup>, dopo 24 e 72 ore dall'inizio dell'esperimento.

Le cellule hSMC trattate con MWCNT, aggiunte al mezzo di coltura alle concentrazioni comprese tra 0.001 e 0.1 mg/ml<sup>-1</sup> per 24 h, hanno evidenziato una minima ma significativa riduzione nella velocità di crescita a confronto con il gruppo di controllo (vedi Fig. 111 e Tab. 6).

Il trattamento con MWCNT a 72h ha dato una riduzione statisticamente significativa della proliferazione cellulare alla concentrazione di MWCNT più elevata ma non è stata osservata la modificazione della velocità di crescita cellulare alla concentrazione di 0.001 mg/ml<sup>-1</sup> (vedi Fig. 111 e Tab. 6).



*Fig. 111: effetti di MWCNT sulle cellule umane HA-SMC.*

| Human arterial smooth muscle cells line hSMC matched with MWCNT dilution from 0.001 to 0.1 mg ml <sup>-1</sup> concentration. |             |              |              |
|---|-------------|--------------|--------------|
| hSMC  |             |              |              |
| MWCNT dilution (mg ml <sup>-1</sup> )   | 0 h         | 24 h         | 72 h         |
| 0   | 1.15 ± 0.22 | 1.42 ± 0.084 | 2.21 ± 0.075 |
| 0.001   | 1.15 ± 0.22 | 1.27 ± 0.055 | 2.14 ± 0.076 |
| 0.01  | 1.15 ± 0.22 | 1.17 ± 0.029 | 1.62 ± 0.127 |
| 0.1   | 1.15 ± 0.22 | 1.13 ± 0.129 | 1.61 ± 0.044 |

*Tab. 6: la coltura cellulare hSMC, è stata trattata con MWCNT, aggiunti al mezzo di coltura alle concentrazioni da 0.001 a 0.1 mg/ml<sup>-1</sup>, dopo 24 e 72 ore dall'inizio dell'esperimento.*

### 6.1.2 Effetti generali del trattamento in VIVO in acuto

Il test di Irwin non ha evidenziato significativi effetti neurovegetativi o comportamentali da infusione di MWCNT alle dosi testate (10, 20, 40 mg/kg<sup>-1</sup> peso corporeo), con l'eccezione di una lieve riduzione della spontanea attività immediatamente dopo l'inoculazione, probabilmente a

seguito dell'irritazione peritoneale conseguente all'anestesia e all'inoculazione della soluzione. Alle dosi più alte ( $40 \text{ mg kg}^{-1}$ ), gli animali hanno mostrato, entro 30 minuti, un colorito violaceo delle borse scrotali che è scomparso nelle ore successive. Nei 7 giorni dopo l'intervento è stato osservato il decesso di un animale trattato a  $40 \text{ mg/kg}^{-1}$  e uno nel gruppo a  $20 \text{ mg/kg}^{-1}$ . Nessun animale è deceduto nel gruppo di controllo. La mortalità totale è riportata nella Tab. 7.

*Tab. 7: mortalità nei 7 giorni dopo l'intervento. E' stato osservato il decesso di un animale trattato a  $40 \text{ mg/kg}^{-1}$  (33%) e uno (20%) nel gruppo trattato a  $20 \text{ mg/kg}^{-1}$ . Nessun animale è deceduto nel gruppo di controllo.*

| Dose ( $\text{mg kg}^{-1}$ i.p.) | Animals dead (%) |
|----------------------------------|------------------|
| 10                               | 0                |
| 20                               | 20               |
| 40                               | 33               |

Il peso degli animali dopo un periodo di 7 giorni è aumentato in tutti i gruppi, sebbene ciò è stato più evidente nel gruppo di controllo (Tab. 8). Tutti gli animali sono stati pesati al settimo giorno e quindi sacrificati. Un basso aumento di peso è stato osservato nel gruppo tratto con MWCNT  $10 \text{ mg/kg}^{-1}$ . Nella Tab. 8 è documentato il mancato incremento di peso nei gruppi trattati con MWCNT  $20$  e  $40 \text{ mg/kg}^{-1}$ .

*Tab. 8: media dei pesi all'inizio del trattamento e dopo 7 giorni.*

| Dose ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) | Body weight ( $\text{g} \pm \text{SE}$ ) |                |                |                |
|------------------------------|--|----------------|----------------|----------------|
|                              | Controls                                 |                | Treated        |                |
|                              | $G_0$                                    | $G_7$          | $G_0$          | $G_7$          |
| 10                           | $30.4 \pm 1.2$                           | $33.8 \pm 1.3$ | $29.2 \pm 0.6$ | $31.6 \pm 1.0$ |
| 20                           | $30.7 \pm 1.1$                           | $33.9 \pm 1.4$ | $32.6 \pm 2.1$ | $32.8 \pm 2.1$ |
| 40                           | $30.5 \pm 0.2$                           | $34.0 \pm 0.1$ | $27.9 \pm 0.9$ | $29.9 \pm 1.6$ |

L'esame necroscopico dei visceri è sembrato apparentemente normale, sia per quanto riguarda il colorito, che per la conformazione degli organi, a tutte le dosi sperimentate. I topi trattati con la

dose di 40 mg/kg<sup>-1</sup> hanno mostrato una peritonite adesiva, coinvolgente tutti i visceri della cavità addominale, ma non si sono osservate modificazioni patologiche, né nelle cavità pleuriche né in quella pericardica. Tutte le membrane adese tra loro mostravano la presenza di aggregati di MWCNT. Tutte le anse intestinali e gli organi parenchimatosi erano tra loro adesi, e si potevano osservare aggregati di MWCNT di color nero. Il peritoneo era opaco. Alla dose di 10 mg/kg<sup>-1</sup> gli animali hanno mostrato una leggera irritazione peritoneale coinvolgente i visceri cavi senza deposizione, microscopicamente osservabile di aggregati di MWCNT. Non sono stati osservati segni di modificazione patologica né nel pericardio né nelle pleure. Infine alla dose di 20 mg/kg<sup>-1</sup> abbiamo osservato una peritonite adesiva diffusa, ma meno aggressiva di quella al dosaggio 40 mg/kg<sup>-1</sup> e non si sono osservati aggregati MWCNT.

Immunological markers for both A-group and B-group mice, showing the absence of antigenic reactions.

| A-treated |     | B-control |     |
|-----------|-----|-----------|-----|
| ANA       | Neg | ANA       | Neg |
| AMA       | Neg | AMA       | Neg |
| ASMA      | Neg | ASMA      | Neg |
| Antiret   | Neg | Antiret   | Neg |
| APG       | Neg | APG       | Neg |
| ENA       | Neg | ENA       | Neg |
| NDNA      | Neg | NDNA      | Neg |

*Tab. 9: media dei pesi all'inizio del trattamento e dopo 7 giorni.*

### 6.1.3 Valutazione immunologica

All'interno dei limiti tecnici e di tempo osservazionale, i marcatori immunologici: ANA (anti-nuclear antibody), AMA (anti-mitochondrial antibody), ASMA (anti-smooth muscle antibody), Antiret (anti-reticolin antibody), APG (anti-gastric wall antibody), ENA (extractable anti-nuclear antigen), NDNA e (native deoxyribonucleic acid), sono risultati negativi sia nel gruppo A, trattato solamente con solvente, sia nel gruppo B trattato con MWCNT e solvente alla concentrazione di 10 mg/pro kg di peso corporeo. Non abbiamo osservato alcuna reazione antigenica, come riportato in

Tab. 9. Non sono state osservate modificazioni dei livelli di immunoglobuline né della immunità umorale.

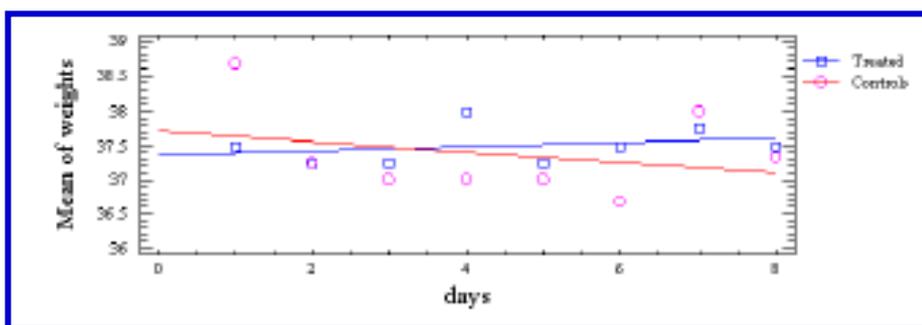
*Fig. 112: (A) intensa congestione dei setti alveolari, bolle enfisematose, atelectasia alveolare, emorragia endoalveolare, inondazione degli alveoli da parte di globuli rossi, ispessimento dei setti alveolari. (B) Vacuolizzazione del 60% dei glomeruli renali. Presenza di cilindri nei tubuli renali. (C) necrosi intestinale massiva, necrosi muscolare con residua area pigmentata (MWCNT). (D) reazione a cellule granulomatose giganti nel sito di impianto sotto la fascia muscolare, connesse a deposito di fibrina nel sito di impianto di 20mg di polvere di MWCNT.*

#### **6.1.4 Effetti generali in vivo dopo somministrazione ripetuta**

Il trattamento con  $5 \text{ mg/kg}^{-1}$  i.p. con MWCNT per 7 giorni, non ha prodotto effetti sul comportamento o mortalità nel topo. Il peso corporeo è rimasto invariato in tutti gli animali dopo 7 giorni di trattamento. L'esame necroscopico, eseguito dopo sacrificio per inalazione di  $\text{CO}_2$ , ha mostrato deposizioni intraperitoneali diffuse di aggregati di MWCNT e varie adesioni tra la superficie epatica e i visceri cavi adiacenti. Il fegato ha mostrato struttura disomogenea. Gli animali di controllo sono stati assolutamente normali all'esame necroscopico, ad eccezione di uno, il cui fegato ha mostrato noduli biancastri.

#### **6.1.5 Analisi statistica**

La valutazione statistica è stata eseguita con software Statgraphics Plus 4.1 PC. Abbiamo studiato la regressione lineare sulle variazioni di peso a confronto per 2 gruppi di topi. Il gruppo trattato ha ricevuto MWCNT e solvente alla concentrazione di  $5 \text{ mg/kg}$  di peso corporeo, somministrato giornalmente per via intraperitoneale per 7 giorni. Il gruppo di controllo ha ricevuto soltanto il solvente alla concentrazione di  $5 \text{ mg/kg}$  di peso nello stesso modo. Anche se i risultati non sono significativi, è possibile osservare che il gruppo dei trattati ha avuto un trend positivo giornaliero di  $0.03 \text{ gr}$  ed il gruppo di controllo ha avuto un decremento giornaliero del peso corporeo di  $0.77 \text{ gr}$ . (vedi Fig. 113).



*Fig. 113: il profilo del diagramma del peso medio del gruppo “trattati” è incrementale, mentre la media dei pesi nel gruppo “controlli” ha avuto un profilo decrementale.*

### 6.1.6 Test di impianto di MWCNT in polvere

Il primo ratto è deceduto entro 180 minuti. L’esame necroscopico ha mostrato un edema polmonare acuto ed una reazione pleurica con versamento pleurico. In una successiva esperienza, vari mesi e varie pubblicazione dopo, abbiamo somministrato a ratti da 400 g, un nuovo mezzo di contrasto contenente MWCNT ed abbiamo osservato nuovamente, all’esame istologico, un quadro di polmonite acuta interstiziale persistente su 2 soggetti di cui uno sacrificato in 7a giornata e l’altro sacrificato in 30a giornata, senza alcuna remissione al passare del tempo. Dovrebbe esserci una connessione tra queste osservazioni, come se il polmone fosse un organo bersaglio, in caso di somministrazione di MWCNT ad alto dosaggio. Abbiamo osservato inoltre, ischemia del miocardio e necrosi cerebrale. Il sito di impianto è stato caratterizzato da una moderata reazione infiammatoria. Il secondo soggetto dell’esperimento è sopravvissuto. In settima giornata, è stato pesato, sacrificato e sottoposto a dissezione, esame necroscopico e prelievi anatomopatologici. Abbiamo osservato la normalità delle pleure, del cuore, del pericardio, dell’addome e della sierosa peritoneale. Il sito di impianto ha mostrato una moderata reazione infiammatoria e fibrotica.

### 6.1.7 Risultati dello studio istopatologico PRIMO esperimento

Nel parenchima polmonare è stata evidenziata una intensa congestione, la rottura dei setti alveolari, bolle enfisematose, intense congestione con atelectasia polmonare, stravasamento endoalveolare, riempimento alveolare con cellule rosse, ispessimento dei setti alveolari E di MWCNT (vedi Fig. 112A). Il parenchima renale mostra alterazione degli organi filtranti, vacuolizzazione della componente filtrante nel 60% dei glomeruli renali, presenza di MWCNT dentro i tubuli (vedi Fig. 112B). La parete del colon mostra diffusa e massiva necrosi a tutto spessore, necrosi muscolare con aree di pigmento residuo dovuto alla presenza di MWCNT all'interno delle aree di necrosi muscolare (vedi Fig. 112C). Il sito di impianto dei ratti mostra reazione gigante cellulare granulomatosa con globuli rossi e granulociti che circondano una sorta di cavità (vedi Fig. 112D). Nel tessuto sottocutaneo sotto la fascia muscolare si osserva una formazione pseudo cistica circondata da reazione gigante cellulare granulomatosa con presenza di necrosi e depositi di fibrina conseguenti all'impianto di 20 mg di polvere di MWCNT. E' stata osservata infine la necrosi massiva dei tubuli seminiferi testicolari.

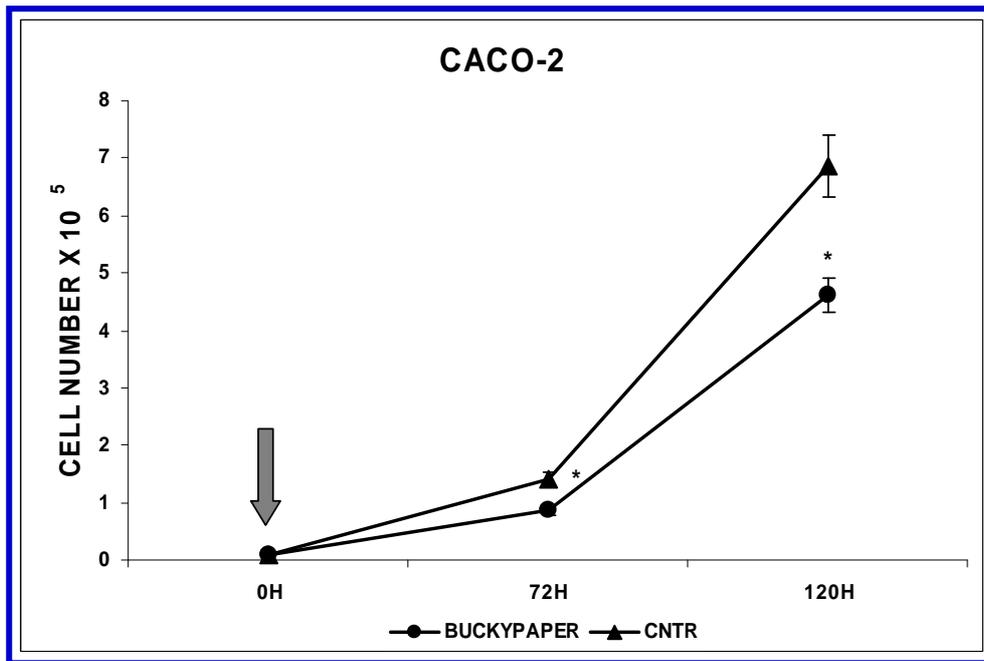
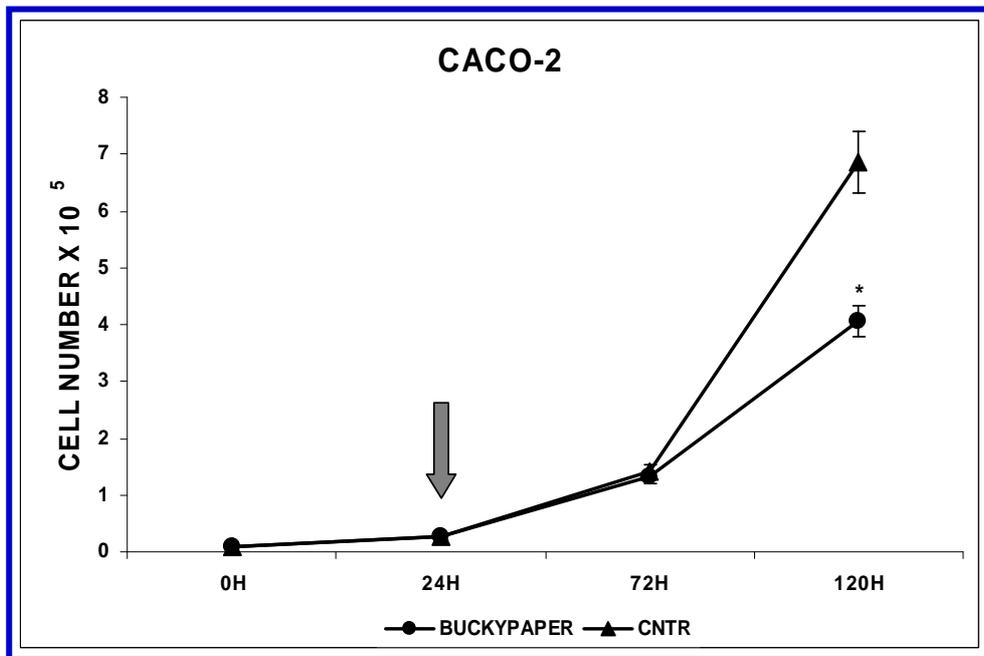
## 6.2- Risultati SECONDO esperimento

### 6.2.1 Risultati in VITRO

I frammenti da 0,1 cm<sup>2</sup> di BP depositati nelle capsule delle colture cellulari di **Caco-2** hanno determinato una significativa riduzione della proliferazione cellulare in confronto ai controlli e la riduzione della velocità di crescita è stata più evidente nell'osservazione a 120 ore (vedi Figg. 114 A e B). Le colture cellulari de adenocarcinoma mammario **MCF-7** hanno subito una significativa riduzione della velocità di crescita a causa della presenza dei frammenti di BP rispetto ai controlli. Comunque, la presenza dei frammenti di BP al T0 produce una maggiore inibizione della velocità di crescita rispetto alle colture in cui il BP viene aggiunto a T24 (vedi Figg. 115 A e B). Sia nelle colture Caco-2 che MCF-7 non è stata osservata una differenza statisticamente significativa fra le conte eseguite con il Coulter cell counter e le conte eseguite con il sistema di controllo, l'emocitometro di Thoma dopo colorazione vitale con Trypan Blue ed il metodo di esclusione. I frammenti da 0,1 cm<sup>2</sup> di BP collocati nelle capsule delle colture delle linee cellulari **HL-60** al T<sub>0</sub>

hanno determinato la completa inibizione della crescita al confronto con le colture (*vedi Figg. 116 A, B e C*) Inoltre, la vitalità cellulare della linea HL-60 era ridotta al 30% del numero totale delle cellule determinato con l'emocitometro di Thoma dopo colorazione con Trypan Blue (*vedi Figg. 116 C e 122*). Inoltre, l'aggiunta in coltura dei frammenti da 0,1 cm<sup>2</sup> di BP al T24 ha determinato una riduzione statisticamente significativa della proliferazione cellulare osservata alle 72 ore, e una completa inibizione della crescita cellulare a 120 ore (*vedi Fig. 122*). L'introduzione di frammenti da 0,1 cm<sup>2</sup> di BP nelle colture cellulari **HA-SMC** (*vedi Figg. 117 A e B*). e **HF** (*vedi Figg. 118 A e B*) non ha prodotto alcuna modificazione ne sulla proliferazione cellulare ne sulla vitalità cellulare, a confronto con i controlli, in entrambe le colture.

.

**A****B**

*Figg. 114 A e B: (A) mostra una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) nella proliferazione della linea cellulare Caco-2 al T0 ed al T24 FIG.6 (B) a causa della presenza del BP depositato sul fondo della capsula contenente la coltura cellulare, confrontata con la proliferazione delle colture cellulari di controllo analizzata con il t-test di Student per dati non appaiati.*

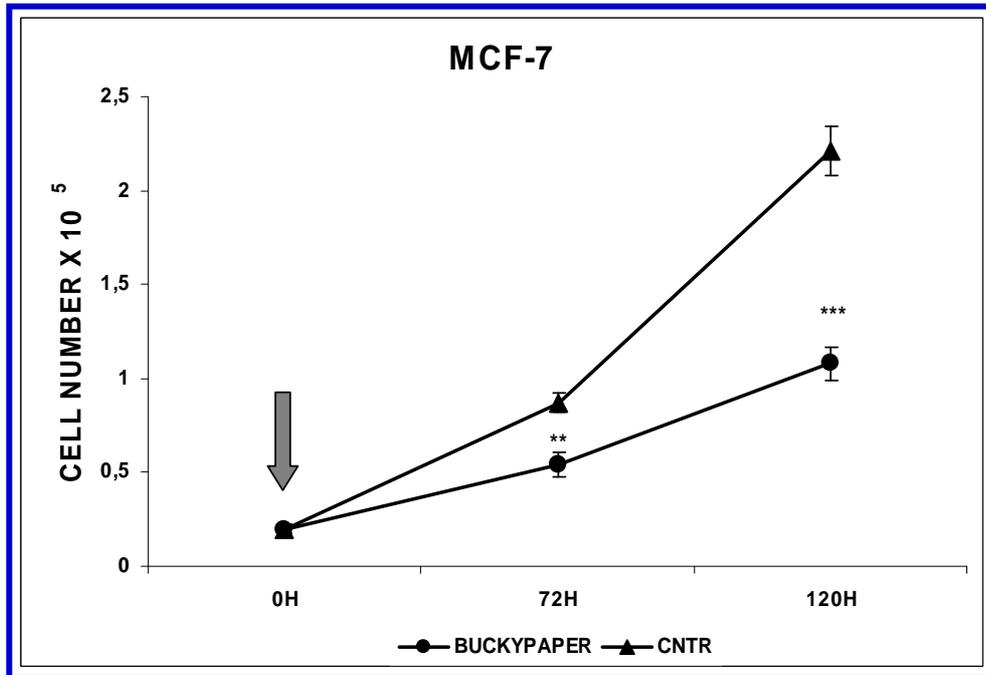
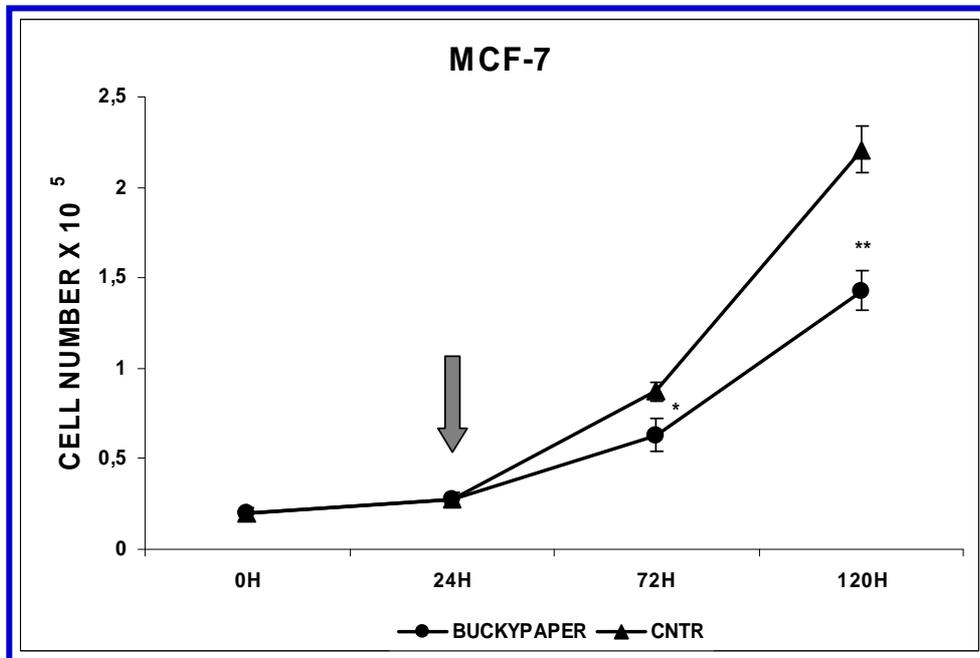
**A****B**

Fig. 115 A e B: una riduzione della velocità di crescita statisticamente significativa ( $*p<0.05$ ;  $**p<0.01$ ;  $***p<0.001$ ) è stata osservata anche nelle colture della linea cellulare MCF-7 al T0 (Fig.115 A) e al T24 (Fig.115 B) a causa della presenza del BP a confronto diretto con le colture cellulari di controllo senza BP analizzata con il t-test di Student per dati non appaiati.

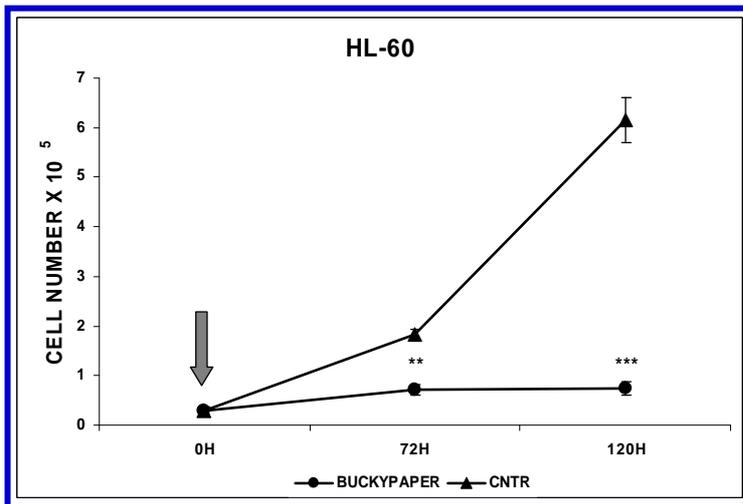
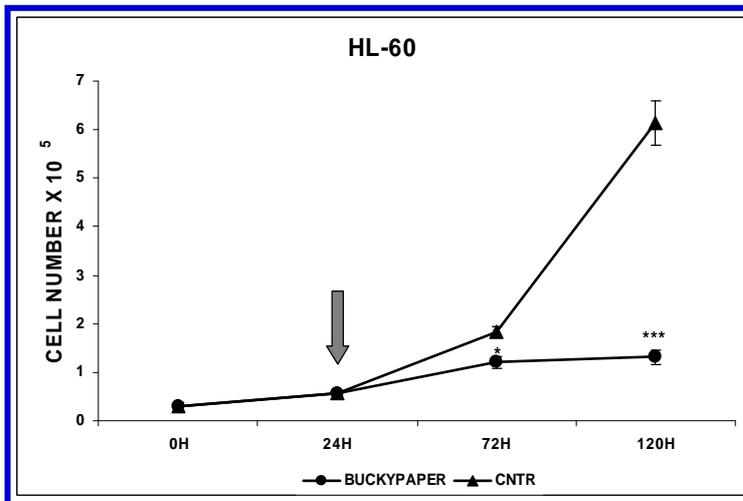
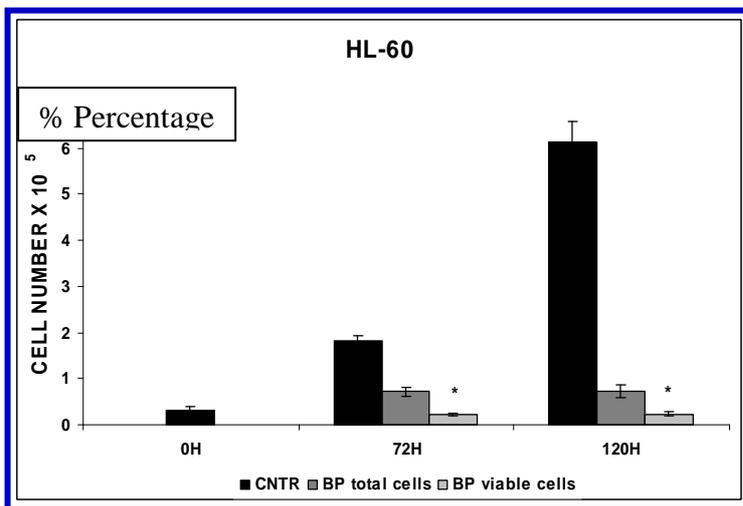
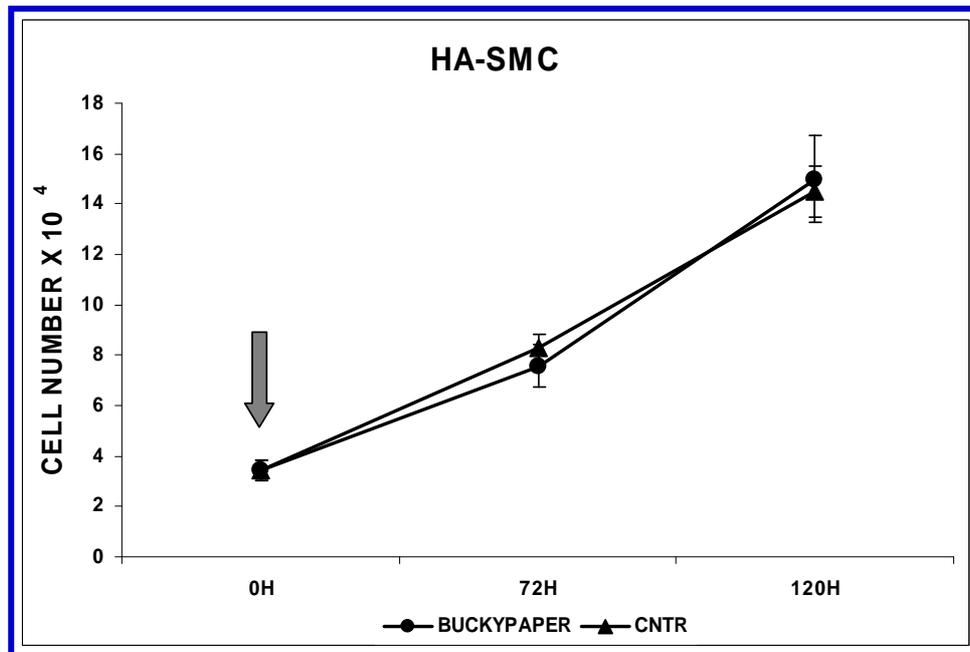
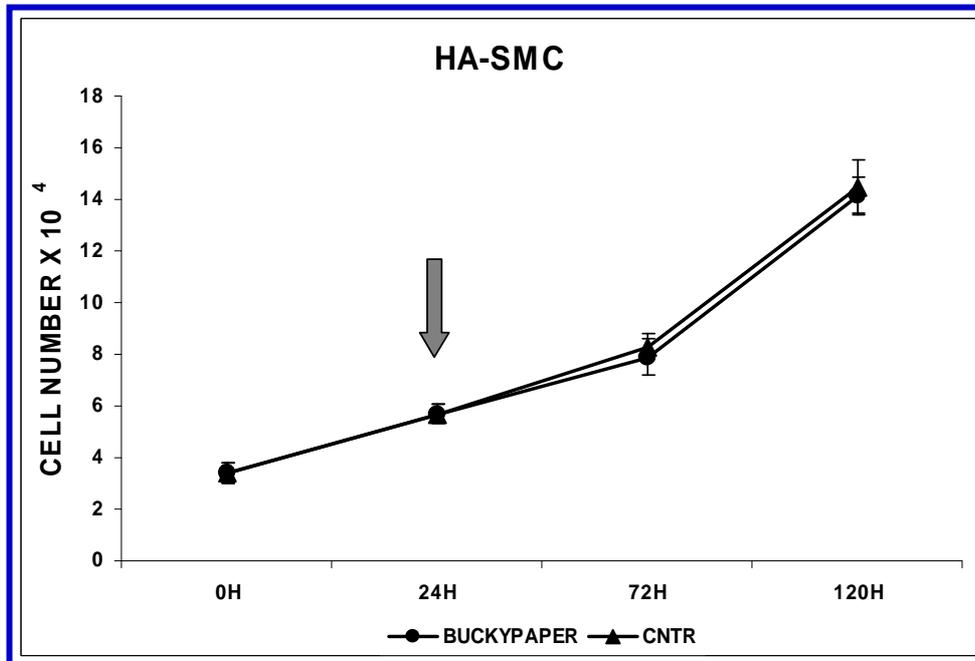
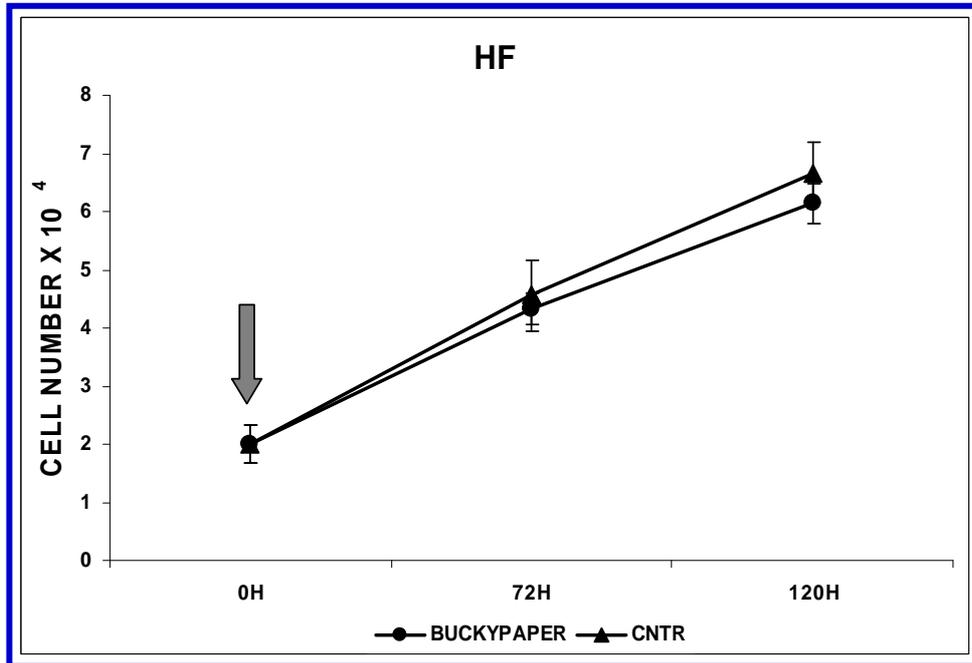
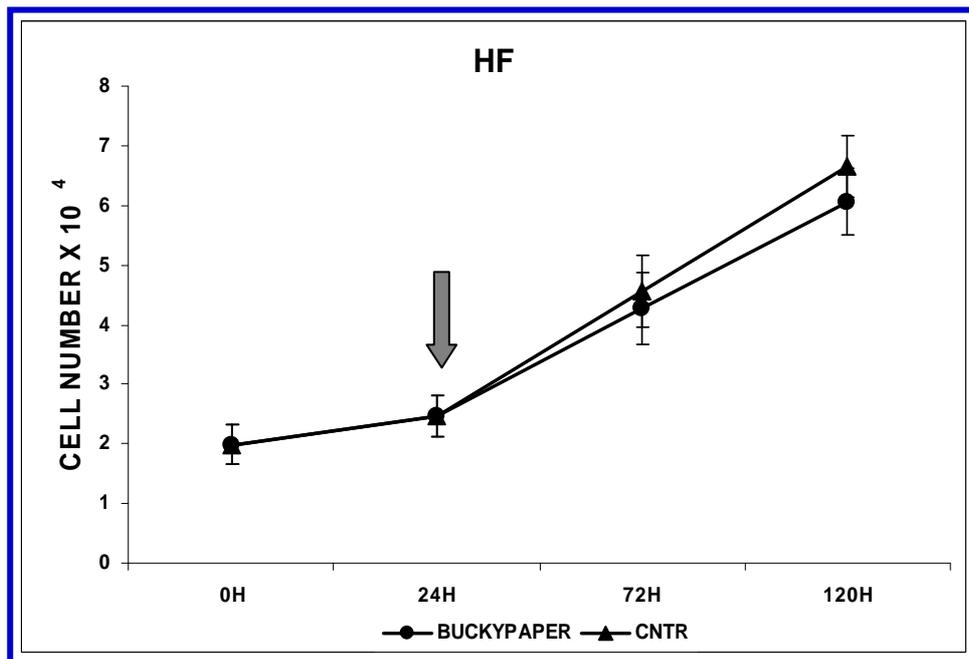
**A****B****C**

Fig. 116A, 116B, 116C: Studio della proliferazione della linea cellulare HL-60, il BP posizionato sul fondo delle capsule contenenti le colture cellulari, osservate al T0 (Fig.116 A) e al T24 (Fig.116 B), a confronto con le colture di controllo prive del BP, le colture contenenti il BP hanno mostrato una riduzione della velocità di crescita che è risultata all'analisi statistica, altamente significativa (\* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ ; \*\*\* $p < 0.0001$ ). La Fig.116 C rappresenta il test sulla vitalità delle colture della linea cellulare HL-60 in presenza di BP. analizzata con il t-test di Student per dati non appaiati.

**A****B**

*Figg. 117 A e B: la presenza del BP nelle colture cellulari delle linee cellulari native non hanno evidenziato segni documentabili di citotossicità o riduzioni statisticamente significative nella velocità di proliferazione delle colture cellulari di cellule sane HA-SMC.*

**A****B**

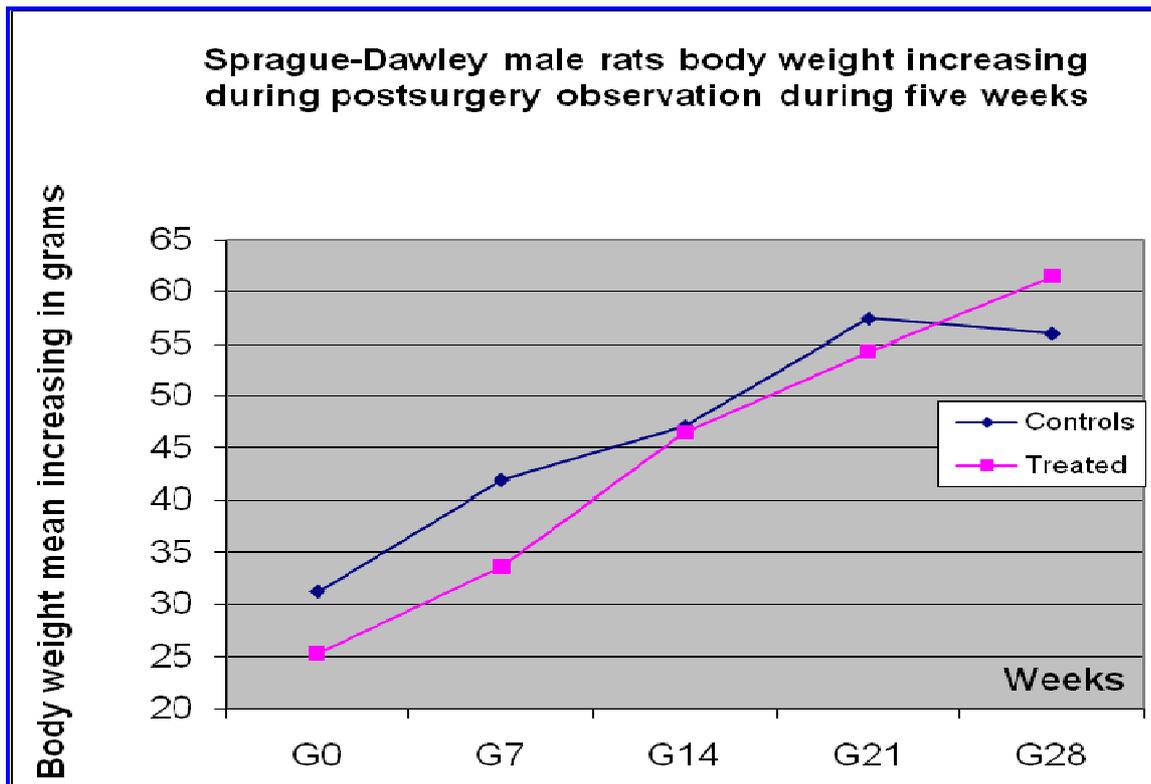
*Fig. 118 A e B: la presenza del BP nelle colture cellulari delle linee cellulari native non hanno evidenziato segni documentabili di citotossicità o riduzioni statisticamente significative nella velocità di proliferazione delle colture cellulari di cellule sane HF come sintetizzato nelle Fig. 118 A e B.*

## 6.2.2 Sperimentazione in VIVO: effetti generali

Il test di Irwin [23] non ha documentato alcuna modificazione dello stato neurovegetativo o effetti sul normale comportamento ed attività animale a seguito dell'impianto di BP, ad eccezione di una moderata riduzione dell'attività spontanea immediatamente dopo l'intervento chirurgico, probabilmente a causa del perdurare degli effetti ipnotici dell'anestesia generale da poco subita. Gli animali sono stati alimentati con dieta standardizzata per roditori. Nessun animale, dei gruppi trattati e controlli, è deceduto. I dati sono riportati in Tab. 10. Il peso corporeo degli animali è stato valutato al 7°, 14°, 21°, 28°, 35° giorno ed è aumentato in entrambi i gruppi, anche se maggiormente nel gruppo di controllo.

Tab. 10: peso corporeo dei soggetti al ( $G_0$ ) e dopo 7, 14, 21, 28, 35 giorni dopo l'intervento chirurgico.

| <i>Animals body weight (g)</i> |       |          |          |          |          |                 |       |          |          |          |          |
|--------------------------------|-------|----------|----------|----------|----------|-----------------|-------|----------|----------|----------|----------|
| Control animals                |       |          |          |          |          | Treated animals |       |          |          |          |          |
| $G_0$                          | $G_7$ | $G_{14}$ | $G_{21}$ | $G_{28}$ | $G_{35}$ | $G_0$           | $G_7$ | $G_{14}$ | $G_{21}$ | $G_{28}$ | $G_{35}$ |
| 268.2                          | 347.5 |          |          |          |          | 258.5           | 331.2 |          |          |          |          |
| 265.4                          |       | 375.1    |          |          |          | 263.1           | 334.7 |          |          |          |          |
| 266.6                          |       |          | 387.7    |          |          | 252.4           | 322.1 |          |          |          |          |
| 260.2                          |       |          |          | 411.8    |          | 270.8           | 345.2 |          |          |          |          |
| 263.1                          |       |          |          |          | 410.4    | 266.9           |       | 357.3    |          |          |          |
|                                |       |          |          |          |          | 249.7           |       | 348.0    |          |          |          |
|                                |       |          |          |          |          | 272.1           |       | 352.1    |          |          |          |
|                                |       |          |          |          |          | 268.6           |       |          | 372.1    |          |          |
|                                |       |          |          |          |          | 271.7           |       |          | 406.6    |          |          |
|                                |       |          |          |          |          | 258.7           |       |          | 414.7    |          |          |
|                                |       |          |          |          |          | 267.8           |       |          |          | 398.1    |          |
|                                |       |          |          |          |          | 269.9           |       |          |          | 422.7    |          |
|                                |       |          |          |          |          | 270.1           |       |          |          | 402.2    |          |
|                                |       |          |          |          |          | 255.1           |       |          |          | 406.5    |          |
|                                |       |          |          |          |          | 271.0           |       |          |          |          | 428.9    |
|                                |       |          |          |          |          | 257.3           |       |          |          |          | 413.0    |
|                                |       |          |          |          |          | 260.8           |       |          |          |          | 418.9    |
|                                |       |          |          |          |          | 256.0           |       |          |          |          | 447.2    |
|                                |       |          |          |          |          | 272.2           |       |          |          |          | 421.2    |
|                                |       |          |          |          |          | 273.0           |       |          |          |          | 436.8    |



*Fig. 119: variazione del peso corporeo in ratti maschi Sprague-Dawley all'inizio dell'osservazione ed al momento del sacrificio alla 7a, 14a, 21a, 28a, 35a giornata postoperatoria dall'impianto di BP nel gruppo dei Trattati e della rete di polipropilene nei Controlli. All'inizio della sperimentazione I due gruppi erano omogenei riguardo al dato del peso corporeo medio ( $p=0.9$ ), mentre alla fine del periodo osservazionale, la differenza di peso è diventata statisticamente significativa ( $t=0,0001$ ).*

*Fig. 120: superficie ruvida opaca del BP a diretto contatto con il piano fasciale. In superficie si osserva la superficie liscia e lucente.*

*Fig. 121: superficie liscia del BP a diretto contatto con il piano fasciale. In superficie si osserva la superficie ruvida opaca*

Ad ogni scadenza programmata con il cronoprogramma, abbiamo anestetizzato i soggetti, registrati i pesi corporei, eseguiti i prelievi ematochimici scegliendo i soggetti, nei due gruppi, sulla base di una tavola di randomizzazione. Sempre in anestesia generale, i soggetti venivano collocati in camera satura di CO<sub>2</sub> e sacrificati, per essere immediatamente sottoposti ad esame necroscopico e prelievo biotico di campioni di tutti i visceri.

### 6.2.3 Risultati del test di impianto del BP in VIVO

Il sito d'impianto è stato rimosso per lo studio anatomopatologico dopo il sacrificio del soggetto. Come si osserva nelle Figg. 120 e 121, l'aspetto delle due superfici del BP è chiaramente diverso perchè sono l'una opaca e ruvida Fig. 120, l'altra liscia e lucente e meno adesiva, Fig.121. All'esame necroscopico abbiamo documentato la normalità macroscopica di tutti i visceri, l'aspetto liscio e lucente del peritoneo parietale in prossimità degli impianti, l'assenza di adesioni visceroparietali in corrispondenza degli impianti ed una moderata fibrosi reattiva in corrispondenza del sito d'impianto, come da reazione da corpo estraneo, già osservata nel precedente esperimento. L'esame isologico, documenta una moderata reazione fibrosa da corpo estraneo e la formazione intorno al BP di una capsula fibrosa cicatriziale che lo ingloba e li isola, con una moderata reazione infiammatoria che non si estende al contesto degli strati tissutali ma resta confinata al sito d'impianto. I campioni tissutali sono stati fissati in Formalina al 4% tampone fosfato pH 7.6, per la successiva inclusione in paraffina e sezionati in fettine da 3 µm di spessore, colorate con Eosina-Ematossillina.

## 6.3- Risultati TERZO esperimento sulla mutagenicità

### 6.3.1 Risultati sulla mutagenicità

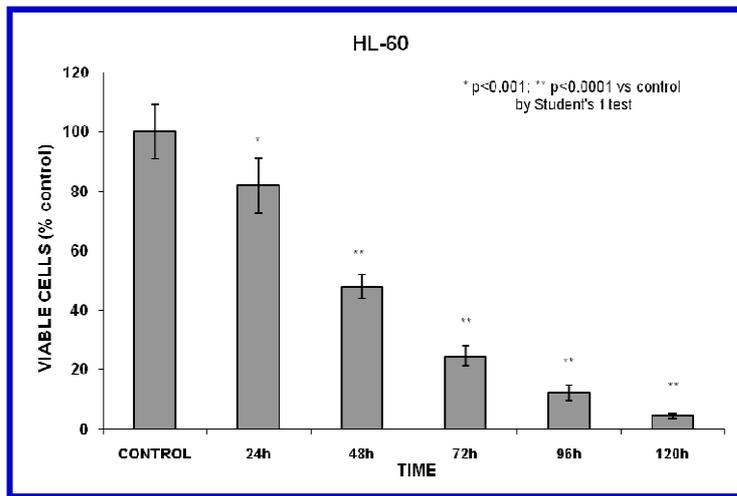
Nell'ambito delle concentrazioni saggiate (9.00, 4.60, 2.30 and 1.26 $\mu$ g/piatto), i MWCNT, non hanno indotto alcuna reazione citotossica, come ad esempio riduzione delle colonie ricombinanti e modificazione dello stato auxotrofico, nessuna riduzione nel numero delle colonie ricombinanti, nessun cambiamento nella crescita nel terreno di coltura (background lawn) in nessuna delle colonie, e sono persino risultati privi di tossicità ad ogni concentrazione testata (dati non pubblicati). Sulla base di tali dati, abbiamo eseguito i test sulla mutagenesi utilizzando un ampio ventaglio di concentrazioni, corrispondenti a: 9.00, 4.60, 2.30, 1.26, 0.46, 0.23, 0.13, 0.05 e 0.01 g/piatto. I MWCNT non hanno provocato l'aumento del numero di colonie ricombinanti di *S. typhimurium* TA 98 ne TA 100 neppure di *E. coli* WP2*uvrA*, sia in presenza che in assenza del sistema di attivazione metabolica (S9). Al contrario, 2NF, 2AA, SA e MMS hanno provocato l'incremento delle nuove colonie ricombinanti, modificando persino la frequenza di mutazione da circa 4 ad 8 volte a confronto con il solo veicolo, mostrando la capacità del sistema, di individuare l'effetto genotossico. Nel test su colonie TA 98, senza S9, abbiamo osservato anche la riduzione spontanea delle colonie ricombinanti in un ambito compreso tra 0.13 e 9.0 g/coltura. Questo effetto non è concentrazione dipendente e la riduzione è stata valutata nell'ordine del 35.8% (Tavola 2). Tale comportamento non è attribuibile ad un effetto citotossico dei MWCNT perché la sopravvivenza e il profilo di crescita batterica era sovrapponibile nelle colonie e nelle colture contenenti esclusivamente il veicolo. I danni causati dalla mutazione spontanea del DNA nelle colonie sono stati riconvertiti al tipo primitivo con uno specifico meccanismo di riparazione (mutazioni del modello nella sequenza CG), che non si verificano nelle colture TA 100 (sostituzione della base nella sequenza CG) e in WP2*uvrA* (sostituzione della base AT nella sequenza) [12-39]. Quindi, abbiamo ipotizzato che i MWCNT riducono selettivamente le ricombinazioni spontanee nelle colonie TA 98 con un meccanismo reversibile associato alla

sequenza GC [12]. L'inibizione delle ricombinazioni spontanee potrebbe esser dovuta alla stimolazione dei sistemi di riparazione [44-46] che potrebbero attivarsi oltre una dose soglia. In ogni caso, sulla base dei dati attualmente disponibili non è ancora possibile tirare delle conclusioni definitive perché sono ancora necessari ulteriori studi di analisi molecolare. In sintesi, assenza di attività mutagenica dei nanotubi di carbonio multiparete nel test di mutazione batterica ricombinante.

## 6.4- Risultati QUARTO esperimento sulla biocompatibilità

### 6.4.1 Risultati sulla biocompatibilità in VITRO

Le [Figg. 114 A e B](#) mostrano una riduzione statisticamente significativa ( $p < 0.01$ ) nella proliferazione della linea cellulare **Caco-2** al  $T_0$  ed al  $T_{24}$  a causa della presenza del BP sul fondo della capsula contenente la coltura cellulare, confrontata con la proliferazione delle colture cellulari di controllo. Una riduzione della velocità di crescita statisticamente significativa ( $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ ) è stata osservata anche nelle colture della linea cellulare **MCF-7** al  $T_0$ , [Figg. 115A](#) e al  $T_{24}$ , [Figg. 115B](#), a causa della presenza del BP a confronto diretto con le colture cellulari di controllo senza BP. Anche nel caso dello studio della proliferazione della linea cellulare **HL-60**, il BP posizionato sul fondo delle capsule contenenti le colture cellulari, osservate al  $T_0$  [Figg. 116A](#) e al  $T_{24}$ , [Figg. 116B](#), a confronto con le colture di controllo, prive del BP, hanno mostrato una riduzione della velocità di crescita che è risultata all'analisi statistica, altamente significativa ( $*p < 0.01$ ;  $**p < 0.001$ ;  $***p < 0.0001$ ). La [Figg. 116 C](#) rappresenta il test sulla vitalità delle colture della linea cellulare **HL-60** in presenza di BP. La [Fig. 122](#): rappresenta il test sulla vitalità monitorizzata per 120 ore di esposizione delle colture della linea cellulare HL-60 alla presenza del BP. Ogni punto rappresenta la media dei valori  $\pm$  la deviazione standard di tre diversi esperimenti eseguiti in duplicato con alta significatività statistica  $* p < 0.001$ ;  $**p < 0.0001$  ottenuta con il *t*-test di Student per dati non appaiati. La presenza del BP nelle colture cellulari delle linee native, non ha invece, evidenziato segni documentabili di citotossicità o riduzioni statisticamente significative nella velocità di proliferazione delle colture cellulari di cellule sane **HA-SMC**, dimostrata nelle [Figg. 117 A e B](#), e nemmeno nella linea cellulare **HF** come sintetizzato nelle [Figg. 118 A e B](#).



*Fig. 122: rappresentazione del test sulla vitalità monitorizzata per 120 ore di esposizione delle colture della linea cellulare HL-60 alla presenza del BP.*

#### 6.4.2 Risultati QUARTO esperimento sulla biocompatibilità in VIVO

Negli esperimenti in vivo *il test di Irwin*<sup>13</sup> non ha dimostrato effetti neurovegetative ne comportamentali su ratti maschi Sprague-Dawley ai quali è stato impiantato il BP, ad eccezione di una lieve riduzione della spontanea attività immediatamente dopo l'intervento chirurgico, probabilmente a causa dell'effetto dell'anestesia eseguita per puntura intraperitoneale. Nel corso del periodo osservazionale, dall'inizio, al termine, tutti gli animali hanno ricevuto una dieta standardizzata sia per qualità che per quantità. Non si è osservata mortalità nei due gruppi a confronto (controlli impiantati con polipropilene standard) ne trattati (impiantati con BP). Gli esami emato-chimici sull'azotemia ed elettroliti, emocromo, epatici e coagulazione sono stati eseguiti prima dell'intervento e prima del sacrificio al 7°, 14°, 21°, 28° e 35° giorno dopo l'intervento, sulla base della tavola di randomizzazione, per la scelta degli individui, e i risultati sono riportati in [Figg. 123, 124, 125, 126,127, 128, 129, 130](#). La rappresentazione dei risultati è stata fatta in modo da evidenziare la sovrapponibilità del comportamento metabolico per sistema biochimico. Gli elettroliti sono stati accoppiati alla creatinina per studiare l'emuntorio renale ([Figg. 127, 128](#)), gli enzimi epatici e la coagulazione per studiare le funzioni epatiche ([Figg. 129, 130](#)), l'emocromo per studiare gli effetti su midollo osseo e risposta immunitaria all'impianto ([Figg. 123, 124, 125](#)). All'inizio e prima di ogni prelievo sono stati rilevati i pesi corporei, la media dei quali è riportata in [Tab. 10 e Fig. 119](#). Al 7°, 14°, 21°, 28° e 35° giorno gli animali, scelti sulla base di una tabella di randomizzazione, sono stati sacrificati per coppie di cui uno del gruppo trattati ed uno del gruppo controllo, anestetizzati, pesati, eseguito il prelievo per puntura intracardiaca, e quindi venivano sacrificati. In [Tab. 10 e Fig. 119](#) si osserva che il peso corporeo è aumentato in entrambi i gruppi, maggiormente nel gruppo di controllo all'inizio e nel gruppo dei trattati, al termine del periodo osservazionale.

### 6.4.3 Risultati dei parametri ematochimici QUARTO esperimento biocompatibilità

Tab. 11: elaborazione dei risultati degli esami ematochimici

|            |          | Mean G0 | Mean G7 | Mean G14 | Mean G21 | Mean G28 |
|------------|----------|---------|---------|----------|----------|----------|
| GR         | Controls | 3,69    | -2,39   | -6,68    | -1,44    | 0,56     |
|            | Treated  | 3,29    | -3,93   | -6,33    | 0,88     | 7,23     |
| GB         | Controls | 209,47  | 20,95   | -7,10    | -11,33   | -56,76   |
|            | Treated  | 199,77  | 28,48   | -9,73    | -0,50    | -52,24   |
|            |          | Mean G0 | Mean G7 | Mean G14 | Mean G21 | Mean G28 |
| Hb         | Controls | -2,25   | 1,28    | -10,20   | 0,78     | 8,15     |
|            | Treated  | -0,43   | 1,14    | -11,29   | -1,06    | 54,56    |
| Hct        | Controls | -15,28  | 0,30    | -5,44    | -2,23    | 5,32     |
|            | Treated  | -8,69   | 0,05    | -6,61    | 2,32     | 0,61     |
| MCV        | Controls | -5,49   | 3,19    | 0,07     | 0,63     | 20,33    |
|            | Treated  | -10,48  | 4,58    | -0,05    | 0,23     | 1,91     |
| MCH        | Controls | -3,09   | 3,99    | 0,63     | 3,51     | 3,25     |
|            | Treated  | -2,11   | 3,90    | 0,24     | -0,97    | -2,14    |
| MCHC       | Controls | 14,78   | -0,06   | 0,00     | 1,25     | -14,25   |
|            | Treated  | 9,99    | 0,61    | 0,60     | 0,32     | -7,79    |
| RDW        | Controls | -3,60   | 8,30    | -2,48    | 0,43     | 17,04    |
|            | Treated  | -4,44   | 5,35    | -0,60    | 0,22     | -0,38    |
| plt        | Controls | 82,65   | 3,38    | -4,11    | -3,70    | -20,29   |
|            | Treated  | 60,40   | 7,03    | -8,05    | -0,45    | 6,23     |
| MPV        | Controls | 5,90    | -23,51  | 0,00     | 1,71     | 25,43    |
|            | Treated  | 9,06    | -22,50  | -0,10    | 3,04     | 20,41    |
| P-LCR      | Controls | 0,26    | -2,67   | 0,00     | 0,56     | 0,19     |
|            | Treated  | 4,09    | -3,76   | 0,17     | 0,66     | -1,13    |
| PDW        | Controls | -49,55  | 123,93  | -0,15    | 2,15     | -13,87   |
|            | Treated  | -47,03  | 126,15  | 0,03     | 0,26     | -10,79   |
| PCT        | Controls | 74,40   | -56,61  | -2,04    | 6,52     | 34,69    |
|            | Treated  | 90,90   | -54,69  | -0,85    | 0,87     | -0,77    |
|            |          | Mean G0 | Mean G7 | Mean G14 | Mean G21 | Mean G28 |
| neutrofili | Controls | 43,23   | -10,21  | -10,34   | -5,56    | -60,00   |
|            | Treated  | 46,91   | -16,24  | -8,94    | -8,26    | -35,02   |
| linfociti  | Controls | 110,08  | -48,03  | -4,70    | 0,15     | 139,58   |
|            | Treated  | 109,83  | -8,61   | -12,11   | 23,14    | 125,58   |
| monociti   | Controls | 301,40  | -90,44  | 23866,67 | 1,46     | -95,95   |
|            | Treated  | 301,80  | -89,82  | 23153,70 | -91,15   | -15,87   |
| basofili   | Controls | -66,65  | -43,33  | -11,11   | 530,89   | 690,91   |
|            | Treated  | -58,53  | -63,73  | 48,43    | 81,39    | 1328,26  |
| eosinofili | Controls | -90,51  | 713,73  | -0,44    | 1,14     | -5,95    |
|            | Treated  | -90,11  | 787,30  | -12,16   | 6,28     | 16,85    |
|            |          | Mean G0 | Mean G7 | Mean G14 | Mean G21 | Mean G28 |
| azotemia   | Controls | -3,35   | -26,12  | 73,48    | -11,90   | 33,33    |
|            | Treated  | -2,45   | -17,30  | 64,00    | 1,23     | 88,83    |
| glicemia   | Controls | 64,43   | 13,55   | 2,27     | 5,82     | -10,03   |
|            | Treated  | 161,97  | 9,04    | 3,25     | -11,85   | -10,34   |
| creatinina | Controls | -18,72  | 37,92   | 0,05     | -7,14    | -4,29    |
|            | Treated  | -28,53  | 59,62   | 8,07     | 4,05     | -46,85   |
|            |          | Mean G0 | Mean G7 | Mean G14 | Mean G21 | Mean G28 |
| potassio   | Controls | -4,95   | -4,25   | -15,77   | 10,78    | 18,75    |
|            | Treated  | 1,54    | 37,87   | -28,88   | 2,52     | 4,94     |
| sodio      | Controls | -1,08   | -0,22   | 0,36     | 2,59     | 1,44     |
|            | Treated  | 0,25    | 1,80    | -2,37    | 3,23     | 3,42     |
|            |          | Mean G0 | Mean G7 | Mean G14 | Mean G21 | Mean G28 |
| PT         | Controls | 4,64    | -14,35  | 1108,05  | 1,76     | -90,33   |
|            | Treated  | 2,51    | -13,74  | 1066,85  | 5,46     | -87,83   |
| PTT        | Controls | -6,47   | -1,00   | 4005,93  | 2,17     | -97,67   |
|            | Treated  | 2,63    | 1,08    | 4235,92  | -11,35   | -97,54   |
| fibrinog   | Controls | 1,60    | -3,54   | -28,98   | 7,09     | 60,84    |
|            | Treated  | 2,84    | -6,88   | -24,37   | -4,85    | 37,01    |
| INR        | Controls | 1,46    | 3,79    | -35,39   | -12,09   | 1439,31  |
|            | Treated  | -1,68   | 0,37    | -8,96    | 4,35     | 18,52    |
|            |          | Mean G0 | Mean G7 | Mean G14 | Mean G21 | Mean G28 |
| ast/got    | Controls | 1,90    | -1,88   | 0,00     | -0,97    | -12,50   |
|            | Treated  | 1,43    | 0,12    | 0,01     | 3,41     | -15,41   |
| alt/gpt    | Controls | 3,72    | -6,81   | 0,66     | -5,27    | -4,30    |
|            | Treated  | 6,77    | -6,70   | 0,13     | -2,86    | -6,30    |
| LDH        | Controls | 0,69    | 4,17    | 2,33     | -11,74   | -8,80    |
|            | Treated  | 0,64    | 2,13    | -0,02    | -5,69    | -8,77    |
| CPK        | Controls | 0,51    | -8,03   | 1,05     | -14,04   | 9,33     |
|            | Treated  | 0,62    | -7,96   | 0,00     | -9,35    | 18,23    |

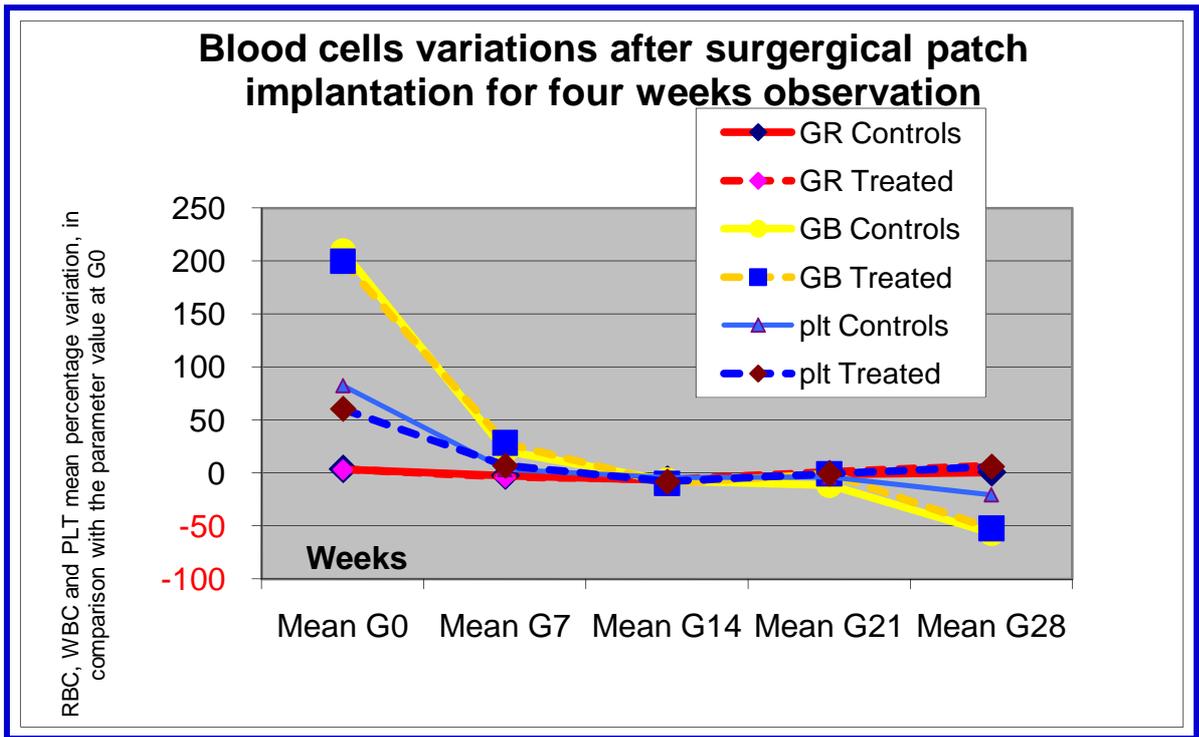


Fig. 123: variazione percentuale dei valori medi delle cellule ematiche.

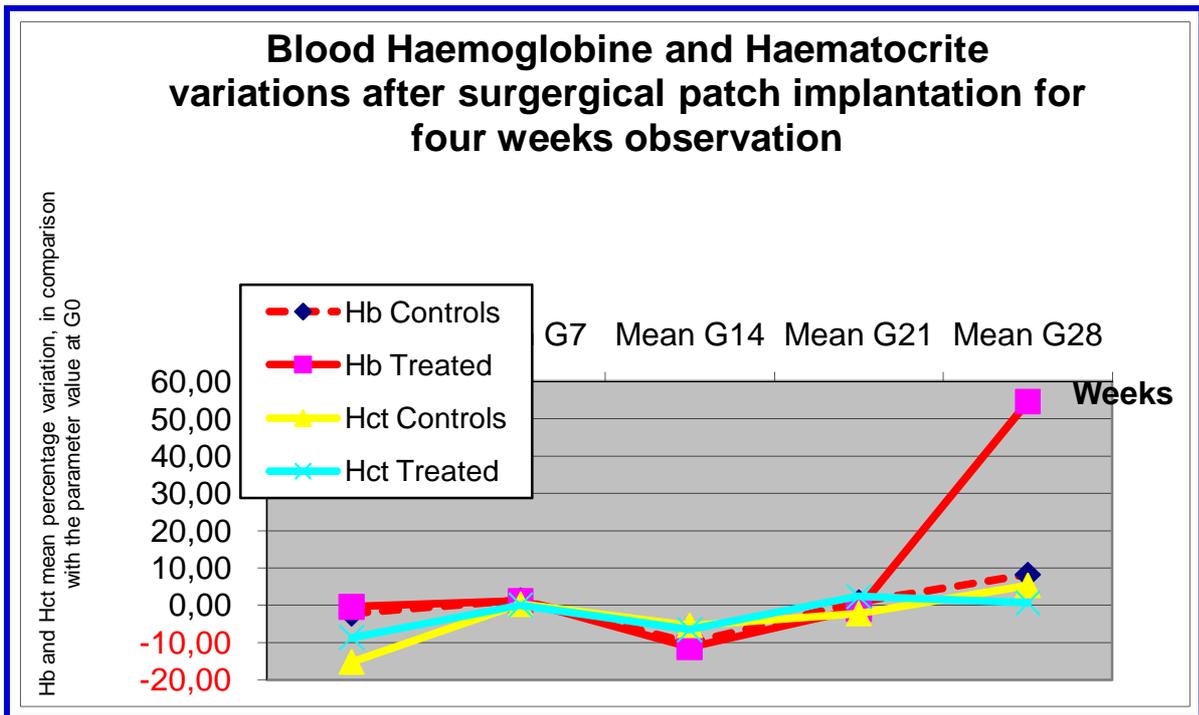


Fig. 124: variazione percentuale dei valori medi dell'emoglobina.

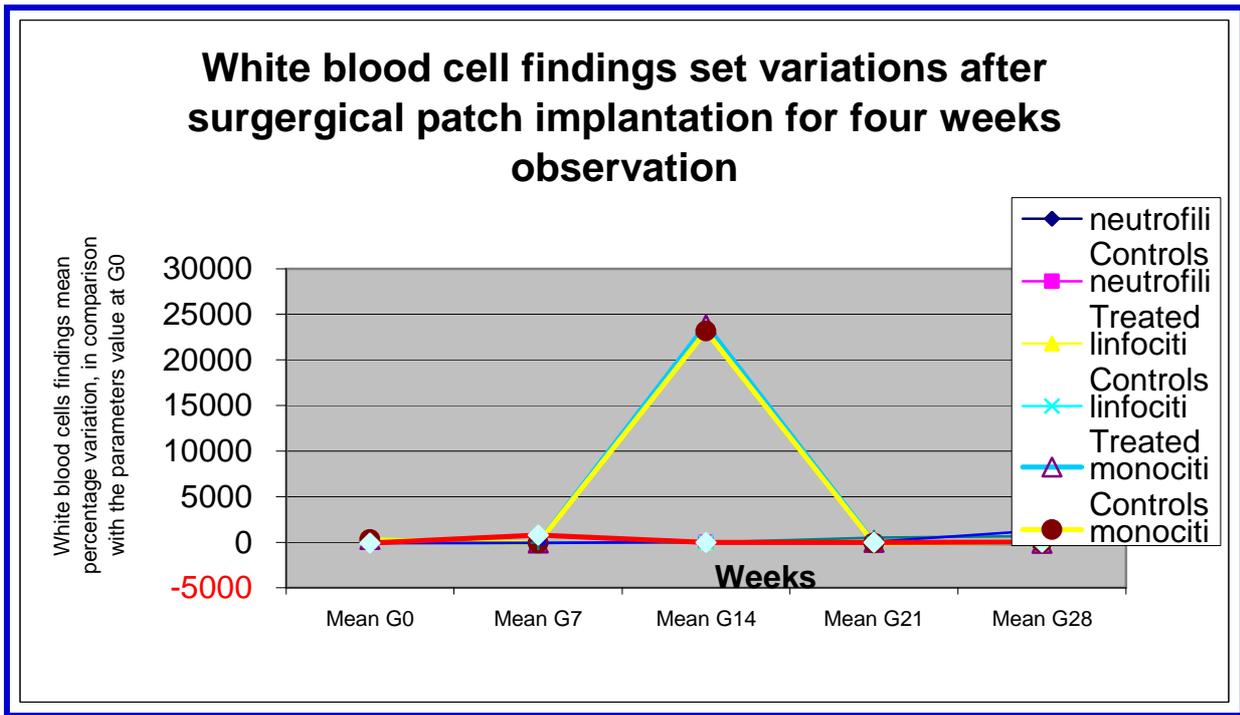


Fig. 125: variazione percentuale dei valori medi dei globuli bianchi.

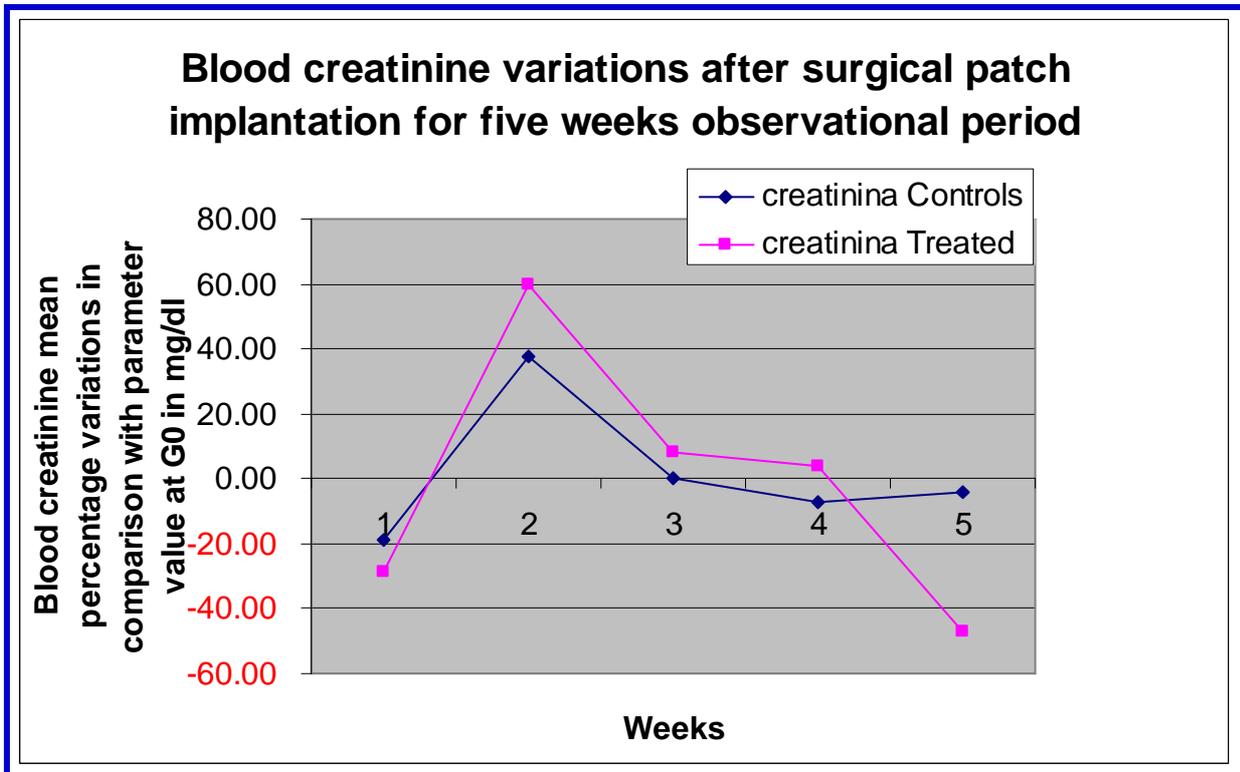


Fig. 126: variazione percentuale dei valori medi della creatininemia, nei controlli e trattati.

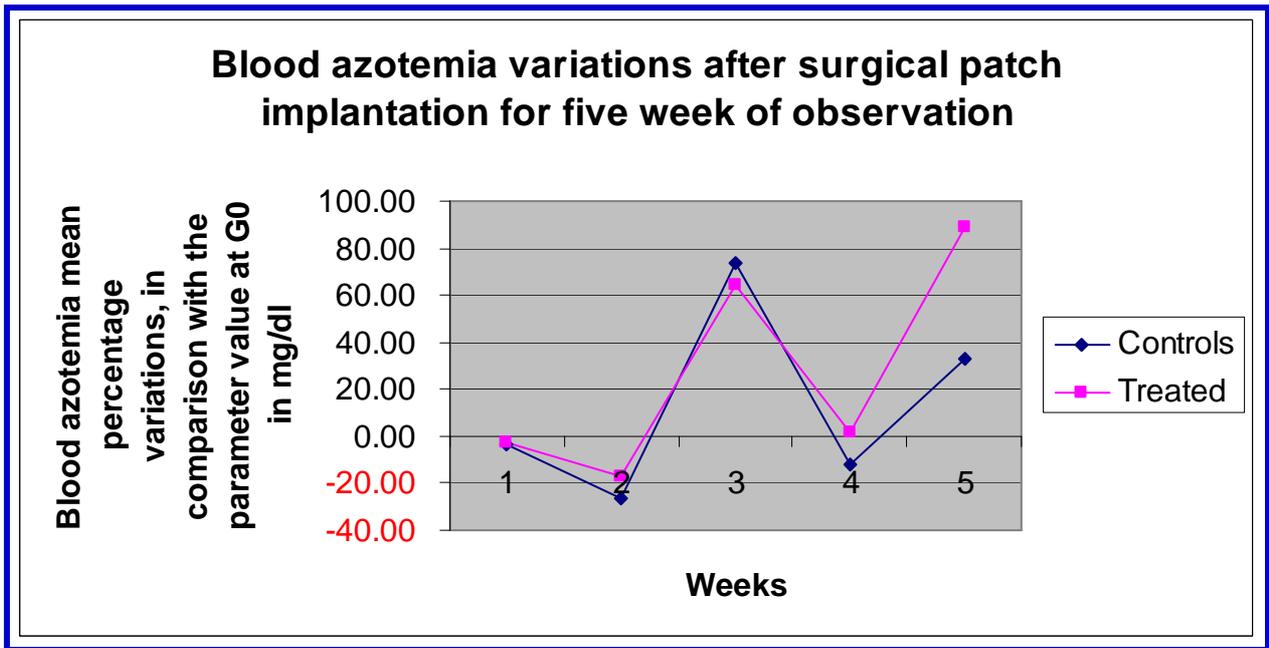


Fig. 127: variazione percentuale dei valori medi dell'azotemia, nei controlli e trattati.

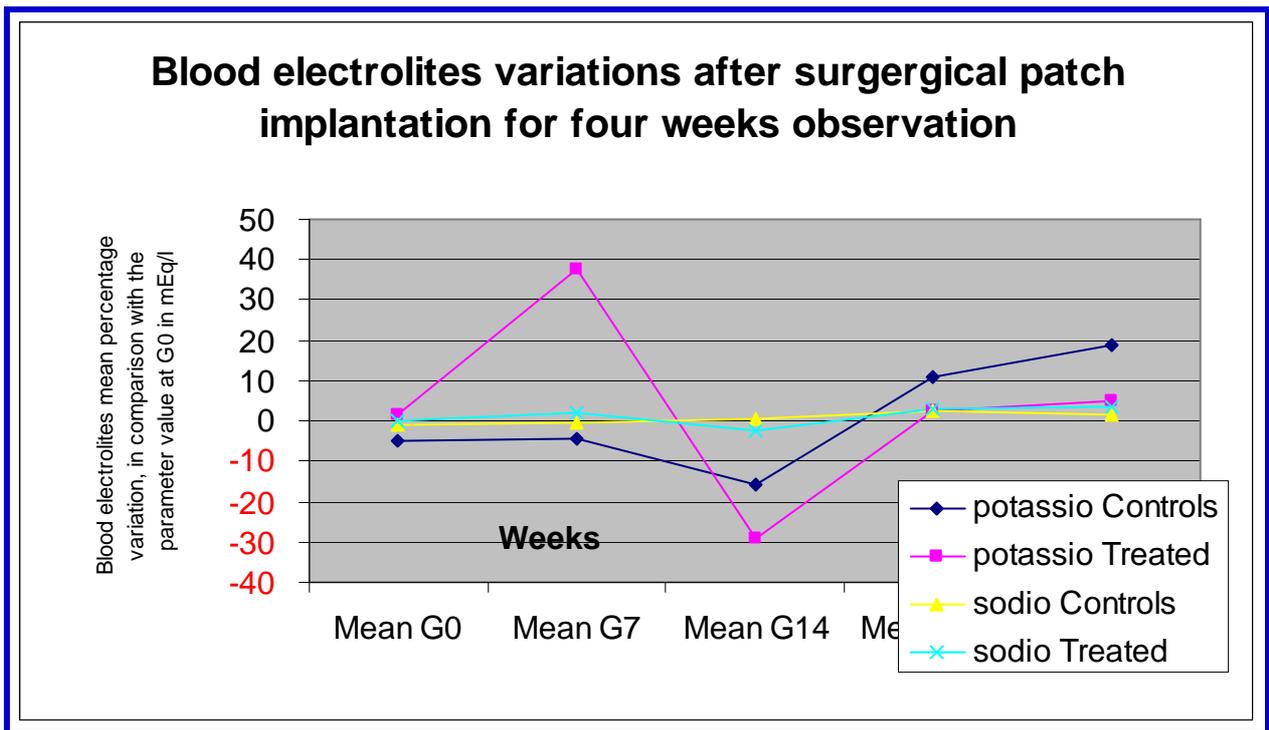


Fig. 128: variazione percentuale dei valori medi degli elettroliti, nei controlli e trattati.

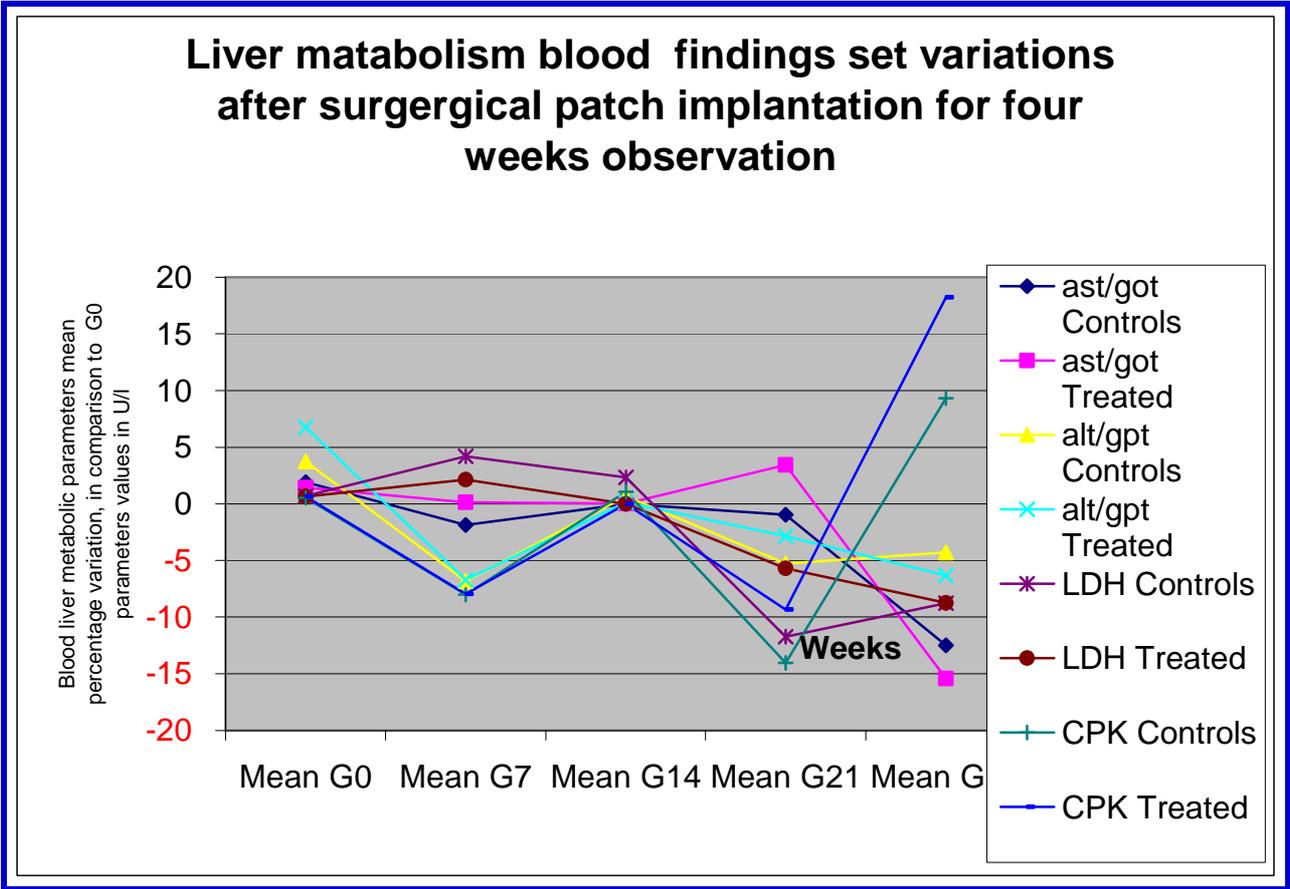


Fig. 129: variazione percentuale dei valori medi degli enzimi epatici, nei controlli e trattati.

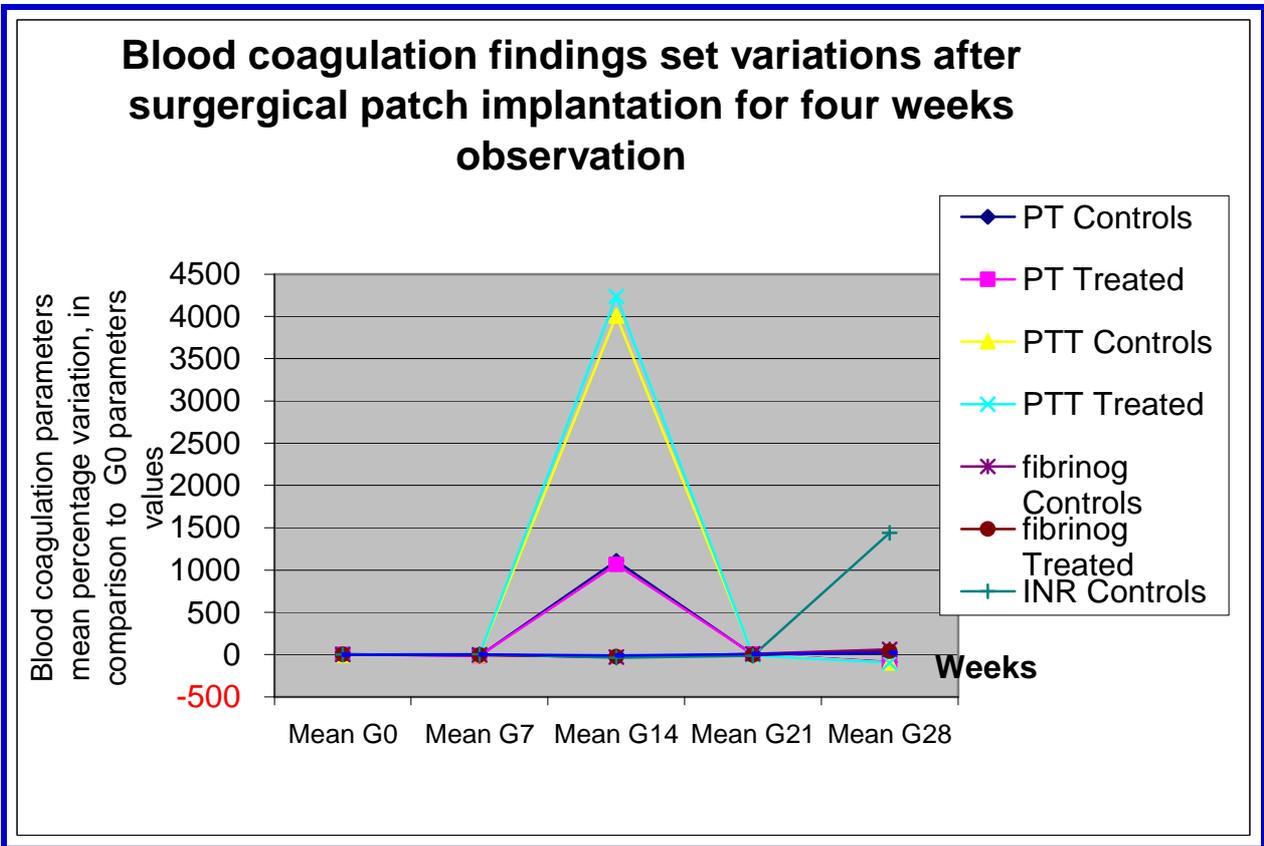


Fig. 130: variazione percentuale dei valori medi dell'assetto emocoagulativo, nei controlli e trattati.

#### 6.4.4 Risultati statistici QUARTO esperimento biocompatibilità. Analisi statistica delle determinazioni emato-chimiche

*Tavola 12: statistica descrittiva delle determinazioni emato-chimiche.*

| STATISTICA DESCRITTIVA DEI CAMPIONI |   |    |          |                |                 |
|-------------------------------------|---|----|----------|----------------|-----------------|
|                                     | T | N  | Mean     | Std. Deviation | Std. Error Mean |
| <b>GR</b>                           | 1 | 5  | 7.3020   | .09365         | .04188          |
|                                     | 2 | 16 | 7.3331   | .12716         | .03179          |
| <b>GB</b>                           | 1 | 5  | 2.3080   | .03421         | .01530          |
|                                     | 2 | 16 | 2.3200   | .05538         | .01384          |
| <b>Hb</b>                           | 1 | 5  | 14.1200  | .06557         | .02933          |
|                                     | 2 | 16 | 13.7656  | .64774         | .16194          |
| <b>Hct</b>                          | 1 | 5  | 47.2140  | .07197         | .03219          |
|                                     | 2 | 16 | 43.7313  | 1.16855        | .29214          |
| <b>MCV</b>                          | 1 | 5  | 57.6280  | .23994         | .10730          |
|                                     | 2 | 16 | 59.7988  | 2.70928        | .67732          |
| <b>MCH</b>                          | 1 | 5  | 19.1460  | .47374         | .21186          |
|                                     | 2 | 16 | 18.9056  | .50505         | .12626          |
| <b>MCHC</b>                         | 1 | 5  | 30.1640  | .13126         | .05870          |
|                                     | 2 | 16 | 31.5069  | .80288         | .20072          |
| <b>RDW</b>                          | 1 | 5  | 15.5560  | .23586         | .10548          |
|                                     | 2 | 16 | 16.2975  | .50743         | .12686          |
| <b>plt</b>                          | 1 | 5  | 451.7860 | 36.13388       | 16.15956        |
|                                     | 2 | 16 | 515.4081 | 37.00095       | 9.25024         |
| <b>MPV</b>                          | 1 | 5  | 6.5500   | .04848         | .02168          |
|                                     | 2 | 16 | 6.4388   | .13520         | .03380          |
| <b>P-LCR</b>                        | 1 | 5  | 5.4260   | .03578         | .01600          |
|                                     | 2 | 16 | 5.3511   | .05553         | .01388          |
| <b>PDW</b>                          | 1 | 5  | 15.6720  | .06099         | .02728          |
|                                     | 2 | 16 | 15.7081  | .37593         | .09398          |
| <b>PCT</b>                          | 1 | 5  | .3300    | .04950         | .02214          |
|                                     | 2 | 16 | .3025    | .05434         | .01359          |
| <b>neutrofilii</b>                  | 1 | 5  | 11.0940  | .58994         | .26383          |
|                                     | 2 | 16 | 11.3238  | .59326         | .14832          |
| <b>linfociti</b>                    | 1 | 5  | 37.7100  | .06819         | .03050          |
|                                     | 2 | 16 | 37.5019  | .24386         | .06097          |
| <b>monociti</b>                     | 1 | 5  | .9260    | .07701         | .03444          |
|                                     | 2 | 16 | .8863    | .04573         | .01143          |
| <b>basofili</b>                     | 1 | 5  | .3620    | .01924         | .00860          |
|                                     | 2 | 16 | .3148    | .03504         | .00876          |

|                   |   |    |           |           |          |
|-------------------|---|----|-----------|-----------|----------|
| <b>eosinofili</b> | 1 | 5  | .8420     | .02387    | .01068   |
|                   | 2 | 16 | .8250     | .03670    | .00917   |
| <b>azotemia</b>   | 1 | 5  | 41.8400   | 17.11397  | 7.65360  |
|                   | 2 | 16 | 31.2063   | 8.47431   | 2.11858  |
| <b>glicemia</b>   | 1 | 5  | 195.2000  | 103.12953 | 46.12093 |
|                   | 2 | 16 | 164.6875  | 48.06623  | 12.01656 |
| <b>creatinina</b> | 1 | 5  | .6580     | .01483    | .00663   |
|                   | 2 | 16 | .6900     | .08656    | .02164   |
| <b>magnesio</b>   | 1 | 5  | 3.6960    | .05367    | .02400   |
|                   | 2 | 16 | 3.6719    | .06337    | .01584   |
| <b>calcio t</b>   | 1 | 5  | 11.3800   | .14230    | .06364   |
|                   | 2 | 16 | 11.3025   | .06403    | .01601   |
| <b>fosforo</b>    | 1 | 5  | 8.0400    | .16733    | .07483   |
|                   | 2 | 16 | 8.0875    | .40146    | .10036   |
| <b>potassio</b>   | 1 | 5  | 6.1000    | .00000    | .00000   |
|                   | 2 | 16 | 5.5938    | .25158    | .06289   |
| <b>sodio</b>      | 1 | 5  | 139.2000  | .83666    | .37417   |
|                   | 2 | 16 | 137.5000  | 1.96638   | .49160   |
| <b>PT</b>         | 1 | 5  | .8220     | .01643    | .00735   |
|                   | 2 | 16 | .8313     | .00885    | .00221   |
| <b>PTT</b>        | 1 | 5  | .6140     | .04219    | .01887   |
|                   | 2 | 16 | .5513     | .03897    | .00974   |
| <b>fibrinog</b>   | 1 | 5  | 217.8000  | 3.27109   | 1.46287  |
|                   | 2 | 16 | 214.6250  | 2.96367   | .74092   |
| <b>INR</b>        | 1 | 5  | .9400     | .02828    | .01265   |
|                   | 2 | 16 | .9788     | .03757    | .00939   |
| <b>ast/got</b>    | 1 | 5  | 238.7400  | 1.95653   | .87499   |
|                   | 2 | 16 | 240.8250  | 1.57205   | .39301   |
| <b>alt/gpt</b>    | 1 | 5  | 73.8600   | 4.72790   | 2.11438  |
|                   | 2 | 16 | 71.8063   | 3.00787   | .75197   |
| <b>LDH</b>        | 1 | 5  | 1022.6200 | 1.89394   | .84699   |
|                   | 2 | 16 | 1022.9500 | 2.49640   | .62410   |
| <b>CPK</b>        | 1 | 5  | 3639.6000 | 36.16352  | 16.17282 |
|                   | 2 | 16 | 3630.2500 | 28.35607  | 7.08902  |
| <b>GR7</b>        | 1 | 5  | 7.5700    | .16538    | .07396   |
|                   | 2 | 16 | 7.5713    | .21469    | .05367   |
| <b>GB7</b>        | 1 | 5  | 7.1420    | .56953    | .25470   |
|                   | 2 | 16 | 6.9556    | .47269    | .11817   |
| <b>Hb7</b>        | 1 | 5  | 13.800    | .5244     | .2345    |
|                   | 2 | 16 | 13.681    | .4539     | .1135    |
| <b>Hct7</b>       | 1 | 5  | 40.000    | .7071     | .3162    |
|                   | 2 | 16 | 39.913    | 1.0455    | .2614    |
| <b>MCV7</b>       | 1 | 5  | 54.460    | 1.3759    | .6153    |

|                    |   |    |         |         |         |
|--------------------|---|----|---------|---------|---------|
|                    | 2 | 16 | 53.425  | 1.5813  | .3953   |
| <b>MCH7</b>        | 1 | 5  | 18.542  | .1653   | .0739   |
|                    | 2 | 16 | 18.494  | .2566   | .0641   |
| <b>MCHC7</b>       | 1 | 5  | 34.620  | .6380   | .2853   |
|                    | 2 | 16 | 34.631  | .6172   | .1543   |
| <b>RDW7</b>        | 1 | 5  | 14.992  | .9912   | .4433   |
|                    | 2 | 16 | 15.562  | .9489   | .2372   |
| <b>plt7</b>        | 1 | 5  | 821.31  | 3.525   | 1.576   |
|                    | 2 | 16 | 822.73  | 3.447   | .862    |
| <b>MPV7</b>        | 1 | 5  | 6.936   | .1484   | .0664   |
|                    | 2 | 16 | 7.019   | .1974   | .0494   |
| <b>P-LCR7</b>      | 1 | 5  | 5.440   | .3050   | .1364   |
|                    | 2 | 16 | 5.569   | .2387   | .0597   |
| <b>PDW7</b>        | 1 | 5  | 7.906   | .3310   | .1480   |
|                    | 2 | 16 | 8.319   | .6742   | .1686   |
| <b>PCT7</b>        | 1 | 5  | .5660   | .01517  | .00678  |
|                    | 2 | 16 | .5594   | .02462  | .00616  |
| <b>neutrofili7</b> | 1 | 5  | 15.760  | 2.9160  | 1.3041  |
|                    | 2 | 16 | 16.588  | 2.7837  | .6959   |
| <b>linfociti7</b>  | 1 | 5  | 79.22   | 2.116   | .946    |
|                    | 2 | 16 | 78.68   | 2.647   | .662    |
| <b>monociti7</b>   | 1 | 5  | 3.680   | .2280   | .1020   |
|                    | 2 | 16 | 3.547   | .2363   | .0591   |
| <b>basofili7</b>   | 1 | 5  | .12     | .110    | .049    |
|                    | 2 | 16 | .13     | .127    | .032    |
| <b>eosinofili7</b> | 1 | 5  | .0800   | .01414  | .00632  |
|                    | 2 | 16 | .0813   | .01025  | .00256  |
| <b>azotemia7</b>   | 1 | 5  | 32.86   | 4.532   | 2.027   |
|                    | 2 | 16 | 28.41   | 4.820   | 1.205   |
| <b>glicemia7</b>   | 1 | 5  | 272.00  | 44.311  | 19.817  |
|                    | 2 | 16 | 386.31  | 495.237 | 123.809 |
| <b>creatinina7</b> | 1 | 5  | .536    | .0921   | .0412   |
|                    | 2 | 16 | .488    | .1025   | .0256   |
| <b>magnesio7</b>   | 1 | 5  | 3.7820  | .11563  | .05171  |
|                    | 2 | 16 | 3.7644  | .12966  | .03242  |
| <b>calciot7</b>    | 1 | 5  | 11.2660 | .10262  | .04589  |
|                    | 2 | 16 | 11.3219 | .10336  | .02584  |
| <b>fosforo7</b>    | 1 | 5  | 7.7660  | .59454  | .26589  |
|                    | 2 | 16 | 7.8856  | .49006  | .12252  |
| <b>potassio7</b>   | 1 | 5  | 5.798   | .5201   | .2326   |
|                    | 2 | 16 | 5.669   | .3790   | .0947   |
| <b>sodio7</b>      | 1 | 5  | 137.70  | .758    | .339    |
|                    | 2 | 16 | 137.82  | 1.186   | .296    |

|                    |   |    |           |          |          |
|--------------------|---|----|-----------|----------|----------|
| <b>PT7</b>         | 1 | 5  | .8600     | .02739   | .01225   |
|                    | 2 | 16 | .8519     | .02562   | .00640   |
| <b>PTT7</b>        | 1 | 5  | .5720     | .05357   | .02396   |
|                    | 2 | 16 | .5638     | .05123   | .01281   |
| <b>fibrinog7</b>   | 1 | 5  | 221.20    | 9.039    | 4.042    |
|                    | 2 | 16 | 220.63    | 8.770    | 2.193    |
| <b>INR7</b>        | 1 | 5  | .9520     | .04438   | .01985   |
|                    | 2 | 16 | .9606     | .03803   | .00951   |
| <b>ast/got7</b>    | 1 | 5  | 243.2700  | 2.04683  | .91537   |
|                    | 2 | 16 | 244.2594  | 2.64582  | .66145   |
| <b>alt/gpt7</b>    | 1 | 5  | 76.4500   | 2.56466  | 1.14695  |
|                    | 2 | 16 | 76.5656   | 2.34007  | .58502   |
| <b>LDH7</b>        | 1 | 5  | 1029.6720 | 4.90489  | 2.19353  |
|                    | 2 | 16 | 1029.5375 | 3.30472  | .82618   |
| <b>CPK7</b>        | 1 | 5  | 3657.8000 | 20.32732 | 9.09065  |
|                    | 2 | 16 | 3652.6875 | 18.19787 | 4.54947  |
| <b>GR14</b>        | 1 | 4  | 7.4150    | .11958   | .05979   |
|                    | 2 | 11 | 7.3564    | .07004   | .02112   |
| <b>GB14</b>        | 1 | 4  | 8.4750    | .65511   | .32755   |
|                    | 2 | 11 | 8.7391    | .68260   | .20581   |
| <b>Hb14</b>        | 1 | 4  | 13.9700   | .84959   | .42479   |
|                    | 2 | 11 | 13.9136   | .92405   | .27861   |
| <b>Hct14</b>       | 1 | 4  | 40.2575   | .41852   | .20926   |
|                    | 2 | 11 | 40.3245   | .47338   | .14273   |
| <b>MCV14</b>       | 1 | 4  | 55.8500   | 1.92094  | .96047   |
|                    | 2 | 11 | 55.8645   | 1.25229  | .37758   |
| <b>MCH14</b>       | 1 | 4  | 19.2125   | 1.05120  | .52560   |
|                    | 2 | 11 | 19.2409   | .89912   | .27109   |
| <b>MCHC14</b>      | 1 | 4  | 34.6075   | 1.31386  | .65693   |
|                    | 2 | 11 | 34.8364   | 1.41653  | .42710   |
| <b>RDW14</b>       | 1 | 4  | 16.4850   | .09037   | .04518   |
|                    | 2 | 11 | 16.2536   | .34984   | .10548   |
| <b>plt14</b>       | 1 | 4  | 849.1825  | 50.55058 | 25.27529 |
|                    | 2 | 11 | 880.0727  | 53.20741 | 16.04264 |
| <b>MPV14</b>       | 1 | 4  | 5.3275    | .14385   | .07192   |
|                    | 2 | 11 | 5.4636    | .36173   | .10906   |
| <b>P-LCR14</b>     | 1 | 4  | 5.3400    | .02944   | .01472   |
|                    | 2 | 11 | 5.3527    | .03608   | .01088   |
| <b>PDW14</b>       | 1 | 4  | 17.9750   | .47976   | .23988   |
|                    | 2 | 11 | 18.1091   | .61066   | .18412   |
| <b>PCT14</b>       | 1 | 4  | .2450     | .00000   | .00000   |
|                    | 2 | 11 | .2545     | .02945   | .00888   |
| <b>neutrofil14</b> | 1 | 4  | 14.2450   | .45757   | .22878   |

|                     |   |    |           |           |           |
|---------------------|---|----|-----------|-----------|-----------|
|                     | 2 | 11 | 14.3736   | .46900    | .14141    |
| <b>linfociti14</b>  | 1 | 4  | 41.2250   | 3.84220   | 1.92110   |
|                     | 2 | 11 | 70.4000   | 98.52141  | 29.70532  |
| <b>monociti14</b>   | 1 | 4  | .3500     | .12910    | .06455    |
|                     | 2 | 11 | .3636     | .11201    | .03377    |
| <b>basofili14</b>   | 1 | 4  | .0933     | .12451    | .06225    |
|                     | 2 | 11 | .0902     | .10075    | .03038    |
| <b>eosinofili14</b> | 1 | 4  | .6375     | .23500    | .11750    |
|                     | 2 | 11 | .7336     | .24545    | .07401    |
| <b>azotemia14</b>   | 1 | 4  | 23.9500   | 2.73435   | 1.36717   |
|                     | 2 | 11 | 23.8000   | 2.99833   | .90403    |
| <b>glicemia14</b>   | 1 | 4  | 293.2500  | 8.53913   | 4.26956   |
|                     | 2 | 11 | 289.6364  | 3.55732   | 1.07257   |
| <b>creatinina14</b> | 1 | 4  | .6975     | .01708    | .00854    |
|                     | 2 | 11 | .7027     | .02005    | .00604    |
| <b>magnesio14</b>   | 1 | 4  | 3.5850    | .02646    | .01323    |
|                     | 2 | 11 | 3.6473    | .06150    | .01854    |
| <b>calcio14</b>     | 1 | 4  | 11.3850   | .06137    | .03069    |
|                     | 2 | 11 | 11.3255   | .06089    | .01836    |
| <b>fosforo14</b>    | 1 | 4  | 7.7550    | .31427    | .15714    |
|                     | 2 | 11 | 15.2391   | 24.10536  | 7.26804   |
| <b>potassio14</b>   | 1 | 4  | 5.5850    | .07937    | .03969    |
|                     | 2 | 11 | 7.7836    | .94398    | .28462    |
| <b>sodio14</b>      | 1 | 4  | 137.5700  | .31230    | .15615    |
|                     | 2 | 11 | 140.3836  | 1.37195   | .41366    |
| <b>PT14</b>         | 1 | 4  | .7325     | .04193    | .02097    |
|                     | 2 | 11 | .7273     | .03952    | .01192    |
| <b>PTT14</b>        | 1 | 4  | .5500     | .02160    | .01080    |
|                     | 2 | 11 | .5491     | .02166    | .00653    |
| <b>fibrinog14</b>   | 1 | 4  | 211.5000  | 18.08314  | 9.04157   |
|                     | 2 | 11 | 202.6318  | 13.36769  | 4.03051   |
| <b>INR14</b>        | 1 | 4  | .9750     | .03317    | .01658    |
|                     | 2 | 11 | .9645     | .03446    | .01039    |
| <b>ast/got14</b>    | 1 | 4  | 238.7825  | 29.24342  | 14.62171  |
|                     | 2 | 11 | 244.4864  | 39.32596  | 11.85722  |
| <b>alt/gpt14</b>    | 1 | 4  | 72.2475   | 4.83317   | 2.41658   |
|                     | 2 | 11 | 71.4382   | 6.69004   | 2.01712   |
| <b>LDH14</b>        | 1 | 4  | 1073.0400 | 96.69782  | 48.34891  |
|                     | 2 | 11 | 1051.5136 | 97.25165  | 29.32248  |
| <b>CPK14</b>        | 1 | 4  | 3362.8900 | 435.46099 | 217.73050 |
|                     | 2 | 11 | 3361.8509 | 600.08713 | 180.93308 |
| <b>GR21</b>         | 1 | 3  | 6.9067    | .24338    | .14051    |
|                     | 2 | 9  | 6.8889    | .25824    | .08608    |

|                     |   |   |         |          |         |
|---------------------|---|---|---------|----------|---------|
| <b>GB21</b>         | 1 | 3 | 7.8100  | .13000   | .07506  |
|                     | 2 | 9 | 7.7667  | .28758   | .09586  |
| <b>Hb21</b>         | 1 | 3 | 12.633  | .6658    | .3844   |
|                     | 2 | 9 | 12.416  | .5217    | .1739   |
| <b>Hct21</b>        | 1 | 3 | 38.000  | .2000    | .1155   |
|                     | 2 | 9 | 37.634  | .4868    | .1623   |
| <b>MCV21</b>        | 1 | 3 | 55.2367 | 1.71733  | .99150  |
|                     | 2 | 9 | 55.7500 | 1.42998  | .47666  |
| <b>MCH21</b>        | 1 | 3 | 18.8333 | .38527   | .22244  |
|                     | 2 | 9 | 19.2289 | .96380   | .32127  |
| <b>MCHC21</b>       | 1 | 3 | 34.2433 | 1.33927  | .77323  |
|                     | 2 | 9 | 35.1033 | 1.38378  | .46126  |
| <b>RDW21</b>        | 1 | 3 | 16.0433 | .57934   | .33448  |
|                     | 2 | 9 | 16.1900 | .41207   | .13736  |
| <b>plt21</b>        | 1 | 3 | 819.33  | 7.234    | 4.177   |
|                     | 2 | 9 | 796.00  | 65.370   | 21.790  |
| <b>MPV21</b>        | 1 | 3 | 5.3533  | .16442   | .09493  |
|                     | 2 | 9 | 5.4711  | .35452   | .11817  |
| <b>P-LCR21</b>      | 1 | 3 | 5.3500  | .02646   | .01528  |
|                     | 2 | 9 | 5.3711  | .03296   | .01099  |
| <b>PDW21</b>        | 1 | 3 | 17.7367 | .32593   | .18818  |
|                     | 2 | 9 | 18.1267 | .59607   | .19869  |
| <b>PCT21</b>        | 1 | 3 | .2400   | .00866   | .00500  |
|                     | 2 | 9 | .2544   | .02789   | .00930  |
| <b>neutrofil21</b>  | 1 | 3 | 12.733  | .3215    | .1856   |
|                     | 2 | 9 | 13.111  | .5302    | .1767   |
| <b>linfociti21</b>  | 1 | 3 | 40.1333 | 3.15647  | 1.82239 |
|                     | 2 | 9 | 39.5222 | 2.62382  | .87461  |
| <b>monociti21</b>   | 1 | 3 | 75.33   | 3.055    | 1.764   |
|                     | 2 | 9 | 75.78   | 3.153    | 1.051   |
| <b>basofili21</b>   | 1 | 3 | .1100   | .14731   | .08505  |
|                     | 2 | 9 | .1118   | .10424   | .03475  |
| <b>eosinofili21</b> | 1 | 3 | .6000   | .21166   | .12220  |
|                     | 2 | 9 | .6256   | .17401   | .05800  |
| <b>azotemia21</b>   | 1 | 3 | 39.33   | 3.055    | 1.764   |
|                     | 2 | 9 | 38.00   | 2.915    | .972    |
| <b>glicemia21</b>   | 1 | 3 | 296.00  | 18.358   | 10.599  |
|                     | 2 | 9 | 298.89  | 39.295   | 13.098  |
| <b>creatinina21</b> | 1 | 3 | .700    | .0000    | .0000   |
|                     | 2 | 9 | .760    | .0409    | .0136   |
| <b>magnesio21</b>   | 1 | 3 | 3.5533  | .04041   | .02333  |
|                     | 2 | 9 | 6.9944  | 10.12771 | 3.37590 |
| <b>calcio21</b>     | 1 | 3 | 11.4000 | .06557   | .03786  |

|                   |   |   |           |           |           |
|-------------------|---|---|-----------|-----------|-----------|
|                   | 2 | 9 | 11.3278   | .06778    | .02259    |
| <b>fosforo21</b>  | 1 | 3 | 7.7000    | .36056    | .20817    |
|                   | 2 | 9 | 16.9011   | 26.63151  | 8.87717   |
| <b>potassio21</b> | 1 | 3 | 4.700     | .4583     | .2646     |
|                   | 2 | 9 | 5.536     | .4581     | .1527     |
| <b>sodio21</b>    | 1 | 3 | 138.00    | 2.646     | 1.528     |
|                   | 2 | 9 | 137.33    | 3.536     | 1.179     |
| <b>PT21</b>       | 1 | 3 | 8.833     | .2887     | .1667     |
|                   | 2 | 9 | 8.464     | .4599     | .1533     |
| <b>PTT21</b>      | 1 | 3 | 23.00     | 2.000     | 1.155     |
|                   | 2 | 9 | 23.78     | 2.438     | .813      |
| <b>fibrinog21</b> | 1 | 3 | 146.00    | 7.000     | 4.041     |
|                   | 2 | 9 | 154.11    | 9.752     | 3.251     |
| <b>INR21</b>      | 1 | 3 | .6235     | .48765    | .28154    |
|                   | 2 | 9 | .8767     | .08155    | .02718    |
| <b>ast/got21</b>  | 1 | 3 | 250.1533  | 22.51647  | 12.99989  |
|                   | 2 | 9 | 244.5056  | 38.78629  | 12.92876  |
| <b>alt/gpt21</b>  | 1 | 3 | 74.2700   | 3.71896   | 2.14715   |
|                   | 2 | 9 | 71.8344   | 6.73900   | 2.24633   |
| <b>LDH21</b>      | 1 | 3 | 1147.4967 | 46.33595  | 26.75207  |
|                   | 2 | 9 | 1057.1100 | 96.64786  | 32.21595  |
| <b>CPK21</b>      | 1 | 3 | 3522.3733 | 409.00292 | 236.13795 |
|                   | 2 | 9 | 3424.9711 | 647.73786 | 215.91262 |
| <b>GR28</b>       | 1 | 2 | 6.8350    | .51619    | .36500    |
|                   | 2 | 6 | 6.9133    | .39200    | .16003    |
| <b>GB28</b>       | 1 | 2 | 6.900     | .7071     | .5000     |
|                   | 2 | 6 | 7.867     | .4033     | .1647     |
| <b>Hb28</b>       | 1 | 2 | 12.950    | .7778     | .5500     |
|                   | 2 | 6 | 12.090    | 3.1737    | 1.2957    |
| <b>Hct28</b>      | 1 | 2 | 37.250    | .4950     | .3500     |
|                   | 2 | 6 | 38.435    | 1.6268    | .6641     |
| <b>MCV28</b>      | 1 | 2 | 54.9900   | 2.43245   | 1.72000   |
|                   | 2 | 6 | 55.9667   | 1.43178   | .58452    |
| <b>MCH28</b>      | 1 | 2 | 19.6800   | 1.30108   | .92000    |
|                   | 2 | 6 | 19.1367   | 1.07645   | .43946    |
| <b>MCHC28</b>     | 1 | 2 | 35.4500   | .49497    | .35000    |
|                   | 2 | 6 | 34.6500   | 1.25180   | .51104    |
| <b>RDW28</b>      | 1 | 2 | 15.9850   | .85560    | .60500    |
|                   | 2 | 6 | 16.2133   | .41351    | .16881    |
| <b>plt28</b>      | 1 | 2 | 793.00    | 42.426    | 30.000    |
|                   | 2 | 6 | 796.50    | 35.280    | 14.403    |
| <b>MPV28</b>      | 1 | 2 | 5.4800    | .35355    | .25000    |
|                   | 2 | 6 | 5.5967    | .31659    | .12925    |

|                     |   |   |          |          |          |
|---------------------|---|---|----------|----------|----------|
| <b>P-LCR28</b>      | 1 | 2 | 5.3900   | .01414   | .01000   |
|                     | 2 | 6 | 5.4067   | .06772   | .02765   |
| <b>PDW28</b>        | 1 | 2 | 18.2500  | .21213   | .15000   |
|                     | 2 | 6 | 18.1167  | .38687   | .15794   |
| <b>PCT28</b>        | 1 | 2 | .2525    | .01061   | .00750   |
|                     | 2 | 6 | .2583    | .02927   | .01195   |
| <b>neutrofili28</b> | 1 | 2 | 11.850   | .9192    | .6500    |
|                     | 2 | 6 | 12.233   | .9564    | .3904    |
| <b>linfociti28</b>  | 1 | 2 | 38.95    | .778     | .550     |
|                     | 2 | 6 | 47.65    | 12.518   | 5.110    |
| <b>monociti28</b>   | 1 | 2 | 75.00    | 1.414    | 1.000    |
|                     | 2 | 6 | 6.67     | .816     | .333     |
| <b>basofili28</b>   | 1 | 2 | .1415    | .15344   | .10850   |
|                     | 2 | 6 | .1027    | .11835   | .04832   |
| <b>eosinofili28</b> | 1 | 2 | .6450    | .27577   | .19500   |
|                     | 2 | 6 | .5817    | .13805   | .05636   |
| <b>azotemia28</b>   | 1 | 2 | 34.000   | 2.8284   | 2.0000   |
|                     | 2 | 6 | 38.267   | 2.6128   | 1.0667   |
| <b>glicemia28</b>   | 1 | 2 | 308.00   | 1.414    | 1.000    |
|                     | 2 | 6 | 279.17   | 41.315   | 16.867   |
| <b>creatinina28</b> | 1 | 2 | .650     | .0707    | .0500    |
|                     | 2 | 6 | .770     | .0713    | .0291    |
| <b>magnesio28</b>   | 1 | 2 | 3.4650   | .13435   | .09500   |
|                     | 2 | 6 | 3.6500   | .11171   | .04561   |
| <b>calcio28</b>     | 1 | 2 | 25.2300  | 19.47372 | 13.77000 |
|                     | 2 | 6 | 6.0167   | 5.78777  | 2.36285  |
| <b>fosforo28</b>    | 1 | 2 | 7.4000   | .00000   | .00000   |
|                     | 2 | 6 | 7.7983   | .45609   | .18620   |
| <b>potassio28</b>   | 1 | 2 | 5.500    | .9899    | .7000    |
|                     | 2 | 6 | 5.618    | .3335    | .1361    |
| <b>sodio28</b>      | 1 | 2 | 140.50   | 2.121    | 1.500    |
|                     | 2 | 6 | 140.00   | 4.147    | 1.693    |
| <b>PT28</b>         | 1 | 2 | 8.900    | .1414    | .1000    |
|                     | 2 | 6 | 8.783    | .2639    | .1078    |
| <b>PTT28</b>        | 1 | 2 | 22.50    | 2.121    | 1.500    |
|                     | 2 | 6 | 20.17    | 2.639    | 1.078    |
| <b>fibrinog28</b>   | 1 | 2 | 152.00   | 12.728   | 9.000    |
|                     | 2 | 6 | 146.50   | 18.436   | 7.527    |
| <b>INR28</b>        | 1 | 2 | .3752    | .44518   | .31479   |
|                     | 2 | 6 | .8867    | .09416   | .03844   |
| <b>ast/got28</b>    | 1 | 2 | 255.5000 | 28.99138 | 20.50000 |
|                     | 2 | 6 | 268.7167 | 25.11717 | 10.25404 |
| <b>alt/gpt28</b>    | 1 | 2 | 72.4000  | 6.22254  | 4.40000  |

|                     |   |   |           |           |           |
|---------------------|---|---|-----------|-----------|-----------|
|                     | 2 | 6 | 73.1350   | 6.23720   | 2.54633   |
| <b>LDH28</b>        | 1 | 2 | 1020.0000 | 142.83557 | 101.00000 |
|                     | 2 | 6 | 1057.8317 | 99.50320  | 40.62201  |
| <b>CPK28</b>        | 1 | 2 | 3102.5000 | 327.39044 | 231.50000 |
|                     | 2 | 6 | 3113.8933 | 480.92236 | 196.33573 |
| <b>GR35</b>         | 1 | 1 | 7.2400    | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 7.1400    | .13000    | .07506    |
| <b>GB35</b>         | 1 | 1 | 3.200     | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 3.700     | .5000     | .2887     |
| <b>Hb35</b>         | 1 | 1 | 14.600    | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 13.900    | .1732     | .1000     |
| <b>Hct35</b>        | 1 | 1 | 39.6000   | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 37.6667   | .25166    | .14530    |
| <b>MCV35</b>        | 1 | 1 | 64.1000   | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 57.6333   | .16503    | .09528    |
| <b>MCH35</b>        | 1 | 1 | 19.3700   | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 18.6767   | .09504    | .05487    |
| <b>MCHC35</b>       | 1 | 1 | 30.1000   | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 32.0167   | .26633    | .15377    |
| <b>RDW35</b>        | 1 | 1 | 18.0000   | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 16.1433   | .03786    | .02186    |
| <b>plt35</b>        | 1 | 1 | 656.00    | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 837.33    | 25.716    | 14.847    |
| <b>MPV35</b>        | 1 | 1 | 6.5600    | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 6.4700    | .03606    | .02082    |
| <b>P-LCR35</b>      | 1 | 1 | 5.3900    | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 5.3323    | .01079    | .00623    |
| <b>PDW35</b>        | 1 | 1 | 15.5900   | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 16.0233   | .03055    | .01764    |
| <b>PCT35</b>        | 1 | 1 | .3300     | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | .2533     | .02082    | .01202    |
| <b>neutrofil35</b>  | 1 | 1 | 5.00      | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 8.00      | 1.000     | .577      |
| <b>linfociti35</b>  | 1 | 1 | 92.00     | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 85.67     | 5.859     | 3.383     |
| <b>monociti35</b>   | 1 | 1 | 3.00      | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 5.33      | .577      | .333      |
| <b>basofili35</b>   | 1 | 1 | .2610     | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | .3110     | .01153    | .00666    |
| <b>eosinofili35</b> | 1 | 1 | .7900     | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | .6533     | .01155    | .00667    |
| <b>azotemia35</b>   | 1 | 1 | 48.00     | .         | .         |
|                     | 2 | 3 | 75.33     | 4.041     | 2.333     |

|                     |          |          |           |          |          |
|---------------------|----------|----------|-----------|----------|----------|
| <b>glicemia35</b>   | <b>1</b> | <b>1</b> | 278.00    | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 283.67    | 123.249  | 71.158   |
| <b>creatinina35</b> | <b>1</b> | <b>1</b> | .6700     | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | .3933     | .03215   | .01856   |
| <b>magnesio35</b>   | <b>1</b> | <b>1</b> | 3.6800    | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 3.6600    | .02000   | .01155   |
| <b>calcio35</b>     | <b>1</b> | <b>1</b> | 11.3100   | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 11.3367   | .02517   | .01453   |
| <b>fosforo35</b>    | <b>1</b> | <b>1</b> | 7.6000    | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 7.8667    | .37859   | .21858   |
| <b>potassio35</b>   | <b>1</b> | <b>1</b> | 5.700     | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 5.767     | .3055    | .1764    |
| <b>sodio35</b>      | <b>1</b> | <b>1</b> | 141.00    | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 142.00    | 1.732    | 1.000    |
| <b>PT35</b>         | <b>1</b> | <b>1</b> | .8700     | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 1.0433    | .15503   | .08950   |
| <b>PTT35</b>        | <b>1</b> | <b>1</b> | .4900     | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | .5467     | .03786   | .02186   |
| <b>fibrinog35</b>   | <b>1</b> | <b>1</b> | 230.0000  | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 223.3333  | 9.29157  | 5.36449  |
| <b>INR35</b>        | <b>1</b> | <b>1</b> | .9300     | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | .9733     | .01155   | .00667   |
| <b>ast/got35</b>    | <b>1</b> | <b>1</b> | 241.5000  | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 240.5667  | 1.79258  | 1.03494  |
| <b>alt/gpt35</b>    | <b>1</b> | <b>1</b> | 73.5000   | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 72.9667   | 2.15019  | 1.24141  |
| <b>LDH35</b>        | <b>1</b> | <b>1</b> | 1022.4000 | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 1023.6667 | 1.35769  | .78387   |
| <b>CPK35</b>        | <b>1</b> | <b>1</b> | 3645.0000 | .        | .        |
|                     | <b>2</b> | <b>3</b> | 3628.3333 | 25.48202 | 14.71205 |

Tab. 13: t-Test per variabili indipendenti

| Independent Samples Test |                             |   |      |                              |        |                 |                 |                       |   |           |
|--------------------------|-----------------------------|---|------|------------------------------|--------|-----------------|-----------------|-----------------------|---|-----------|
|                          |                             | Levene's Test for Equality of Variances |      | t-test for Equality of Means |        |                 |                 |                       |   |           |
|                          |                             | F                                       | Sig. | t                            | df     | Sig. (2-tailed) | Mean Difference | Std. Error Difference | 95% Confidence Interval of the Difference |           |
|                          |                             |   |      |                              |        |                 |                 |                       | Lower                                     | Upper     |
| GR                       | Equal variances assumed     | 1.883                                   | .186 | -.503                        | 19     | .621            | -.03113         | .06193                | -.16075                                   | .09850    |
|                          | Equal variances not assumed |   |      | -.592                        | 9.129  | .568            | -.03113         | .05258                | -.14981                                   | .08756    |
| GB                       | Equal variances assumed     | 1.693                                   | .209 | -.453                        | 19     | .655            | -.01200         | .02646                | -.06738                                   | .04338    |
|                          | Equal variances not assumed |   |      | -.582                        | 11.228 | .572            | -.01200         | .02063                | -.05730                                   | .03330    |
| Hb                       | Equal variances assumed     | 4.712                                   | .043 | 1.200                        | 19     | .245            | .35438          | .29528                | -.26365                                   | .97240    |
|                          | Equal variances not assumed |   |      | 2.153                        | 15.936 | .047            | .35438          | .16457                | .00539                                    | .70336    |
| Hct                      | Equal variances assumed     | 6.132                                   | .023 | 6.544                        | 19     | .000            | 3.48275         | .53223                | 2.36878                                   | 4.59672   |
|                          | Equal variances not assumed |   |      | 11.850                       | 15.358 | .000            | 3.48275         | .29390                | 2.85758                                   | 4.10792   |
| MCV                      | Equal variances assumed     | 8.236                                   | .010 | -1.758                       | 19     | .095            | -2.17075        | 1.23464               | -4.75489                                  | .41339    |
|                          | Equal variances not assumed |   |      | -3.165                       | 15.725 | .006            | -2.17075        | .68577                | -3.62658                                  | -.71492   |
| MCH                      | Equal variances assumed     | .161                                    | .693 | .941                         | 19     | .359            | .24038          | .25547                | -.29433                                   | .77508    |
|                          | Equal variances not assumed |   |      | .975                         | 7.107  | .362            | .24038          | .24663                | -.34105                                   | .82180    |
| MCHC                     | Equal variances assumed     | 7.481                                   | .013 | -3.661                       | 19     | .002            | -1.34288        | .36680                | -2.11059                                  | -.57516   |
|                          | Equal variances not assumed |   |      | -6.421                       | 17.204 | .000            | -1.34288        | .20913                | -1.78370                                  | -.90205   |
| RDW                      | Equal variances assumed     | .378                                    | .546 | -3.121                       | 19     | .006            | -.74150         | .23756                | -1.23872                                  | -.24428   |
|                          | Equal variances not assumed |   |      | -4.494                       | 15.367 | .000            | -.74150         | .16498                | -1.09242                                  | -.39058   |
| plt                      | Equal variances assumed     | .116                                    | .737 | -3.373                       | 19     | .003            | -63.62213       | 18.86469              | -103.10638                                | -24.13787 |

|            |                             |        |      |        |        |      |           |          |            |           |
|------------|-----------------------------|--------|------|--------|--------|------|-----------|----------|------------|-----------|
|            | Equal variances not assumed |        |      | -3.417 | 6.855  | .012 | -63.62213 | 18.61984 | -107.84102 | -19.40323 |
| MPV        | Equal variances assumed     | 4.005  | .060 | 1.777  | 19     | .092 | .11125    | .06259   | -.01976    | .24226    |
|            | Equal variances not assumed |        |      | 2.771  | 18.279 | .012 | .11125    | .04015   | .02698     | .19552    |
| P-LCR      | Equal variances assumed     | 1.045  | .319 | 2.813  | 19     | .011 | .07494    | .02664   | .01918     | .13070    |
|            | Equal variances not assumed |        |      | 3.538  | 10.676 | .005 | .07494    | .02118   | .02814     | .12173    |
| PDW        | Equal variances assumed     | 8.819  | .008 | -.210  | 19     | .836 | -.03613   | .17173   | -.39557    | .32332    |
|            | Equal variances not assumed |        |      | -.369  | 17.176 | .717 | -.03613   | .09786   | -.24243    | .17018    |
| PCT        | Equal variances assumed     | .132   | .720 | 1.006  | 19     | .327 | .02750    | .02734   | -.02972    | .08472    |
|            | Equal variances not assumed |        |      | 1.059  | 7.305  | .323 | .02750    | .02597   | -.03340    | .08840    |
| neutrofili | Equal variances assumed     | .267   | .611 | -.757  | 19     | .458 | -.22975   | .30360   | -.86519    | .40569    |
|            | Equal variances not assumed |        |      | -.759  | 6.748  | .473 | -.22975   | .30266   | -.95088    | .49138    |
| linfociti  | Equal variances assumed     | 2.562  | .126 | 1.856  | 19     | .079 | .20813    | .11217   | -.02664    | .44289    |
|            | Equal variances not assumed |        |      | 3.053  | 18.988 | .007 | .20813    | .06817   | .06544     | .35081    |
| monociti   | Equal variances assumed     | 1.484  | .238 | 1.441  | 19     | .166 | .03975    | .02759   | -.01800    | .09750    |
|            | Equal variances not assumed |        |      | 1.095  | 4.914  | .324 | .03975    | .03629   | -.05402    | .13352    |
| basofili   | Equal variances assumed     | 3.343  | .083 | 2.850  | 19     | .010 | .04725    | .01658   | .01255     | .08195    |
|            | Equal variances not assumed |        |      | 3.848  | 12.899 | .002 | .04725    | .01228   | .02070     | .07380    |
| eosinofili | Equal variances assumed     | 1.249  | .278 | .965   | 19     | .347 | .01700    | .01762   | -.01989    | .05389    |
|            | Equal variances not assumed |        |      | 1.208  | 10.553 | .254 | .01700    | .01408   | -.01414    | .04814    |
| azotemia   | Equal variances assumed     | 22.002 | .000 | 1.908  | 19     | .072 | 10.63375  | 5.57390  | -1.03257   | 22.30007  |
|            | Equal variances not assumed |        |      | 1.339  | 4.629  | .243 | 10.63375  | 7.94141  | -10.28203  | 31.54953  |
| glicemia   | Equal variances assumed     | 34.794 | .000 | .934   | 19     | .362 | 30.51250  | 32.65815 | -37.84179  | 98.86679  |

|            |                             |       |      |        |        |      |          |          |           |           |
|------------|-----------------------------|-------|------|--------|--------|------|----------|----------|-----------|-----------|
|            | Equal variances not assumed |       |      | .640   | 4.556  | .553 | 30.51250 | 47.66065 | -95.68379 | 156.70879 |
| creatinina | Equal variances assumed     | 1.425 | .247 | -.809  | 19     | .429 | -.03200  | .03956   | -.11480   | .05080    |
|            | Equal variances not assumed |       |      | -1.414 | 17.376 | .175 | -.03200  | .02263   | -.07968   | .01568    |
| magnesio   | Equal variances assumed     | 1.074 | .313 | .766   | 19     | .453 | .02413   | .03149   | -.04178   | .09003    |
|            | Equal variances not assumed |       |      | .839   | 7.849  | .426 | .02413   | .02876   | -.04241   | .09066    |
| calcio t   | Equal variances assumed     | 3.437 | .079 | 1.747  | 19     | .097 | .07750   | .04437   | -.01537   | .17037    |
|            | Equal variances not assumed |       |      | 1.181  | 4.517  | .296 | .07750   | .06562   | -.09675   | .25175    |
| fosforo    | Equal variances assumed     | 2.882 | .106 | -.254  | 19     | .802 | -.04750  | .18694   | -.43877   | .34377    |
|            | Equal variances not assumed |       |      | -.379  | 16.820 | .709 | -.04750  | .12519   | -.31185   | .21685    |
| potassio   | Equal variances assumed     | 8.144 | .010 | 4.420  | 19     | .000 | .50625   | .11453   | .26654    | .74596    |
|            | Equal variances not assumed |       |      | 8.049  | 15.000 | .000 | .50625   | .06289   | .37219    | .64031    |
| sodio      | Equal variances assumed     | 2.353 | .142 | 1.855  | 19     | .079 | 1.70000  | .91652   | -.21829   | 3.61829   |
|            | Equal variances not assumed |       |      | 2.752  | 16.566 | .014 | 1.70000  | .61779   | .39396    | 3.00604   |
| PT         | Equal variances assumed     | 2.006 | .173 | -1.657 | 19     | .114 | -.00925  | .00558   | -.02093   | .00243    |
|            | Equal variances not assumed |       |      | -1.205 | 4.748  | .285 | -.00925  | .00767   | -.02930   | .01080    |
| PTT        | Equal variances assumed     | .064  | .803 | 3.088  | 19     | .006 | .06275   | .02032   | .02021    | .10529    |
|            | Equal variances not assumed |       |      | 2.955  | 6.297  | .024 | .06275   | .02123   | .01138    | .11412    |
| fibrinog   | Equal variances assumed     | .001  | .981 | 2.045  | 19     | .055 | 3.17500  | 1.55292  | -.07529   | 6.42529   |
|            | Equal variances not assumed |       |      | 1.936  | 6.206  | .099 | 3.17500  | 1.63980  | -.80532   | 7.15532   |
| INR        | Equal variances assumed     | .000  | .985 | -2.112 | 19     | .048 | -.03875  | .01835   | -.07716   | -.00034   |
|            | Equal variances not assumed |       |      | -2.459 | 8.906  | .036 | -.03875  | .01576   | -.07445   | -.00305   |
| ast/got    | Equal variances             | .479  | .497 | -2.451 | 19     | .024 | -2.08500 | .85070   | -3.86555  | -.30445   |

|         |                             |       |      |        |        |      |          |          |           |          |  |
|---------|-----------------------------|-------|------|--------|--------|------|----------|----------|-----------|----------|--|
|         | assumed                     |       |      |        |        |      |          |          |           |          |  |
|         | Equal variances not assumed |       |      | -2.174 | 5.715  | .075 | -2.08500 | .95920   | -4.46076  | .29076   |  |
| alt/gpt | Equal variances assumed     | 2.075 | .166 | 1.165  | 19     | .259 | 2.05375  | 1.76358  | -1.63747  | 5.74497  |  |
|         | Equal variances not assumed |       |      | .915   | 5.054  | .402 | 2.05375  | 2.24412  | -3.69634  | 7.80384  |  |
| LDH     | Equal variances assumed     | .572  | .459 | -.270  | 19     | .790 | -.33000  | 1.22054  | -2.88463  | 2.22463  |  |
|         | Equal variances not assumed |       |      | -.314  | 8.829  | .761 | -.33000  | 1.05209  | -2.71706  | 2.05706  |  |
| CPK     | Equal variances assumed     | .808  | .380 | .605   | 19     | .552 | 9.35000  | 15.45656 | -23.00096 | 41.70096 |  |
|         | Equal variances not assumed |       |      | .529   | 5.629  | .617 | 9.35000  | 17.65826 | -34.55738 | 53.25738 |  |
| GR7     | Equal variances assumed     | .206  | .655 | -.012  | 19     | .991 | -.00125  | .10518   | -.22140   | .21890   |  |
|         | Equal variances not assumed |       |      | -.014  | 8.681  | .989 | -.00125  | .09138   | -.20914   | .20664   |  |
| GB7     | Equal variances assumed     | .506  | .486 | .735   | 19     | .471 | .18638   | .25344   | -.34408   | .71683   |  |
|         | Equal variances not assumed |       |      | .664   | 5.835  | .532 | .18638   | .28078   | -.50540   | .87815   |  |
| Hb7     | Equal variances assumed     | .060  | .809 | .496   | 19     | .625 | .1194    | .2406    | -.3842    | .6230    |  |
|         | Equal variances not assumed |       |      | .458   | 6.004  | .663 | .1194    | .2605    | -.5180    | .7568    |  |
| Hct7    | Equal variances assumed     | .426  | .522 | .174   | 19     | .864 | .0875    | .5042    | -.9677    | 1.1427   |  |
|         | Equal variances not assumed |       |      | .213   | 10.078 | .835 | .0875    | .4103    | -.8257    | 1.0007   |  |
| MCV7    | Equal variances assumed     | .336  | .569 | 1.311  | 19     | .205 | 1.0350   | .7892    | -.6168    | 2.6868   |  |
|         | Equal variances not assumed |       |      | 1.415  | 7.637  | .196 | 1.0350   | .7314    | -.6656    | 2.7356   |  |
| MCH7    | Equal variances assumed     | .791  | .385 | .387   | 19     | .703 | .0476    | .1231    | -.2100    | .3053    |  |
|         | Equal variances not assumed |       |      | .487   | 10.678 | .636 | .0476    | .0979    | -.1686    | .2638    |  |
| MCHC7   | Equal variances assumed     | .004  | .952 | -.035  | 19     | .972 | -.0113   | .3185    | -.6779    | .6554    |  |
|         | Equal variances not assumed |       |      | -.035  | 6.533  | .973 | -.0113   | .3244    | -.7895    | .7670    |  |

|                    |                                    |       |      |        |        |      |         |        |         |        |
|--------------------|------------------------------------|-------|------|--------|--------|------|---------|--------|---------|--------|
| <b>RDW7</b>        | <b>Equal variances assumed</b>     | .058  | .813 | -1.161 | 19     | .260 | -.5699  | .4908  | -1.5971 | .4574  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | -1.133 | 6.477  | .297 | -.5699  | .5028  | -1.7784 | .6387  |
| <b>plt7</b>        | <b>Equal variances assumed</b>     | .042  | .840 | -.800  | 19     | .434 | -1.420  | 1.775  | -5.134  | 2.294  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | -.790  | 6.592  | .457 | -1.420  | 1.796  | -5.722  | 2.882  |
| <b>MPV7</b>        | <b>Equal variances assumed</b>     | .898  | .355 | -.858  | 19     | .401 | -.0828  | .0964  | -.2846  | .1191  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | -1.000 | 8.920  | .343 | -.0828  | .0827  | -.2701  | .1046  |
| <b>P-LCR7</b>      | <b>Equal variances assumed</b>     | .581  | .455 | -.989  | 19     | .335 | -.1288  | .1302  | -.4012  | .1437  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | -.865  | 5.623  | .422 | -.1288  | .1489  | -.4990  | .2415  |
| <b>PDW7</b>        | <b>Equal variances assumed</b>     | 2.298 | .146 | -1.305 | 19     | .207 | -.4134  | .3166  | -1.0761 | .2494  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | -1.843 | 14.566 | .086 | -.4134  | .2243  | -.8928  | .0660  |
| <b>PCT7</b>        | <b>Equal variances assumed</b>     | 5.737 | .027 | .563   | 19     | .580 | .00663  | .01176 | -.01799 | .03124 |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | .723   | 11.265 | .484 | .00663  | .00916 | -.01348 | .02673 |
| <b>neutrofil7</b>  | <b>Equal variances assumed</b>     | .138  | .714 | -.574  | 19     | .572 | -.8275  | 1.4408 | -3.8431 | 2.1881 |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | -.560  | 6.463  | .594 | -.8275  | 1.4781 | -4.3825 | 2.7275 |
| <b>linfociti7</b>  | <b>Equal variances assumed</b>     | .734  | .402 | .413   | 19     | .684 | .539    | 1.303  | -2.189  | 3.267  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | .467   | 8.336  | .653 | .539    | 1.155  | -2.105  | 3.183  |
| <b>monociti7</b>   | <b>Equal variances assumed</b>     | .053  | .820 | 1.108  | 19     | .282 | .1331   | .1202  | -.1184  | .3847  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | 1.130  | 6.926  | .296 | .1331   | .1179  | -.1462  | .4124  |
| <b>basofili7</b>   | <b>Equal variances assumed</b>     | 1.118 | .304 | -.207  | 19     | .838 | -.013   | .063   | -.146   | .119   |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | -.225  | 7.710  | .828 | -.013   | .058   | -.149   | .122   |
| <b>eosinofili7</b> | <b>Equal variances assumed</b>     | 3.217 | .089 | -.218  | 19     | .830 | -.00125 | .00573 | -.01324 | .01074 |
|                    | <b>Equal variances</b>             |       |      | -.183  | 5.382  | .861 | -.00125 | .00682 | -.01842 | .01592 |

|                    |                                    |       |      |        |        |      |          |         |          |         |
|--------------------|------------------------------------|-------|------|--------|--------|------|----------|---------|----------|---------|
|                    | <b>not assumed</b>                 |       |      |        |        |      |          |         |          |         |
| <b>azotemia7</b>   | <b>Equal variances assumed</b>     | .002  | .966 | 1.823  | 19     | .084 | 4.448    | 2.439   | -.658    | 9.553   |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | 1.886  | 7.092  | .101 | 4.448    | 2.358   | -1.113   | 10.008  |
| <b>glicemia7</b>   | <b>Equal variances assumed</b>     | .950  | .342 | -.507  | 19     | .618 | -114.313 | 225.689 | -586.684 | 358.059 |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | -.912  | 15.740 | .376 | -114.313 | 125.385 | -380.475 | 151.850 |
| <b>creatinina7</b> | <b>Equal variances assumed</b>     | 4.919 | .039 | .943   | 19     | .357 | .0485    | .0514   | -.0591   | .1561   |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | 1.000  | 7.399  | .349 | .0485    | .0485   | -.0649   | .1619   |
| <b>magnesio7</b>   | <b>Equal variances assumed</b>     | .002  | .969 | .271   | 19     | .789 | .01763   | .06499  | -.11839  | .15364  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | .289   | 7.455  | .781 | .01763   | .06103  | -.12493  | .16018  |
| <b>calcio7</b>     | <b>Equal variances assumed</b>     | .000  | .987 | -1.057 | 19     | .304 | -.05588  | .05288  | -.16654  | .05479  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | -1.061 | 6.757  | .325 | -.05588  | .05267  | -.18132  | .06957  |
| <b>fosforo7</b>    | <b>Equal variances assumed</b>     | .224  | .641 | -.454  | 19     | .655 | -.11963  | .26326  | -.67063  | .43138  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | -.409  | 5.809  | .697 | -.11963  | .29276  | -.84172  | .60247  |
| <b>potassio7</b>   | <b>Equal variances assumed</b>     | .461  | .505 | .611   | 19     | .548 | .1293    | .2115   | -.3133   | .5718   |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | .515   | 5.398  | .627 | .1293    | .2512   | -.5023   | .7608   |
| <b>sodio7</b>      | <b>Equal variances assumed</b>     | 1.593 | .222 | -.209  | 19     | .837 | -.119    | .568    | -1.308   | 1.071   |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | -.264  | 10.770 | .797 | -.119    | .450    | -1.113   | .875    |
| <b>PT7</b>         | <b>Equal variances assumed</b>     | .098  | .757 | .610   | 19     | .549 | .00813   | .01332  | -.01976  | .03601  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | .588   | 6.360  | .577 | .00813   | .01382  | -.02524  | .04149  |
| <b>PTT7</b>        | <b>Equal variances assumed</b>     | .558  | .464 | .311   | 19     | .759 | .00825   | .02651  | -.04723  | .06373  |
|                    | <b>Equal variances not assumed</b> |       |      | .304   | 6.472  | .771 | .00825   | .02717  | -.05707  | .07357  |
| <b>fibrinog7</b>   | <b>Equal variances assumed</b>     | .387  | .541 | .127   | 19     | .900 | .575     | 4.523   | -8.891   | 10.041  |

|          |                             |       |      |       |       |      |         |          |           |          |
|----------|-----------------------------|-------|------|-------|-------|------|---------|----------|-----------|----------|
|          | Equal variances not assumed |       |      | .125  | 6.549 | .904 | .575    | 4.599    | -10.453   | 11.603   |
| INR7     | Equal variances assumed     | .294  | .594 | -.427 | 19    | .674 | -.00863 | .02021   | -.05093   | .03368   |
|          | Equal variances not assumed |       |      | -.392 | 5.962 | .709 | -.00863 | .02201   | -.06256   | .04531   |
| ast/got7 | Equal variances assumed     | 3.128 | .093 | -.763 | 19    | .455 | -.98938 | 1.29702  | -3.70407  | 1.72532  |
|          | Equal variances not assumed |       |      | -.876 | 8.640 | .405 | -.98938 | 1.12935  | -3.56046  | 1.58171  |
| alt/gpt7 | Equal variances assumed     | .003  | .956 | -.094 | 19    | .926 | -.11563 | 1.22405  | -2.67759  | 2.44634  |
|          | Equal variances not assumed |       |      | -.090 | 6.239 | .931 | -.11563 | 1.28753  | -3.23703  | 3.00578  |
| LDH7     | Equal variances assumed     | 1.108 | .306 | .071  | 19    | .944 | .13450  | 1.89546  | -3.83275  | 4.10175  |
|          | Equal variances not assumed |       |      | .057  | 5.188 | .956 | .13450  | 2.34396  | -5.82591  | 6.09491  |
| CPK7     | Equal variances assumed     | .136  | .716 | .535  | 19    | .599 | 5.11250 | 9.56367  | -14.90449 | 25.12949 |
|          | Equal variances not assumed |       |      | .503  | 6.152 | .633 | 5.11250 | 10.16551 | -19.61372 | 29.83872 |
| GR14     | Equal variances assumed     | 2.707 | .124 | 1.194 | 13    | .254 | .05864  | .04911   | -.04745   | .16472   |
|          | Equal variances not assumed |       |      | .925  | 3.777 | .410 | .05864  | .06341   | -.12159   | .23886   |
| GB14     | Equal variances assumed     | .430  | .524 | -.669 | 13    | .515 | -.26409 | .39491   | -1.11724  | .58906   |
|          | Equal variances not assumed |       |      | -.683 | 5.576 | .522 | -.26409 | .38685   | -1.22841  | .70023   |
| Hb14     | Equal variances assumed     | .261  | .618 | .106  | 13    | .917 | .05636  | .52981   | -1.08823  | 1.20095  |
|          | Equal variances not assumed |       |      | .111  | 5.813 | .915 | .05636  | .50801   | -1.19643  | 1.30915  |
| Hct14    | Equal variances assumed     | .060  | .810 | -.249 | 13    | .807 | -.06705 | .26934   | -.64892   | .51483   |
|          | Equal variances not assumed |       |      | -.265 | 6.048 | .800 | -.06705 | .25330   | -.68566   | .55157   |
| MCV14    | Equal variances assumed     | .681  | .424 | -.017 | 13    | .986 | -.01455 | .83758   | -1.82403  | 1.79494  |
|          | Equal variances not assumed |       |      | -.014 | 3.970 | .989 | -.01455 | 1.03202  | -2.88832  | 2.85923  |
| MCH14    | Equal variances             | .021  | .886 | -.052 | 13    | .959 | -.02841 | .54674   | -1.20958  | 1.15276  |

|             |                             |        |      |        |        |      |           |          |            |          |
|-------------|-----------------------------|--------|------|--------|--------|------|-----------|----------|------------|----------|
|             | assumed                     |        |      |        |        |      |           |          |            |          |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -.048  | 4.709  | .964 | -.02841   | .59139   | -1.57739   | 1.52057  |
| MCHC14      | Equal variances assumed     | .003   | .957 | -.281  | 13     | .783 | -.22886   | .81363   | -1.98661   | 1.52888  |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -.292  | 5.763  | .780 | -.22886   | .78356   | -2.16543   | 1.70770  |
| RDW14       | Equal variances assumed     | 6.280  | .026 | 1.279  | 13     | .223 | .23136    | .18093   | -.15952    | .62224   |
|             | Equal variances not assumed |        |      | 2.016  | 12.593 | .066 | .23136    | .11475   | -.01736    | .48008   |
| plt14       | Equal variances assumed     | 2.818  | .117 | -1.006 | 13     | .333 | -30.89023 | 30.71541 | -97.24683  | 35.46637 |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -1.032 | 5.630  | .344 | -30.89023 | 29.93671 | -105.32577 | 43.54531 |
| MPV14       | Equal variances assumed     | 20.498 | .001 | -.718  | 13     | .485 | -.13614   | .18958   | -.54570    | .27343   |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -1.042 | 12.628 | .317 | -.13614   | .13064   | -.41922    | .14695   |
| P-LCR14     | Equal variances assumed     | 3.894  | .070 | -.629  | 13     | .540 | -.01273   | .02024   | -.05645    | .03099   |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -.695  | 6.583  | .511 | -.01273   | .01830   | -.05657    | .03112   |
| PDW14       | Equal variances assumed     | 1.457  | .249 | -.394  | 13     | .700 | -.13409   | .34044   | -.86956    | .60138   |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -.443  | 6.862  | .671 | -.13409   | .30239   | -.85207    | .58389   |
| PCT14       | Equal variances assumed     | 5.942  | .030 | -.633  | 13     | .538 | -.00955   | .01508   | -.04213    | .02303   |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -1.075 | 10.000 | .308 | -.00955   | .00888   | -.02933    | .01024   |
| neutrofil14 | Equal variances assumed     | .236   | .635 | -.472  | 13     | .644 | -.12864   | .27231   | -.71693    | .45966   |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -.478  | 5.490  | .651 | -.12864   | .26896   | -.80187    | .54460   |
| linfociti14 | Equal variances assumed     | 1.508  | .241 | -.578  | 13     | .573 | -29.17500 | 50.46349 | -138.19474 | 79.84474 |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -.980  | 10.083 | .350 | -29.17500 | 29.76738 | -95.42671  | 37.07671 |
| monociti14  | Equal variances assumed     | .034   | .857 | -.201  | 13     | .844 | -.01364   | .06783   | -.16018    | .13290   |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -.187  | 4.760  | .859 | -.01364   | .07285   | -.20378    | .17651   |

|              |                             |        |      |        |        |      |          |          |           |          |
|--------------|-----------------------------|--------|------|--------|--------|------|----------|----------|-----------|----------|
| basofili14   | Equal variances assumed     | .074   | .789 | .049   | 13     | .961 | .00307   | .06230   | -.13152   | .13766   |
|              | Equal variances not assumed |        |      | .044   | 4.522  | .967 | .00307   | .06927   | -.18081   | .18695   |
| eosinofili14 | Equal variances assumed     | 2.652  | .127 | -.677  | 13     | .510 | -.09614  | .14193   | -.40275   | .21048   |
|              | Equal variances not assumed |        |      | -.692  | 5.588  | .516 | -.09614  | .13886   | -.44208   | .24981   |
| azotemia14   | Equal variances assumed     | .349   | .565 | .087   | 13     | .932 | .15000   | 1.71631  | -3.55786  | 3.85786  |
|              | Equal variances not assumed |        |      | .092   | 5.861  | .930 | .15000   | 1.63904  | -3.88378  | 4.18378  |
| glicemia14   | Equal variances assumed     | 4.612  | .051 | 1.201  | 13     | .251 | 3.61364  | 3.00914  | -2.88723  | 10.11450 |
|              | Equal variances not assumed |        |      | .821   | 3.387  | .466 | 3.61364  | 4.40222  | -9.53359  | 16.76086 |
| creatinina14 | Equal variances assumed     | .723   | .411 | -.461  | 13     | .652 | -.00523  | .01133   | -.02970   | .01924   |
|              | Equal variances not assumed |        |      | -.500  | 6.285  | .634 | -.00523  | .01046   | -.03055   | .02009   |
| magnesio14   | Equal variances assumed     | 4.193  | .061 | -1.925 | 13     | .076 | -.06227  | .03235   | -.13217   | .00762   |
|              | Equal variances not assumed |        |      | -2.734 | 12.219 | .018 | -.06227  | .02278   | -.11180   | -.01274  |
| calciot14    | Equal variances assumed     | .147   | .708 | 1.672  | 13     | .118 | .05955   | .03562   | -.01740   | .13649   |
|              | Equal variances not assumed |        |      | 1.665  | 5.327  | .153 | .05955   | .03576   | -.03070   | .14979   |
| fosforo14    | Equal variances assumed     | 1.646  | .222 | -.606  | 13     | .555 | -7.48409 | 12.34447 | -34.15269 | 19.18451 |
|              | Equal variances not assumed |        |      | -1.029 | 10.009 | .327 | -7.48409 | 7.26974  | -23.68003 | 8.71185  |
| potassio14   | Equal variances assumed     | 10.588 | .006 | -4.543 | 13     | .001 | -2.19864 | .48392   | -3.24408  | -1.15319 |
|              | Equal variances not assumed |        |      | -7.651 | 10.380 | .000 | -2.19864 | .28738   | -2.83579  | -1.56148 |
| sodio14      | Equal variances assumed     | 2.434  | .143 | -3.974 | 13     | .002 | -2.81364 | .70800   | -4.34318  | -1.28409 |
|              | Equal variances not assumed |        |      | -6.364 | 12.226 | .000 | -2.81364 | .44215   | -3.77503  | -1.85224 |
| PT14         | Equal variances assumed     | .011   | .917 | .223   | 13     | .827 | .00523   | .02341   | -.04534   | .05580   |
|              | Equal variances             |        |      | .217   | 5.092  | .837 | .00523   | .02412   | -.05643   | .06688   |

|                   |                             |       |      |       |       |      |          |           |            |           |
|-------------------|-----------------------------|-------|------|-------|-------|------|----------|-----------|------------|-----------|
|                   | not assumed                 |       |      |       |       |      |          |           |            |           |
| <b>PTT14</b>      | Equal variances assumed     | .008  | .932 | .072  | 13    | .944 | .00091   | .01264    | -.02639    | .02821    |
|                   | Equal variances not assumed |       |      | .072  | 5.378 | .945 | .00091   | .01262    | -.03086    | .03268    |
| <b>fibrinog14</b> | Equal variances assumed     | 1.632 | .224 | 1.041 | 13    | .317 | 8.86818  | 8.51975   | -9.53762   | 27.27398  |
|                   | Equal variances not assumed |       |      | .896  | 4.260 | .418 | 8.86818  | 9.89924   | -17.96677  | 35.70313  |
| <b>INR14</b>      | Equal variances assumed     | .264  | .616 | .524  | 13    | .609 | .01045   | .01995    | -.03264    | .05355    |
|                   | Equal variances not assumed |       |      | .534  | 5.560 | .614 | .01045   | .01957    | -.03836    | .05927    |
| <b>ast/got14</b>  | Equal variances assumed     | 7.368 | .018 | -.262 | 13    | .797 | -5.70386 | 21.74481  | -52.68067  | 41.27294  |
|                   | Equal variances not assumed |       |      | -.303 | 7.296 | .770 | -5.70386 | 18.82520  | -49.85439  | 38.44667  |
| <b>alt/gpt14</b>  | Equal variances assumed     | 9.837 | .008 | .220  | 13    | .830 | .80932   | 3.68437   | -7.15029   | 8.76892   |
|                   | Equal variances not assumed |       |      | .257  | 7.539 | .804 | .80932   | 3.14780   | -6.52756   | 8.14620   |
| <b>LDH14</b>      | Equal variances assumed     | .755  | .401 | .380  | 13    | .710 | 21.52636 | 56.70827  | -100.98441 | 144.03713 |
|                   | Equal variances not assumed |       |      | .381  | 5.394 | .718 | 21.52636 | 56.54577  | -120.69427 | 163.74699 |
| <b>CPK14</b>      | Equal variances assumed     | 2.030 | .178 | .003  | 13    | .998 | 1.03909  | 330.68288 | -713.35784 | 715.43602 |
|                   | Equal variances not assumed |       |      | .004  | 7.501 | .997 | 1.03909  | 283.09600 | -659.42111 | 661.49929 |
| <b>GR21</b>       | Equal variances assumed     | .059  | .812 | .104  | 10    | .919 | .01778   | .17022    | -.36150    | .39706    |
|                   | Equal variances not assumed |       |      | .108  | 3.654 | .920 | .01778   | .16478    | -.45733    | .49289    |
| <b>GB21</b>       | Equal variances assumed     | 1.375 | .268 | .246  | 10    | .810 | .04333   | .17580    | -.34838    | .43505    |
|                   | Equal variances not assumed |       |      | .356  | 8.315 | .731 | .04333   | .12175    | -.23557    | .32224    |
| <b>Hb21</b>       | Equal variances assumed     | .436  | .524 | .590  | 10    | .568 | .2178    | .3690     | -.6045     | 1.0400    |
|                   | Equal variances not assumed |       |      | .516  | 2.872 | .643 | .2178    | .4219     | -1.1594    | 1.5949    |
| <b>Hct21</b>      | Equal variances assumed     | 1.399 | .264 | 1.234 | 10    | .246 | .3656    | .2963     | -.2947     | 1.0258    |

|             |                             |        |      |        |       |      |         |         |          |         |
|-------------|-----------------------------|--------|------|--------|-------|------|---------|---------|----------|---------|
|             | Equal variances not assumed |        |      | 1.836  | 8.961 | .100 | .3656   | .1991   | -.0852   | .8164   |
| MCV21       | Equal variances assumed     | .201   | .664 | -.516  | 10    | .617 | -.51333 | .99459  | -2.72942 | 1.70275 |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -.467  | 2.991 | .673 | -.51333 | 1.10013 | -4.02017 | 2.99350 |
| MCH21       | Equal variances assumed     | 6.554  | .028 | -.675  | 10    | .515 | -.39556 | .58607  | -1.70139 | .91028  |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -1.012 | 9.123 | .337 | -.39556 | .39076  | -1.27770 | .48659  |
| MCHC21      | Equal variances assumed     | .025   | .878 | -.938  | 10    | .370 | -.86000 | .91666  | -2.90245 | 1.18245 |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -.955  | 3.564 | .400 | -.86000 | .90035  | -3.48517 | 1.76517 |
| RDW21       | Equal variances assumed     | .554   | .474 | -.488  | 10    | .636 | -.14667 | .30035  | -.81588  | .52254  |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -.406  | 2.712 | .715 | -.14667 | .36159  | -1.36967 | 1.07634 |
| plt21       | Equal variances assumed     | 3.330  | .098 | .598   | 10    | .563 | 23.333  | 39.039  | -63.651  | 110.317 |
|             | Equal variances not assumed |        |      | 1.052  | 8.552 | .322 | 23.333  | 22.187  | -27.260  | 73.926  |
| MPV21       | Equal variances assumed     | 10.130 | .010 | -.543  | 10    | .599 | -.11778 | .21701  | -.60130  | .36574  |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -.777  | 8.124 | .459 | -.11778 | .15158  | -.46639  | .23084  |
| P-LCR21     | Equal variances assumed     | .190   | .672 | -.997  | 10    | .342 | -.02111 | .02118  | -.06829  | .02607  |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -1.122 | 4.315 | .320 | -.02111 | .01882  | -.07188  | .02966  |
| PDW21       | Equal variances assumed     | 2.867  | .121 | -1.058 | 10    | .315 | -.39000 | .36847  | -1.21101 | .43101  |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -1.425 | 6.825 | .198 | -.39000 | .27366  | -1.04049 | .26049  |
| PCT21       | Equal variances assumed     | 1.749  | .215 | -.858  | 10    | .411 | -.01444 | .01683  | -.05194  | .02305  |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -1.368 | 9.963 | .201 | -.01444 | .01056  | -.03798  | .00909  |
| neutrofil21 | Equal variances assumed     | 2.547  | .142 | -1.144 | 10    | .279 | -.3778  | .3304   | -1.1139  | .3583   |
|             | Equal variances not assumed |        |      | -1.474 | 6.032 | .191 | -.3778  | .2563   | -1.0041  | .2485   |
| linfociti21 | Equal variances             | .000   | .996 | .335   | 10    | .745 | .61111  | 1.82577 | -3.45696 | 4.67918 |

|              |                             |       |      |        |       |      |          |          |           |          |
|--------------|-----------------------------|-------|------|--------|-------|------|----------|----------|-----------|----------|
|              | assumed                     |       |      |        |       |      |          |          |           |          |
|              | Equal variances not assumed |       |      | .302   | 2.988 | .782 | .61111   | 2.02140  | -5.83679  | 7.05901  |
| monociti21   | Equal variances assumed     | .075  | .790 | -.213  | 10    | .836 | -.444    | 2.089    | -5.100    | 4.211    |
|              | Equal variances not assumed |       |      | -.216  | 3.561 | .840 | -.444    | 2.053    | -6.434    | 5.545    |
| basofili21   | Equal variances assumed     | .776  | .399 | -.023  | 10    | .982 | -.00178  | .07611   | -.17136   | .16780   |
|              | Equal variances not assumed |       |      | -.019  | 2.705 | .986 | -.00178  | .09187   | -.31309   | .30953   |
| eosinofili21 | Equal variances assumed     | .014  | .907 | -.210  | 10    | .838 | -.02556  | .12144   | -.29614   | .24503   |
|              | Equal variances not assumed |       |      | -.189  | 2.965 | .862 | -.02556  | .13527   | -.45893   | .40782   |
| azotemia21   | Equal variances assumed     | .061  | .809 | .679   | 10    | .512 | 1.333    | 1.963    | -3.040    | 5.706    |
|              | Equal variances not assumed |       |      | .662   | 3.322 | .551 | 1.333    | 2.014    | -4.738    | 7.405    |
| glicemia21   | Equal variances assumed     | 1.386 | .266 | -.120  | 10    | .907 | -2.889   | 24.062   | -56.502   | 50.724   |
|              | Equal variances not assumed |       |      | -.171  | 8.069 | .868 | -2.889   | 16.849   | -41.686   | 35.908   |
| creatinina21 | Equal variances assumed     | 4.645 | .057 | -2.459 | 10    | .034 | -.0600   | .0244    | -.1144    | -.0056   |
|              | Equal variances not assumed |       |      | -4.398 | 8.000 | .002 | -.0600   | .0136    | -.0915    | -.0285   |
| magnesio21   | Equal variances assumed     | 1.617 | .232 | -.570  | 10    | .581 | -3.44111 | 6.03901  | -16.89687 | 10.01465 |
|              | Equal variances not assumed |       |      | -1.019 | 8.001 | .338 | -3.44111 | 3.37598  | -11.22602 | 4.34379  |
| calciot21    | Equal variances assumed     | .001  | .980 | 1.609  | 10    | .139 | .07222   | .04490   | -.02782   | .17226   |
|              | Equal variances not assumed |       |      | 1.638  | 3.565 | .185 | .07222   | .04409   | -.05631   | .20075   |
| fosforo21    | Equal variances assumed     | 1.577 | .238 | -.579  | 10    | .575 | -9.20111 | 15.88033 | -44.58469 | 26.18247 |
|              | Equal variances not assumed |       |      | -1.036 | 8.009 | .330 | -9.20111 | 8.87961  | -29.67362 | 11.27140 |
| potassio21   | Equal variances assumed     | .238  | .636 | -2.736 | 10    | .021 | -.8356   | .3054    | -1.5161   | -.1550   |
|              | Equal variances not assumed |       |      | -2.735 | 3.458 | .061 | -.8356   | .3055    | -1.7387   | .0676    |

|                   |                             |        |      |        |       |      |          |           |            |           |
|-------------------|-----------------------------|--------|------|--------|-------|------|----------|-----------|------------|-----------|
| <b>sodio21</b>    | Equal variances assumed     | 1.274  | .285 | .296   | 10    | .773 | .667     | 2.251     | -4.349     | 5.682     |
|                   | Equal variances not assumed |        |      | .346   | 4.675 | .745 | .667     | 1.929     | -4.398     | 5.731     |
| <b>PT21</b>       | Equal variances assumed     | .343   | .571 | 1.284  | 10    | .228 | .3689    | .2874     | -.2715     | 1.0093    |
|                   | Equal variances not assumed |        |      | 1.629  | 5.781 | .156 | .3689    | .2264     | -.1903     | .9281     |
| <b>PTT21</b>      | Equal variances assumed     | .614   | .451 | -.495  | 10    | .631 | -.778    | 1.571     | -4.279     | 2.723     |
|                   | Equal variances not assumed |        |      | -.551  | 4.214 | .610 | -.778    | 1.412     | -4.621     | 3.065     |
| <b>fibrinog21</b> | Equal variances assumed     | 1.987  | .189 | -1.313 | 10    | .219 | -8.111   | 6.178     | -21.877    | 5.655     |
|                   | Equal variances not assumed |        |      | -1.564 | 4.911 | .180 | -8.111   | 5.187     | -21.517    | 5.294     |
| <b>INR21</b>      | Equal variances assumed     | 29.532 | .000 | -1.652 | 10    | .130 | -.25319  | .15330    | -.59478    | .08839    |
|                   | Equal variances not assumed |        |      | -.895  | 2.037 | .464 | -.25319  | .28285    | -1.44904   | .94265    |
| <b>ast/got21</b>  | Equal variances assumed     | 13.097 | .005 | .235   | 10    | .819 | 5.64778  | 24.08226  | -48.01084  | 59.30640  |
|                   | Equal variances not assumed |        |      | .308   | 6.358 | .768 | 5.64778  | 18.33439  | -38.60967  | 49.90523  |
| <b>alt/gpt21</b>  | Equal variances assumed     | 12.864 | .005 | .584   | 10    | .572 | 2.43556  | 4.16853   | -6.85250   | 11.72361  |
|                   | Equal variances not assumed |        |      | .784   | 6.752 | .460 | 2.43556  | 3.10745   | -4.96749   | 9.83860   |
| <b>LDH21</b>      | Equal variances assumed     | 6.458  | .029 | 1.525  | 10    | .158 | 90.38667 | 59.26232  | -41.65801  | 222.43135 |
|                   | Equal variances not assumed |        |      | 2.158  | 7.869 | .063 | 90.38667 | 41.87530  | -6.45754   | 187.23087 |
| <b>CPK21</b>      | Equal variances assumed     | 4.313  | .065 | .240   | 10    | .815 | 97.40222 | 405.02848 | -805.05746 | 999.86191 |
|                   | Equal variances not assumed |        |      | .304   | 5.739 | .772 | 97.40222 | 319.96779 | -694.23668 | 889.04112 |
| <b>GR28</b>       | Equal variances assumed     | .181   | .686 | -.231  | 6     | .825 | -.07833  | .33908    | -.90803    | .75137    |
|                   | Equal variances not assumed |        |      | -.197  | 1.411 | .869 | -.07833  | .39854    | -2.69993   | 2.54326   |
| <b>GB28</b>       | Equal variances assumed     | 1.267  | .303 | -2.531 | 6     | .045 | -.9667   | .3820     | -1.9014    | -.0319    |
|                   | Equal variances not assumed |        |      | -1.836 | 1.226 | .281 | -.9667   | .5264     | -5.3443    | 3.4109    |

|                |                             |       |      |        |       |      |         |         |           |          |
|----------------|-----------------------------|-------|------|--------|-------|------|---------|---------|-----------|----------|
|                | not assumed                 |       |      |        |       |      |         |         |           |          |
| <b>Hb28</b>    | Equal variances assumed     | .799  | .406 | .361   | 6     | .730 | .8600   | 2.3797  | -4.9630   | 6.6830   |
|                | Equal variances not assumed |       |      | .611   | 5.992 | .564 | .8600   | 1.4076  | -2.5854   | 4.3054   |
| <b>Hct28</b>   | Equal variances assumed     | 2.238 | .185 | -.968  | 6     | .370 | -1.1850 | 1.2237  | -4.1794   | 1.8094   |
|                | Equal variances not assumed |       |      | -1.578 | 5.891 | .166 | -1.1850 | .7507   | -3.0302   | .6602    |
| <b>MCV28</b>   | Equal variances assumed     | 1.113 | .332 | -.729  | 6     | .494 | -.97667 | 1.34026 | -4.25617  | 2.30284  |
|                | Equal variances not assumed |       |      | -.538  | 1.241 | .671 | -.97667 | 1.81661 | -15.74954 | 13.79621 |
| <b>MCH28</b>   | Equal variances assumed     | .000  | .994 | .596   | 6     | .573 | .54333  | .91205  | -1.68838  | 2.77504  |
|                | Equal variances not assumed |       |      | .533   | 1.493 | .663 | .54333  | 1.01957 | -5.63233  | 6.71900  |
| <b>MCHC28</b>  | Equal variances assumed     | 1.536 | .262 | .844   | 6     | .431 | .80000  | .94751  | -1.51848  | 3.11848  |
|                | Equal variances not assumed |       |      | 1.292  | 5.138 | .252 | .80000  | .61941  | -.77944   | 2.37944  |
| <b>RDW28</b>   | Equal variances assumed     | 5.808 | .053 | -.544  | 6     | .606 | -.22833 | .41992  | -1.25584  | .79917   |
|                | Equal variances not assumed |       |      | -.364  | 1.160 | .771 | -.22833 | .62811  | -6.02149  | 5.56483  |
| <b>plt28</b>   | Equal variances assumed     | .059  | .817 | -.117  | 6     | .911 | -3.500  | 29.858  | -76.560   | 69.560   |
|                | Equal variances not assumed |       |      | -.105  | 1.498 | .929 | -3.500  | 33.278  | -204.060  | 197.060  |
| <b>MPV28</b>   | Equal variances assumed     | .002  | .970 | -.442  | 6     | .674 | -.11667 | .26376  | -.76207   | .52874   |
|                | Equal variances not assumed |       |      | -.415  | 1.583 | .728 | -.11667 | .28143  | -1.69058  | 1.45724  |
| <b>P-LCR28</b> | Equal variances assumed     | .964  | .364 | -.329  | 6     | .754 | -.01667 | .05070  | -.14072   | .10739   |
|                | Equal variances not assumed |       |      | -.567  | 5.890 | .592 | -.01667 | .02940  | -.08894   | .05560   |
| <b>PDW28</b>   | Equal variances assumed     | 1.705 | .240 | .449   | 6     | .669 | .13333  | .29690  | -.59315   | .85982   |
|                | Equal variances not assumed |       |      | .612   | 3.569 | .577 | .13333  | .21782  | -.50134   | .76801   |
| <b>PCT28</b>   | Equal variances assumed     | 1.477 | .270 | -.264  | 6     | .801 | -.00583 | .02210  | -.05991   | .04824   |



|            |                             |        |      |        |       |      |           |           |             |            |
|------------|-----------------------------|--------|------|--------|-------|------|-----------|-----------|-------------|------------|
|            | assumed                     |        |      |        |       |      |           |           |             |            |
|            | Equal variances not assumed |        |      | -2.139 | 5.000 | .085 | -.39833   | .18620    | -.87697     | .08030     |
| potassio28 | Equal variances assumed     | 22.551 | .003 | -.286  | 6     | .784 | -.1183    | .4131     | -1.1292     | .8926      |
|            | Equal variances not assumed |        |      | -.166  | 1.077 | .894 | -.1183    | .7131     | -7.7865     | 7.5498     |
| sodio28    | Equal variances assumed     | .633   | .457 | .158   | 6     | .880 | .500      | 3.171     | -7.259      | 8.259      |
|            | Equal variances not assumed |        |      | .221   | 3.904 | .836 | .500      | 2.262     | -5.842      | 6.842      |
| PT28       | Equal variances assumed     | 1.838  | .224 | .577   | 6     | .585 | .1167     | .2023     | -.3783      | .6117      |
|            | Equal variances not assumed |        |      | .794   | 3.679 | .475 | .1167     | .1470     | -.3059      | .5393      |
| PTT28      | Equal variances assumed     | .600   | .468 | 1.116  | 6     | .307 | 2.333     | 2.091     | -2.782      | 7.449      |
|            | Equal variances not assumed |        |      | 1.263  | 2.182 | .325 | 2.333     | 1.847     | -5.010      | 9.677      |
| fibrinog28 | Equal variances assumed     | 7.670  | .032 | .382   | 6     | .715 | 5.500     | 14.382    | -29.691     | 40.691     |
|            | Equal variances not assumed |        |      | .469   | 2.631 | .675 | 5.500     | 11.732    | -34.987     | 45.987     |
| INR28      | Equal variances assumed     | 27.205 | .002 | -3.116 | 6     | .021 | -.51146   | .16415    | -.91313     | -.10979    |
|            | Equal variances not assumed |        |      | -1.613 | 1.030 | .348 | -.51146   | .31713    | -4.27393    | 3.25101    |
| ast/got28  | Equal variances assumed     | .021   | .891 | -.627  | 6     | .554 | -13.21667 | 21.06831  | -64.76896   | 38.33562   |
|            | Equal variances not assumed |        |      | -.577  | 1.544 | .637 | -13.21667 | 22.92151  | -145.79440  | 119.36107  |
| alt/gpt28  | Equal variances assumed     | .110   | .752 | -.144  | 6     | .890 | -.73500   | 5.09066   | -13.19140   | 11.72140   |
|            | Equal variances not assumed |        |      | -.145  | 1.743 | .900 | -.73500   | 5.08368   | -26.01121   | 24.54121   |
| LDH28      | Equal variances assumed     | .386   | .557 | -.429  | 6     | .683 | -37.83167 | 88.13275  | -253.48473  | 177.82140  |
|            | Equal variances not assumed |        |      | -.348  | 1.343 | .775 | -37.83167 | 108.86298 | -811.89499  | 736.23166  |
| CPK28      | Equal variances assumed     | .387   | .557 | -.030  | 6     | .977 | -11.39333 | 374.70226 | -928.25674  | 905.47008  |
|            | Equal variances not assumed |        |      | -.038  | 2.679 | .973 | -11.39333 | 303.54566 | -1046.37695 | 1023.59029 |

|                |                             |   |   |        |   |      |          |        |          |         |
|----------------|-----------------------------|---|---|--------|---|------|----------|--------|----------|---------|
| <b>GR35</b>    | Equal variances assumed     | . | . | .666   | 2 | .574 | .10000   | .15011 | -.54588  | .74588  |
|                | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | .10000   | .      | .        | .       |
| <b>GB35</b>    | Equal variances assumed     | . | . | -.866  | 2 | .478 | -.5000   | .5774  | -2.9841  | 1.9841  |
|                | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -.5000   | .      | .        | .       |
| <b>Hb35</b>    | Equal variances assumed     | . | . | 3.500  | 2 | .073 | .7000    | .2000  | -.1605   | 1.5605  |
|                | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | .7000    | .      | .        | .       |
| <b>Hct35</b>   | Equal variances assumed     | . | . | 6.653  | 2 | .022 | 1.93333  | .29059 | .68301   | 3.18366 |
|                | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | 1.93333  | .      | .        | .       |
| <b>MCV35</b>   | Equal variances assumed     | . | . | 33.936 | 2 | .001 | 6.46667  | .19055 | 5.64678  | 7.28656 |
|                | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | 6.46667  | .      | .        | .       |
| <b>MCH35</b>   | Equal variances assumed     | . | . | 6.318  | 2 | .024 | .69333   | .10975 | .22113   | 1.16554 |
|                | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | .69333   | .      | .        | .       |
| <b>MCHC35</b>  | Equal variances assumed     | . | . | -6.232 | 2 | .025 | -1.91667 | .30754 | -3.23988 | -.59345 |
|                | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -1.91667 | .      | .        | .       |
| <b>RDW35</b>   | Equal variances assumed     | . | . | 42.471 | 2 | .001 | 1.85667  | .04372 | 1.66857  | 2.04476 |
|                | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | 1.85667  | .      | .        | .       |
| <b>plt35</b>   | Equal variances assumed     | . | . | -6.107 | 2 | .026 | -181.333 | 29.695 | -309.100 | -53.567 |
|                | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -181.333 | .      | .        | .       |
| <b>MPV35</b>   | Equal variances assumed     | . | . | 2.162  | 2 | .163 | .09000   | .04163 | -.08913  | .26913  |
|                | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | .09000   | .      | .        | .       |
| <b>P-LCR35</b> | Equal variances assumed     | . | . | 4.630  | 2 | .044 | .05767   | .01245 | .00408   | .11125  |
|                | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | .05767   | .      | .        | .       |

|              |                             |   |   |        |   |      |         |         |          |         |
|--------------|-----------------------------|---|---|--------|---|------|---------|---------|----------|---------|
|              | not assumed                 |   |   |        |   |      |         |         |          |         |
| PDW35        | Equal variances assumed     | . | . | 12.284 | 2 | .007 | -.43333 | .03528  | -.58512  | -.28155 |
|              | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -.43333 | .       | .        | .       |
| PCT35        | Equal variances assumed     | . | . | 3.190  | 2 | .086 | .07667  | .02404  | -.02676  | .18009  |
|              | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | .07667  | .       | .        | .       |
| neutrofil35  | Equal variances assumed     | . | . | -2.598 | 2 | .122 | -3.000  | 1.155   | -7.968   | 1.968   |
|              | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -3.000  | .       | .        | .       |
| linfociti35  | Equal variances assumed     | . | . | .936   | 2 | .448 | 6.333   | 6.766   | -22.778  | 35.445  |
|              | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | 6.333   | .       | .        | .       |
| monociti35   | Equal variances assumed     | . | . | -3.500 | 2 | .073 | -2.333  | .667    | -5.202   | .535    |
|              | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -2.333  | .       | .        | .       |
| basofili35   | Equal variances assumed     | . | . | -3.755 | 2 | .064 | -.05000 | .01332  | -.10730  | .00730  |
|              | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -.05000 | .       | .        | .       |
| eosinofili35 | Equal variances assumed     | . | . | 10.250 | 2 | .009 | .13667  | .01333  | .07930   | .19404  |
|              | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | .13667  | .       | .        | .       |
| azotemia35   | Equal variances assumed     | . | . | -5.857 | 2 | .028 | -27.333 | 4.667   | -47.412  | -7.254  |
|              | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -27.333 | .       | .        | .       |
| glicemia35   | Equal variances assumed     | . | . | -.040  | 2 | .972 | -5.667  | 142.316 | -618.002 | 606.669 |
|              | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -5.667  | .       | .        | .       |
| creatinina35 | Equal variances assumed     | . | . | 7.454  | 2 | .018 | .27667  | .03712  | .11696   | .43637  |
|              | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | .27667  | .       | .        | .       |
| magnesio35   | Equal variances assumed     | . | . | .866   | 2 | .478 | .02000  | .02309  | -.07937  | .11937  |

|            |                             |   |   |        |   |      |          |          |           |          |
|------------|-----------------------------|---|---|--------|---|------|----------|----------|-----------|----------|
|            | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | .02000   | .        | .         | .        |
| calciot35  | Equal variances assumed     | . | . | -.918  | 2 | .456 | -.02667  | .02906   | -1.15170  | .09837   |
|            | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -.02667  | .        | .         | .        |
| fosforo35  | Equal variances assumed     | . | . | -.610  | 2 | .604 | -.26667  | .43716   | -2.14763  | 1.61429  |
|            | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -.26667  | .        | .         | .        |
| potassio35 | Equal variances assumed     | . | . | -.189  | 2 | .868 | -.0667   | .3528    | -1.5845   | 1.4512   |
|            | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -.0667   | .        | .         | .        |
| sodio35    | Equal variances assumed     | . | . | -.500  | 2 | .667 | -1.000   | 2.000    | -9.605    | 7.605    |
|            | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -1.000   | .        | .         | .        |
| PT35       | Equal variances assumed     | . | . | -.968  | 2 | .435 | -.17333  | .17901   | -.94355   | .59688   |
|            | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -.17333  | .        | .         | .        |
| PTT35      | Equal variances assumed     | . | . | -1.296 | 2 | .324 | -.05667  | .04372   | -.24476   | .13143   |
|            | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -.05667  | .        | .         | .        |
| fibrinog35 | Equal variances assumed     | . | . | .621   | 2 | .598 | 6.66667  | 10.72898 | -39.49643 | 52.82976 |
|            | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | 6.66667  | .        | .         | .        |
| INR35      | Equal variances assumed     | . | . | -3.250 | 2 | .083 | -.04333  | .01333   | -1.10070  | .01404   |
|            | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | -.04333  | .        | .         | .        |
| ast/got35  | Equal variances assumed     | . | . | .451   | 2 | .696 | .93333   | 2.06989  | -7.97268  | 9.83935  |
|            | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | .93333   | .        | .         | .        |
| alt/gpt35  | Equal variances assumed     | . | . | .215   | 2 | .850 | .53333   | 2.48283  | -10.14942 | 11.21609 |
|            | Equal variances not assumed |   |   | .      | . | .    | .53333   | .        | .         | .        |
| LDH35      | Equal variances             | . | . | -.808  | 2 | .504 | -1.26667 | 1.56773  | -8.01207  | 5.47873  |

|       |                             |  |  |      |   |      |          |          |            |           |
|-------|-----------------------------|--|--|------|---|------|----------|----------|------------|-----------|
|       | assumed                     |  |  |      |   |      |          |          |            |           |
|       | Equal variances not assumed |  |  |      |   |      | -1.26667 |          |            |           |
| CPK35 | Equal variances assumed     |  |  | .566 | 2 | .628 | 16.66667 | 29.42410 | -109.93503 | 143.26836 |
|       | Equal variances not assumed |  |  |      |   |      | 16.66667 |          |            |           |

I dati sono stati statisticamente analizzati con il *t*-test di Student a due code, per variabili indipendenti, per valori non appaiati, assumendo uguali varianze. Abbiamo studiato le variazioni di tutti i parametri ematochimici per gruppi clinicamente sensibili, nei controlli e nei trattati per 5 settimane:

- **funzione emopoietica** (GR, GB, Hb, Hct, MCV, MCH, RDW, Plt, MPV, P-LCR, PDW, Neutrofili, Linfociti, Basofili, eosinofili, Monoliti, MCHC,)
- **funzione emuntorio renale** (azotemia, creatinina, Na, K)
- **funzione emuntorio epatica** (got/alt, gpt/ast, ggt, fosf.Alc, Bild, Bilt)
- **coagulazione** (PT, PTT, Fibrinogeno)
  
- Abbiamo confrontato i **trattati** (20 soggetti, indicati con il simbolo 1) con i **controlli** (5 soggetti, indicati con il simbolo 2), nei vari tempi osservazionale (G0, G7, G14, G21, G28, G35, w per week).
- Il nostro laboratorio analisi veterinarie ha eseguito in totale **3400** esami ematochimici completi, CERTIFICATI, a 25 soggetti maschi Sprague-Dawley con cadenza settimanale. Le prime 850 determinazioni sono state eseguite sui 25 campioni prelevati ai 25 soggetti al momento dell'intervento e settimanalmente (G7=850 esami ematochimici, G14=680, G21=510, G28=340, G35=170) sono state eseguite le successive determinazioni, su tutti i soggetti, di cui, dopo l'esecuzione del prelievo in vivo, 5 per volta (1 controllo e 5 trattati, di cui 2 appartenenti al sottogruppo BP e 2 al sottogruppo rete riassorbibile), sono stati sacrificati in camera satura con CO<sub>2</sub>.

➤ Per eseguire l'indagine statistica abbiamo utilizzato il software SPSS 13.0 per Windows (Northwestern University Information Technology (NUIT) SPSS Inc., 1800 Sherman Avenue Evanston, Illinois 60201).

➤ Si osserva dalla [Tab. 13](#) del *t*-test che i parametri progressivamente nel tempo si normalizzano e dai 10 statisticamente tra loro diversi al G0, in G14 se ne osservano solamente 2, a G21 se ne contano 3, e 3 anche al G28, che sono di seguito elencati:

➤ **G0:**

|            |         |                      |
|------------|---------|----------------------|
| ○ Hct      | p<0.001 | funzione emopoietica |
| ○ MCHC     | p=0.002 | funzione emopoietica |
| ○ RDW      | p=0.006 | funzione emopoietica |
| ○ PLT      | p=0.003 | funzione emopoietica |
| ○ P-LCR    | p=0.011 | funzione emopoietica |
| ○ BASOFILI | p=0.001 | funzione emopoietica |
| ○ K        | p<0.001 | emuntorio renale     |
| ○ GOT      | p=0.024 | emuntorio epatico    |
| ○ PTT      | p=0.006 | coagulazione         |
| ○ INR      | p=0.05  | coagulazione         |

➤ **G14:**

|      |         |                  |
|------|---------|------------------|
| ○ K  | p=0.001 | emuntorio renale |
| ○ Na | p=0.002 | emuntorio renale |

➤ **G21:**

|        |         |                  |
|--------|---------|------------------|
| ○ K    | p=0.021 | emuntorio renale |
| ○ Crea | p=0.034 | emuntorio renale |

➤ **G28:**

|            |          |                      |
|------------|----------|----------------------|
| ○ GB       | p=0.045  | funzione emopoietica |
| ○ Monociti | p<0.0001 | funzione emopoietica |
| ○ INR      | =0.021   | coagulazione         |

### 6.4.5 Analisi statistica delle variazioni ponderali

*Tab. 14: media dei pesi dei controlli (1) e dei trattati (2) al tempo (w)*

|           | T | N  | Mean of weigths | Std. Deviation |
|-----------|---|----|-----------------|----------------|
| <b>w0</b> | 1 | 5  | 264.70          | 3.13           |
|           | 2 | 20 | 264.29          | 7.54           |
| <b>w1</b> | 1 | 5  | 347.22          | 0.88           |
|           | 2 | 20 | 335.85          | 8.15           |
| <b>w2</b> | 1 | 4  | 374.33          | 3.25           |
|           | 2 | 16 | 354.00          | 4.57           |
| <b>w3</b> | 1 | 3  | 387.20          | 1.14           |
|           | 2 | 13 | 388.52          | 20.38          |
| <b>w4</b> | 1 | 2  | 411.90          | 0.14           |
|           | 2 | 10 | 409.01          | 11.55          |

Medie dei pesi dei controlli (1) e dei trattati (2) nei vari tempi (w)

Inizialmente le medie dei pesi nei due gruppi, non erano diverse ( $p=0.9$ ) con il test di Kolmogorov-Smirnov e quindi i due gruppi erano inizialmente omogenei.

*Tab. 15: composizione dei due gruppi statistici: controlli (1) e dei trattati (2) al tempo iniziale (w0).*

|               | T | N  | Mean    | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|---------------|---|----|---------|----------------|-----------------|
| peso iniziale | 1 | 5  | 264.700 | 3.1289         | 1.3993          |
|               | 2 | 20 | 264.285 | 7.5370         | 1.6853          |

E quindi i due gruppi erano inizialmente omogenei

*Tab. 16 studio statistico sull'incremento del peso corporeo nei due gruppi: controlli (1) e dei trattati (2) confrontato con la media dei pesi iniziali*

|    | T | N  | Mean    | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|----|---|----|---------|----------------|-----------------|
| w1 | 1 | 5  | 82.520  | 3.1539         | 1.4105          |
|    | 2 | 20 | 71.560  | 4.3931         | .9823           |
| w2 | 1 | 4  | 110.500 | 3.6815         | 1.8407          |
|    | 2 | 16 | 88.944  | 4.3115         | 1.0779          |
| w3 | 1 | 3  | 123.900 | 2.4576         | 1.4189          |
|    | 2 | 13 | 122.969 | 25.8720        | 7.1756          |
| w4 | 1 | 2  | 150.250 | 1.9092         | 1.3500          |
|    | 2 | 10 | 143.690 | 15.6733        | 4.9563          |

Tabella degli incrementi di peso rispetto al peso iniziale

Ora studiamo se le differenze degli incrementi di peso sono significative con il *t*-test.

Tab. 17: studio statistico per la valutazione della significatività della variazione dell'incremento del peso corporeo, nei due gruppi: controlli (1) e dei trattati (2).

| Independent Samples Test, <i>t</i> -test for Equality of Means |          |    |                 |                 |                       |   |         |
|--|----------|----|-----------------|-----------------|-----------------------|---|---------|
|  | <i>t</i> | df | Sig. (2-tailed) | Mean Difference | Std. Error Difference | 95% Confidence Interval of the Difference |         |
| w1   | 5.214    | 23 | .000            | 10.9600         | 2.1020                | 6.6118                                    | 15.3082 |
| w2   | 9.153    | 18 | .000            | 21.5563         | 2.3552                | 16.6082                                   | 26.5043 |
| w3   | .061     | 14 | .953            | .9308           | 15.3536               | -31.9995                                  | 33.8610 |
| w4   | .569     | 10 | .582            | 6.5600          | 11.5270               | -19.1237                                  | 32.2437 |

Le abbreviazioni in Tab.17 sono di seguito spiegate:

- df- degree of freedom il totale dei soggetto meno 1 grado di libertà per gruppo
- Sig.(2-tailed) significatività a due code (p) probabilità
- Std err errore standard della differenza è la variabilità della distribuzione

Abbiamo attentamente studiato il comportamento della curva della media dei pesi, perché esprime direttamente lo stato di benessere animale. La sovrapposibilità dei grafici di controlli e trattati, dimostra che gli impianti non condizionano il comportamento alimentare e non provocano alterazioni organiche negli emuntori dei soggetti studiati. Il *t*-test di Student a due code, per variabili indipendenti, nei vari momenti osservazionali, riporta la significatività delle differenze degli incrementi di peso per ogni osservazione nel corso del tempo (W-Week) rispetto al peso iniziale.

Tab. 18: Valori percentuali delle medie degli incrementi del grafico in Fig. 119.

| week | controlli | trattati |
|------|-----------|----------|
| 1    | 31,19     | 28,01    |
| 2    | 41,89     | 34,45    |
| 3    | 47,07     | 47,15    |
| 4    | 57,43     | 54,24    |

## 6.5- Risultati QUINTO esperimento bioadesività

### 6.5.1 Risultati esperimento bioadesività

Le prove hanno evidenziato una differenza rilevante di comportamento tra i vari campioni. Il campione BP lato opaco-ruvido ha presentato la maggiore forza di adesione durante tutto il test. Il valore massimo registrato  $F_{max}=1N$  (**buckypaper 1° run**). La seconda prova, **buckypaper 2° run**, è stata effettuata impiegando la stessa faccia di BP utilizzata nell'esperimento precedente registrando una netta caduta della forza media di adesione con valore massimale  $F_{max}=0.2N$ . La superficie liscia-lucente del buckypaper (**buckypaper lato liscio**) mostra una minore adesività rispetto alla superficie ruvida. Si registra, infatti, un valore di  $F_{max}$  pari a  $0.8N$ . La rete Parietene Progrid® presenta un valore di bioadesività ancora più basso,  $F_{max}=0.01$  N. Di seguito è riportata la formula che esprime il lavoro, espresso in  $g = \int_0^l F dl$  funzione della forza adesiva misurata dallo strumento e dallo spostamento del campione, durante il "peeling test:

### 6.5.2 Prima prova BP lato ruvido su supporto biologico disidratato

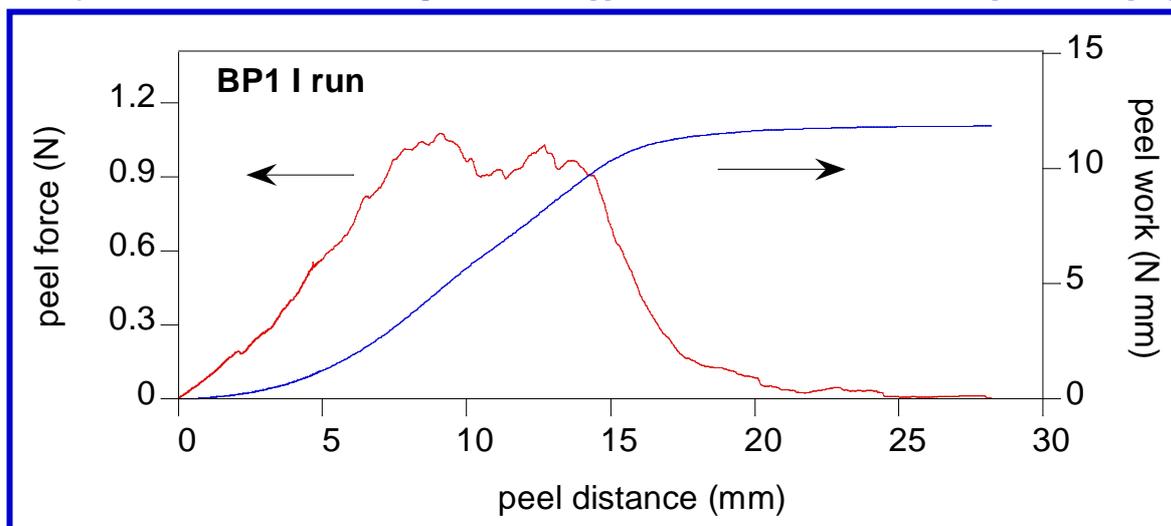
*Fig. 131: il BP asciutto non aderisce alla fascia disidratata*

Abbiamo iniziato il 1 test osservando che il BP asciutto non aderisce al supporto biologico disidratato e quindi non è stato possibile eseguire il peeling test a  $90^\circ$  e quindi non abbiamo potuto ricavare il grafico

*Fig. 132: il BP asciutto non aderisce al supporto disidratato*

### 6.5.3 Prima prova BP lato ruvido su supporto biologico umido

Fig. 133: forza di adesione del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria

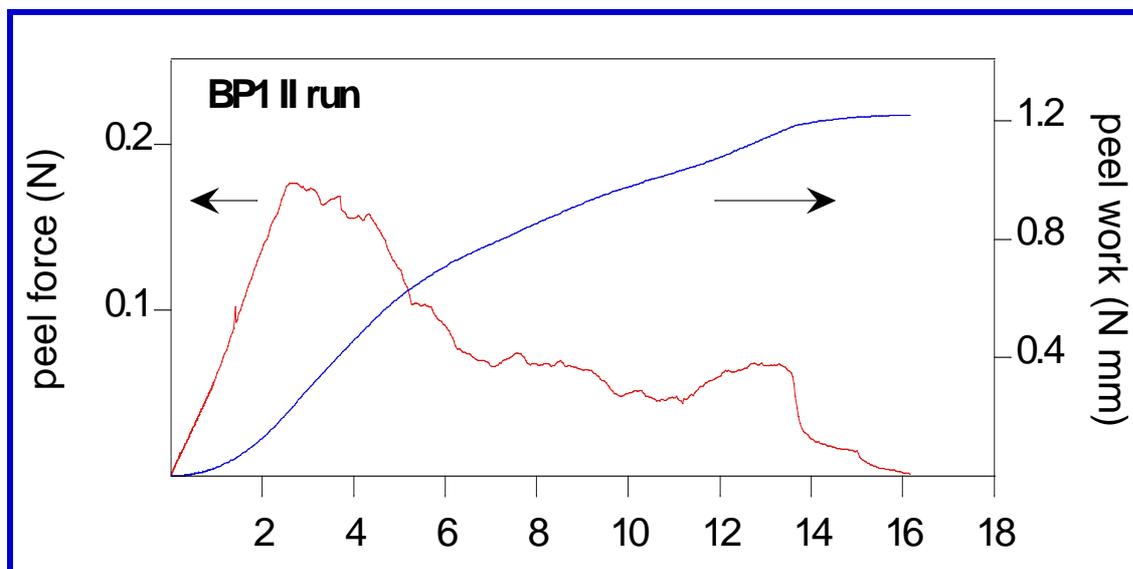


fascia previa umidificazione della superficie fasciale con acqua.

Il grafico in colore rosso esprime la forza di adesione del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia umida e man mano che viene traziionato incrementa la resistenza fino ad un valore limite di forza adesiva di 0,9 -1 N che esprime la resistenza e la consistenza della fascia muscolare adesa al suo supporto muscolare, oltrepassato tale valore si osserva il cedimento strutturale corrispondente alla lacerazione della fascia fibrosa (primo avvallamento), la risposta di un'altra porzione di fascia (secondo picco) e la successiva lacerazione della seconda porzione fasciale congiuntamente a quella della compagine muscolare. Parti della fascia restano adese al BP.

Fig. 134, 135, 136: preparazione del test per lo studio della forza di adesione del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia umidificata con acqua di fonte.

#### 6.5.4 Prima prova BP lato ruvido ripetuto con il BP del precedente esperimento, su nuovo supporto biologico idratato

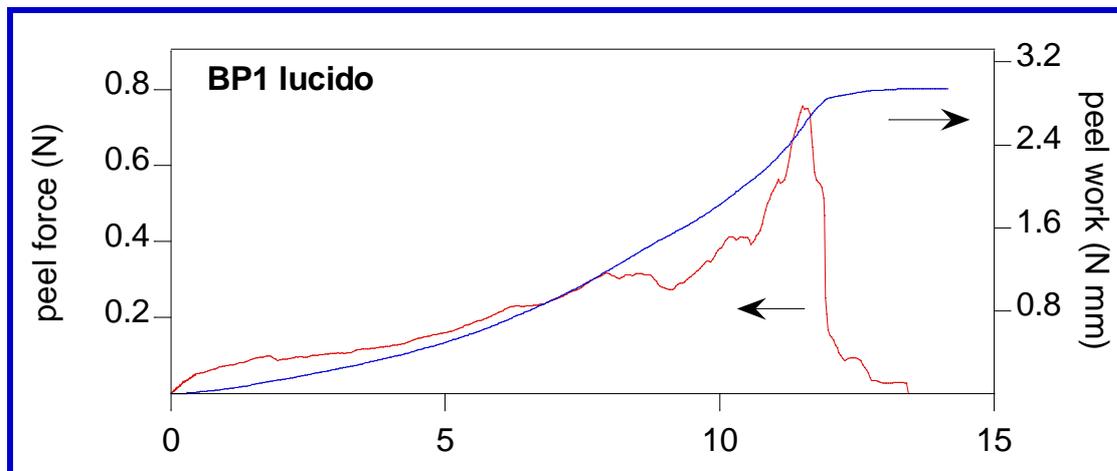


*Fig. 137: ripetizione del test: forza di adesione del BP utilizzato nel precedente esperimento, applicato ad un nuovo campione di tessuto muscolare ricoperto della propria fascia.*

Il grafico in colore rosso esprime la forza di adesione del BP sulla superficie nel quale sono rimasti adesi brandelli di fascia muscolare del precedente esperimento che azzerano, nelle aree interessate, la capacità adesiva perché già saturate. Si procede quindi all'applicazione del BP ad un nuovo campione di tessuto muscolare ricoperto della propria fascia e man mano che il BP viene traziionato incrementa la resistenza fino ad un valore limite ( $< 0,2$  N) di forza adesiva che esprime l'adesività del BP la cui superficie è stata modificata dal precedente esperimento. Superati i 2 mm il BP si stacca dal supporto fibroso e il profilo decade esprimendo la parte di superficie non più adesiva per la presenza dei brandelli di tessuto del primo esperimento, tra i 12 ed i 14 mm il profilo risale perché probabilmente quella area non era saturata e quindi manifesta attività adesiva.

*Fig. 138: ripetizione del test di bioadesività utilizzando lo stesso BP del precedente esperimento, applicato ad un nuovo campione di tessuto muscolare ricoperto della propria fascia.*

### 6.5.5 Prima prova BP lato liscio-lucido

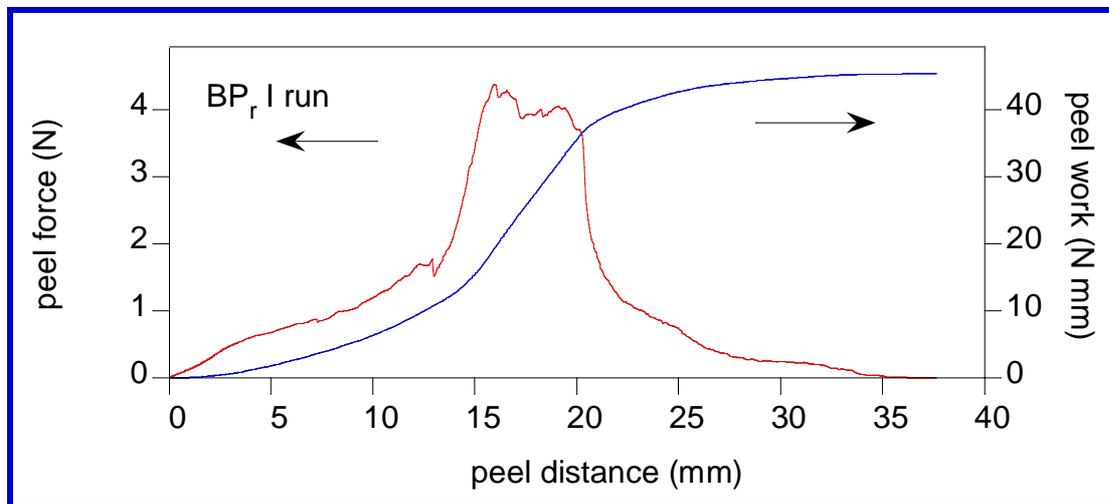


*Fig. 139: il grafico in colore rosso esprime la forza adesiva del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia dal lato liscio-lucido.*

Il grafico in colore rosso esprime la forza adesiva del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia, applicato dal lato liscio-lucido e man mano che viene traziionato incrementa la resistenza fino ad un valore limite di forza adesiva di 0,7 N che esprime la resistenza e la consistenza della fascia muscolare adesa al suo supporto muscolare. Oltrepassato tale valore si osserva il cedimento strutturale corrispondente alla lacerazione della fascia fibrosa. All'osservazione macroscopica, non sembra che parti della fascia restino adese al BP.

*Figg. 140, 141,142,143: misurazione della bioadesività del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia dal lato liscio-lucente.*

### 6.5.6 Seconda prova BP lato ruvido su supporto biologico idratato con soluzione fisiologica



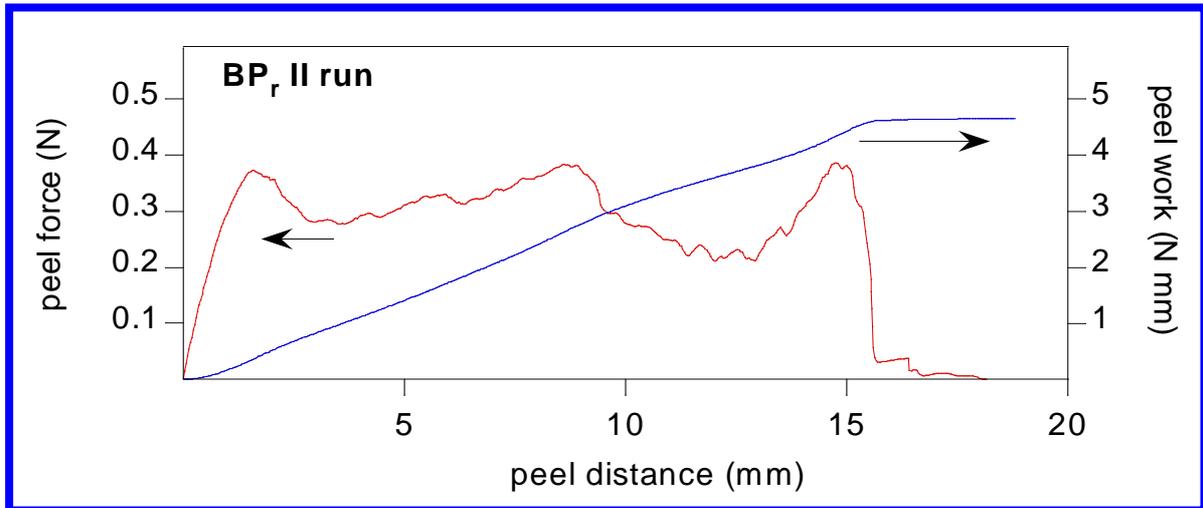
*Fig. 144: il grafico in colore rosso esprime la forza adesiva del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia inumidito con soluzione fisiologica.*

Il grafico in colore rosso esprime la forza adesiva del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia inumidito con soluzione fisiologica e man mano che viene traziionato incrementa la resistenza fino ad un valore limite di forza adesiva di 4 N che esprime la resistenza e la consistenza della fascia muscolare adesa al suo supporto muscolare, oltrepassato tale valore si osserva il cedimento strutturale corrispondente alla lacerazione della fascia fibrosa (primo avvallamento), lacerazione della componente muscolare (secondo picco) e lacerazione massiva senza ulteriore resistenza. Parte della fascia resta adesa al BP. La soluzione fisiologica sembra provocare una modificazione del comportamento adesivo del BP rispetto all'acqua pura ma non ne abbiamo ancora chiarito il meccanismo.

*Figg. 145, 146: preparazione del test per lo studio della forza di adesione del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia reidratata.*

*Figg. 147, 148: completamento del test per lo studio della forza di adesione del BP tal quale, secco, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia reidratato con soluzione fisiologica*

### 6.5.7 Ripetizione del secondo test BP lato ruvido già utilizzato nel precedente esperimento su nuovo supporto biologico idratato con soluzione fisiologica

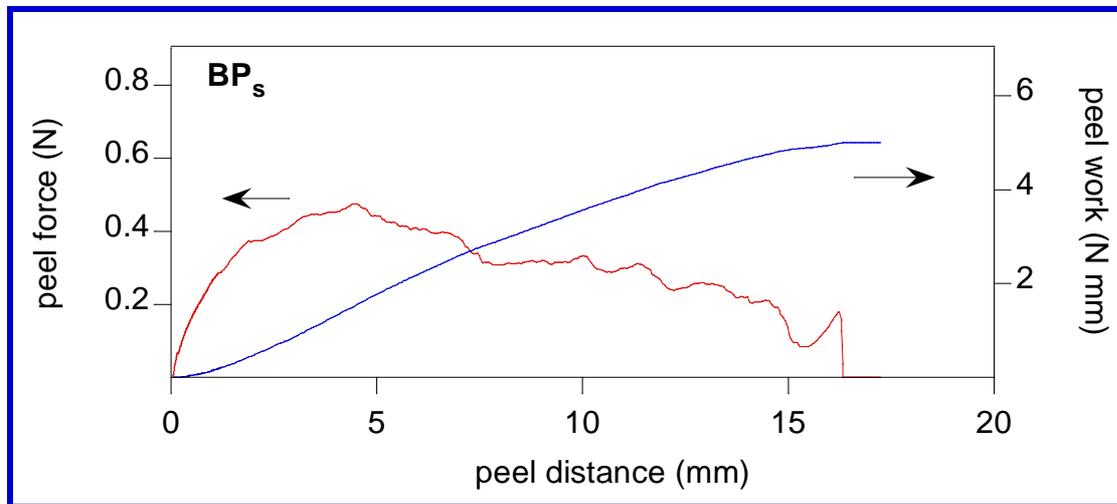


*Fig. 149: il grafico in colore rosso esprime la forza adesiva del BP già utilizzato nel precedente esperimento, applicato al nuovo campione di tessuto muscolare ricoperto della propria fascia inumidito con soluzione fisiologica.*

Il grafico in colore rosso esprime la forza bioadesiva del BP precedentemente utilizzato sulla superficie del quale sono rimasti adese isole di fascia muscolare del precedente esperimento. Si procede quindi all'applicazione del BP al nuovo campione di tessuto muscolare ricoperto della propria fascia e man mano che il BP viene trazionato incrementa la resistenza fino ad un valore limite 0,38 N. Nelle aree in cui la fascia è rimasta lacerata, la capacità adesiva si riduce ( $< 0,25$  N) esprimendo l'adesività condizionata del BP, la cui superficie è stata modificata dal precedente esperimento, mentre nelle zone libere dai brandelli di fascia, l'adesività sale come nel BP vergine. Superati i 16 mm il BP si stacca dal supporto fibroso e il profilo decade.

*Figg. 150, 151, 152: test per lo studio della forza di adesione del BP utilizzato nel test precedente, applicato al nuovo campione biologico di tessuto muscolare ricoperto della propria fascia reidratato con soluzione fisiologica. Si osserva una capacità adesiva, ridotta rispetto al precedente test per la presenza di isole di tessuto lacerato dal precedente test che occupano parte della superficie bioadesiva del BP lato ruvido.*

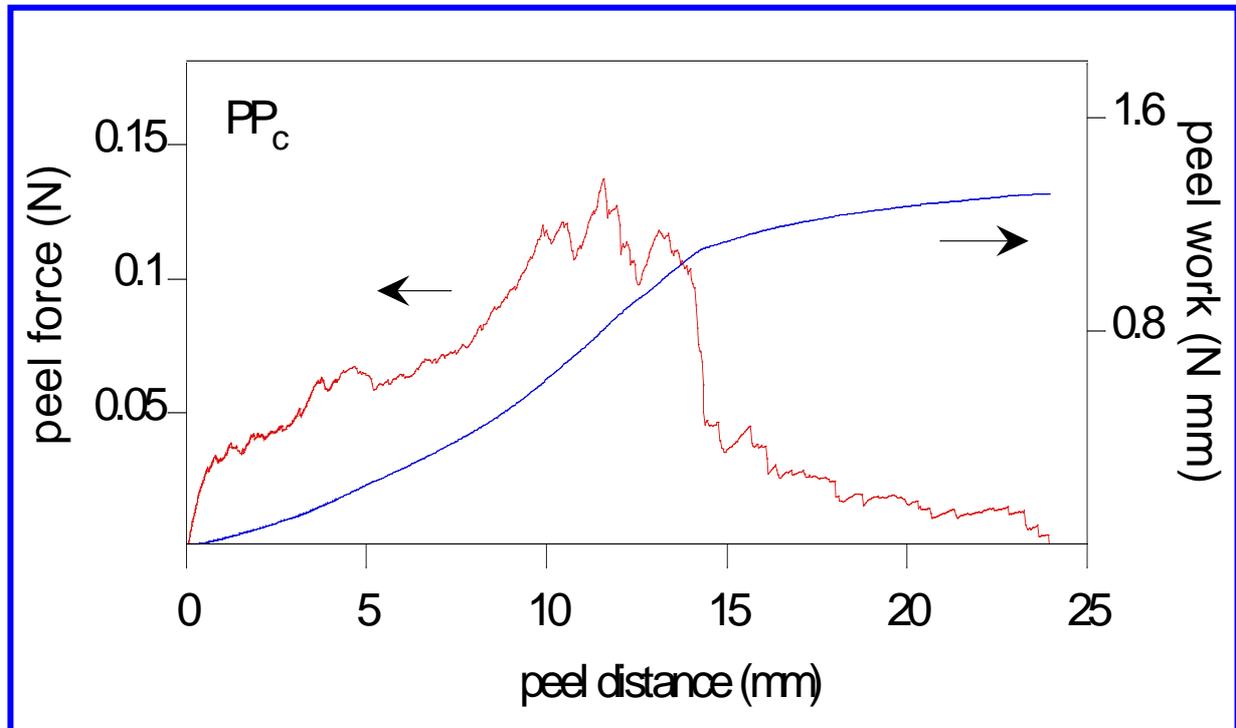
### 6.5.8 Seconda prova BP lato liscio



*Fig. 153: Seconda prova BP lato liscio applicato a supporto biologico idratato.*

Il grafico in colore rosso esprime la forza adesiva del BP tal quale, secco, applicato dal lato liscio-lucente alla fascia che riveste il tessuto muscolare della parete addominale di coniglio femmina. Man mano che viene trazione, incrementa la resistenza fino ad un valore limite di forza adesiva di 0,5 N, che esprime la resistenza e la consistenza della fascia muscolare adesa al suo supporto muscolare idratato. Man mano che il BP lato liscio si stacca dal supporto biologico, si osserva un comportamento praticamente uniforme (anche se il supporto biologico è disomogeneo) lungo tutto la superficie adesa al BP, fino al completo distacco. Parti della fascia non sembrano restare adese al BP. In future indagini, acclareremo anche questo punto.

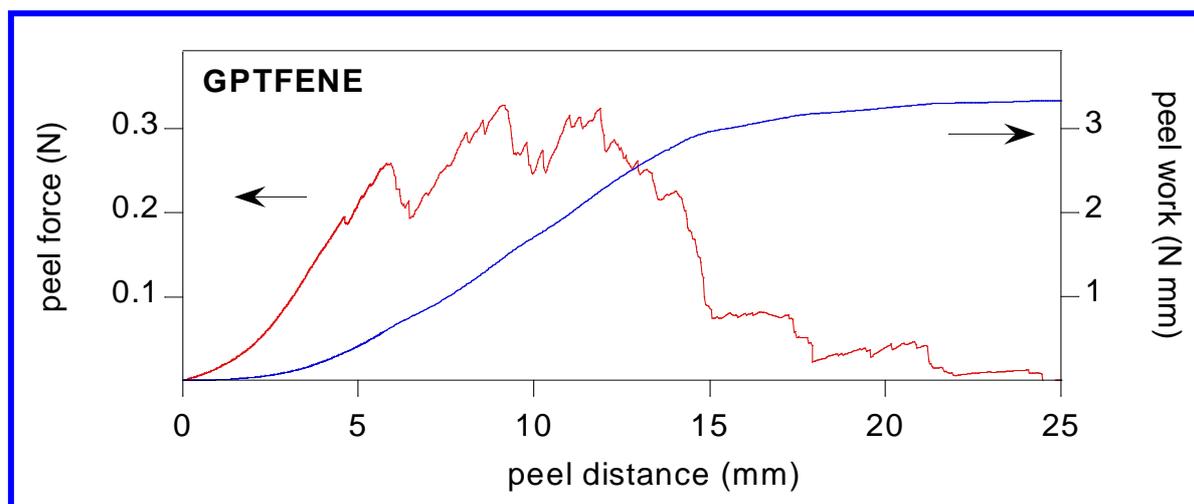
### 6.5.9 Misurazione della bioadesività del self-gripping Parietene Progrid® Coated rivestito con poliglactina su una delle due superfici



*Fig. 154: misurazione della bioadesività del Parietene Progrid® lato Coated (PP), applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia dal lato pretrattato con POLIGLACTINA*

Il grafico in colore rosso esprime la forza adesiva del Parietene Progrid (PP), applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia dal lato trattato con POLIGLACTINA al fine di aumentarne l'asperità superficiale e quindi conferirgli la bioadesività (self.grip). Man mano che il campione in analisi viene traziato, aumenta la resistenza che cade improvvisamente in corrispondenza delle zone di distacco della protesi dal supporto fasciale, risalita del profilo in corrispondenza delle zone adese, fino ad un valore limite di forza adesiva di 0,014 N, che esprime la intensità della forza adesiva del campione al suo supporto fasciale-muscolare. Oltrepastato tale valore si osserva il completo distacco, senza lacerazione della componente fasciale.

## 6.5.10 Misurazione bioadesività di protesi non bioadesive, fissate con colla di fibrina Tissucol®



### 6.5.10.1 Misurazione bioadesività di INFINITY GORE® con colla di fibrina Tissucol®

*Fig. 155: INFINITY GORE® Polytetrafluoroethylene not expanded (GPTFENE) hexagonale net*

La curva rossa in Fig. 156 mostra la forza bioadesiva sviluppata dal collante tra fascia e materiale protesico del prototipo INFINITY GORE® rete a maglia esagonale, realizzata in Poly tetra fluoro ethylene non espanso (Fig. 157). La superficie applicata sul campione biologico di supporto, di fascia muscolare bagnata, è realizzato con un rettangolo di 3,5x5 cm ricavato dalla parete muscolare addominale di coniglio femmina. Il prototipo protesico è fissato con colla di fibrina, TISSUCOL®, al supporto biologico ed il test inizia dopo 5 minuti dall'applicazione della colla. La forza di bioadesività è misurata dalla trazione applicata al campione protesico, in funzione dello spostamento della protesi sui piani fasciali e muscolari. Lo strumento (*vedi* 5.5- Materiali e metodi QUINTO esperimento) registra una intensità di picco di 0,3 N alla distanza di 5 dei 15 mm dal margine e quindi si osserva una caduta della forza adesiva. Supponiamo che la rete si sia completamente staccata dalla fascia per rottura dei legami proteici del collante.

*Fig. 156: INFINITY GORE® rete a maglie esagonali (Polytetrafluoroethylene not expanded) fissata con colla di fibrina (TISSUCOL®) su parete muscolare addominale di coniglio*

### 6.5.10.2 Misurazione bioadesività di CORDUROY GORE® con colla di fibrina Tissucol®

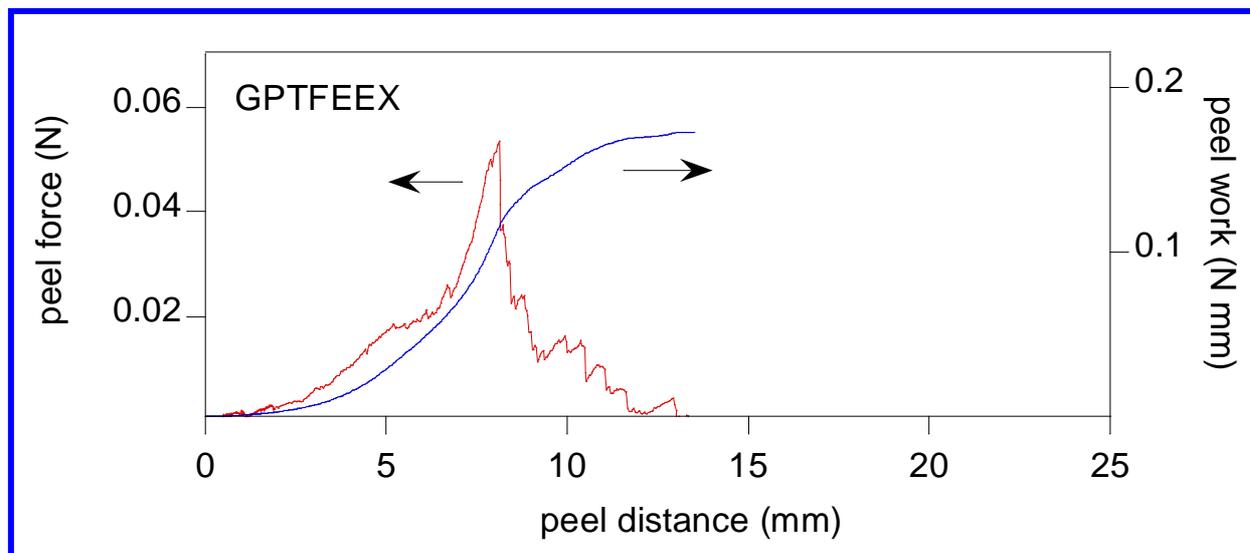
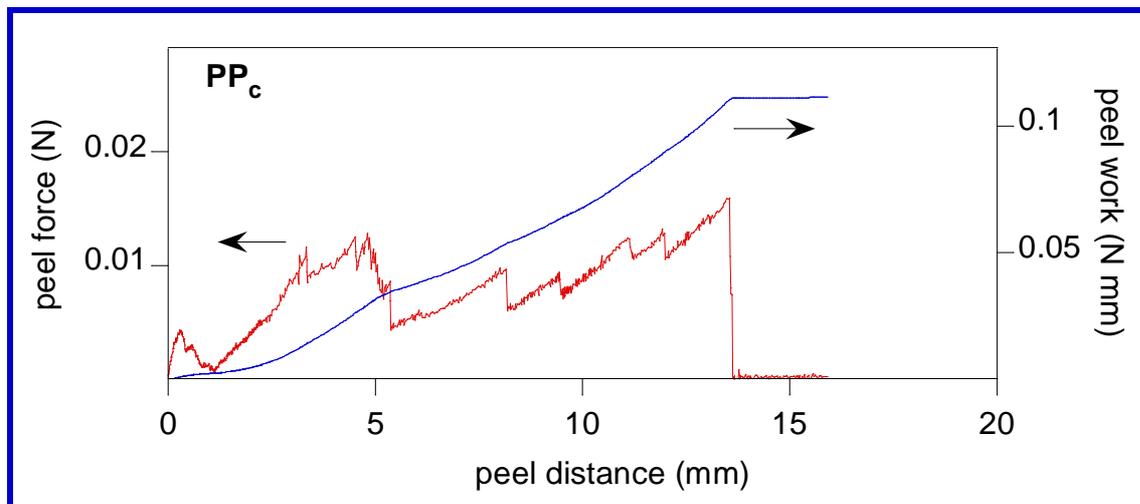


Fig. 157: *Polytetrafluoroethylene expanded (GPTFEEX) CORDUROY® GORE® mesh.*

La curva rossa in Fig. 157 mostra la forza bioadesiva sviluppata dal collante tra fascia e materiale protesico del prototipo CORDUROY GORE®, realizzata in Poli tetra fluoro ethylene espanso (Fig. 158) e applicata dal lato liscio. La superficie del campione biologico di supporto è stata inumidita con soluzione fisiologica. Il supporto è realizzato con un rettangolo di 3,5x5 cm ricavato dalla parete muscolare addominale di coniglio femmina. Il prototipo protesico è fissato con colla di fibrina, TISSUCOL® al supporto biologico ed il test inizia dopo 5 minuti dalla deposizione della colla ed applicazione della protesi, in modo da dare il tempo necessario al consolidamento dei legami chimici della fibrina. La forza di bioadesività è stata misurata sulla base della trazione, applicata al campione protesico, misurando lo spostamento della protesi sui piani fasciali e muscolari. Lo strumento (*vedi 5.5- Materiali e metodi QUINTO esperimento vedi sopra*) misura una intensità di picco di 0,05 N alla distanza di 8 mm dal margine e quindi, abbiamo osservato una caduta della forza adesiva, probabilmente per il completo distacco della protesi, applicata dalla parte liscia, dalla fascia, per rottura dei legami proteici del collante, senza opporre ulteriore resistenza.

*Fig. 158: Polytetrafluoroethylene expanded (GPTFEEX) CORDUROY® GORE® mesh*

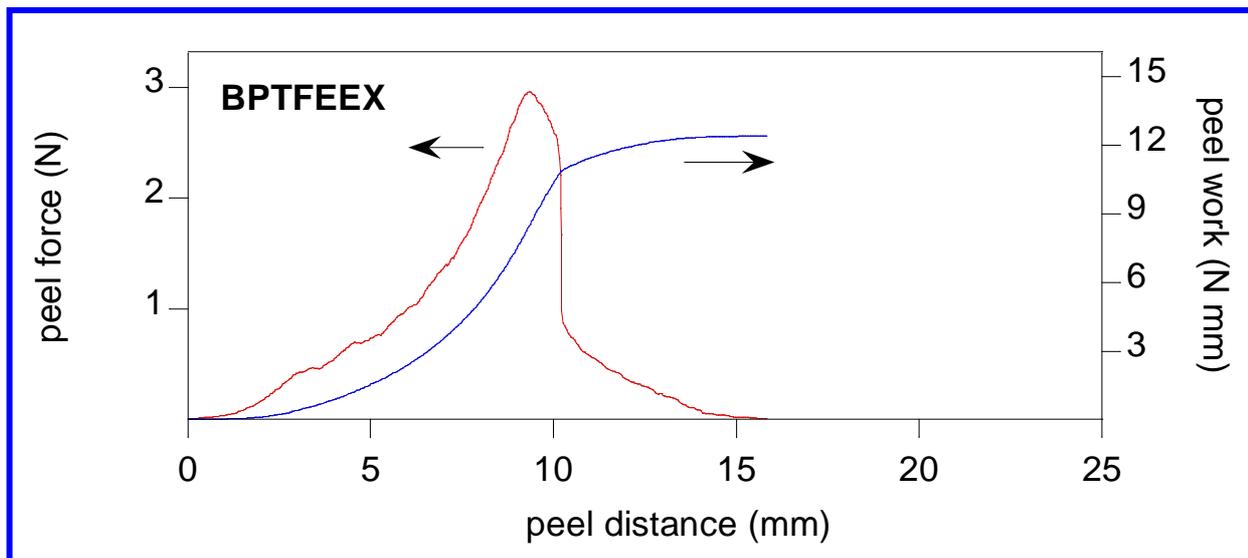
### 6.5.10.3 Misurazione bioadesività DEL POLIPROPILENE fissato con colla di fibrina Tissucol®



*Fig. 159: misurazione della bioadesività del Parietene Progrip® DAL LATO NON RIVESTITO CON POLIGLACTINA, applicato al tessuto muscolare umido, ricoperto dalla propria fascia, FISSATO CON COLLA DI FIBRINA.*

Il grafico in Fig. 159 esprime la forza adesiva del Parietene Progrip® (PP), applicato al tessuto muscolare ricoperto dalla propria fascia ed inumidito con soluzione fisiologica. Il materiale protesico è il POLIPROPILENE del PP, applicato dal lato NON trattato con POLIGLACTINA, al fine di misurare la bioadesività della rete, fissata con colla di fibrina. Man mano che il campione in analisi viene traziionato, incrementa la resistenza che cade improvvisamente in corrispondenza delle zone di distacco della protesi dal supporto fasciale, per rottura dei legami proteici, la risalita del profilo corrisponde alle zone di aderenza, fintanto che i legami proteici non si frantumano sotto trazione, fino ad un valore di picco di forza adesiva di 0,013 N, che esprime l'intensità della forza adesiva del campione al suo supporto fasciale-muscolare. Oltrepassato tale valore si osserva il distacco della protesi dal supporto, senza lacerazione della componente fasciale.

#### 6.5.10.4 Misurazione bioadesività del PTFE ESPANSO BARD® fissato con colla di fibrina Tissucol®

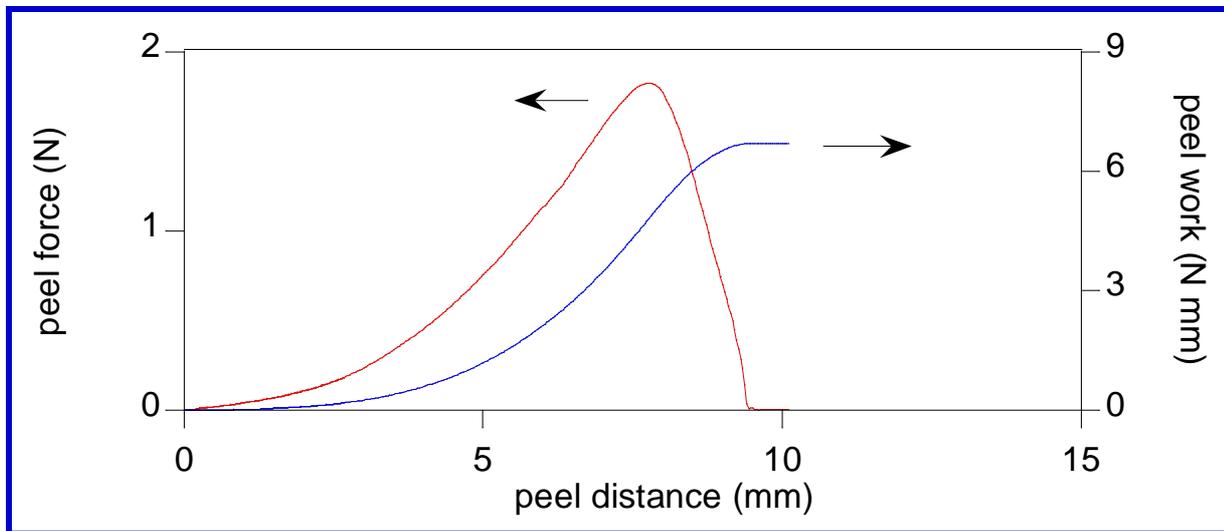


*Fig. 160: misurazione della bioadesività del Poli Tetra Fluoro Etilene Espanso Bard® applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia, fissato con colla di fibrina Tissucol®*

Il grafico in Fig. 160 esprime la forza adesiva del Poli Tetra Fluoro Etilene Espanso Bard®, applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia e fissato con colla di fibrina. Il campione in analisi (Fig. 161) è trazionato sviluppando una forte bioadesività, in corrispondenza della zona centrale della protesi, ad 8 mm dal margine protesico. La resistenza raggiunge un valore di picco di forza adesiva di 3 N, che esprime la intensità della forza adesiva del campione al suo supporto fasciale. Oltrepassato tale valore si osserva il distacco progressivo della protesi dal supporto, senza lacerazione della componente fasciale.

*Fig. 161: aspetto del Poli Tetra Fluoro Etilene Espanso Bard® applicato al tessuto muscolare ricoperto della propria fascia, fissato con colla di fibrina Tissucol®.*

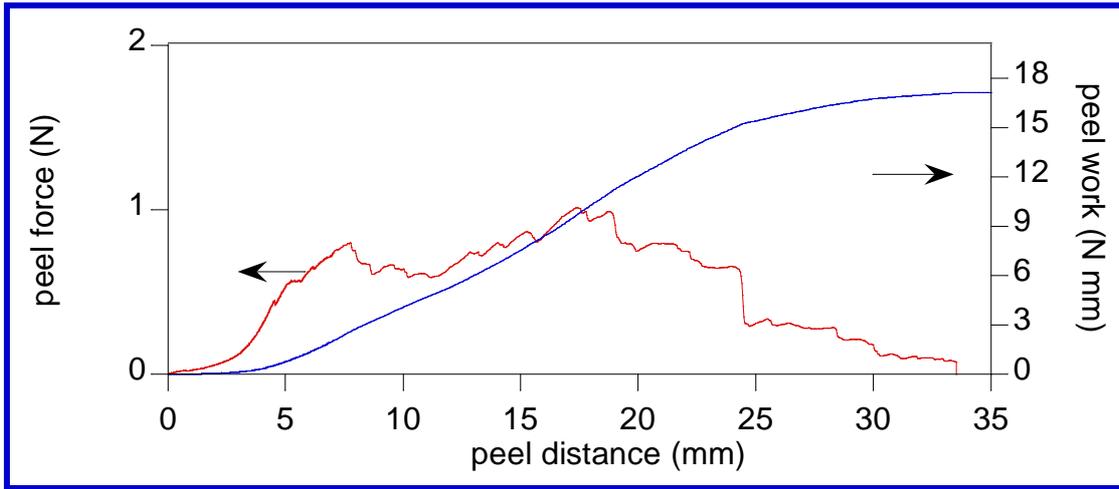
### 6.5.11 Test in vivo



*Fig. 162: peeling test eseguito sul preparato chirurgico del sito di impianto di un campione di BP applicato in regione parete addominale anteriore, in una tasca realizzata tra il piano sottocutaneo e la fascia muscolare.*

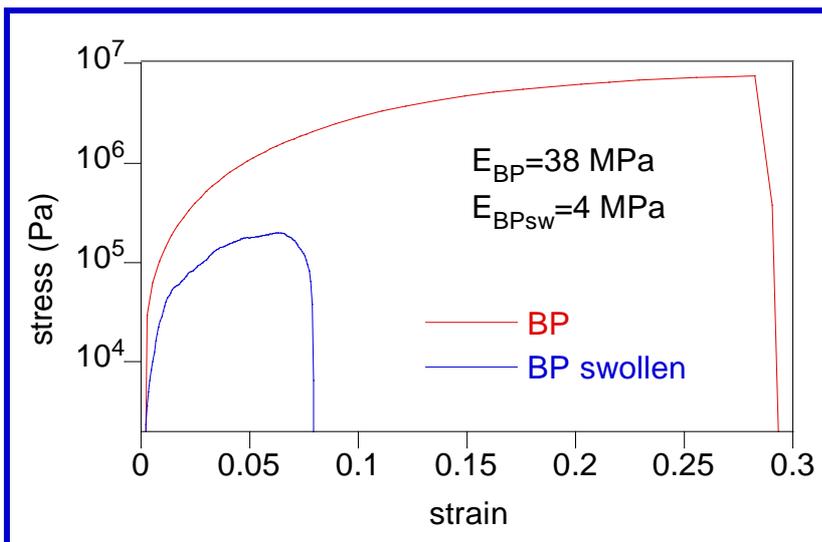
Prova in cui si misura la forza adesiva del BP impiantato in regione laterale della parete addominale anteriore, in una tasca realizzata tra il piano sottocutaneo e la fascia muscolare. La superficie rugosa-opaca è a diretto contatto con la fascia muscolare mentre il lato liscio è rivolto al derma, *vedi*

*Fig. 162.*



*Fig. 163: peeling test eseguito sul preparato chirurgico del sito di impianto di un campione di BP applicato sul peritoneo parietale dal lato ruvido e con il lato liscio a contatto con le anse intestinali*

La Fig. 163 sintetizza la prova del BP adesivo alla parete peritoneale dal suo lato rugoso-opaco ed esposto alle anse intestinali dal suo lato liscio-lucido. Abbiamo, infine, sperimentato l'effetto dell'idratazione sul BP misurandone la deformazione e la capacità tensile sia allo stato secco, tal quale come prodotto in fabbrica che dopo idratazione conseguente all'impianto in altro soggetto. La Fig. 164 e la Tab. 19 sintetizzano la prova documentando l'importante effetto dell'idratazione sulla consistenza del campione studiato.



*Fig. 164: prove tensili di sforzo-deformazione del BP secco (in rosso) ed idratato (in bleu).*

*Tab. 19: prove tensili sforzo-deformazione (Peeling test a 90°) del BP secco come prodotto di fabbrica e del BP idratato, dopo sacrificio di coniglio femmina New Zealand da 2500 g, sulla quale è stato realizzato l'impianto di BP 2x2 cm<sup>2</sup>, in tasca muscolofasciale della parete addominale e in altro soggetto da 2565 g sul peritoneo parietale.*

| <b>Sample</b>            | <b>Mean peel strength (N/mm)</b> | <b>Maximum peel strength (N/mm)</b> | <b>Pell work (J/m<sup>2</sup>)</b> |
|--------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|
| BP on peritoneum surface | 0.037                            | 0.055                               | 31                                 |
| BP in muscle pocket      | -                                | (0.091)                             | (33)                               |

### 6.5.12 Sintesi dei risultati

Le prove hanno evidenziato una differenza significativa di comportamento tra i vari campioni. Il campione BP lato opaco-ruvido ha presentato la maggiore forza di adesione in tutti i test. Il valore massimo registrato  $F_{max}=1N$  (**buckypaper 1° run**). La seconda prova, **buckypaper 2° run**, è stata realizzata impiegando la stessa faccia di BP utilizzata nell'esperimento precedente registrando una netta caduta della forza media di adesione con valore massimale  $F_{max}=0.2N$ . La superficie liscia-lucente del BP (buckypaper lato liscio) mostra una minore adesività rispetto alla superficie ruvida (vedi Fig. 120, 121). Si registra, infatti, un valore di  $F_{max}$  pari a 0.8 N. La rete Parietene Progrid® presenta un valore ancora più basso di bioadesività,  $F_{max}=0.01 N$ .

# 7 DISCUSSIONE

## 7.1- Discussione test PRIMO esperimento

### 7.1.1- Discussione test in VITRO primo esperimento

Nel nostro studio in vitro tre diversi citotipi colturali sono stati esposti a varie concentrazioni di MWCNT, al fine di valutarne gli effetti citotossici. Abbiamo osservato che le tre linee cellulari reagiscono in modo diverso al trattamento con MWCNT. L'adenocarcinoma della mammella umana, linea MCF-7, ha mostrato una chiara inibizione della proliferazione quando trattata con MWCNT a tutte le concentrazioni testate, sia a 24 sia a 72 ore di incubazione. In particolare, dopo le prime 24 ore di trattamento, alla concentrazione di  $0.1 \text{ mg/ml}^{-1}$ , si è osservata una significativa riduzione del numero di cellule rispetto a quelle presenti in coltura al tempo zero (*vedi Fig. 115 A e B*). Questo risultato indica che i MWCNT esercitano una forte azione citotossica su queste cellule. Dopo 72 ore, la conta cellulare dimostra la proliferazione cellulare in tutti i campioni ma, alla concentrazione più alta di MWCNT, il numero di cellule era significativamente più basso rispetto al controllo. Questo risultato corrisponde a quello rilevato da altri Autori, che hanno dimostrato la tossicità e gli effetti pericolosi dei nanotubi di carbonio in una varietà di colture cellulari, anche se di diversa morfologia e modificati nei gruppi funzionali. Per esempio, Bottini [6, 7, 8, 22] hanno dimostrato che i MWCNT causano una diminuzione nella vitalità cellulare tempo-dose-dipendente, sulle cellule T della leucemia di Jurkat ed inducono l'apoptosi nelle stesse cellule e nei linfociti T umani primari, recentemente isolati [22]. Sato *et al* [23] hanno dimostrato l'influenza della lunghezza dei MWCNT sulla tossicità. Hanno eseguito studi in vitro sulle cellule monocitiche della leucemia umana THP-1 [23]. Monteiro-Riviere *et al* [24] hanno dimostrato, alla microscopia elettronica a trasmissione TEM, che l'interazione dei MWCNT con i cheratinociti epidermici umani porta all'internalizzazione dei nanotubi nel citoplasma cellulare, ed hanno quindi, dimostrato sia

l'effetto citotossico che l'aumentato rilascio di IL-8, un marcatore dell'inflammazione [24]. Infine, Magrez *et al* [3] hanno dimostrato che i MWCNT, bloccano la proliferazione cellulare ed inducono la morte cellulare in tre diversi tumori umani del polmone, e l'effetto citotossico è potenziato da un pretrattamento acido delle particelle. Nei nostri esperimenti, le cellule hSMC ( hanno dimostrato una significativa riduzione della proliferazione rispetto ai controlli solo dopo 72 ore di trattamento con MWCNT alle concentrazioni da 0.1 a 0.01 mg/ml<sup>-1</sup>. Alla concentrazione più bassa testata non si è osservata inibizione della crescita cellulare. Dopo 24h di trattamento le hSMC (vedi Fig. 117 A e B) non mostrano alcuna significativa modificazione della curva di crescita in qualunque condizione studiata. I nostri risultati, sono in accordo con gli studi eseguiti su cellule di muscolo liscio dell'aorta di ratto trattato con SWCNT (single walled carbon nano tubes) che hanno dimostrato scarsa riduzione della velocità di crescita, alla fine del primo giorno di coltura, mentre si osservava una significativa riduzione dose-dipendente della proliferazione cellulare tra il secondo e terzo giorno per concentrazioni da 0 a 0.1 mg/ml<sup>-1</sup> [25]. Nel cancro colon rettale umano della linea Caco-2, il trattamento con MWCNT non ha prodotto alcuna modificazione nel rateo di crescita cellulare a confronto con i controlli (vedi Fig. 114 A e B). Il risultato sorprendente è che vari tipi di CNT (SWCNT e MWCNT) non determinano alcuna tossicità acuta, sulla vitalità cellulare e sull'apoptosi in due tipi cellulari: i macrofagi alveolari della linea cellulare NR8383 e nelle cellule epiteliali del polmone umano della linea cellulare A549 [26]. Inoltre, il trattamento con MWCNT in ambedue le linee cellulari non ha indotto il rilascio di mediatori infiammatori ma ha prodotto specie reattive con l'ossigeno, dose-tempo-dipendenti - intracellular reactive oxygen species (ROS) [26]. In conclusione: il nostro studio *in vitro* dimostra che la risposta anti-proliferativa ai MWCNT può differire in relazione al citotipo e al tessuto utilizzato. E' necessario che gli effetti della presenza di MWCNT siano verificati su altri citotipi e che sia studiato il rilascio delle citochine e ROS al fine di spiegare il reale rischio connesso con l'impiego di nanostrutture. Al fine di esplorare le proprietà chimiche di superficie sulla tossicità, Magrez *et al* [3] hanno eseguito esperimenti in cui hanno modificato chimicamente la superficie dei nanofilamenti. La superficie dei MWCNT è stata decorata come indicato da Hiura *et al* [27] in modo da alterare lo strato esterno dei MWCNT con

trattamento acido. Questa procedura consiste nell'aggiunta di gruppi carbonilici (-CO), carbossilici (-COOH), e/o ossidrilici (-OH) sulla superficie dei nanotubi. Nel loro esperimento, la crescita cellulare è stata eseguita in capsule contenenti gelatina e terreno di coltura standardizzato. Quando il numero delle cellule vitali è stato comparato dopo trattamento con i nanotubi, si è evidenziato che la tossicità aumenta con il pretrattamento acido della superficie. Questo dato è importante nel caso dei MWCNT. Questa ultima osservazione, può essere in qualche modo contraddetta dall'osservazione che i MWCNT nativi, già di per sé, sono molto tossici. In ogni caso, questi risultati dimostrano chiaramente che, l'aggiunta di gruppi chimici sulla superficie dei MWCNT, riducono significativamente la vitalità cellulare. Questi esperimenti dimostrano che i nanotubi di carbonio, in generale, inibiscono la proliferazione e provocano la morte cellulare come dimostrato anche nel nostro studio, sebbene i nanotubi di carbonio risultano essere meno tossici delle nano particelle e che la tossicità dei nanotubi di carbonio aumenta con l'aggiunta dei gruppi carbonilici (-CO), carbossilici (-COOH), e/o ossidrilici (-OH) in superficie. Anche a nostro parere, l'esatto meccanismo che conduce alla morte cellulare, non è ancora chiaro, ma i nanotubi di carbonio, possono indurre la morte cellulare o per contatto con le membrane cellulari o dopo internalizzazione e al fine di dimostrare il reale meccanismo stiamo proseguendo con altri esperimenti. Se vogliamo usare i nuovi materiali in un nuovo, futuro mezzo di contrasto per RMN, nelle nuove terapie antitumorali, come carrier molecolare per la somministrazione di farmaci, come device, scaffold (struttura di supporto) per l'impianto di cellule di Langerhans nel trattamento del diabete mellito, o come nuova generazione di materiali protesici di interesse chirurgico, dobbiamo assolutamente chiarire questi meccanismi molecolari.

## 7.1.2 Discussione test in VIVO primo esperimento

### 7.1.2.1 Sperimentazione della singola somministrazione

La dose di 5, 10 mg/kg<sup>-1</sup> di peso corporeo è innocua. La dose di 20 mg/kg<sup>-1</sup> di peso corporeo è fatale nel 20% dei casi nelle prime 24 ore, e alla dose di 40 mg/kg<sup>-1</sup> di peso corporeo è fatale nel 33% dei casi, in 1° giornata.

### 7.1.2.2 Sperimentazione della somministrazione ripetuta

La dose di 5 mg/kg<sup>-1</sup> di peso corporeo è praticamente (istologicamente e clinicamente) innocua. Non sono riportate lesioni in cavità addominale, né sulle pleure e nemmeno nel pericardio. Si osserva solamente un'areola di irritazione nel punto di inoculazione.

### 7.1.2.3 Impianto di MWCNT

La dose di 20 mg/kg<sup>-1</sup> di peso corporeo è stata fatale in 180 minuti. Probabilmente un'eccessiva quantità di MWCNT ha causato la morte del soggetto, infatti, 5 mg di MWCNT non provocano disturbi, né necrosi tissutale o sofferenza, ma solamente una reazione granulomatosa da corpo estraneo, ben tollerata dal soggetto. Presumiamo che nell'esperimento sul primo ratto, la dose di MWCNT sia stata eccessiva:

- ha causato un'intensa reazione infiammatoria con dilatazione dei vasi capillari ed edema tissutale;
- la circolazione del liquido interstiziale nel circuito linfatico ha causato la migrazione dei nanotubi dal sito d'impianto con la redistribuzione in tutto l'organismo;
- il passaggio dei MWCNT dal dotto toracico nel tronco anonimo, cava superiore e cuore, dal quale sono stati pompati nel piccolo circolo polmonare, provocando la necrosi interstiziale per internalizzazione nelle cellule alveolari e quindi l'edema polmonare acuto;
- presumiamo che in questa maniera si origini l'insufficienza respiratoria acuta, l'ischemia miocardica e cerebrale.

Nel caso del secondo soggetto, pensiamo che la bassa dose di MWCNT non sia stata sufficiente a provocare la reazione patologica massiva. Infatti, è stata osservata solo una lieve reazione infiammatoria nel sito d'impianto, ben tollerata dal soggetto stesso.

### 7.1.3 Studio dell'assetto immuologico dopo somministrazione di MWCNT

Abbiamo studiato ogni possibile modificazione verificatasi nell'assetto immunologico, 7 giorni dopo la somministrazione di solvente nel gruppo A, solvente e MWCNT nel gruppo B, non abbiamo trovato alcuna variazione nel quadro anticorpale, cioè le dosi di MWCNT somministrate non sono pericolose per gli animali da laboratorio. Questo risultato stabilisce che né i MWCNT né il solvente, nei limiti di tempo osservazionale e di dosaggio valutati, provocano reazione flogistica.

### 7.1.4 Studio istologico

I danni provocati dai MWCNT osservati alla microscopia ottica (*vedi Fig. 112*) provocano la polmonite diffusa, la ritenzione urinaria, l'edema tissutale e probabilmente per questo motivo la curva del peso corporeo dei topi trattati è crescente, anche se di poco. Invece, nel gruppo dei controlli, trattati solo con solvente, il peso dovrebbe essere diminuito per la sofferenza provocata dall'inoculazione intraperitoneale ripetuta, che provoca comunque un'irritazione peritoneale, senza evidenza di danni viscerali. L'irritazione provoca la diminuzione della voracità dei roditori che, non alimentandosi come di norma, hanno un rateo di crescita inferiore a quello atteso per animali della stessa età e peso non trattati (*vedi Fig. 113*).

## 7.2- Discussione risultati in vitro SECONDO esperimento.

- In questo lavoro abbiamo studiato gli effetti del BP realizzato con MWCNT, sulla proliferazione cellulare di 5 diverse linee cellulari umane di cui 2 da adenocarcinomi umani solidi, Caco2 e MCF-7, una linea leucemica HL-60 e due linee cellulari fisiologiche native HA-SMC e HF. Abbiamo eseguito due diversi tipi di esperimento: nel primo abbiamo aggiunto frammenti di BP sul fondo della capsula contenente la coltura cellulare e le cellule sono state seminate su questi ( $T_0$ ). Nel secondo esperimento invece, abbiamo aggiunto i frammenti di BP sul monostrato cellulare a 24 ore di tempo di crescita in coltura ( $T_{24}$ ). Le cellule sono state quindi raccolte e contate dopo 72 e 120 ore di coltura. La proliferazione delle cellule di tumore solido risulta ridotta dalla presenza di BP nella coltura, in entrambe le linee cellulari. La riduzione della velocità di crescita è stata maggiore nell'adenocarcinoma umano della mammella MCF-7 rispetto alla linea Caco2 del carcinoma umano coloretale. Questo risultato non sorprende perché in un nostro precedente lavoro, abbiamo scoperto che la velocità di crescita delle cellule MCF-7, è stata ridotta dalla presenza in coltura di MWCNT, anche se a bassa concentrazione, mentre la velocità di proliferazione della linea cellulare Caco-2 non subiva alcuna modificazione in presenza di MWCNT, al confronto con la coltura di controllo [5].
- L'inibizione della velocità di crescita delle colture MCF-7 è più evidente nel primo tipo di esperimento, cioè quando i frammenti di BP vengono posizionati sul fondo della capsula al  $T_0$  e le cellule ed il mezzo di coltura sono aggiunte dopo, in confronto al secondo tipo di esperimento nel quale i frammenti di BP sono aggiunti sopra la coltura a  $T_{24}$ . Questo risultato potrebbe essere spiegato con il fatto che la presenza del BP sul fondo della capsula impedisce, alle cellule MCF-7, di aderire al fondo di plastica del contenitore mentre

l'aggiunta a T<sub>24</sub>, non impedisce la formazione del film monocellulare adeso al fondo del recipiente. La presenza dei frammenti di BP non influenza né la velocità di crescita né la vitalità delle colture di cellule sane HA-SMC e HF, in entrambi i tipi di esperimento. Nel nostro precedente studio la linea cellulare HA-SMC, trattata con MWCNT ha mostrato una riduzione della velocità di proliferazione a confronto con i controlli, solo alle più alte concentrazioni e dopo la coltura per 72 ore di trattamento, mentre dopo le prime 24 ore, non risultava alcuna inibizione della velocità di crescita alle concentrazioni studiate [5].

- In un più recente esperimento, il trattamento della linea cellulare HF con MWCNT a varie concentrazioni, a 24 e 72 ore, non ha prodotto alcuna riduzione della velocità di proliferazione cellulare, proprio come osservato nel trattamento delle stesse cellule con BP in coltura. La proliferazione dei promielociti umani della leucemia HL-60 è, invece, inibita dall'aggiunta in coltura di BP al T<sub>0</sub>. Inoltre, in questo tipo di esperimento, le cellule vitali erano solamente il 30% del totale delle cellule della coltura sia a 72 che a 120 ore di coltura, come evidenziato con colorazione Trypan Blue e test di esclusione delle cellule morte. Quando il BP è stato aggiunto alle colture a T<sub>24</sub>, abbiamo osservato una riduzione statisticamente significativa della proliferazione a 72 ore di coltura e, successivamente, la completa inibizione della crescita cellulare. La differenza nei due esperimenti è, probabilmente, dovuta al reale tempo d'esposizione cellulare al BP. Infatti, quando il BP è stato aggiunto in coltura a T<sub>24</sub>, le cellule raccolte a 72 ore, erano state trattate con BP solamente per 48 ore di esposizione. Questo risultato contrasta con altri esperimenti in cui il trattamento delle cellule HL-60 con MWCNT, a varie concentrazioni per 24 e 72 ore, non produce alcuna riduzione della velocità di proliferazione. Per queste ragioni, supponiamo che l'effetto citotossico del BP, sulla linea cellulare HL-60, non dipende dallo stress ossidativo indotto dalle impurità metalliche contenute nel BP.

- E' noto che le cellule in coltura sono sensibili al danno ossidativo. A nostro parere la contaminazione del BP con il ferro, ed il conseguente stress ossidativo, non dovrebbe essere causa di danno perché nel caso delle cellule HL-60 ,più sensibili, i MWCNT solubilizzati in acqua, non inducono alcuna tossicità. Questo lavoro dimostra che il BP provoca una notevole riduzione della velocità di crescita in due linee cellulari di tumori solidi (Caco-2 e MCF-7), e la completa inibizione di una linea cellulare leucemica (HL-60). Il diverso effetto del BP su queste linee, dovrebbe essere spiegabile dal fatto che Caco-2 e MCF-7, derivano da tessuti di origine epiteliale e crescono in colture attaccate al fondo di plastica, invece, la linea cellulare HL-60, deriva dalle cellule ematiche e cresce in sospensione. Questo effetto del BP sembra essere caratteristico sulle cellule sdifferenziate, perché il BP non produce alcuna riduzione nella velocità di crescita e nella vitalità delle due linee cellulari normali. La differenza tra cellule sdifferenziate e cellule normali, potrebbe spiegarsi, almeno in parte, per la differente velocità di crescita, ma il meccanismo biomolecolare, al momento, non ci è ancora chiaro ma è motivo del nostro più vivo interesse. Questi risultati aprono nuove prospettive di impiego dei nanomateriali per futuri studi sperimentali oncologici.
  
- In precedenza sono state riportate esperienze di risposte cellulo-specifiche alle nanoparticelle. [24]. Gli autori hanno osservato una differente risposta alle nanoparticelle aurifere (GNPs) in diverse linee cellulari e morte cellulare nelle “human carcinoma lung cell line A549” indotta da GNP. Altre linee cellulari studiate (“human liver carcinoma HepG2”), non sono invece risultate sensibili al trattamento con GNP. I nostri risultati confermano la specificità della risposta delle diverse linee cellulari ai nanomateriali (CNT, BP), che come i GNPs, non distruggono le cellule viventi indifferentemente ma selettivamente.
  
- Altro punto che richiede un ulteriore approfondimento, riguarda il meccanismo sottostante l'azione del BP, chiarendo come il BP stesso si rapporta con le cellule, o attraverso recettori superficiali, o attraverso l'interazione recettoriale che determina il danneggiamento

cellulare. Tale punto può essere importante per la definitiva comprensione degli effetti sulle cellule neoplastiche ed i scarsi effetti sulle cellule normali. Potrebbe quindi essere utile lo studio al microscopio elettronico a trasmissione elettronica TEM per risolvere tali pressanti quesiti.

- Occorrono successive indagini al fine di comprendere se il BP rilasci o meno nanoparticelle nel terreno di coltura, in grado di causare apoptosi solo su linee cellulari particolari e nulla su altre.

### 7.2.1 Discussione risultati in VIVO secondo esperimento.

I dati sulla tossicità *in vivo* indicano che l'esposizione delle vie aeree ai CNT provoca il cancro pleurico, la fibrosi polmonare e l'ipertrofia delle cellule epiteliali, fino a provocare il danno funzionale [25, 26]. Il BP sembra invece privo di ogni effetto tossico, sull'animale sano. Si osserva, infatti, solamente una lieve reazione flogistica nel sito d'impianto, all'esame necroscopico, peraltro ben tollerato dal soggetto. In dettaglio abbiamo osservato, alla microscopia ottica, che il BP provoca la deposizione di fibroblasti formando una capsula granulomatosa che incorpora ed intrappola il BP, come una reazione da corpo estraneo.

- Questa sembra essere la prima volta anche il BP sia stato impiantato su animale e mostri scarsi effetti su cellule normali, ma contemporaneamente, sia in grado di indurre significativi effetti solo su cellule tumorali. Questi risultati potrebbero giocare un ruolo importante nella comprensione dei meccanismi di base per il trattamento dei tumori solidi ed occorrono, quindi, studi approfonditi sugli effetti collaterali (e.g. malattia da rigetto dell'impianto contro l'ospite). Questo punto sarà oggetto dei nostri prossimi studi.
- Altro interessante sviluppo della sperimentazione *in vivo*, potrebbe essere la prosecuzione della sperimentazione del BP sugli stessi tumori solidi e sistemici, già studiati *in vitro*, in cui

la presenza del BP, in coltura, ha bloccato la crescita delle colture cellulari. Tale sperimentazione è già iniziata da parte del nostro gruppo, con la richiesta di autorizzazione ministeriale, e di ciò riferiremo successivamente.

### 7.3- Discussione risultati TERZO esperimento mutagenicità.

L'aumento dell'esposizione professionale alle nanoparticelle, è stata correlata al mesotelioma pleurico del tratto respiratorio umano. Inoltre studi epidemiologici suggeriscono che l'esposizione al particolato o a polveri ultrasottili con diametri inferiori a 100 nm, presenti in ambiente o emesse nel corso della produzione di nanomateriali, contribuiscono a numerose malattie acute e croniche [23, 24]. Per stabilire il rischio carcinogenetico da nanoparticelle, i test di genotossicità sono considerati strumento affidabile. (OECD, 1997). La genotossicità si interessa del danneggiamento di tutti i tipi di DNA. Non esiste un unico tipo di test in grado di evidenziare tutti gli agenti genotossici importanti e, quindi occorrono vari test *in vitro* and *in vivo* per valutare la genotossicità. L'Ames test [1] indaga le mutazioni batteriche in singoli geni (punti di mutazione) in cellule procariote e la maggioranza dei mutageni carcinogeni nei roditori. Ed è il test più largamente utilizzato per valutare le potenzialità mutagene di una sostanza chimica. Altri test, sono utilizzati nell'individuazione delle aberrazioni cromosomiche nelle cellule di mammiferi (CHO, V79 cells), per esempio il test sui micronuclei è usato per la ricerca di danno cromosomico o dell'apparato mitotico. Il Comet test individua le rotture delle catene DNA [11, 42]. Questi tests, sono tra loro complementari, e per questa ragione, per la valutazione della genotossicità alle sostanze chimiche, a livello regolatorio è consigliabile usare una batteria di tests. Tale batteria deve comprendere: un test per la ricerca di mutazioni con batteri, test *in vitro* con valutazione citogenetica del danno cromosomiale con cellule di mammifero, oppure ceppi di linfoma tk murino. In *vivo*, il test per danno cromosomiale utilizza cellule emopoietiche murine (EMEA, 1998). Nel presente studio abbiamo osservato che i MWCNT erano privi di effetto mutagenico utilizzando test batterici con *S. typhimurium* TA 98 e TA 100 e in *E. coli* WP2uvrA, a concentrazioni non citotossiche. L'attività mutagena non appare nemmeno in presenza di attivatore metabolico, così che possiamo escludere

che i metaboliti dei MWCNT, prodotti attraverso il sistema ossidativo del citocromo P450, non possano agire come mutageni. I nostri risultati sono in linea con quelli di Szendi e Varga (2008) [47], che pure hanno osservato l'assenza di effetti mutageni dopo trattamento con MWCNT di cellule urinarie studiate con il test di Ames modificato, suggerendo che i MWCNT non provocano punti di mutazione in cellule procariote, ed in particolare possiamo escludere che si possano verificare mutazioni da scivolamento e mutazioni per sostituzione di coppie di basi. I nostri risultati non sono direttamente comparabili con quelli ottenuti con altri modelli sperimentali. In particolare, i MWCNT di 10–30 nm ×1–2 sono risultati privi di effetto genotossico in MN e SCE tests, suggerendo così che non provocano né l'aberrazione cromosomica né il danneggiamento dell'apparato mitotico (Szendi and Varga, 2008); invece, le cellule staminali di embrione di topo, sono danneggiate dai MWCNT (campione fabbricato in Cina, di dimensioni non dichiarate) causando danno al DNA, con rottura della doppia catena, per mezzo della produzione di ROS [54]. Inoltre Muller, [34, 36] ha dimostrato che i MWCNT inducono l'aumento dei micronuclei, sia dei pneumociti tipo II del ratto, che dell'epitelio polmonare di cellule tumorali umane (MCF-7). In considerazione che i nanotubi, utilizzati da Muller et al. contenevano tracce di ferro e cobalto, non possiamo escludere che tali catalizzatori, almeno in parte, siano responsabili dell'osservato effetto genotossico. Infatti, Knaapen [23, 24] ha dimostrato che le particelle solubili metalliche associate, presenti come contaminanti o residui del processo produttivo, possono agire da pro-ossidanti e danneggiare il DNA. I CNT sono stati ritrovati nello spessore delle membrane cellulari e dentro il citoplasma delle cellule epiteliali, specialmente quelli di calibro inferiore, e con l'aumentare della superficie, aumenta l'interazione e la captazione dei nanomateriali attraverso le pareti delle cellule viventi [20]. Nel nostro caso, abbiamo valutato i MWCNT, caratterizzati da basso indice superficie/volume, grande diametro e bassa contaminazione metallica (<0.1% Fe) in considerazione della letteratura pubblicata. Ipotizziamo che l'assenza di effetto mutagenico, osservato dal nostro gruppo, può essere correlato alla penetrazione nel citoplasma batterico. Infine il basso livello di impurità metalliche, Fe<0.1%, nella partita di materiale testato, così come dichiarato dal fabbricante, può ridurre il rischio di danno ossidativo e gli effetti tossici dovuti alla presenza dei

contaminanti metallici. In conclusione, i MWCNT studiati con la nostra ricerca risultano privi di effetto mutagenico e ciò potrebbe dipendere dalla loro struttura o dal contenuto di impurità metalliche. I risultati ottenuti fin qui non ci consentono tuttavia di proporre un quadro completo dei meccanismi e delle conoscenze riguardanti i MWCNT, in quanto gli studi eseguiti sono pochi ed i tipi di CNT sono numerosi e quindi i risultati non sono ancora confrontabili. A nostro avviso i MWCNT non sono ancora mai stati studiati per l'effetto mutagenico o genotossico. A causa del limitato numero di studi, le conoscenze sulla genotossicità, relative all'aumentato rischio da esposizione ai nanomateriali, è ancora in gran parte oscuro sebbene, i nostri risultati sul mancato effetto mutageno possono essere utili a gettare una luce sul problema, sulle proprietà e gli effetti di questi interessanti materiali tanto da incoraggiare ulteriori investigazioni per meglio approfondire gli aspetti tossicologici.

## **7.4- Discussione risultati QUARTO esperimento biocompatibilità'**

### **7.4.1 Discussione risultati quarto esperimento biocompatibilità' in VIVO**

La scomparsa della differenza dei pesi corporei, a partire dalla terza settimana osservazionale, seguita dall'inversione della curva di crescita del peso corporeo nei due gruppi, controlli e trattati, è probabilmente conseguenza della normalizzazione della funzione renale e dei livelli plasmatici dell'azotemia e degli elettroliti, come sintetizzato in [Figg.119, 127 e 128](#). La biocompatibilità del BP è buona, tanto quanto quella della rete in polipropilene, perché i ratti impiantati con polipropilene (controlli) e quelli impiantati con BP (trattati), hanno sviluppato una reazione cicatriziale da corpo estraneo, moderatamente infiammatoria, intorno agli impianti, del tutto sovrapponibile. Nuovi studi riguarderanno la comprensione e la verifica dell'ipotesi di rilascio, in soluzione, di singoli nanotubi da parte del BP, chiarendo se i nanotubi sono catturati dalle cellule o se i recettori superficiali interagiscono con la superficie del BP, e da tale interazione, scaturisce il

danno selettivo osservato solo sulle linee cellulari CaCo2, MCF-7 e HL-60, senza alcun effetto sulle linee cellulari sane, compresi i fibroblasti pericatrizziale del sito d'impianto. La SEM (microscopia elettronica a scansione) da noi eseguita e di cui siamo in attesa di ottenere l'interpretazione delle immagini, e gli studi sull'apoptosi che a breve verranno iniziati, potranno aiutare nella risoluzione di tali quesiti. L'ampia superficie del BP, non modifica il comportamento biologico delle cellule sane, ma interferisce pesantemente con la vitalità e il profilo di crescita delle linee cellulari CaCo2, MCF-7 e HL-60. L'ampia superficie del lato opaco e ruvido del BP, di cui noi abbiamo segnalato, pensiamo per la prima volta, il differente comportamento sui tessuti viventi, mostra un effetto energeticamente bioadesivo, mentre nel caso dell'altra superficie del BP, quella liscia e lucente, la bioadesività è presente ma di lievissima intensità. Infine, il comportamento del BP è profondamente condizionato dal suo stato fisico. Infatti, quando è secco, così com'è commercializzato, ha una bioadesività scarsa su entrambi le superfici, che aumenta se le superfici sono bagnate con acqua distillata, e aumenta ulteriormente se si eseguono tests con le superfici bagnate con soluzione fisiologica (*vedi Par. 6.5.6, pag. 148, Par. 6.5.7, pag 156 e 158*). Queste osservazioni sono sicuramente riproducibili, ma non è ancora noto il meccanismo.

#### 7.4.2 Discussione sull'analisi statistica delle determinazioni ematochimiche

In [Tab. 12](#) è riportata la statistica descrittiva e in [Tab. 13](#) il *t*-Test delle medie dei valori dei parametri ematochimici dei controlli (1) e dei trattati (2) nei vari tempi osservazionali (*vedi pagg. 138, 139*).

- Abbiamo osservato che esistono differenze statisticamente significative tra le medie dei valori, solo in alcune variabili (funzione emopoietica, coagulazione, emuntorio renale ed epatico) e che tali differenze sono concentrate in G0 (10 parametri) e che progressivamente nel tempo, tali differenze perdono significatività, cioè perde significatività la differenza tra i valori medi tra i controlli e i trattati, i quali si comportano, biologicamente, superata la prima settimana, nella stessa maniera dei controlli, nei confronti dei materiali impiantati.

### 7.4.3 Discussione sullo studio dei pesi corporei QUARTO esperimento biocompatibilità

Abbiamo studiato le variazioni del peso corporeo di un campione di 25 ratti maschi Sprague-Dawley confrontando la media dei pesi dei **controlli** (impiantati con protesi in polipropilene commerciale) e dei **trattati** (impiantati con BP e con rete riassorbibile trattata con MWCNT) prima dell'impianto, in 7°, 14°, 21°, 28° e in 35° giornata postoperatoria al momento del sacrificio. All'inizio dell'esperimento i due gruppi erano omogenei e la media dei pesi era simile ( $p=0.9$ ). Si è osservata una significativa differenza nella curve delle differenze medie espresse in percentuale dei pesi in w1 (G7-G0) ed in w2 (G14-G0) ( $t=0,0001$ ) ma alla fine dell'esperimento si osserva una sovrapposibilità delle due curve (vedi [Tabb. 14, 15, 16, 17](#) e [Fig. 165](#)).

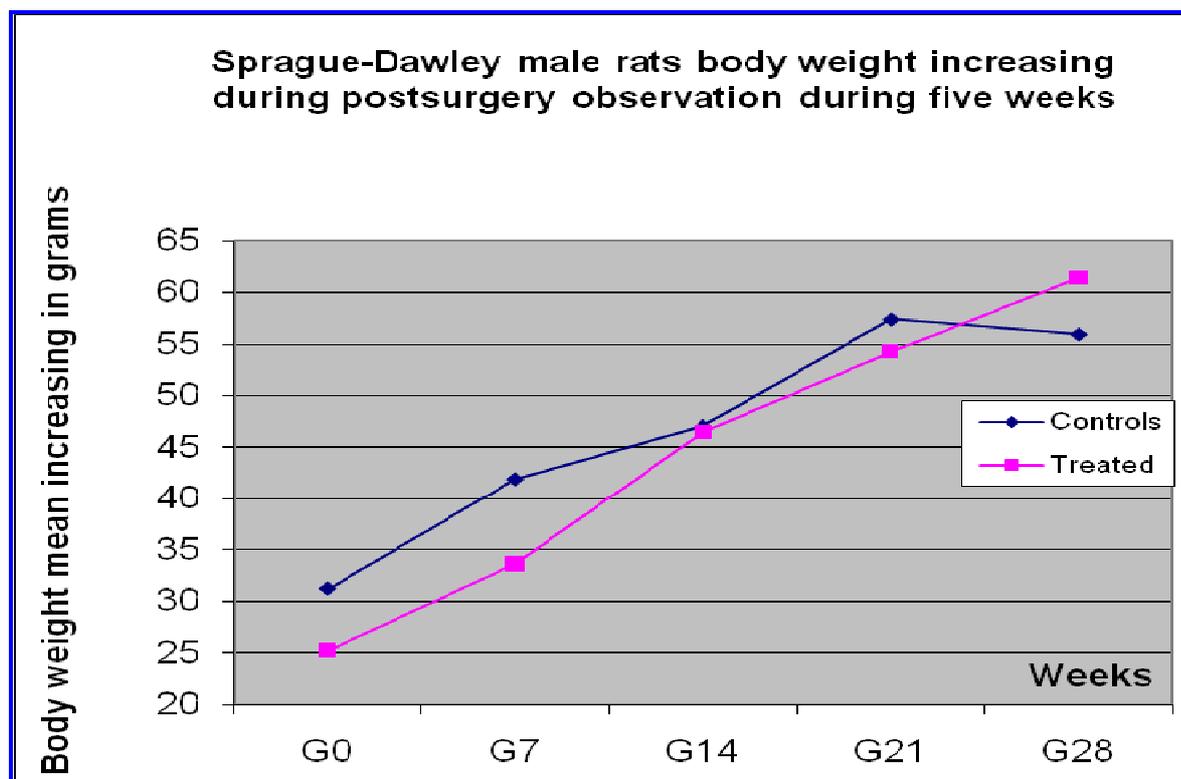
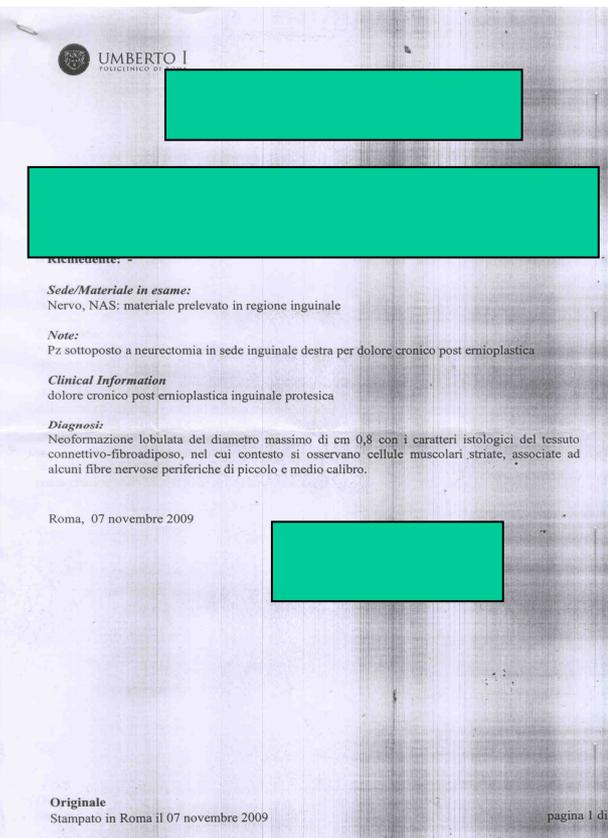
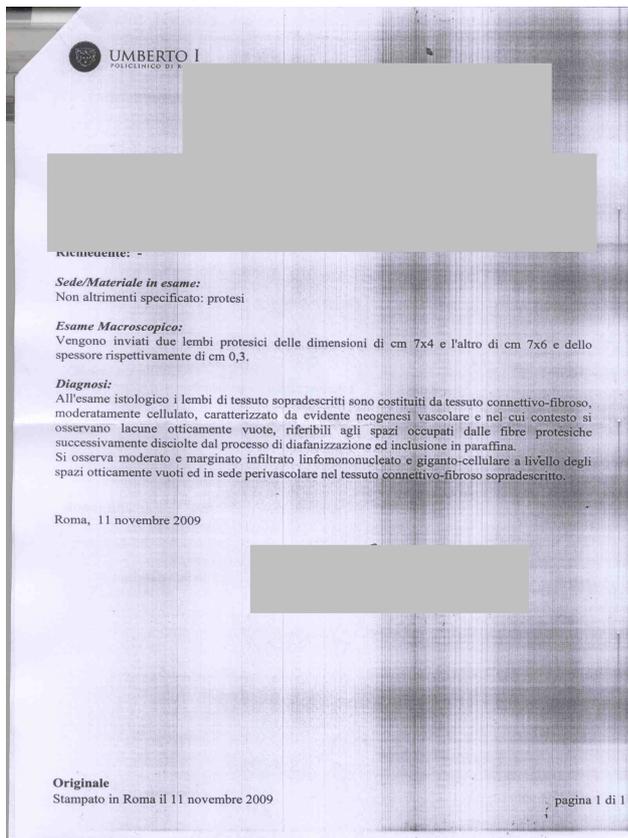


Fig. 165: medie dei pesi nei controlli (1) e nei trattati (2) nel corso dell'osservazione protratta per 4 settimane (w)

Le medie dei pesi nei controlli (1) e nei trattati (2), nei vari tempi (w), inizialmente non erano diverse nei due gruppi, come confermato dal test di Kolmogorov-Smirnov ( $p=0.9$ ), (vedi Tab. 15). Quindi i due gruppi erano inizialmente omogenei. Studiando le differenze degli incrementi di peso con il *t*-test per dati indipendenti (vedi Tab. 17), per ogni differenza di peso, per ogni tempo osservazionale confrontato con il peso iniziale, abbiamo osservato che le differenze tra controlli (1) e trattati (2), risultano significative solo per il periodo  $t_1 - t_0$  (indicato  $w_1$ ) e al  $t_2 - t_0$  (indicato come  $w_2$ ). Se ne deduce che le curve di crescita sono significativamente diverse nel primo periodo, mentre tornano sovrapponibili successivamente. La Fig. 165 riguarda gli incrementi di peso percentuali (prima abbiamo calcolato le medie, poi le percentuali delle differenze delle medie rispetto al peso iniziale) e documenta che, inizialmente i trattati crescono meno perché hanno subito l'intervento con il posizionamento di protesi di BP, ma successivamente il profilo dei trattati si equipara ai controlli, evidenziando un recupero fisiologico e clinico dello stato di benessere.

## 7.5 Discussione QUINTO esperimento bioadesivita'

Il nuovo materiale testato, il BP, lo stiamo sperimentando con finalità di interesse chirurgico, valutando sotto ogni possibile aspetto, se il BP possa essere impiegato o meno, come materiale protesico in sostituzione del polipropilene. Il BP presenta nuove attitudini quali, ad esempio una spiccata bioadesività, differente sulle due superfici, che potrebbe essere una qualità interessante per evitare l'applicazione di punti di sutura necessari a fissare i materiali protesici attuali, sia nella chirurgia delle ernie che dei laparoceli, open e laparoscopica. In tal modo, si eviterebbe il rischio di intrappolamento di terminazioni nervose con possibile insorgenza della neuropatia dolorosa, evento che di tanto in tanto si evidenzia con discomfort sia del paziente che del chirurgo [4, 5, 7, 8]. Anche l'uso delle colle biologiche potrebbe esser sostituito in questo stesso tipo di chirurgia [8], proteggendo il paziente da teoriche ma possibili infezioni trasmissibili dal materiale biologico, non ancora scoperte né diagnosticabili. La dimostrazione che il BP ha una bioadesività 100 volte maggiore del migliore materiale protesico bioadesivo attualmente in commercio, pone una seria ipoteca sugli sviluppi futuri, che potrebbero cambiare radicalmente se, come sembra allo stato attuale della sperimentazione, il BP non risulti né tossico né immunogenico ma perfettamente biocompatibile e questi sviluppi, sono tutelati da brevetto. Le [Figg. 166 e 167](#) documentano un caso di neuropatia post ernioplastica inguinale protesica. Ad un anno dall'intervento chirurgico di ernioplastica protesica, il paziente è stato sottoposto ad espianto della protesi e neurectomia inguinale, per dolore cronico con diagnosi istologica di neoformazione lobulata del diametro massimo di cm 0,8 con i caratteri istologici del tessuto connettivo fibroadiposo, nel cui contesto si osservano cellule muscolari striate, associate ad alcune fibre nervose periferiche di piccolo e medio calibro. All'esame microscopico della protesi espiantata si osserva la neogenesi vascolare in tessuto connettivo fibroso, nel cui contesto si riscontra la presenza di lacune riferibili agli spazi occupati dalle fibre protesiche successivamente disciolte nel processo di inclusione in paraffina.



*Figg. 166 e 167: esame istologico di protesi espantata per neuropatia cronica e neurectomia inguinale*

Queste possibili complicanze determinano un uso estensivo di analgesici con nocumento della vita di relazione e professionale del paziente [1,2,3]. La nuova generazione di tessuti protesici di cui il BP è il prototipo, può concorrere a prevenirle.

# 8 CONCLUSIONI

## 8.1 Conclusioni PRIMO esperimento

- E' necessario proseguire con lo studio dei MWCNT al fine di sviluppare un numero di casi statisticamente significativo.
- Sebbene i SWCNT sono più costosi dovrebbe essere interessante studiarli con le stesse cellule e gli stessi animali e confrontando i risultati con quelli ottenuti nel presente studi sui MWCNT.
- La citotossicità dei nanotubi di carbonio aumenta significativamente quando sulla loro superficie sono presenti gruppi carbonile (-CO), carbossile (-COOH), e/o idrossile (-OH). I nanotubi di carbonio possono indurre morte cellulare o per contatto o per internalizzazione ma l'esatto meccanismo resta al momento sconosciuto. Il presente lavoro non considera i nanotubi funzionalizzati, ma ci proponiamo di studiarli in un prossimo esperimento chiarificatore, specie per quanto riguarda l'interazione tra la superficie dei nanotubi e la superficie cellulare.
- Tanto più alta è la concentrazione dei MWCNT tanto più bassa è la velocità di crescita delle cellule in coltura. In ogni modo le cellule del carcinoma coloretale Caco-2 sono insensibili alla presenza dei MWCNT. Sarebbe interessante capire questo meccanismo con successive ricerche dato che, al momento, non sono disponibili altre informazioni.
- Non abbiamo trovato variazioni nell'assetto anticorpale e quindi le dosi di MWCNT somministrate, non sono pericolose per gli animali. Forse il sistema immunitario o non è attivato o è soppresso dalla tossicità dei MWCNT, ma non lo sappiamo ancora. Dobbiamo studiare la possibilità di utilizzare i MWCNT a scopo terapeutico.
- A basso dosaggio i MWCNT non provocano risposte infiammatorie e questo è un dato interessante per la futura realizzazione per materiali protesici da impiegare in Chirurgia Generale.

- Infine non è stato ancora studiato il potere carcinogenetico dei nanotubi di carbonio, cioè il potenziale di trasformazione di una cellula normale in una cellula tumorale, studio che necessita una dettagliata ricerca sul follow up. Negli ultimi 5 anni la questione della potenziale tossicità dei nanotubi di carbonio è stata frequentemente richiamata, in ogni caso il nostro studio mostra assenza di tossicità ai dosaggi di 5, 10 mg/kg<sup>-1</sup> peso corporeo. Non sono stati osservati effetti immunologici alle alte dosi di 20, 40 mg/kg<sup>-1</sup> di peso corporeo ed immaginiamo quindi, la possibilità di servirci dei nanotubi di carbonio come veicoli per molecole farmacologiche [28] e mezzi di contrasto per RMN [29], o materiale protesico. In ogni caso si raccomanda prudenza nella manipolazione di questi materiali fin tanto che non saranno disponibili notizie complete e dettagliate [30, 33, 34, 35].

## 8.2 Conclusioni, sommario e sviluppi del SECONDO esperimento

- Il presente lavoro riguarda gli effetti biologici del BP fabbricato a partire da MWCNT. Tali materiali sono stati sperimentati su 5 diverse linee cellulari umane *in vitro*, ed impiantati su topo di laboratorio. Attualmente siamo passati a sperimentare su ratto. Abbiamo studiato gli effetti biologici e la tossicologia *in vitro and in vivo*. L'argomento è, infatti, attualissimo e d'interesse nelle applicazioni biologiche dei nanomateriali e nanotecnologie ed è stato oggetto della recente pubblicazione di un volume [27]. Riteniamo, motivati dal gran numero di ricercatori impegnati in ricerche su nanoparticelle e nanomateriali, di importanza essenziale valutare il rischio potenziale per la salute umana, correlato all'esposizione giornaliera ai CNT e nanoparticelle.
- Le conseguenze dell'esposizione ai CNT delle vie aeree (AEC) è stata studiata meno, rispetto a quella delle cellule macrofagiche, sebbene le vie aeree siano la prima barriera contro le nanoparticelle inalate. Caratteristica importante delle AEC è il mantenimento delle giunzioni intercellulari serrate (tight junctional complexes) che consentono la secrezione

polarizzata e che previene l'ingresso di patogeni ed inquinanti chimici e può partecipare alla trasduzione di segnali nella regolazione dell'espressione genica [28]. Questa proprietà è mantenuta da molte cellule delle vie aeree quali CaLu-3, linea cellulare derivata dall'adenocarcinoma polmonare umano. Queste cellule hanno la capacità, se coltivate su filtro permeabile, di formare monostrati cellulari tra loro molto aderenti con resistenza elettrica trans-epiteliale (trans-epithelial electrical resistance-TEER) elevata, valutata  $>1000\text{Ohm/cm}^2$ .

- L'uso di linee cellulari CaLu-3 in esperimenti con SWCNT e MWCNT commerciali [29] a bassa contaminazione metallica, ha permesso l'osservazione che l'impiego di MWCNT ha provocato una progressiva riduzione del TEER, mentre utilizzando i SWCNT è stato osservata una riduzione meno spiccata ma ancora misurabile.
- L'aggiunta di nanomateriali carboniosi, durante la fase di crescita e costituzione dei "tight functional complexes", come testimoniato dal progressivo ridursi del TEER durante lo sviluppo del clone cellulare monostratificato CaLu-3, ha effetti sono strettamente dipendenti dal tipo di materiale impiegato. Ad esempio, i MWCNT hanno un profondo effetto inibitorio, sostanzialmente rappresentato dalla soppressione della formazione dei "high-resistance epithelium tight junctions". La soppressione della funzione di barriera, è associata al parallelo aumento della permeabilità interstiziale del monostrato cellulare CaLu-3, al mannitolo, senza sostanziale riduzione della vitalità cellulare [29].
- Il mantenimento dell'efficienza della funzione di barriera, è quindi una funzione importantissima per la prevenzione dalle malattie respiratorie e la determinazione dell'esposizione agli xenobiotici, simili ai MWCNT, può indurre modificazioni con importanti conseguenze funzionali, come l'aumento della suscettibilità ai patogeni, il passaggio dal compartimento respiratorio agli altri compartimenti corporei di inquinanti

ambientali [28,29]. Tali influenze non dipendono dalla quantità dei materiali inquinanti inalati ma dal loro tipo, perché la conformazione superficiale condiziona enormemente la reattività chimica molecolare.

- Altro argomento importante relativo ai rischi per la salute correlati all'esposizione ai CNT è il rischio mutageno [2]. Anche la tossicità dei MWCNT solubili in soluzione acquosa è stata trattata [5]. Il MWCNT possiede un piccolo volume ed un'enorme superficie di contatto, proprietà che sembrano essere implicate nella loro attività biologica [18]. In definitiva è opportuno che la loro manipolazione avvenga con prudenza [30].
  
- Abbiamo somministrato nanoparticelle sterilizzate a colture cellulari e impiantato BP sterilizzato su ratto. Gli effetti sulla cicatrizzazione, studiata lungo tutto il suo sviluppo a 7, 14, 21, 28 e 35 giorni dall'incisione chirurgica, sono stati studiati alla microscopia ottica. Non sono stati osservati effetti mutageni. Abbiamo studiato anche gli effetti del BP su 5 linee cellulari verificando gli effetti del BP sulla proliferazione cellulare dei 5 diversi citotipi umani: due da adenocarcinoma solido, Caco-2 e MCF-7, uno da leucemia HL-60 e due da cellule normali, HA-SMC (human arterial smooth muscle cells) e HF (human dermal fibroblasts). Queste ricerche hanno evidenziato che il BP ha indotto una significativa riduzione nella proliferazione cellulare delle linee Caco-2 e MCF-7 e la completa inibizione della HL-60 cell. Pensiamo che il BP abbia un effetto specifico sulle cellule trasformate, confermato dall'innocuità nei confronti delle altre due linee cellulari normali.
  
- I presenti risultati sono utili nell'approfondimento delle conoscenze sulla innocuità del BP in vista delle sue possibili applicazioni. Comunque, per le future applicazioni mediche, potrebbe essere utile realizzare tessuti protesici a base di MWCNT e studiarne gli effetti nel soggetto impiantato. Il nostro gruppo di ricerca sta procedendo nelle ricerche sull'apoptosi e la cancerogenicità dei MWCNT, studi che richiedono dettagliati follow-up investigativi su

specifiche problematiche. Sono in ogni caso necessari, ulteriori studi, in vista di successivi e più estesi impieghi dei MWCNT, specialmente nelle applicazioni mediche e biologiche in cui i MWCNT vengono iniettati per via endovenosa in umano, per la somministrazione di farmaci e come mezzo di contrasto per RMN [33, 34, 35 [bibliografia 1 esperimento](#)], o materiale base per una nuova generazione di tessuti protesici di interesse per la Chirurgia Generale.

- In conclusione i risultati sopra presentati sugli effetti biologici del BP sono interessanti per la relativamente scarsa reazione flogistica manifestata all'impianto del BP. D'altra parte il BP ha avuto un effetto che sembrerebbe selettivo sulle linee cellulari utilizzate, innocuo sulle 2 normali e citotossico sulle tre neoplastiche. Non è ancora chiaro il meccanismo sottostante tale comportamento selettivo. Non sappiamo se dipende da un recettore superficiale cellulare che attivi il rilascio di sostanze antiproliferative o dipenda semplicemente dal tipo di interazione superficiale. Come possibile futuro sviluppo, pensiamo che sia indispensabile una migliore comprensione del fenomeno e che la comprensione dell'effetto selettivo del BP, vada sperimentato su animale con tumore solido corrispondente alle linee tumorali cellulari già studiate *in vitro*. Se vogliamo realizzare una nuova generazione di tessuti protesici e uno device antitumorale per il trattamento di specifici tumori solidi è quindi indispensabile, approfondire queste problematiche.

### **8.3 Conclusioni, sommario e sviluppi del TERZO esperimento mutagenicità'**

L'effetto mutageno dei MWCNT, caratterizzati da piccolissimo volume e grande superficie e con la presenza di impurità metalliche inferiori all' 0.1%, è stata valutata con il test di Ames che serve a valutare la mutagenicità sul DNA modificato da mutazioni sulla *Salmonella typhimurium* sui ceppi TA 98 e TA 100 e sull'*Escherichia coli* ceppo WP2uvrA in presenza ed in assenza del sistema di attivazione metabolica S9. Un test di citotossicità è stato eseguito preliminarmente per accertare che

non vi fosse alcuna tossicità che avesse potuto interferire con l'indagine sulla mutagenesi. I MWCNT sono risultati privi di effetto mutageno nei sistemi cellulari batterici testati, in cui il numero delle colonie ricombinanti non è aumentato significativamente. L'attività mutagenica non è comparsa nemmeno in presenza dell'attivatore metabolico, tanto che possiamo escludere che i MWCNT metaboliti, prodotti mediante il sistema ossidativo metabolico cytochrome-based P-450, può agire da mutageno. I nanomateriali a base di carbonio, sembrano esibire vari tipi di attività biologica e diversa tossicità in relazione alle loro caratteristiche fisicochimiche, dimensione, profilo, cristallinità e contaminanti metallici, così che è difficile stabilire la loro potenziale pericolosità, per la salute umana. A causa delle limitate conoscenze sulla genotossicità e l'aumentato numero di ricercatori esposti per motivi professionali ai nanomateriali, i risultati del presente lavoro migliorano il grado di conoscenza, sulla sicurezza d'uso dei nanotubi di carbonio, in vista delle loro possibili applicazioni.

## **8.4 Conclusioni, QUARTO esperimento biocompatibilità'**

Il BP studiato con le nostre sperimentazioni, per quanto ne sappiamo, non è mai stato studiato, fino ad oggi, per le proprietà di bioadesività e biocompatibilità, perchè nasce come prodotto destinato alla microelettronica. A causa del sempre più diffuso impiego dei nanomateriali e del BP, in considerazione delle limitate conoscenze, attualmente esistenti, e del conseguente aumento dei rischi da esposizione professionale e pubblica ai nanomateriali. Sono necessari nuovi studi sulla bioadesività e sulla tossicità del BP. I dati riportati dalle nostre sperimentazioni possono essere utili ad estendere le conoscenze sulla innocuità del BP al fine di definirne il potenziale impiego in ambito chirurgico, verificando i potenziali rischi per la salute umana correlati alla esposizione al BP. In particolare, abbiamo osservato sia alla microscopia ottica sia con i test di trazione che l'effetto bioadesivo del BP è molto più energico dal suo lato opaco-ruvido rispetto al lato opposto, liscio, lucido che risulta debolmente bioadesivo. Inoltre il comportamento cambia in relazione allo stato di idratazione e dipende anche dalle caratteristiche del solvente. Infatti, il BP migliora la sua

prestazione bioadesiva se idratato con soluzione fisiologica. Queste proprietà sono utilissime nell'impiego chirurgico, specialmente nelle procedure laparoscopiche, ma necessitano di verifica clinica e di grandi numeri per raggiungere una significatività statistica. Il lato opaco provoca una reazione cicatriziale da corpo estraneo con deposizione di fibroblasti, mentre il lato liscio-lucente, scarsamente adesivo determina la deposizione di uno strato fibroso che non aderisce alla superficie. Sembra inoltre, per la prima volta chiaramente documentato, che il BP non evidenzia effetti citotossici su cellule normali sane, ma induce pesanti effetti sulle linee cellulari CaCo2, MCF-7 e HL-60. Pensiamo di procedere con le indagini scientifiche per chiarire esaurientemente questi punti, ancora oscuri nei nostri prossimi lavori. Altro interessantissimo possibile sviluppo è l'impiego del BP a fini chirurgici ed una sperimentazione in questa direzione, con animali di maggior taglia è in fase di progettazione. In conclusione i presenti risultati sono utili per estendere le conoscenze sulla sicurezza d'uso del BP, in vista del suo possibile futuro impiego in applicazioni chirurgiche ed endocrinologiche sui esseri viventi, con l'obiettivo finale dell'estensione all'Uomo. Infine, vogliamo enfatizzare il fatto che il nostro gruppo di ricerca lavorerà anche sull'apoptosi cellulare da BP, per chiarire i meccanismi che danneggiano esclusivamente le linee cellulari neoplastiche. Tali ricerche richiedono uno specifico, prolungato e dettagliato follow-up.

#### 8.4.1 Conclusioni delle analisi statistiche quarto esperimento biocompatibilità

I valori medi dei parametri ematochimici che esprimono la funzione dell'emuntorio renale dei **trattati** a confronto, con i **controlli**, mostra una differenza statisticamente significativa. nelle prime tre settimane di osservazione, come se l'emuntorio dei trattati, fosse sottoposto a maggiore sollecitazione metabolica, ma dopo le prime tre settimane la funzione ritorna alla norma. Occorrerebbe approfondire l'indagine statistica per analizzare se tale comportamento riguarda maggiormente il sottogruppo trattati con BP oppure il sottogruppo dei trattati con rete riassorbibile, di cui non sono stati dati tutti i particolari. Per quanto riguarda lo studio delle curve ponderali, concludiamo dicendo che inizialmente i gruppi sono omogenei ( $p=0.9$ ). ma le differenze di peso diventano significative in  $t_1-t_0$  e  $t_2-t_0$  ( $t=0,0001$ ), indicando che nel postoperatorio dei **trattati**,

esiste una sofferenza metabolica per il fatto che inizialmente crescono meno (potrebbe dipendere dal fatto che hanno subito l'impianto di BP, ma non è ancora completamente chiarito) ma successivamente la velocità di crescita si equipara a quella dei **controlli**.

## 8.5 Conclusioni QUINTO esperimento bioadesivita'

Le prove meccaniche di peeling test a 90° hanno evidenziato una differenza significativa di comportamento dei 5 campioni. Il campione BP lato ruvido ha presentato la maggiore adesività, valore di  $F_{max}=1$  N., seguito dall'adesività del lato liscio-lucente con valore di  $F_{max}$  pari a 0.8 N. In ordine decrescente, documentato dalla prova effettuata impiegando lo stesso campione di BP utilizzato nel I test (bucky paper 2° run), si registra una netta diminuzione della forza media di adesione ed un valore di  $F_{max}=0.2$  N. La rete Progrid presenta il valore più basso di adesività, mostrando un valore di forza  $F_{max}=0.01$  N, non modificabile alla ripetizione del test con la stessa rete su nuovo preparato biologico identico. L'adesività si azzerava sull'altra faccia, in polipropilene non rivestito da poliglattina. Il diverso comportamento del BP secco, come giunge dalla fabbrica, rispetto a quando è idratato con acqua pura o con soluzione fisiologica è interessante perché quando è asciutto ha un basso grado di flessibilità e si spezza alla torsione, risulta scarsamente bioadesivo. Se bagnato con acqua o con liquido interstiziale, diventa flessibile, molto bioadesivo e non si frammenta più, migliorando notevolmente le prestazioni a fini chirurgici [1-2-3-4]. È ovvio che questa esperienza preliminare debba essere approfondita, estesa e consolidata. Le prove hanno evidenziato una differenza significativa di comportamento tra i vari campioni. Il BP ha presentato la maggiore forza di adesione in tutti i test. Il BP lo stiamo valutando per verificare l'ipotesi di utilizzarlo in sostituzione dei mezzi di sintesi e collanti biologici attuali. [Vedi Par. 9.4, 18 ], proteggendo il paziente da teoriche ma possibili infezioni trasmissibili e neuralgia cronica. Il BP ha una bioadesività 100 volte maggiore del migliore materiale protesico bioadesivo

attualmente in commercio e pone una seria ipoteca sugli sviluppi futuri, che potrebbero cambiare radicalmente se, come sembra allo stato attuale della sperimentazione, il BP risulta perfettamente biocompatibile

**La chirurgia dei difetti della parete addominale si avvale di materiali protesici al fine di prevenire le recidive, migliorare il confort postoperatorio, ridurre il dolore, abbreviare la degenza ospedaliera ed accelerare la ripresa delle attività personali del Paziente. In tale ambito ho coinvolto nella mia avventura molti magnifici Colleghi Ricercatori, nella ricerca di un nuovo tessuto sintetico con il quale realizzare la “Protesi Ideale”. I nuovi materiali studiati sembrano rispondere alle caratteristiche di leggerezza, resistenza, biocompatibilità, economicità, reazione infiammatoria controllabile, maggior confort per i pazienti ed eliminazione del rischio di neuralgia cronica. I nuovi materiali, inoltre, riducono i rischi correlati all’impiego degli emoderivati come le colle di fibrina, consentono la riduzione dei tempi operatori per l’impianto e la precoce ripresa delle attività dell’operato. Questo fantastico periodo della mia vita si conclude felicemente come una meravigliosa esperienza. I risultati sono stati talmente ricchi, interessanti ed entusiasmanti che sicuramente, conclusosi il Dottorato, verranno ulteriormente sviluppati in futuro, per concretizzarne l’applicazione pratica.**

# 9 BIBLIOGRAFIA

## 9.1 Bibliografia PRIMO esperimento

- [1] Iijima S 1991 *Nature* **354** 56–8
- [2] Chen X, Tam U C, Czapinski J L, Lee G S, Rabuka D, Zettl A and Bertozzi C R 2006 Interfacing carbon nanotubes with living cells *J. Am. Chem. Soc.* **128** 6292–3
- [3] Magrez A, Kasas S, Salicio V, Pasquier N, Seo J W, Celio M, Catsicas S, Schwaller B and Forro L 2006 *Nano Lett.* **6** 1121–5
- [4] Singh R, Pantarotto D, Lacerda L, Pastorin G, Klumpp C, Prato M, Bianco A and Kostarelos K 2006 *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103** 3357–62
- [5] Banerjee S, Kahn M G and Wong S S 2003 Rational chemical strategies for carbon nanotube functionalization *Chemistry* **9** 1898–908
- [6] Bottini M, Tautz L, Huynh H, Monosov E, Bottini N, Dawson M I, Bellucci S and Mustelin T 2005 Covalent decoration of multi-walled carbon nanotubes with silica nanoparticles *Chem. Commun.* **6** 758–60
- [7] Bottini M, Balasubramanian C, Dawson M I, Bergamaschi A, Bellucci S and Mustelin T 2006 Isolation and characterization of fluorescent nanoparticles from pristine and oxidized electric arc-produced single-walled carbon nanotubes *J. Phys. Chem. B* **110** 831–6
- [8] Bottini M, Magrini A, Di Venere A, Bellucci S, Dawson M I, Rosato N, Bergamaschi A and Mustelin T 2006 Synthesis and characterization of supramolecular nanostructures of carbon nanotubes and ruthenium-complex luminophores *J. Nanosci. Nanotechnol.* **6** 1381–6
- [9] Kuhlmann U, Jantoljak H, Pfander N, Bernier P, Journet C and Thomsen C 1998 *Chem. Phys. Lett.* **294** 237
- [10] Kim U J, Liu X M, Furtado C A, Chen G, Saito R, Jiang J, Dresselhaus M S and Eklund P C 2005 *Phys. Rev. Lett.* **95** 157402
- [11] Bellucci S, Balasubramanian C, Micciulla F and Rinaldi G 2007 CNT composites for aerospace applications *J. Exp. Nanosci.* **2** 193–206
- [12] Bellucci S, Balasubramanian C, Micciulla F and Tiberia A 2007 Study of field emission of multiwalled C nanotubes from arc discharge *J. Phys.: Condens. Matter* **19** 395014
- [13] Bellucci S 2005 Carbon nanotubes: physics and applications *Phys. Status Solidi c* **2** 34–47
- [14] Bellucci S 2005 Nanotubes for particle channeling, radiation and electron sources *Nucl. Instrum. Methods B* **234** 57–77
- [15] Favero M S 1983 Chemical disinfection of medical and surgical materials *Disinfection, Sterilization and Preservation* 3rd edn, ed SS Block (Philadelphia, PA: Lea and Febiger) pp 469–92
- [16] Colombo C and Paletto A E 2001 *The New Textbook of Surgical Technique* 3rd edn (Torino: Minerva Medica)
- [17] Romeo A A 1984 The economics of reuse *Reuse of Disposable Medical Devices in the 1980's: Proc. Int. Conf. on the Reuse of Disposable Medical Devices in the 1980's* (The Institute for Health Policy

- Analysis, Georgetown University Medical Center, March 1984*) (Washington, DC: Institute for Health Policy Analysis) pp 43–9
- [18] De Nicola M, Mirabile Gattia D, Bellucci S, De Bellis G, Micciulla F, Pastore R, Tiberia A, Cerella C, D'Alessio M, Vittori Antisari M, Marazzi R, Traversa E, Magrini A, Bergamaschi A and Ghibelli L 2007 *J. Phys.: Condens. Matter* **19** 395013
- [19] Bergamaschi E, Bussolati E, Magrini A, Bottini M, Migliore L, Bellucci S, Iavicoli I and Bergamaschi A 2006 *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **19** 3–13
- [20] Rotoli B M, Bussolanti O, Bianchi M G, Barilli A, Balasubramanian C, Bellucci S and Bergamaschi E 2007 Non-functionalized multiwalled carbon nanotubes alter the paracellular permeability of human airway epithelial cells *Toxicol. Lett.* **178** 95–102
- [21] Irwin S 1968 Comprehensive observational assessment: a systematic, quantitative procedure for assessing the behavioural and physiologic state of the mouse *Psychopharmacologia* **13** 222–57
- [22] Bottini M, Bruckner S, Nika K, Bottini N, Bellucci S, Magrini A, Bergamaschi A and Mustelin T 2006 *Toxicol. Lett.* **160** 121
- [23] Sato Y, Yokoyama A, Shibata K, Akimoto Y, Ogino S, Nodasaka Y, Kohgo T, Tamura K, Akasaka T, Uo M, Motomiya K, Jeyadevan B, Ishiguro M, Hatakeyama R, Watari F and Tohji K 2005 Influence of length on cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes against human acute monocytic leukemia cell line THP-1 *in vitro* and subcutaneous tissue of rats *in vivo* *Mol. Biosyst.* **1** 176–82
- [24] Monteiro-Riviere N A, Nemanich R J, Inman A O, Wang Y Y and Riviere J E 2005 Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes *Toxicol. Lett.* **155** 377–84
- [25] Raja P M V, Connolley J, Ganesan G P, Ci L, Ajayan P M, Nalamasu O and Thompson D M 2007 Impact of carbon nanotube exposure, dosage and aggregation on smooth muscle cells *Toxicol. Lett.* **169** 51–63
- [26] Pulskamp K, Diabat'e S and Krug H F 2007 Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants *Toxicol. Lett.* **168** 58–74
- [27] Hiura H, Ebbesen T W and Tanigaki K 1995 *Adv. Mater.* **7** 275–7
- [28] Colvin V L 2003 *Nat. Biotechnol.* **21** 1166–70
- [29] Sitharaman B, Kissell K R, Hartman K B, Tran L A, Baikalov, Rusakova I, Sun Y, Khant H A, Ludtke S J, Chiu W, Laus S, Toth E, Helm L, Merbach A E and Wilson L J 2005 *Chem. Commun.* **31** 3915–7
- [30] De Nicola M, Bellucci S, Traversa E, De Bellis G, Micciulla F and Ghibelli L 2008 Carbon nanotubes on Jurkat cells: effects on cell viability and plasma membrane potential *J. Phys.: Condens. Matter* **20** 474204
- [31] Chiaretti M., Mazzanti G., Bosco S., Bellucci S, Cucina A., Le Foche F., Carru G.A. 2008 Carbon nanotubes toxicology and immunological effects *in vitro* and *in vivo* *J. Phys.: Condens. Matter* **20** 474203 (10 pp).
- [32] Bellucci S, Chiaretti M., Onorato P, Rossella F., Simone M. 2009, september 21-22 Micro-Raman study of effect of sterilization on carbon nanotubes for biomedical applications. Poster Session 2<sup>nd</sup>. National Nanomedicine Conference Padova.

- [33] Mattson MP, Haddon RC, Rao AM. Molecular functionalization of carbon nanotubes and use as substrates for neuronal growth. *J Mol Neurosci* 2000;14(3):175–82
- [34] *Nano Lett.*, Vol. 6, No. 3, 2006,
- [35] Hu, H.; Ni, Y.; Mandal, S. K.; Montana, V.; Zhao, B.; Haddon, R.C.; Parpura, V. J. *Phys. Chem. B* 2005, 109, 4285.

## 9.2 Bibliografia SECONDO esperimento

[1] Magrez A., Kasas S., *Nano Letters*, Vol 6, No 6 1121-1125, 2006

[2] Di Sotto A.; Chiaretti M.; Carru G. A.; Bellucci S.; Mazzanti G.; 2009 *Toxicol Lett.* vol. 184; p. 192-197, ISSN: 0378-4274, doi:10.1016/j.toxlet.2008.11.007

[3] Bottini M., Tautz L., Huynh H., Monosov E., Bottini N., Dawson M.I., Bellucci S. and Mustelin T. 2005, *Chem. Commun.*, 6, 758.

[4] Bottini M., Magrini A., Di Venere A., Bellucci S., Dawson M.I., Rosato N., Bergamaschi A.; 2006 *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 6, 1381-1386.

[5] Chiaretti M., Mazzanti G., Bosco S., Bellucci S., Cucina A., Le Foche F., Carru G.A., Mastrangelo S., Di Sotto A., Masciangelo R., Chiaretti A. M., Balasubramanian C., De Bellis G., Micciulla F., Porta N., Deriu G. and Tiberia A. 2008 *J. Phys.: Condens. Matter*, 20, 474203.

[6] Monteiro-Riviere N. A.; Nemanich R. J.; Inman A. O.; Wang Y. Y.; Riviere J. E. *Toxicol Lett.* 2005, 155, 377.

[7] Bottini M.; Bruckner S.; Nika K.; Bottini N.; Bellucci S.; Magrini A.; Bergamaschi A.; Mustelin T. *Toxicol Lett.* 2006, 160, 121.

[8] Jia G.; Wang,H.; Yan L.; Wang X.; Pei R.; Yan T.; Zhao Y.; Guo X. *Environ Sci Technol.* 2005, 39, 1378.

[9] Pulskamp K.; Diabate S.; Krug H. F: *Toxicol Lett.* 2007, 168, 58.

[10] Yacobi N. R.; Phuleria H. C.; Demaio L.; Liang C. H.; Peng C. A.; Sioutas C.; Borok, Z.; Kim K. J.; Crandall E. D. *Toxicol In Vitro.* 2007, 21, 1373.

[11] Zeni O.; Palombo R.; Bernini R.; Zeni L.; Sarti M.; Scarfi M. R. *Sensor.* 2008, 8, 488.

[12] Maron D. M.; Ames B. N. *Mutat Res.* 1983, 113, 173.

[13] Green M. H.; Muriel W. J. *Mutat Res.* 1976, 38, 3.

[14] Herzog E., Byrne H.J., Casey A., Davoren M., Lenz A.-G., Maier K.L., Duschl A., Oostingh G.J. SWCNT suppress inflammatory mediator responses in human lung epithelium *in vitro*. *Toxicology and Applied Pharmacology* 234 (3), pp. 378-390 (2009).

[15] Murray, A.R., Kisin, E., Leonard, S.S., Young, S.H., Kommineni, C., Kagan, V.E., Castranova, V., Shvedova, A.A. Oxidative stress and inflammatory response in dermal toxicity of single-walled carbon nanotubes. *Toxicology Article in Press* (2009).

[16] Iijima, S., Ichihashi, T. *Nature* 1993, 363, 603.

[17] Ebbesen, T. W.; Hiura, H.; Fujita, J.; Ochiai, Y.; Matsui, S.; Tanigaki, K. *Chemical physics letters* 1993, 209, 83.

[18] De Nicola M., Bellucci S., Traversa E., De Bellis G., Micciulla F. and Ghibelli L. 2008 *J. Phys.: Condens. Matter*, 20, 474204.

- [19] Panhuis MIH, Salvador-Morales C, Franklin E, Chambers G, Fonseca A and Nagy JB, et al. "Characterization of an interaction between functionalized carbon nanotubes and an enzyme". [J Nanosci Nanotechnology 3 \(2003\) 209](#)
- [20] Sun J and Gao L. "Development of a dispersion process for carbon nanotubes in ceramic matrix by heterocoagulation". [Carbon 41 \(2003\) 1063](#)
- [21] Vohrer U., Kolaric I., Haque M.H., Roth S. and Detlaff-Weglikowska U. :Carbon nanotube sheets for the use as artificial muscles. [Carbon 42 \(2004\) 1159](#)
- [22] Whitby R.L.D., Fukuda T., Maekawa T., James S.L., Mikhalovsky S.V.:Geometric control and tuneable pore size distribution of buckypaper and buckydiscs. [Carbon 46 \(2008\) 949](#)
- [23] Irwin S Comprehensive observational assessment: a systematic, quantitative procedure for assessing the behavioural and physiologic state of the mouse *Psychopharmacologia* 13 222–57, 1968
- [24] Hirak K. Patra, Shuvojit Banerjee, Utpal Chaudhuri, Prabir Lahiri, Anjan Kr. Dasgupta, Cell selective response to gold nanoparticles, *Nanomedicine* 3 111-119, 2007.
- [25] Lam C. W.; James J. T.; Mc Cluskey, R.; Hunter R. L. *Toxicol Sci.* 2004 77, 126.
- [26] Muller J.; Huaux F.; Moreau N.; Misson P.; Heilier J. F.; Delos M.; Arras M.; Fonseca A.; Nagy J. B.; Lison D. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005, 207, 221.
- [27] Bellucci S. (2009). Nanoparticles and Nanodevices in Biological Applications. The INFN Lectures - Vol I. BERLIN HEIDELBERG: Springer Verlag, vol. 4, p. 1-198, ISBN: 978-3-540-70943-5.
- [28] E. Bergamaschi, O. Bussolati, A. Magrini, M. Bottini, L. Migliore, S. Bellucci, I. Iavicoli, A. Bergamaschi, *Int J Immunopathol Pharmacol* 2006, 19 (4):3-10.
- [29] Bianca Maria Rotoli, Ovidio Bussolati, Massimiliano G. Bianchi, Amelia Barilli, Chidambara Balasubramanian, Stefano Bellucci, Enrico Bergamaschi, *Toxicol Lett* 2008, 178: 95-102.
- [30] De Nicola M., Mirabile Gattia D., Bellucci S., De Bellis G., Micciulla F., Pastore R., Tiberia A., Cerella C., D'Alessio M., Vittori Antisari M., Marazzi R., Traversa E., Magrini A., Bergamaschi A. and Ghibelli L. *J. Phys.: Condens. Matter* 2007, 19:395013.
- [31] Toxicity studies of carbon nanotubes. Kolosnjaj J. *Adv. Exp. Med Biol* 2007; 620: 181-204
- [32] Carbon Nanostructures as a new high-performance platform for MR molecular imaging. Hartman KB, *Adv. Exp. Med Biol* 2007; 620: 74-84
- [33] Contrast agents: magnetic resonance. Burtea C. *Handb Exp Pharmacol.* 2008; (185 Pt 1): 135-65
- [34] Pulmonary toxicity of single wall carbon nano tubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. Lam CW *Toxicol Sci* 2004 Jan; 77(1):126-34 Epub 2003 Sept 26
- [35] A review of carbon nano tube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. Lam CW *Crit Rev Toxicol.* 2006 Mar; 36(3): 189-217
- [36] The pulmonary toxicity of multi wall carbon nanotube in mice 30 and 60 days after inhalation exposure. Li JG. *J Nanosc Nanotechnol* 2009 Feb; 9(2):1384-7
- [37] Gadonanotubes as new high-performance MRI contrast agents. Sitharaman B. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(3):291-5

[38] Nephrogenic systemic fibrosis versus contrast-induced nephropathy: risks and benefits of contrast-enhanced MR and CT in renally impaired patients. Martin DR J Magnetic Resonance imaging. 2009; 30:1350-1356

## 9.3 Bibliografia TERZO esperimento mutagenicità'

- 1 Ames, B.N., Mccann, J., Yamasaki, E., 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347–364.
- 2 Banerjee, S., Kahn, M.G., Wong, S.S., 2003. Rational chemical strategies for carbon nanotube functionalization. *Chemistry* 9, 1898–1908.
- 3 Bottini, M., Bruckner, S., Nika, K., Bottini, N., Bellucci, S., Magrini, A., Bergamaschi, A.,
- 4 Mustelin, T., 2006. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicol. Lett.* 160, 121–126.
- 5 Brusick, D.J., Simmon, V.F., Rosenkranz, H.S., Ray, V.A., Stafford, R.S., 1980. An evaluation of the *Escherichia coli* WP2 and WP2 uvrA reverse mutation assay. *Mutat. Res.* 76, 169–190.
- 6 Calvert, G.M., Rice, F.L., Boiano, J.M., Sheehy, J.W., Sanderson, W.T., 2003. Occupational silica exposure and risk of various diseases: an analysis using death certificates from 27 states of the United States. *Occup. Environ. Med.* 60, 122–129.
- 7 Chiaretti, M., Mazzanti, G., Bosco, S., Bellocci, S., Cucina, A., Le Foche, F., Carru, G.A., Mastrangelo, S., Di Sotto, A., Masciangelo, R., Chiaretti, A.M., Balasubramanian, C., De Bellis, G., Micciulla, F., Porta, N., Deriu, G., Tiberia A., 2008. Carbon nanotubes toxicology and effects on metabolism and immunological modification *in vitro* and *in vivo*. *J. Phys.: Condens. Matter* 20 (47), 474203 (10 pp), doi:10.1088/0953-8984/20/47/474203.
- 8 Cui, D., Tian, F., Ozkan, C.S., Wang, M., Gao, H., 2005. Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol. Lett.* 155, 73–85.
- 9 Davoren, M., Herzog, E., Casey, A., Cottineau, B., Chambers, G., Byrne, H.J., Lyng, F.M., 2007. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. *Toxicol. In Vitro* 21, 438–448.
- 10 De Boeck, M., Hoet, P., Lombaert, N., Nemery, B., Kirsch-Volders, M., Lison, D., 2003. In vivo genotoxicity of hard metal dust: induction of micronuclei in rat type II epithelial lung cells. *Carcinogenesis* 24, 1793–1800.
- 11 Dearfield, K.L., Cimino, M.C., McCarroll, N.E., Mauer, I., Valcovic, L.R., US Environmental Protection Agency, 2002. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutat. Res.* 521, 121–135.
- 12 DeMarini, D.M., 2000. Influence of DNA repair on mutation spectra in *Salmonella*. *Mutat. Res.* 450, 5–17.
- 13 Ebbesen, T.W., Hiura, H., Fujita, J., Ochiai, Y., Matsui, S., Tanigaki, K., 1993. Patterns in the bulk growth of carbon nanotubes. *Chem. Phys. Lett.* 209, 83–90. EMEA (European Medicines Agency), 1998. Note for guidance on genotoxicity: a standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals. CPMP/ICH/174/95.

- 14** Green, M.H., Muriel, W.J., 1976. Mutagen testing using TRP+ reversion in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 38, 3–32.
- 15** Helland, A., Wick, P., Koehler, A., Schmid, K., Som, C., 2007. Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.* 115, 1125–1131.
- 16** Hoet, P.H., Brüske-Hohlfeld, I., Salata, O.V., 2004. Nanoparticles—known and unknown health risks. *J. Nanobiotechnol.* 2, 12.
- 17** IARC, 1977. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Chemicals on Man: Asbestos, vol. 14. IARC, Lyon, pp. 1–106.
- 18** Iijima, S., 1991. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354, 56–58.
- 19** Iijima, S., Ichihashi, T., 1993. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* 363, 603–605.
- 20** Jia, G., Wang, H., Yan, L., Wang, X., Pei, R., Yan, T., Zhao, Y., Guo, X., 2005. Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1378–1383.
- 21** Kisin, E.R., Murray, A.R., Keane, M.J., Shi, X.C., Schwegler-Berry, D., Gorelik, O., Arepalli, S., Castranova, V., Wallace, W.E., Kagan, V.E., Shvedova, A., 2007. Singlewalled carbon nanotubes: geno and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 70, 2071–2079.
- 22** Kleiner, K., Hogan, J., 2003. How safe is nanotech? *New Sci.* (March), 14–15.
- 23** Knaapen, A.M., Albrecht, C., Becker, A., Höhr, D., Winzer, A., Haenen, G.R., Borm, P.J., Schins, R.P., 2002. DNA damage in lung epithelial cells isolated from rats exposed to quartz: role of surface reactivity and neutrophilic inflammation. *Carcinogenesis* 23, 1111–1120.
- 24** Knaapen, A.M., Borm, P.J.A., Albrecht, C., Schins, R.P.F., 2004. Inhaled particles and lung cancer. Part A: mechanisms. *Int. J. Cancer* 109, 799–809.
- 25** Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., Arepalli, S., Hunter, R.L., 2006. A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. *Crit. Rev. Toxicol.* 36, 189–217.
- 26** Lin, Y., Taylor, S., Li, H., Fernando, S.K.A., Qu, L., Wang, W., Gu, L., Zhou, B., Sun, Y.P., 2004. Advances towards bioapplications of carbon nanotubes. *J. Mater. Chem.* 14, 527–541.
- 27** Magrez, A., Kasa, S., Salicio, V., Pasquier, N., Seo, J.W., Celio, M., Catsicas, S., Schwaller, B., Forro, L., 2006. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett.* 6, 1121–1125.
- 28** Manna, S.K., Sarkar, S., Barr, J., Wisw, K., Barrera, E.V., Jejelowo, O., Rice-Ficht, A.C., Ramesh, J.T., 2005. Single-walled carbon nanotubes induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor-kB in human keratinocytes. *Nano Lett.* 5, 1676–1684.
- 29** Manning, C.B., Vallyathan, V., Mossman, B.T., 2002. Diseases caused by asbestos: mechanisms of injury and disease development. *Int. Immunopharmacol.* 2, 191–200.
- 30** Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity
- 31** test. *Mutat. Res.* 113, 173–215.

- 32** Maynard, A.D., Baron, P.A., Foley, M., Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Castranova, V., 2004. Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J. Toxicol. Environ. Health Part A* 7, 87–108.
- 33** Monteiro-Riviere, N.A., Nemanich, R.J., Inman, A.O., Wang, Y.Y., Riviere, J.E., 2005. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 155, 377–384.
- 34** Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., Misson, P., Heilier, J.F., Delos, M., Arras, M., Fonseca, A., Nagy, J.B., Lison, D., 2005. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 221–231
- 36** Muller, J., Decordier, I., Hoet, P.H., Lombaert, N., Thomassen, L., Huaux, F., Lison, D., Kirsch-Volders, M., 2008. Clastogenic and aneugenic effects of multi-wall carbon nanotubes in epithelial cells. *Carcinogenesis*. 29, 427–433.
- 37** Nemmar, A., Hoylaerts, M.F., Hoet, P.H., Vermylen, J., Nemery, B., 2003. Size effect of intratracheally instilled particles on pulmonary inflammation and vascular thrombosis. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 186, 38–45.
- 38** OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), 1997. Guideline for the testing of chemicals: bacteria reverse mutation test. Guideline 471.
- 39** Ohta, T., Tokishita, S., Tsunoi, R., Ohmae, S., Yamagata, H., 2002. Characterization of Trp(+) reversions in *Escherichia coli* strain WP2uvrA. *Mutagenesis* 17, 313–316.
- 40** Peters, A., Dockery, D.W., Muller, J.E., Mittleman, M.A., 2001. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 103, 2810–2815.
- 41** Pulskamp, K., Diabate, S., Krug, H.F., 2007. Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicol. Lett.* 168, 58–74.
- 42** Rao, K.S., Xu, Y., Shaw, E., Parton, J.W., 2004. Mutagenicity testing applied for regulation of developing products. *Curr. Sep.* 20, 141–144.
- 43** Rotoli, B.M., Bussolati, O., Bianchi, M.G., Barilli, A., Balasubramanian, C., Bellucci, S., Bergamaschi, E., 2008. Non-functionalized multi-walled carbon nanotubes alter the paracellular permeability of human airway epithelial cells. *Toxicol. Lett.* 178, 95–102.
- 44** Rutten, B., Gocke, E., 1988. The ‘antimutagenic’ effect of cinnamaldehyde is due to a transient growth inhibition. *Mutat. Res.* 201, 97–105.
- 45** Schins, R.P., 2002. Mechanisms of genotoxicity of particles and fibers. *Inhal. Toxicol.* 14, 57–78.
- 46** Shaughnessy, D.T., Setzer, R.W., DeMarini, D.M., 2001. The antimutagenic effect of vanillin and cinnamaldehyde on spontaneous mutation in *Salmonella* TA104 is due to a reduction in mutations at GC but not AT sites. *Mutat. Res.* 480–481, 55–69.
- 47** Szendi, K., Varga, C., 2008. Lack of genotoxicity of carbon nanotubes in a pilot study. *Anticancer Res.* 28, 349–352.

- 48** Wick, P., Manser, P., Limbach, L.K., Dettlaff-Weglikowska, U., Krumeich, F., Roth, S., Stark, W.J., Bruinink, A., 2007. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. *Toxicol. Lett.* 168, 121–131.
- 49** Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D.J., Gatehouse, D.G., 1990. Comparison of *Salmonella typhimurium* TA102 with *Escherichia coli* WP2 tester strains. *Mutagenesis* 5, 285–291.
- 50** Wu, Y., Hudson, J., Lu, Q., Moore, J., Mount, A., Rao, A., Alexov, E., Ke, P.C., 2006. Coating single-walled carbon nanotubes with phospholipids. *J. Phys. Chem. B* 110, 2475–2478.
- 51** Yacobi, N.R., Phuleria, H.C., Demaio, L., Liang, C.H., Peng, C.A., Sioutas, C., Borok, Z., Kim, K.J., Crandall, E.D., 2007. Nanoparticle effects on rat alveolar epithelial cell monolayer barrier properties. *Toxicol. In Vitro* 21, 1373–1381.
- 52** Yang, K., Zhu, L., Xing, B., 2006. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by carbon nanomaterials. *Environ. Sci. Technol.* 40, 1855–1861.
- 53** Zeni, O., Palombo, R., Bernini, R., Zeni, L., Sarti, M., Scarfì, M.R., 2008. Cytotoxicity investigation on cultured human blood cells treated with single-wall carbon nanotubes. *Sensor* 8, 488–499.
- 54** Zhu, L., Chang, D.W., Dai, L., Hong, Y., 2007. DNA damage induced by multiwalled carbon nanotubes in mouse embryonic stem cells. *Nano Lett.* 7, 3592–3597

## 9.4 Bibliografia QUARTO esperimento biocompatibilita'

1. **Chiaretti, M.**; Mazzanti, G.; Bosco, S.; **Bellucci, S.**; Cucina, A.; Le Foche, F; Carru, G A; Mastrangelo, S ; Di Sotto, A ; Masciangelo, R; Chiaretti, A M; *J. Phys.: Condensed Matters* **2008**, *20*, 47-57.
2. **Chiaretti, M.**; Cucina, A.; **Bellucci, S.**; Di Sotto A; Mazzanti G.; [www.icact.com](http://www.icact.com) Abstract book of 20<sup>th</sup> International Congress on Anti-Cancer Treatment **2009**, 438-439.
3. Ebbesen, T. W.; Hiura, H.; Fujita, J.; Ochiai, Y.; Matsui, S.; Tanigaki, K. *Chemical physics letters* **1993**, *209*, 83.
4. Rotoli, B. M.; Bussolati, O.; Bianchi, M. G.; Barilli, A.; Balasubramanian, C.; **Bellucci, S.**; Bergamaschi, E. *Toxicol Lett.* **2008**, *178*, 95.
5. Lam, C. W.; James, J. T.; Mccluskey, R.; Hunter, R. L. *Toxicol Sci.* **2004**, *77*, 126.
6. Muller, J.; Huaux, F.; Moreau, N.; Misson, P.; Heilier, J. F.; Delos, M.; Arras, M.; Fonseca, A.; Nagy, J. B.; Lison, D. *Toxicol Appl Pharmacol.* **2005**, *207*, 221.
7. Monteiro-Riviere, N. A.; Nemanich, R. J.; Inman, A. O.; Wang, Y. Y.; Riviere, J. E. *Toxicol Lett.* **2005**, *155*, 377.
8. Bottini, M.; Bruckner, S.; Nika, K.; Bottini, N.; **Bellucci, S.**; Magrini, A.; Bergamaschi, A.; Mustelin, T. *Toxicol Lett.* **2006**, *160*, 121.
9. Pulskamp, K.; Diabate, S.; Krug, H. F. *Toxicol Lett.* **2007**, *168*, 58.
10. Yacobi, N. R.; Phuleria, H. C.; Demaio, L.; Liang, C. H.; Peng, C. A.; Sioutas, C.; Borok, Z.; Kim, K. J.; Crandall, E. D. *Toxicol In Vitro.* **2007**, *21*, 1373.
11. Zeni, O.; Palombo, R.; Bernini, R.; Zeni, L.; Sarti, M.; Scarfi, M. R. *Sensor.* **2008**, *8*, 488.
12. Di Sotto, A.; **Chiaretti, M.**; Carru, G. A.; **Bellucci, S.**; Mazzanti, G.; *Toxicol Lett.* **2008**, *184*(3),192-197.
13. Irwin S.; *Psychopharmacologia*, **1968**, *13* 222–57.
14. Panhuis MIH, Salvador-Morales C, Franklin E, Chambers G, Fonseca A and Nagy JB, et al. "Characterization of an interaction between functionalized carbon nanotubes and an enzyme". [J Nanosci Nanotechnology 3 \(2003\) 209](#)
15. Sun J and Gao L. "Development of a dispersion process for carbon nanotubes in ceramic matrix by heterocoagulation". *Carbon* [41 \(2003\) 1063](#)
16. Vohrer U., Kolaric I., Haque M.H., Roth S. and Detlaff-Weglikowska U. :Carbon nanotube sheets for the use as artificial muscles. [Carbon 42 \(2004\) 1159](#)
17. Monteiro-Riviere NA, Nemanich RJ, Inman AO, Wang YY, Riviere JE. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol Lett* 155:377-384; **2005**.
18. Multi Walled Carbon Nanotube buckypaper: toxicology and biological effects in vitro and in vivo.; **Bellucci, S.**; **Chiaretti, M.**;Cucina, A.; Carru, G A; Chiaretti, A I. *Nanomedicine* (2009) *4*(5); 531-540 ISSN 1743-5889

## 9.5 Bibliografia QUINTO esperimento bioadesivita'

- 1 Novitsky Y.W., Harrel A.G., Cristiano J.A., Lauren Paton B., Norton H.J.,: Comparative evaluation of adhesion formation, strength of ingrowth, and textile properties of prosthetic meshes after long-term intra-abdominal implantation in a Rabbit. *Journal of Surgical Research* 140, 6-11(2007)
- 2 Millesi H., Terzis JK.: *Nomenclature in peripheral nerve surgery*. Clin Plast Surg,1984.
- 3 Seddon A.: *Surgical disorders of the peripheral nerves*. Livingstone, Edinburg, 1972
- 4 Sunderland S.: *Nerves and nerve jniury*. Livingstone, Edinburg.1968.
- 5 Jacob B.P., Hogle N.J, Durak E., Kim T.,: Tissue ingrowth and bowel adhesion formation in an animal comparative study: polypropylene versus Procede versus Parietex Composite. *Surg Endosc* 21: 629-623 (2007)
- 6 Bradley WG.: *Disorders of peripheral nerves*. Blackwell Scientific Publication, Oxford, 1974
- 7 Topart P, Vandenbroucke F, Lozach P: Tissucol versus tack staples as mesh fixation in totally extraperitoneal laparoscopic repair of groin hernias. A retrospective analysis. *Sur Endoscop*. 19:724-727 (2005).
- 8 Olmi S.Addis A: Experimental comparison of type of Tissucol dilution and composite mesh (Parietex) for laparoscopic repair of groin and abdominal hernia: observational study conducted in a university laboratory. *Hernia*. 11:211-215 (2007).

# RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano gli Amici:

- Nicoletta Petecchia e Giovanna Angela Carru, Direzione Generale Azienda Policlinico Umberto I, Università di Roma “Sapienza”
- Andrea Martinelli Dipartimento di Chimica, Università di Roma “Sapienza”
- Raffaele Masciangelo Servizio di Statistica Sanitaria, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Azienda Policlinico Umberto I, Università di Roma “Sapienza”
- Ernesto Tomei Cattedra di Radiologia B, Azienda Policlinico Umberto I, Università di Roma “Sapienza”
- Stefano Bellucci Istituto di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali di Frascati
- Paola Consentino Appialab SRL, Laboratorio Analisi Chimicocliniche Veterinarie, Via Latina 286, Roma
- Giovanni De Bellis Istituto di Fisica Nucleare Laboratori Nazionali di Frascati
- Emanuela D’Amore Istituto Superiore di Sanità Servizio Benessere Animale, Stabulario, Roma
- Agostino Eusepi Istituto Superiore di Sanità Servizio Benessere Animale, Stabulario, Roma
- Antonio Di Virgilio Istituto Superiore di Sanità Servizio Benessere Animale, Stabulario, Roma
- Carmine Nicoletti Dipartimento di Embriologia e Istologia Università di Roma “Sapienza”
- Alessandra Cucina Dipartimento Pietro Valdoni, Azienda Policlinico Umberto I, Università di Roma “Sapienza”
- Luigi Scucchi Anatomia ed Istologia Patologica, Università di Roma Sapienza,
- Sandro Bosco Anatomia ed Istologia Patologica, Università di Roma Sapienza,
- Fabio Faiola Servizio Benessere animale, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università di Roma Sapienza
- Gabriela Mazzanti Dipartimento di Farmacologia “Vittorio Ersparmer” Università di Roma Sapienza
- Il Personale infermieristico ed in particolare, il Caposala Marco della NCO del Dipartimento Paride Stefanini Azienda Policlinico Umberto I.