



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Scienze del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOLOGICHE
INDIRIZZO: FARMACOLOGIA, TOSSICOLOGIA E TERAPIA
CICLO XXVI

**Tossicità di inquinanti ambientali correlati ai processi
di incenerimento dei rifiuti solidi urbani:
studio dei meccanismi molecolari su cellule del tratto respiratorio**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Palatini

Supervisore: Ch.mo Prof. Maria Carrara

Dottorando: Alessia Forgiarini

INDICE

ABSTRACT	1
RIASSUNTO	3
Capitolo 1	5
INTRODUZIONE	5
1.1 INQUINAMENTO AMBIENTALE	5
1.1.1 INQUINAMENTO ATMOSFERICO	6
1.2 INCENERIMENTO DI RIFIUTI SOLIDI URBANI	11
1.2.1 GENERE LEGGERA O FLY ASH	15
1.3 EFFETTI DEL PARTICOLATO SULLA SALUTE	22
1.3.1 SISTEMA RESPIRATORIO	25
1.3.2 INTERAZIONE TRA PARTICOLATO E SISTEMA RESPIRATORIO	27
1.4 MECCANISMI DI TOSSICITÀ	28
1.4.1 STRESS OSSIDATIVO	29
1.4.2 INFIAMMAZIONE	35
1.5 NORMATIVA SULLE EMISSIONI IN ATMOSFERA	37
Capitolo 2	41
SCOPO DELLA TESI	41
Capitolo 3	45
MATERIALI E METODI	45
3.1 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI	45
3.2 ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE GRANULOMETRICA	47
3.3 ANALISI DELLA SUPERFICIE PARTICELLARE E DELLA POROSITÀ	47
3.4 ANALISI SEM-EDX	48
3.5 ANALISI HRGC-HRMS	48
3.6 ANALISI ICP	49
3.7 MODELLI CELLULARI	49
3.8 ANALISI DELLA MORFOLOGIA CELLULARE: MICROSCOPIA OTTICA	50
3.9 ANALISI TEM	50
3.10 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO	51

3.11	VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ROS	52
3.12	DOSAGGIO DEL GLUTATIONE RIDOTTO TOTALE	52
3.13	ESPRESSIONE DI HO-1 E NF-kB p65: WESTERN BLOTTING	53
3.14	TRASLOCAZIONE NUCELARE DI NF-kB p65: IMMUNOCITOCHIMICA	54
3.15	DOSAGGIO DELLE INTERLEUCHINE	55
3.16	PRE-TRATTAMENTO CON N-ACETILCISTEINA	56
3.17	ANALISI STATISTICA	57

Capitolo 4 **59**

RISULTATI **59**

4.1	PROFILO TOSSICOLOGICO DEL FLY ASH	59
4.1.1	DISTRIBUZIONE GRANULOMETRICA	59
4.1.2	ANALISI DELLA SUPERFICIE PARTICELLARE E DELLA POROSITÀ	60
4.1.3	ANALISI SEM-EDX	61
4.1.4	CARATTERIZZAZIONE CHIMICA HRGC-HRMS	62
4.1.5	CARATTERIZZAZIONE CHIMICA ICP	62
4.1.6	INFLUENZA SULLA MORFOLOGIA CELLULARE	63
4.1.7	ANALISI TEM	64
4.1.8	EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO	66
4.1.9	PRODUZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)	68
4.1.10	DOSAGGIO DEL GLUTATIONE RIDOTTO TOTALE (tGSH)	70
4.1.11	ESPRESSIONE DELL'EME-OSSIGENASI-1 (HO-1)	72
4.1.12	ESPRESSIONE E TRASLOCAZIONE NUCLEARE DI NF-kB	74
4.1.13	DOSAGGIO DELLE INTERLEUCHINE 6 E 8	77
4.1.14	EFFETTO DEL PRE-TRATTAMENTO CON N-ACETILCISTEINA	80
4.2	PROFILO TOSSICOLOGICO DEI CAMPIONI DERIVATI DA FILTRI DELL'ARIA	82
4.2.1	CARATTERIZZAZIONE CHIMICA HRGC-HRMS	82
4.2.2	EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO	83
4.2.3	PRODUZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)	85
4.2.4	DOSAGGIO DELLE INTERLEUCHINE 6 E 8	87

Capitolo 5 **91**

DISCUSSIONE **91**

BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA **101**

ABSTRACT

The demands of our society generate wastes that tend to increase in quantity as the standard of living increases. The most effective means of dealing with this problem is to reduce the amount of wastes generated (McKay, 2002). Solid waste incinerators reduce the volume and the mass of wastes, but emissions could contain highly toxic components. Major problems regarding the operation of incineration are by-products, especially the lightest fraction (Fly Ash), that contains the highest amount of volatile heavy metals, such as Cd, Pb and Zn, and polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (Yao et al., 2012).

Particulate air pollution (PM) is an important environmental health risk factor for many different diseases. This is indicated by numerous epidemiological studies on associations between PM exposure and occurrence of acute respiratory infections, lung cancer and chronic respiratory and cardiovascular diseases (de Kok et al., 2006).

The pulmonary epithelium represents a primary barrier preventing the entry of inhaled compounds into the body. As a consequence, lung epithelial cells are also a primary target of many inhaled noxious substances (Ovrevik et al., 2009).

Fly Ash collected from the electrostatic precipitator of Bozen's municipal solid waste incinerator was taken as an example for real particles with complex composition released into the atmosphere to study the mechanism of early biological responses of BEAS-2B and A549 human lung epithelial cells. Furthermore, some different air samples were collected in Bozen area and their cellular effects were studied.

Chemical and physical analysis identified and quantified the pollutants, and *in vitro* cellular assays were used to estimate some toxic effects of Fly Ash (*Total Fraction*) and air samples. The studies include also the effects of *Water-soluble*, *Water-insoluble* and *DMSO-soluble Fractions* of the Fly Ash.

The *Total Fraction* induced a concentration-dependent reduction on cell viability (mostly on BEAS-2B cells, as compared with A549 cells) and increased ROS generation. The Fly Ash-induced oxidative stress was correlated with diminution of tGSH content and induction of heme oxygenase-1. Data confirmed a strong correlation between samples' composition and their biological effects, in fact *Total* and *Water-insoluble Fractions* were the most toxic and responsive, instead *Water* and *DMSO-soluble Fractions* were less active.

Fly Ash was also able to induce inflammatory responses through NF- κ B activation, followed by enhancement of IL-6 and IL-8 levels.

ROS generation, tGSH reduction and IL secretion were markedly inhibited by preincubation of the cells with the anti-oxidant N-acetylcysteine, which confirmed the involvement of oxidative stress in Fly Ash toxicity.

The study of the toxicity of air samples revealed that there was a significant diminution of cellular viability only after 72 hours of exposition. The sample containing the incinerator's chimney emissions increased ROS production and IL-6 and IL-8 secretion. This underlined that oxidative stress was probably related to the inflammatory responses and cleared how the cellular response is closely linked with the content of toxic substances of the samples.

RIASSUNTO

I moderni stili di vita portano alla produzione di una grande quantità di rifiuti, che tende costantemente ad aumentare (McKay, 2002). Il modo più efficace per tentare di risolvere questo problema è quello di ridurre il volume. Gli odierni inceneritori di rifiuti solidi urbani sono in grado di diminuire il volume e la massa dei rifiuti, ma le sostanze che vengono emesse possono essere altamente tossiche. I sottoprodotti che si formano, in particolare la frazione più leggera delle ceneri (*Fly Ash*), possono contenere alte quantità di metalli pesanti volatili, come Cd, Pb e Zn, oltre a diossine e furani (Yao et al., 2012).

Il particolato atmosferico (PM) è un importante fattore di rischio ambientale e per la salute. Molti studi epidemiologici hanno infatti evidenziato una correlazione diretta tra l'esposizione al PM e l'insorgere di infezioni respiratorie acute, tumore polmonare e malattie croniche del tratto respiratorio e del sistema cardiovascolare (de Kok et al., 2006).

Il *Fly Ash*, raccolto dal filtro a manica dell'inceneritore dei rifiuti solidi urbani di Bolzano, è stato utilizzato come modello di miscela di particelle a composizione complessa rilasciata in atmosfera, al fine di studiare il meccanismo delle risposte biologiche precoci di cellule epiteliali polmonari umane BEAS-2B e A549. Sono stati inoltre studiati alcuni campioni ottenuti da filtri di aria posti in diverse posizioni della città di Bolzano.

Le analisi chimico-fisiche hanno permesso di identificare e quantificare gli inquinanti presenti, mentre i test *in vitro* di valutare gli effetti tossici del *Fly Ash* (*Frazione Totale*) e dei campioni d'aria. Gli studi hanno riguardato anche gli effetti di alcune frazioni derivate dal *Fly Ash*: *Frazione Idrosolubile*, *Non-Idrosolubile* e *DMSO-solubile*.

L'esposizione alla *Frazione Totale* ha indotto una riduzione concentrazione-dipendente della crescita cellulare (in modo particolare delle cellule BEAS-2B) e un'aumentata produzione di ROS. Lo stress ossidativo indotto è stato confermato anche dalla diminuzione del contenuto di tGSH e dall'induzione dell'eme ossigenasi-1. Inoltre è in grado di innescare risposte infiammatorie con attivazione di NF-kB e aumento dei livelli di IL-6 e IL-8. I dati hanno confermato una forte correlazione tra la composizione dei campioni e i loro effetti biologici, infatti le frazioni *Totale* e *Non-Idrosolubile* si sono rivelate quelle più tossiche, mentre le frazioni *Idrosolubile* e *DMSO-solubile* sono quelle meno attive.

Il pre-trattamento delle cellule con l'antiossidante N-acetilcisteina inibisce nettamente la produzione di ROS, la riduzione dei livelli di tGSH e la secrezione di IL, confermando così il coinvolgimento dello stress ossidativo nei meccanismi di tossicità indotti dal *Fly Ash*.

I risultati ottenuti studiando alcuni campioni ottenuti da filtri di aria posti in diverse posizioni della città, sottolineano innanzitutto la buona efficienza dei sistemi di filtrazione dei fumi dell'inceneritore, in grado di diminuire notevolmente la quantità di IPA, diossine e soprattutto metalli emessi in atmosfera e quindi di limitarne i possibili danni. Tra i campioni studiati, influenzati in maniera più o meno importante dalla presenza di diverse fonti di emissione, tra cui l'inceneritore, solo quello ottenuto dal filtro posto a camino dell'impianto è in grado di attivare un'importante risposta ossidativa e infiammatoria, indicando un significativo contributo delle emissioni, in ogni caso inferiori ai limiti imposti dalle vigenti normative.

Capitolo 1

INTRODUZIONE

1.1 INQUINAMENTO AMBIENTALE

L'inquinamento viene definito come la perturbazione degli equilibri di un ecosistema e viene considerata inquinante una qualunque sostanza, di origine naturale o antropica, che non rientri nella composizione della matrice di interesse (o sia presente in essa in concentrazione nettamente superiore ai valori naturali) e che abbia un effetto ritenuto dannoso per l'ambiente o per l'uomo (Campanella, 2007).

Sin dagli anni Settanta del secolo scorso, la questione dell'inquinamento ambientale è divenuta di grande interesse, poiché il fenomeno è aumentato considerevolmente e, soprattutto negli ultimi anni, l'inquinamento provocato dalle attività umane ha di gran lunga superato l'inquinamento di origine naturale.

Il normale equilibrio ecologico può infatti essere modificato da eventi naturali, quali, ad esempio, i terremoti e le eruzioni vulcaniche, e l'inquinamento, quindi, può essere provocato sia da fenomeni naturali come tempeste di sabbia, fumo dovuto ad incendi o ad attività vulcanica, sia da attività antropiche quali traffico veicolare, impianti di riscaldamento, produzione di acque reflue ed attività industriali. I rifiuti industriali e quelli civili contribuiscono

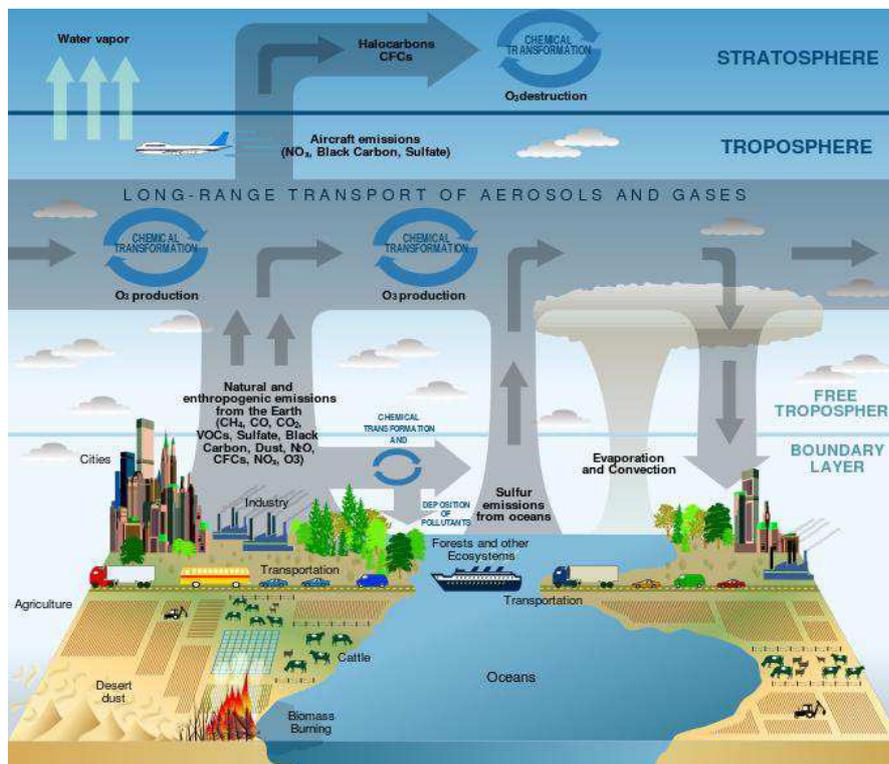


Fig. 1: Rappresentazione dell'inquinamento atmosferico (Rekacewicz, The 2003 Strategic Plan for the U.S. Climate Change Science Program (CCSP)).

Introduzione

significativamente all'inquinamento che minaccia l'ecosistema e la salute dell'uomo (Campanella, 2007).

L'inquinamento chimico è provocato sia dall'immissione che dalla generazione nell'ambiente di inquinanti chimici che, se direttamente immessi, sono detti primari, mentre se prodotti per reazioni chimiche nell'atmosfera, sono detti secondari. L'inquinamento biologico è legato all'immissione nell'ambiente di microrganismi. L'inquinamento fisico è determinato dall'immissione nell'ambiente di energia termica, acustica, elettromagnetica sia ionizzante che non ionizzante e di pressione. In molti casi l'inquinamento fisico è associato all'inquinamento chimico e biologico.

Gli inquinanti immessi nell'ambiente si disperdono con velocità e per distanze che dipendono dal tipo di sostanza e dalle condizioni ambientali, modificando la propria concentrazione, partecipando o catalizzando trasformazioni chimiche, fisiche e biologiche. La dispersione degli elementi inquinanti nelle matrici ambientali (acqua, aria, suolo) viene governata da complessi fenomeni di trasporto convettivi, diffusivi e radiativi nonché dagli equilibri termodinamici e dalle reazioni chimiche che si realizzano nel contatto fra le matrici e gli inquinanti (Lancia, Nigro, 2010).

1.1.1 INQUINAMENTO ATMOSFERICO

L'atmosfera terrestre è composta prevalentemente da azoto, da ossigeno e da alcuni gas nobili (argo, neon, kripto e xeno) le cui concentrazioni sono essenzialmente costanti nel tempo. Accanto a queste specie gassose, denominate perenni o di accumulo, ve ne sono altre cosiddette in traccia, cioè a concentrazioni relativamente basse ma comunque variabili. L'atmosfera è un sistema dinamico formato da costituenti che vengono continuamente scambiati tra materia vivente, oceani, suolo (Fig. 1). Tali scambi coinvolgono processi di natura fisica e chimica (Campanella, 2007). Alcune sostanze chimiche pericolose possono venire emesse nell'ambiente in modo accidentale, ma molti inquinanti atmosferici vengono

rilasciati da impianti industriali e altre attività in modo continuo e possono causare effetti negativi alla salute umana e all'ambiente (Kampa, Castanas, 2008).

Come riportato nel DPR 203/1988, viene definito inquinamento atmosferico "ogni modificazione della composizione o stato fisico dell'aria atmosferica, dovuta alla presenza nella stessa di una o più sostanze in quantità e con caratteristiche tali da alterare le normali condizioni ambientali e di salubrità dell'aria; da costituire pericolo ovvero pregiudizio diretto o indiretto per la salute dell'uomo; da compromettere le attività ricreative e gli

Constituent	Chemical symbol	Mole percent
Nitrogen	N ₂	78.084
Oxygen	O ₂	20.947
Argon	Ar	0.934
Carbon dioxide	CO ₂	0.0350
Neon	Ne	0.001818
Helium	He	0.000524
Methane	CH ₄	0.00017
Krypton	Kr	0.000114
Hydrogen	H ₂	0.000053
Nitrous oxide	N ₂ O	0.000031
Xenon	Xe	0.0000087
Ozone	O ₃	trace to 0.0008
Carbon monoxide	CO	trace to 0.000025
Sulfur dioxide	SO ₂	trace to 0.00001
Nitrogen dioxide	NO ₂	trace to 0.000002
Ammonia	NH ₃	trace to 0.0000003

Tab. 1: Composizione dell'aria secca (Mackenzie, 1995).

altri usi legittimi dell'ambiente; da alterare le risorse biologiche e gli ecosistemi ed i beni materiali pubblici e privati".

L'aria è considerata inquinata quando presenta una composizione chimica diversa da quella media valutata su campioni prelevati in zone lontane da ogni fonte di inquinamento. In Tabella 1 sono riportate le concentrazioni medie dei componenti dell'aria secca pulita.

Gli aerosol atmosferici (o materiale particellare aerodisperso) sono una miscela complessa di particelle solide o liquide relativamente stabili nell'aria circostante.

Le dimensioni delle particelle costituiscono il parametro più importante per la descrizione del loro comportamento e della loro origine; la composizione chimica, la rimozione ed il tempo di residenza nell'atmosfera sono tutte caratteristiche correlate con le dimensioni delle particelle.

Queste sospensioni possono essere costituite da una varietà di particelle di diversa dimensione e composizione in funzione della loro origine (Marconi, 2003).

Gli inquinanti atmosferici possono inoltre essere distinti in (Leduc et al., 1995):

- inquinanti primari: si trovano nell'atmosfera con la stessa composizione con cui sono stati emessi dalle sorgenti, siano esse naturali o antropiche: particolato aerodisperso, anidride solforosa e acido solforico, monossido e biossido d'azoto, monossido di carbonio, composti organici volatili e metalli pesanti;
- inquinanti secondari: derivano dalla combinazione di due o più inquinanti primari, oppure dalla loro reazione con i costituenti fondamentali dell'aria, oppure per trasformazioni chimico-fisiche o dovute alle radiazioni solare (come biossido di azoto, ozono, aldeidi e chetoni). Gli inquinanti secondari possono, a loro volta, reagire oppure depositarsi sulla superficie terrestre causando effetti dannosi per gli ecosistemi naturali.

Un ulteriore sistema di classificazione degli aerosol fa riferimento alle sorgenti naturali o antropiche da cui essi derivano. Negli ambienti ad intensa urbanizzazione le particelle aerodisperse derivano essenzialmente dai processi di combustione di sorgenti mobili, come i veicoli a motore, e di sorgenti fisse, come gli impianti per la produzione di energia (Tab. 2).

La gran parte dei cambiamenti della composizione atmosferica è dovuta alla combustione di carburanti fossili, per la generazione di energia e per i trasporti. Sono stati identificati numerosi inquinanti dell'aria, che variano in composizione chimica, reattività, fonti di emissione, persistenza nell'ambiente, capacità di

Naturali
Spruzzi marini.
Polveri minerali trascinate dai venti.
Emissioni vulcaniche (includono particelle direttamente emesse e particelle prodotte da reazioni dei composti gassosi).
Materiali biogenici (particelle emesse direttamente e particelle secondarie derivanti dalla condensazione di sostanze organiche emesse dalle piante).
Fumi derivanti da incendi boschivi o di materiali vegetali.
Prodotti delle reazioni naturali di conversione gas-particelle (ad es. solfati generati dallo zolfo ridotto emesso dalla superficie degli oceani, reazioni con gas emessi dalle paludi).
Antropiche
Particelle emesse direttamente dalle attività industriali, dai processi di combustione, dalle attività di trasporto, costruzioni (ceneri, fumi, polveri delle strade, ecc.).
Prodotti della conversione dei gas generati dalla combustione di materiali fossili.

Tab. 2: *Sorgenti di particelle aerodisperse* (Marconi, 2003).

Introduzione

essere trasportati a brevi o lunghe distanze e i loro eventuali impatti sulla salute dell'uomo e degli animali.

In ogni caso essi hanno in comune alcune caratteristiche, che permettono di suddividerli in 4 gruppi (Kampa, Castanas, 2008):

1. *Inquinanti gassosi* (SO_2 , NO_x , CO, ozono, composti organici volatili): essi contribuiscono in modo importante alle modifiche della composizione atmosferica e sono principalmente dovuti alla combustione di carburanti fossili. Gli ossidi di azoto vengono emessi come NO che reagisce rapidamente con l'ozono o con specie radicaliche nell'atmosfera formando NO_2 . L'ozono si forma negli strati atmosferici inferiori da una serie di reazioni che coinvolgono NO_2 e composti organici volatili, processo che viene avviato dalla radiazione solare. CO è un prodotto di combustione incompleta e il trasporto su strada è la sua fonte principale. Mentre la SO_2 antropica è dovuta ai combustibili fossili contenenti zolfo (principalmente carbone e oli pesanti), la sua emissione naturale è causata dalla fusione di minerali contenenti zolfo, vulcani e oceani. Infine i composti organici volatili (COV) sono principalmente dovuti alle emissioni dei carburanti, a processi di combustione per la produzione di energia e al trasporto su strada. Questa è una classe di composti, che comprende specie chimiche di natura organica, come il benzene. Anche se la maggior parte di inquinanti gassosi viene inalata e induce quindi problematiche principalmente all'apparato respiratorio, può portare anche all'insorgenza di problemi ematologici (CO, benzene) e cancro.
2. *Inquinanti organici persistenti*: perdurano nell'ambiente per lunghi periodi e i loro effetti sono amplificati in quanto entrano nella catena alimentare (bio-magnificazione). Essi comprendono pesticidi, diossine, furani e PCB. Generalmente, con il termine generico "diossine" si comprendono le dibenzo-diossine (PCDD) e dibenzo-furani (PCDF), mentre bifenili policlorurati (PCB) sono chiamati "composti diossina-simili" e hanno attività tossica paragonabile alle diossine. Le diossine si formano durante i processi di combustione incompleta e quando vengono bruciati materiali contenenti cloro (ad es. plastiche). Una volta emesse nell'atmosfera, esse tendono a depositarsi sul suolo e sull'acqua, ma, non essendo idrosolubili, non contaminano le sorgenti. La maggior parte delle diossine presenti nelle piante derivano dall'aria inquinata o dai pesticidi utilizzati ed entrano nella catena alimentare dove si bio-accumulano, grazie alla loro capacità di legarsi stabilmente ai lipidi. Per "bio-accumulo" si intende l'aumento nel tempo della concentrazione di una sostanza chimica all'interno di un organismo biologico. I composti si accumulano negli organismi ogni qual volta vengono assunti e immagazzinati in modo più veloce di quanto vengano metabolizzati o secreti.
3. *Metalli pesanti*: elementi come il piombo, il mercurio, il nichel, il cadmio, l'argento, il vanadio, il cromo e il manganese. Essi sono componenti naturali della crosta terrestre, non possono essere degradati o distrutti, possono essere trasportati per via aerea e entrare nell'apporto umano di acqua e cibo. Inoltre, vengono immessi nell'ambiente attraverso una grande varietà di fonti, come la combustione, gli scarichi di acque reflue e le industrie manifatturiere. In piccola misura sono presenti nell'organismo umano dove,

come oligoelementi, sono essenziali per mantenere le normali reazioni metaboliche. Tuttavia, a concentrazioni maggiori (anche se relativamente basse) possono diventare tossici. La maggior parte dei metalli pesanti è pericolosa, in quanto tendono a bioaccumularsi nell'organismo umano.

4. *Materiale particolato (PM)*: termine generico utilizzato per inquinanti atmosferici costituiti da complesse ed eterogenee miscele di particelle sospese nell'aria che variano di dimensione e composizione. Sono prodotti da una grande varietà di attività naturali e antropiche; le maggiori fonti sono le fabbriche, le centrali elettriche, gli inceneritori di rifiuti, gli autoveicoli, le attività di costruzione, gli incendi e la polvere naturale trasportata dal vento. La composizione del PM è variabile, in quanto le particelle possono adsorbire sulla loro superficie una moltitudine di inquinanti, tuttavia, i loro componenti principali sono: metalli, composti organici, materiale di origine biologica, ioni, gas reattivi e il nucleo carbonioso delle particelle. Il contenuto di metalli, la presenza di IPA (Idrocarburi Policiclici Aromatici), diossine e altri componenti organici, quali endotossine, contribuiscono in larga parte al profilo tossicologico del materiale particolato.

Particolare interesse è focalizzato su quest'ultimo gruppo di inquinanti, poiché recenti studi hanno evidenziato una stretta correlazione tra l'inalazione di particolato e l'insorgere di malattie del tratto respiratorio e cardiovascolare.

Le caratteristiche chimico-fisiche del particolato sono fortemente dipendenti dai meccanismi di formazione e dal tipo di sorgente. Su scala ridotta le dinamiche delle particelle aerodisperse primarie sono influenzate dalla diffusione Browniana e dalla coagulazione, mentre, su più larga scala, dai processi di miscelazione atmosferica. Le proprietà degli aerosol sono soggette a continui cambiamenti a causa di numerosi processi di natura chimica e fisica. I diversi meccanismi di formazione influenzano anche la distribuzione dimensionale delle particelle aerodisperse (Marconi, 2003).

Le particelle ambientali hanno generalmente un diametro aerodinamico compreso tra 0.01 e 100 μm . Quelle con diametro compreso tra 0.01 e 0.1 μm vengono definite "ultrafini" o $\text{PM}_{0.1}$; generalmente sono costituite dai prodotti della nucleazione omogenea di vapori sovrasaturi (SO_2 , NH_3 , NO_x e prodotti della combustione).

Le particelle con diametro aerodinamico compreso tra 0.1 e 2.5 μm (denominate "fini", o $\text{PM}_{2.5}$) sono formate per coagulo delle particelle ultrafini e attraverso i processi di conversione gas-particella (nucleazione eterogenea), oppure per condensazione di gas su particelle preesistenti. I maggiori costituenti di queste particelle nelle aree industrializzate sono i solfati, i nitrati, lo ione ammonio, il carbonio elementare ed il carbonio organico. Possono essere presenti diversi metalli in traccia provenienti dai processi di combustione e, spesso, anche particelle di origine biologica, come spore fungine, batteri, lieviti, pollini e virus. Le particelle fini, in generale, sono troppo piccole per sedimentare per gravità e troppo grandi per coagulare formando particelle di maggiori dimensioni; per questo hanno tempi di residenza in atmosfera dell'ordine dei giorni e possono essere trasportate a lunga distanza.

Le particelle con diametro compreso tra i 2.5 e i 10 μm , dette grossolane (*coarse*, o PM_{10}), sono prodotte essenzialmente da processi meccanici (macinazione, erosione, risospensione

Introduzione

meccanica o da parte del vento), contengono elementi presenti nel suolo e nei sali marini, quali Si, Al, Ca, Fe, Mn, Na, Sr e K. Essendo relativamente grandi, queste particelle vengono liberate dall'atmosfera per sedimentazione in tempi di poche ore o minuti e si ritrovano spesso vicino alle sorgenti di emissione (Marconi, 2003).

Ogni composto chimico introdotto nell'ambiente crea potenzialmente un numero indefinito di nuove miscele chimiche con effetti sulla salute ancora sconosciuti. Il loro numero viene moltiplicato, poi, dalla reazione con quelli già presenti nell'ambiente, sia di origine naturale che sintetica. Ulteriore reattività viene poi promossa dalle condizioni climatiche e dalle radiazioni elettromagnetiche. Tutto ciò deve essere tenuto in debito conto quando lo studio dell'effetto tossico di singole sostanze chimiche porta a risultati tra loro contraddittori.

L'esposizione a miscele di sostanze chimiche produce effetti che sono per la maggior parte sconosciuti ed imprevedibili e generalmente descritti come:

- effetto di intensificazione, definito come un effetto sull'organo bersaglio in eccesso rispetto a quello previsto dalle azioni delle specie chimiche presenti nella miscela;
- reazione a basso livello, ossia una reazione dell'organo bersaglio ad un componente della miscela nella quale tutti i componenti sono presenti a concentrazioni ben al di sotto del valore della soglia di tossicità;
- punto d'attacco imprevedibile, in cui si ha un attacco ad un organo da parte di una miscela in cui nessun componente dimostra reattività verso lo stesso.

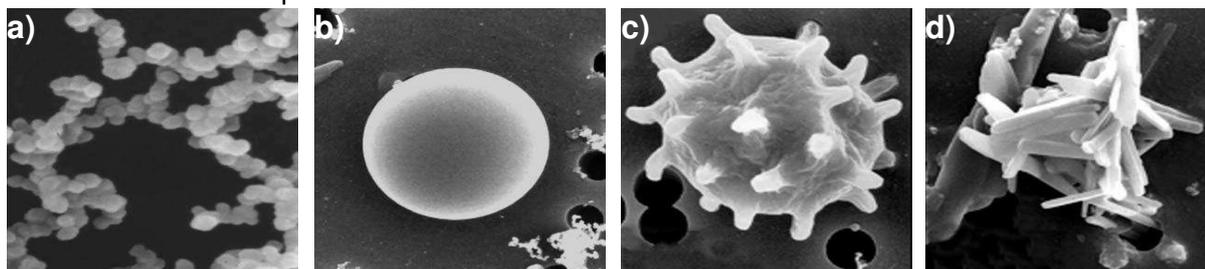


Fig. 2: Quattro differenti classi di particelle inalabili dall'ambiente: a) antropogeniche (particelle di fuliggine); b) tecnogeniche (ceneri derivanti da fonderie); c) biogeniche (polline e spore fungine); d) geogeniche (minerali e cristalli di sale marino) (Bérubé et al., 2009).

Il particolato aerodisperso subisce varie interazioni chimiche e fisiche, il cosiddetto *invecchiamento atmosferico*, quali alterazioni di grandezza, struttura e composizione. Il particolato si sviluppa dinamicamente come un sistema reattivo nel tempo e nello spazio e dipende dalla sorgente e dalle condizioni meteorologiche. Il numero totale di particelle e la concentrazione di massa variano tipicamente nel range di 10^2 - 10^5 cm^{-3} e 1-100 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, rispettivamente (Van Dingenen et al., 2004).

In base alla natura e alle dimensioni delle particelle possiamo distinguere:

- aerosol: particelle sospese solide o liquide con diametro <1 μm ;
- foschie: goccioline con diametro <2 μm ;
- esalazioni: particelle solide con diametro <1 μm rilasciate solitamente da processi chimici e metallurgici;
- fumo: particelle solide con diametro generalmente <2 μm trasportate da miscele di gas;
- polveri: particelle solide con diametro compreso tra 0.25 e 500 μm ;
- sabbie: particelle solide con diametro >500 μm .

L'inquinamento atmosferico nelle grandi aree urbane costituisce una delle grandi sfide per la tutela dell'ambiente ed in particolare della salute umana. L'Unione Europea regola, dal punto di vista normativo, la prevenzione e la gestione dell'inquinamento atmosferico con la Direttiva 96/62/CE (direttiva quadro sulla qualità dell'aria) che, attraverso direttive specifiche per i singoli inquinanti, definisce i limiti di concentrazione, le metodiche, le strategie di misura, la localizzazione dei punti di misura, l'incertezza delle misure e le modalità di informazione al pubblico. La direttiva, recepita in Italia dal DL 351 del 4 agosto 1999 e dal DM 60 del 2 aprile 2002, fissa i limiti per gran parte degli inquinanti di interesse; per il biossido e gli ossidi di azoto sono definiti i limiti e gli standard di riferimento che possono essere raggiunti entro un periodo di tempo fissato: per i NO_x il valore limite, è stato fissato a $30 \mu\text{g}/\text{m}^3$; mentre per l' NO_2 il valore limite annuale per la salvaguardia della salute umana non deve eccedere i $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Per questo inquinante è stato inoltre stabilito il valore limite orario di $200 \mu\text{g}/\text{m}^3$, limite che, a partire dal 2001, non deve essere superato per più di 18 volte l'anno.

1.2 INCENERIMENTO DI RIFIUTI SOLIDI URBANI

Negli ultimi decenni del XX secolo l'aumentata produzione di rifiuti ha causato seri problemi dal punto di vista ambientale, dovuti principalmente al loro smaltimento senza le dovute attenzioni. Per ridurre al minimo lo spazio adibito allo smaltimento (discariche), sono diventate pratiche comuni lo smistamento, il riciclo e l'incenerimento dei rifiuti. Quest'ultimo, mediante un processo di combustione ad alta temperatura, permette di ridurre il volume dei rifiuti di circa il 90% e consente di recuperare gran parte dell'energia dal processo di combustione (Kalogirou et al., 2010).

Questo processo viene però considerato una fonte secondaria di inquinamento. I residui che si formano durante l'incenerimento, infatti, hanno proprietà molto diverse rispetto a quelle dei rifiuti di partenza non combustibili, e necessitano di particolari accorgimenti per il loro smaltimento a causa dell'alto contenuto in sostanze pericolose (Yao et al., 2012).

A partire dal 1 gennaio 1990 la realizzazione di nuovi impianti di incenerimento è autorizzata solo se il relativo processo di combustione è accompagnato dal recupero energetico. Le strutture più recenti utilizzano il calore sviluppato per produrre vapore il quale, a sua volta, verrà sfruttato per produrre energia elettrica o per il teleriscaldamento.

Questi impianti vengono indicati comunemente in Italia, come "termovalorizzatori" ma questo termine non viene mai utilizzato nella

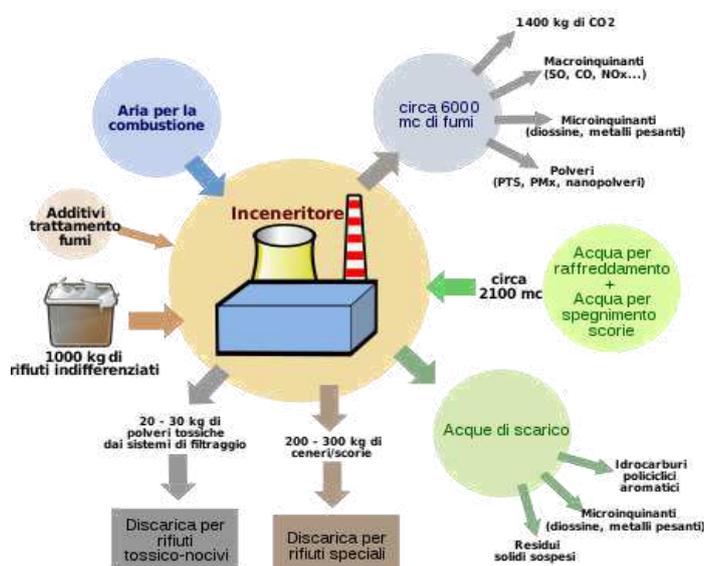


Fig. 3: Schema della produzione di un inceneritore.

Introduzione

normativa europea o italiana di riferimento, ove si parla sempre di “inceneritori”.

Secondo il Rapporto Rifiuti Urbani (ed. 2013), in Italia nel 2012 sono risultati operativi 50 impianti di incenerimento, la maggior parte dei quali situati al Nord. La quantità totale di rifiuti urbani trattati è stata di circa 5.5 milioni di tonnellate, pari al 17% della raccolta totale; il recupero di energia elettrica nel 2011 è stato di 4.063 MW ed il recupero di energia termica è stato di 2.301 MW (Fonte ISPRA).

Secondo quanto riportato dall'Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente (ENEA) e Federambiente tra le tecnologie di trattamento termico, i dispositivi più diffusi sono i combustori a griglia (82.3% della capacità di trattamento totale), mentre i letti fluidi (14.8%), i tamburi rotanti (1.8%) e i gassificatori (1.2%, un solo impianto esistente presso la discarica di Malagrotta) sono meno utilizzati.

L'inceneritore di Bolzano (gestito dall'Eco-Center) è in funzione dal 1988 e rientra, come la maggior parte degli impianti europei, negli inceneritori di tipo a griglia.

Dati medi di funzionamento (annui)

RIFIUTI TRATTATI		CONCENTRAZIONI MEDIE INQUINANTI EMESSI – MEDIA GIORNALIERA						
70.000 t		polveri	(mg/Nm ³)	1	limite autorizzazione	5		
RESIDUI DI PROCESSO		ossidi di azoto	(mg/Nm ³)	35	limite autorizzazione	70		
polveri	1.100 t	scorie	17.000 t	monossido di carbonio	(mg/Nm ³)	10	limite autorizzazione	50
RISORSE PRODOTTE		carbonio organico totale	(mg/Nm ³)	5	limite autorizzazione	10		
energia elettrica	22.500 MWh, 50% ceduta e 50% utilizzata	ossidi di zolfo	(mg/Nm ³)	5	limite autorizzazione	50		
energia termica	28.000 MWh, 100% ceduta	acido cloridrico	(mg/Nm ³)	1	limite autorizzazione	10		
		diossine	(ng/Nm ³)	0,02	limite autorizzazione	0,1		

Tab. 3: Termovalorizzatore di Bolzano – Eco-Center, dati 2012.

Come schematizzato in Figura 4, gli automezzi scaricano i rifiuti direttamente nella fossa di stoccaggio (1), che è mantenuta in depressione in modo da evitare la fuoriuscita di odori e polveri. I rifiuti vengono prelevati dalla fossa di stoccaggio e caricati nel forno, che è costituito dalla camera di combustione e di postcombustione (2). La prima racchiude la griglia inclinata, formata da sei rulli girevoli, dove avviene la combustione. Nella camera di postcombustione i fumi vengono mantenuti ad una temperatura al di sopra degli 850 °C per minimo 2 secondi mediante apporto di ulteriore aria. I fumi attraversano la caldaia a recupero termico (3 e 4), cedendo gran parte del loro calore per produrre vapore surriscaldato a

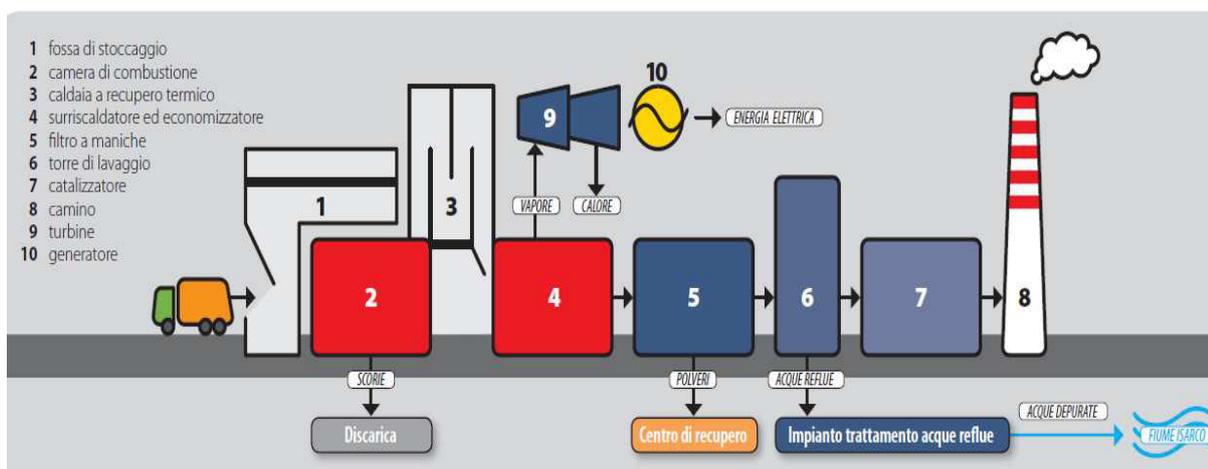


Fig. 4: Schema dell'impianto dell'inceneritore di Bolzano (Eco-Center).

360 °C, destinato a generare energia elettrica ed energia termica per il teleriscaldamento urbano. Nel successivo filtro a maniche (5) si effettua la depurazione dalle polveri, quindi i fumi sono forzati nella colonna a doppio stadio di lavaggio (6), dove avviene l'assorbimento degli inquinanti acidi dai gas. Il refluo acido della colonna viene convogliato all'impianto chimico-fisico di trattamento acque e, adeguatamente trattato, al corpo idrico ricettore. Il reattore catalitico SCR (reattore catalitico selettivo) (7), posto alla fine del trattamento fumi, abbatte gli inquinanti residui (ossidi di azoto e composti organici del cloro e del fluoro), scindendoli in sostanze elementari innocue per l'ambiente ed assicurando che dal camino (8) vengano emessi fumi sostanzialmente esenti da inquinanti, uniti ad una piccola quantità di vapore acqueo. Un analizzatore posizionato sul camino consente di monitorare in continuo senza interruzioni la qualità delle emissioni.

I fumi caldi (200-300°C) passano attraverso opportuni sistemi di filtraggio per garantire l'abbattimento del contenuto di agenti inquinanti presenti nelle ceneri leggere. I fumi trattati vengono poi rilasciati in atmosfera a circa 140 °C. Il sistema di depurazione fumi è importantissimo, poiché riduce la quantità di metalli e di inquinanti che l'inceneritore emette in atmosfera aumentandone la quantità nelle ceneri leggere.

I fumi, provenienti dalle colonne di lavaggio delle rispettive linee di incenerimento, vengono preriscaldati prima dell'ingresso al reattore, addizionati ed opportunamente miscelati con soluzione ammoniacale (necessaria per la reazione di conversione degli NO_x). I gas entrano nel reattore catalitico composto da due letti di catalizzatore: sul primo si decompongono gli NO_x, mentre sul secondo si ossidano i composti inquinanti residui inclusi gli organo-clorurati. I fumi così depurati escono a camino. A seguito del processo di combustione dei rifiuti solidi urbani, vengono generati diversi materiali residui allo stato liquido o solido, insieme ad effluenti gassosi.

I residui da incenerimento o termovalorizzazione dei rifiuti comprendono (IAWG, 1997):

- Ceneri pesanti o scorie di fondo (*Bottom Ash*) generalmente caratterizzate da una miscela di scorie, metalli ferrosi e non ferrosi, ceramiche ed altri materiali incombusti, raccolte all'uscita della camera di combustione in un recipiente di raffreddamento; escludendo i materiali di grosse dimensioni (>10 cm), la dimensione delle particelle è piuttosto uniforme e le ceneri pesanti possono essere classificate come un materiale eterogeneo di pezzatura variabile tra la sabbia e la ghiaia. Sono inoltre caratterizzate da porosità e superficie specifica piuttosto elevate, a causa dell'espulsione di gas, mentre il contenuto di umidità può variare piuttosto considerevolmente a seconda dei processi di raffreddamento. Sono di natura alcalina, con valori di pH che vanno da 9.5 a 11.5, e contengono elementi alcalini ed alcalino-terrosi ed ossidi metallici che formano idrossidi durante l'idrolisi;
- Ceneri dalla griglia (*Grate Siftings*): che includono materiale relativamente fine passante attraverso le maglie delle griglie e raccolto al di sotto della camera di combustione in apposite tramogge. Sono solitamente combinate alle ceneri pesanti, pertanto nella maggior parte dei casi non è possibile separare i due flussi; assieme alle ceneri pesanti costituiscono il 20-30% in massa del rifiuto iniziale su base umida;

Introduzione

- Ceneri da caldaia e ceneri dell'economizzatore (*Boiler and Economizer Ash*): che rappresentano la frazione grossolana del particolato trasportato dai gas di scarico dalla camera di combustione e raccolto nella sezione di recupero del calore. Questa corrente può costituire fino al 10% del rifiuto iniziale su base umida;
- Ceneri leggere o volanti (*Fly Ash*): particolato fine rimasto nei gas effluenti al di sotto delle unità di recupero del calore, vengono rimosse prima di ulteriori trattamenti degli effluenti gassosi. La quantità di ceneri leggere prodotta da un inceneritore è dell'ordine dell'1-3% della massa di rifiuto in ingresso su base umida;
- Ceneri volanti dal trattamento fumi (*APC Residues*) che includono il materiale particolato catturato dopo l'iniezione del reagente nelle unità di trattamento del gas prima dello scarico in atmosfera, talvolta comprendono anche *Fly Ash*. Questo residuo può essere solido, liquido o fangoso, a seconda che i processi adottati siano a secco, a semi-secco o ad umido. Tali residui rappresentano generalmente il 2-5% del rifiuto iniziale su base umida.

In generale, nella totalità dei residui sono state individuate diverse tipologie di contaminanti, tra cui ioni metallici, metalli anfoteri, specie ossianioniche e sali. Il contenuto totale di tali elementi può essere assai vario per diversi residui da incenerimento, come è presentato in Tabella 4; gli elementi più abbondanti (>10 g/kg) presenti in tutti i residui da incenerimento sono rappresentati da Si, Ca, Fe, Al, Na, K e Mg. Da un punto di vista qualitativo le caratteristiche di principale interesse ambientale riguardano la differente distribuzione di metalli pesanti e microinquinanti organoclorurati nelle diverse frazioni di residui, nonché le mobilità dei contaminanti rilasciati in ambiente acquoso. Occorre tener presente che, poiché tali residui sono generati da processi a temperature elevate, essi sono termodinamicamente instabili a condizioni ambientali e ciò li rende altamente reattivi (Bacocchi, 2010).

Element	Concentration (mg/kg)			
	Bottom ash	Fly ash	Dry/semi-dry APC residues	Wet APC residues
Al	22,000–73,000	49,000–90,000	12,000–83,000	21,000–39,000
As	0.1–190	37–320	18–530	41–210
Ba	400–3000	330–3100	51–14,000	55–1600
Ca	370–123,000	74,000–130,000	110,000–350,000	87,000–200,000
Cd	0.3–70	50–450	140–300	150–1400
Cl	800–4200	29,000–210,000	62,000–380,000	17,000–51,000
Cr	23–3,200	140–1100	73–570	80–560
Cu	190–8200	600–3200	16–1700	440–2400
Fe	4,100–150,000	12,000–44,000	2600–71,000	20,000–97,000
Hg	0.02–8	0.7–30	0.1–51	2.2–2300
K	750–16,000	22,000–62,000	5900–40,000	810–8600
Mg	400–26,000	11,000–19,000	5100–14,000	19,000–170,000
Mn	80–2400	800–1900	200–900	5000–12,000
Mo	2–280	15–150	9–29	2–44
Na	2800–42,000	15,000–57,000	7600–29,000	720–3400
Ni	7–4200	60–260	19–710	20–310
Pb	100–13,700	5300–26,000	2500–10,000	3300–22,000
S	1000–5,000	11,000–45,000	1400–25,000	2700–6000
Sb	10–430	260–1100	300–1,100	80–200
Si	91,000–308,000	95,000–210,000	36,000–120,000	78,000
V	20–120	29–150	8–62	25–86
Zn	610–7800	9000–70,000	7000–20,000	8100–53,000

Tab. 4: Composizione elementare media dei residui da incenerimento dei rifiuti (IAWG, 1997).

Il fattore discriminante le diverse frazioni di residui è rappresentato dalla differente distribuzione di metalli pesanti, determinata da meccanismi di arricchimento sui grani solidi dipendenti dalle condizioni operative nelle varie sezioni dell'impianto. Gli elementi meno volatili caratterizzati dalle temperature di ebollizione più elevate rimangono nelle ceneri pesanti e nelle ceneri di griglia. Al contrario, a causa della volatilizzazione degli elementi con temperature di ebollizione più basse (Cd, Hg, As, Pb e Zn) e conseguente condensazione in aggiunta a fenomeni di concentrazione che hanno luogo durante la combustione, le ceneri di caldaia, le ceneri leggere e i residui APC mostrano elevate concentrazioni di metalli pesanti tossici, sali e micro-inquinanti organici, i quali possono costituire potenziali pericoli per l'uomo (Bacocchi, 2010).

La possibilità di un totale e/o parziale riutilizzo dei residui da incenerimento in sostituzione totale o parziale di materiali naturali appare molto interessante dal punto di vista economico ma soprattutto ambientale.

Le opzioni maggiormente praticate per il recupero dei residui da incenerimento di rifiuti urbani consistono nel riutilizzo come aggregati o come materiale di riempimento. Se il riutilizzo non è possibile a causa di vincoli normativi o altre ragioni, tali residui devono essere smaltiti nel rispetto della tutela dell'ambiente, adottando soluzioni che possano al contempo essere sostenibili dal punto di vista tecnico ed economico. In genere, le ceneri pesanti possono essere smaltite in discariche per rifiuti speciali non pericolosi, mentre le ceneri leggere possono essere smaltite in discariche per rifiuti pericolosi.

Le alternative applicabili al fine di rendere questi materiali riutilizzabili senza creare situazioni di rischio ambientale sono essenzialmente due: la riduzione della mobilità degli elementi tossici presenti all'interno dei residui tramite processi di inertizzazione, vetrificazione e solidificazione, soprattutto nel caso di inquinanti inorganici, e l'estrazione degli elementi tossici presenti all'interno dei residui (Bacocchi, 2010).

1.2.1 CENERE LEGGERA O *FLY ASH*

Le ceneri leggere o volanti sono formate dal fine particolato che viene trasportato nell'aria della camera principale e si deposita nei condotti, nei vari dispositivi dell'inceneritore e per ultimo viene separato dai fumi mediante filtrazione.

Il *Fly Ash* comprende anche quei costituenti dei rifiuti che volatilizzano nelle zone ad alta temperatura della camera di combustione e successivamente si condensano sulle particelle, con maggior efficienza su quelle a piccolo diametro che presentano un'ampia area superficiale. Possono quindi essere presenti

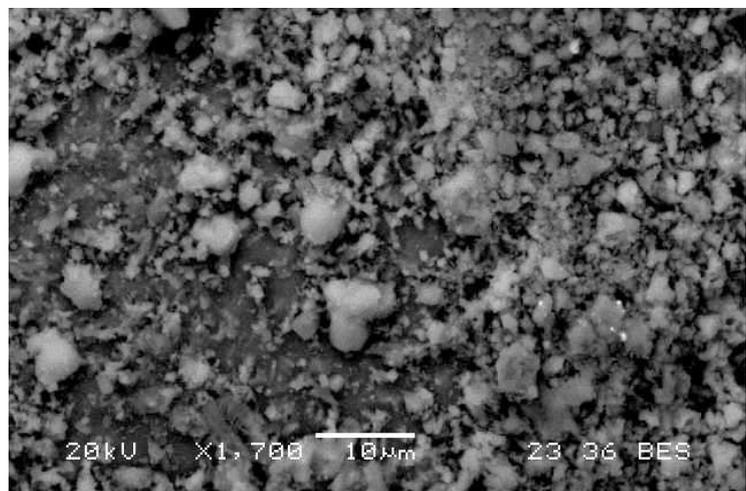


Fig. 5: Immagine in microscopia elettronica a scansione del *Fly Ash*.

Introduzione

metalli pesanti e idrocarburi ad alto peso molecolare, sostanze che possono avere significativi impatti sulla salute.

Uno studio giapponese (Jung, 2004) ha dimostrato che nelle ceneri la concentrazione di metalli tossici (Cd, As, Cr, Sb e Pb) può essere maggiore rispetto a quella presente nei materiali post consumo prima dell'incenerimento. Inoltre la combustione può trasformarli in forme chimiche più tossiche o più facilmente biodisponibili. Ad esempio il cadmio che normalmente è presente come solfuro o ossido, reagisce con l'acido cloridrico, presente in elevate quantità nei fumi dell'inceneritore, trasformandosi in cloruro, sale molto volatile, estremamente tossico e solubile in acqua, ciò fa sì che entri nella catena alimentare dando bioaccumulo (Liu, 2004).

I sistemi di abbattimento delle polveri presenti nei moderni inceneritori lavorano in maniera molto efficiente ma nel caso di incidente all'impianto, esiste la possibilità che queste vengano rilasciate nell'ambientale. Fino agli anni Settanta si riteneva che le ceneri ottenute dall'incenerimento, viste le alte temperature raggiunte in questi impianti, fossero inerti, per cui la loro tossicità poteva essere legata alla presenza di metalli pesanti solubili e sono state utilizzate in opere edili o in coperture di discariche senza essere trattate.

Solo negli anni '90 numerosi studi (Johnson et al., 1995) hanno dimostrato che in discarica, dove vengono stoccate le ceneri, si verificano reazioni esotermiche che portano la temperatura delle ceneri fino a 90 °C, intaccando quindi le membrane polimeriche e gli strati di argilla posti sul fondo della discarica che mal sopportano temperature maggiori di 40 °C. Tutto ciò può portare al rilascio degli eluati nel terreno con conseguente inquinamento. Questi eluati sottoposti a test eco e genotossici hanno dato risultati positivi (Radetski, 2004).

Oltre al problema dello stoccaggio e utilizzo dei rifiuti provenienti dall'inceneritore, fondamentale è la questione delle emissioni in atmosfera. I dati di rilevamento degli impianti devono rientrare nei limiti stabiliti dalla legge.

Gli impianti ed i processi di incenerimento dei rifiuti solidi urbani danno origine principalmente a scorie e ceneri, estratte dai forni, dai fanghi, dalle acque di lavaggio e dai sistemi di filtraggio dei fumi da combustione, che a seconda della loro natura chimico-fisica e della loro classificazione, vengono smaltite in base a quanto previsto dalle direttive CEE sull'etichettatura delle sostanze pericolose.

Nel caso dell'inceneritore di Bolzano, le scorie (1/10 in volume rispetto ai rifiuti in entrata) sono considerate rifiuto non pericoloso, poiché rappresentano un residuo inerte non reattivo, e quindi smaltite in discariche per materiali inerti nell'ambito della provincia stessa (Vadena, Sciaves, Sacco, Brunico, Badia, Dobbiaco). Le ceneri leggere, che rappresentano il 3% in peso dei rifiuti in entrata, costituiscono invece un rifiuto pericoloso e come tale sono destinate allo stoccaggio presso discariche speciali, attualmente nelle miniere di sale in Germania.

Molteplici sono le problematiche associate alla gestione dei prodotti del processo d'incenerimento, fondamentalmente riconducibili al fatto di renderne compatibile lo stoccaggio e l'eventuale riutilizzo nel rispetto delle norme di legge in materia di tutela ambientale e di salute pubblica.

Gli studi condotti per il riutilizzo del *Fly Ash* presuppongono, in fase preliminare, l'analisi delle caratteristiche chimico fisiche e dimensionali delle sostanze di partenza e l'eventuale necessità di pretrattamenti, in funzione dei successivi processi industriali per l'ottenimento di prodotti idonei agli impieghi ipotizzati, alla verifica d'impatto ambientale ed ai relativi costi di produzione.

Attualmente sono state individuate 4 possibili applicazioni per il riutilizzo dei residui del trattamento del *Fly Ash*: materiali da costruzione (produzione di cemento, materiale inerte nelle miscele per calcestruzzi, ceramiche, materiali in vetro e vetro-ceramiche); opere stradali (sottofondo di pavimentazioni stradali, materiali per riempimento e terrapieni); agricoltura (concimazione); come adsorbenti, isolanti e coibenti; usate nel trattamento e disidratazione di fanghi.

Nella maggior parte dei casi non sono state finora riscontrate le condizioni di rispetto dei vincoli ambientali previsti dalle normative e dalla legislazione vigente in materia, principalmente per la lisciviazione dei prodotti finali dei processi implementati. Per questi motivi l'utilizzo del *Fly Ash* non è molto diffuso nei campi d'impiego sopra riportati.

Tra le numerose sostanze tossiche presenti nel *Fly Ash* le diossine, gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e i metalli sono quelli di maggior interesse per l'impatto negativo che possono avere sulla salute dell'uomo.

• **DISSINE**

Il termine generico di "diossine" indica un gruppo di 210 composti chimici aromatici policlorurati, ossia formati da carbonio, idrogeno, ossigeno e cloro, divisi in due famiglie: dibenzo-p-diossine (PCDD o propriamente "diossine") e dibenzo-p-furani (PCDF o "furani").

Si tratta di idrocarburi aromatici clorurati, per lo più di origine antropica, particolarmente stabili e persistenti nell'ambiente, tossici per l'uomo, gli animali e l'ambiente stesso; le diossine e i furani costituiscono infatti due delle dodici classi di inquinanti organici persistenti riconosciute a livello internazionale dall'UNEP (United Nations Environment Program).

Esistono in totale 75 congeneri di diossine e 135 congeneri di furani: di questi però solo 7 PCDD e 10 PCDF destano particolare preoccupazione dal punto di vista tossicologico.

La tossicità delle diossine dipende dal numero e dalla posizione degli atomi di cloro sull'anello aromatico: le più tossiche presentano 4 atomi di cloro legati agli atomi di carbonio β dell'anello aromatico e pochi o nessun atomo di cloro legato agli atomi di carbonio α dell'anello aromatico.

Nella terminologia corrente il termine "diossina" è usato come sinonimo di 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-diossina (TCDD), ossia della specie maggiormente tossica, che ha 4 atomi di cloro nelle posizioni β e nessuno in α.

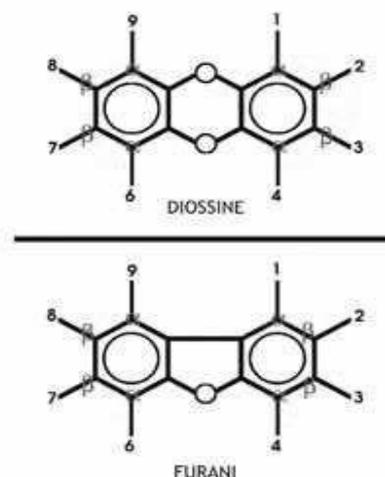


Fig. 6: Formula di struttura delle diossine e dei furani (Fonte APAT, 2006).

Introduzione

Le diossine sono sostanze semivolatili, termostabili, scarsamente polari, scarsamente solubili in acqua, altamente liposolubili, estremamente resistenti alla degradazione chimica e biologica. Nonostante la loro scarsa idrosolubilità, trovano nell'acqua un'ottima via di diffusione una volta adsorbite sulle particelle minerali ed organiche presenti in sospensione. Tali sostanze sono facilmente trasportabili dalle correnti atmosferiche, possono quindi causare contaminazione in luoghi lontani dalla sorgente di emissione.

A causa della loro ubiquitaria presenza nell'ambiente, persistenza e liposolubilità, le diossine sono soggette a bioaccumulo in tutti gli organismi viventi tra cui l'uomo, ove hanno un'emivita di ben 7 anni (APAT, 2006).

L'uomo può venire a contatto con le diossine attraverso tre principali fonti di esposizione:

1. accidentale, contaminazioni dovute ad incidenti;
2. occupazionale, che riguarda persone esposte in ambiente di lavoro;
3. ambientale, sia per ingestione di cibo contaminato che per inalazione o contatto.

L'uomo è particolarmente sensibile alla presenza ambientale di diossine anche se presenti a concentrazioni basse o addirittura bassissime. Studi condotti sia nell'animale che nell'uomo evidenziano come, anche dosi molto limitate, possono indurre alterazioni a carico del sistema immunitario, con riduzione e danno alla popolazione linfocitaria (U.S. E.P.A, 1994). L'esposizione in utero a diossine è particolarmente pericolosa, soprattutto per la differenziazione del sistema immunitario (Van Loveren et al., 2003).

Importanti effetti sono stati riportati a carico del sistema endocrino. L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro nel 1997 ha riconosciuto la TCDD quale agente cancerogeno per l'uomo (classificata nel gruppo 1: "cancerogeno certo per l'uomo"). Di conseguenza l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) nel 1998 ha rivisto la dose giornaliera tollerabile di diossina, fissata nel 1991 a 10 pg/kg di peso corporeo, abbassandola a 1-4 pg/kg.

L'esposizione cronica a dosi sub-letali di TCDD provoca un accumulo epatico di porfirine (porfiria) ed un significativo incremento della loro escrezione urinaria. Nei casi conclamati, l'accumulo di porfirine riguarda anche milza e reni (www.apat.it). Inoltre, la TCDD è irritante per gli occhi, la cute e il tratto respiratorio, può causare effetti negativi a carico del sistema cardiovascolare, gastrointestinale, nervoso ed endocrino anche a tempi successivi l'esposizione.

Le diossine sono tutte caratterizzate da una struttura chimica planare, che permette loro di interagire con lo stesso recettore citoplasmatico, il recettore per gli idrocarburi policiclici aromatici (AhR). L'affinità di legame per il recettore è direttamente proporzionale al numero di atomi di cloro legati ai carboni 2,3 e 7,8 quindi la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD) è quella con maggiore affinità per il recettore.

Questo recettore, identificato nel 1976, è una proteina citoplasmatica che una volta attivata per interazione con un ligando trasloca nel nucleo, dimerizza con la *aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein* (ARNT) ed attiva la trascrizione di numerosi geni compresi quelli che codificano per CYP1A1, CYP2A2 che metabolizzano gli stessi idrocarburi in epossidi cancerogeni.

Generalmente le diossine non vengono rilevate nelle diverse matrici come singoli composti, ma come miscele complesse dei diversi congeneri.

Per riuscire a esprimere la tossicità dei singoli congeneri, è stato introdotto il concetto di fattore di tossicità equivalente (TEF). I fattori di tossicità equivalente si basano sulla considerazione che i PCDD e i PCDF sono composti strutturalmente simili che presentano il medesimo meccanismo strutturale di azione e producono effetti tossici simili. I TEF vengono calcolati confrontando l'affinità di legame dei vari composti organo clorurati con il recettore Ah, rispetto a quella della 2,3,7,8-TCDD, considerando l'affinità di questa molecola come il valore unitario di riferimento. Per esprimere la concentrazione complessiva di diossine nelle diverse matrici si è introdotto il concetto di tossicità equivalente (TEQ) che si ottiene sommando i prodotti tra i valori TEF dei singoli congeneri e le rispettive concentrazioni, espresse con l'unità di misura della matrice in cui vengono riscontrate (WHO-TEFs 2005).

Secondo quanto riportato nell'inventario Europeo delle emissioni di diossine in atmosfera (1995), le maggiori fonti, responsabili di oltre il 62% dell'emissione di diossine sono: inceneritori per rifiuti urbani (26%), fonderie (18%), inceneritori di rifiuti ospedalieri (14%), attività metallurgiche diverse dal ferro (4%); il restante 38% è attribuito ad impianti di riscaldamento domestico a legna, incendi e traffico automobilistico (combustibili fossili).

La Comunità Europea ha fissato per le diossine un limite di emissione per gli inceneritori pari a 0.1 ng/m³. Questa concentrazione è da 10 a 100 volte inferiore rispetto a quelle riscontrabili nelle emissioni dei vecchi inceneritori.

• **IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICI**

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono una classe di composti organici, generalmente a struttura piana, con due o più anelli benzenici condensati tra loro attraverso coppie di atomi di carbonio condivisi fra anelli adiacenti. Gli IPA sono alcune centinaia ma i più importanti per l'inquinamento ambientale sono poche decine secondo le classificazioni delle più importanti agenzie internazionali come l'EPA, che ne indica 16, o l'ATSDR, che ne individua 18, o lo IARC, l'organismo internazionale che classifica il grado di evidenza di cancerogenicità di agenti chimici e fisici (IARC, 2011). I diversi IPA differiscono fra loro sia per le diverse fonti ambientali che per le caratteristiche chimiche. Si formano nel corso della combustione incompleta di prodotti organici come carbone, petrolio, gas o rifiuti.

Gli IPA che possono essere dannosi per la salute di uomini e animali sono: l'acenaftene, l'acenaftilene, l'antracene, il benzo(a)antracene, il dibenzo(a,h)antracene, il crisene, il pirene, il benzo(a)pirene, l'indeno(1,2,3-c,d)pirene, il fenantrene, il fluorantene, il benzo(b)fluoroantene, il benzo(k)fluoroantene, il benzo(g,h,i)perilene e il fluorene (Tab. 5).

L'idrocarburo policiclico aromatico più semplice dal punto di vista strutturale è il naftalene, un composto a due anelli, che, come inquinante aerodisperso, si trova in forma gassosa a temperatura ambiente.

Gli IPA sono composti solidi, la cui volatilità decresce proporzionalmente con l'aumentare del numero degli anelli. Quelli con almeno quattro anelli rimangono in forma gassosa ad alte temperature, mentre quelli più pesanti tendono a condensare e vengono adsorbiti sulla

Introduzione

superficie delle particelle di particolato. Quelli che si legano a PM <1 µm, sono estremamente stabili, degradabili in presenza di radiazione ultravioletta, altamente affini ai grassi tessutali, poco solubili in acqua e quindi in grado di bioaccumularsi.

Gli IPA si formano principalmente attraverso processi pirolitici, specialmente durante la combustione incompleta di sostanze organiche usate in processi industriali o in altre attività umane come il riscaldamento, l'autotrazione, la cottura di cibi, il fumo di tabacco, l'uso di legna o materiali derivati da ardere. Questa molteplicità di sorgenti ne fa una classe di composti inquinanti pressoché ubiquitaria, il cui grado di esposizione dell'uomo è legato a parametri come la concentrazione, la ripartizione tra fase gassosa e aerosol e il diametro aerodinamico delle particelle cui si legano (ISPRA, 2010).

Solitamente nell'aria non si ritrovano mai come composti singoli ma come miscele, dove i vari IPA sono presenti in proporzioni variabili, per questo è difficile correlare gli effetti sulla salute ad uno specifico IPA.

L'esposizione agli idrocarburi policiclici aromatici può avvenire per inalazione, per ingestione di cibo o di bevande contaminate, oppure per via cutanea in seguito a contatto con terreno contaminato o prodotti come gli oli pesanti e il catrame di carbone. Una volta assorbiti, gli IPA, grazie alla loro liposolubilità, diffondono rapidamente, raggiungono reni e fegato e possono depositarsi nel tessuto adiposo. La metabolizzazione è abbastanza rapida e nel giro di pochi giorni vengono eliminati con urine e feci. L'esposizione a queste sostanze sembra essere correlata a immunosoppressione e a danni ematici e polmonari.

Queste molecole sono state i primi inquinanti ad essere identificati come possibili

	Nome	Formula chimica	Gruppo IARC ^a	US-EPA ^b	ATSDR ^c	D. Lgs 155
1	naftalene	C ₁₀ H ₈	3	Si	No	No
2	acenaftilene	C ₁₂ H ₈	-	Si	Si	No
3	acenaftene	C ₁₂ H ₁₀	3	Si	Si	No
4	fluorene	C ₁₃ H ₁₀	3	Si	Si	No
5	fenantrene	C ₁₄ H ₁₀	2B	Si	Si	No
6	antracene	C ₁₄ H ₁₀	3	Si	Si	No
7	fluorantene	C ₁₆ H ₁₀	3	Si	Si	No
8	pirene	C ₁₆ H ₁₀	3	Si	Si	No
9	benzo(a)antracene	C ₁₈ H ₁₂	2B	Si	Si	Si
10	crisene	C ₁₈ H ₁₂	2B	Si	Si	No
11	benzo(b)fluorantene	C ₂₀ H ₁₂	2B	Si	Si	Si
12	benzo(j)fluorantene	C ₂₀ H ₁₂	2B	No	No	Si
13	benzo(k)fluorantene	C ₂₀ H ₁₂	2B	Si	Si	Si
14	benzo(a)pirene	C ₂₀ H ₁₂	2B	Si	Si	Si
15	benzo(e)pirene	C ₂₀ H ₁₂	1	No	Si	No
16	dibenzo(a,h)antracene	C ₂₂ H ₁₄	2A	Si	Si	Si
17	benzo(g,h,i)perilene	C ₂₂ H ₁₂	3	Si	Si	No
18	indeno(1,2,3-cd)pirene	C ₂₂ H ₁₂	2B	Si	Si	Si
19	Coronene	C ₂₄ H ₁₂	3	No	Si	No

Tabella 5: IPA più importanti per l'inquinamento ambientale (ISPRA, 2010).

a: International Agency for Research on Cancer, b: United States Environmental Protection Agency, c: Agency for Toxic Substances and Disease Registry

cancerogeni. Sia i singoli IPA che le loro miscele sono stati classificati dallo IARC come cancerogeni o probabili cancerogeni. All'aumentare del peso molecolare aumenta la cancerogenicità, mentre la tossicità acuta diminuisce (IARC, 2011).

Gli IPA maggiormente imputati nello sviluppo del tumore sono quelli che presentano da 3 a 7 anelli aromatici. Gli IPA di per sé non sono cancerogeni, ma vengono attivati da vari processi enzimatici presenti nei tessuti bersaglio. Questa biotrasformazione comporta la formazione di intermedi reattivi, il cui effetto genotossico e mutageno è dovuto alla loro capacità di formare addotti con il DNA o causare danno ossidativo al DNA delle cellule bersaglio (Baird et al., 2005).

- **METALLI**

La revisione della letteratura supporta il ruolo dei metalli nella tossicità da particolato atmosferico. Diversi studi epidemiologici hanno confermato, poi, che il contenuto di specifici metalli nel particolato atmosferico è correlato a determinati stati patologici (Kennedy, 1998).

I metalli pesanti sono costituenti naturali della crosta terrestre, e molti sono essenziali alla vita, in determinate forme e a concentrazioni opportune. Una caratteristica che li rende pericolosi è la tendenza a bioaccumularsi in alcuni tessuti provocando effetti negativi alla salute umana e all'ambiente in generale. Gli effetti tossici che possono derivare dall'esposizione a metalli pesanti dipendono da molteplici fattori, come le concentrazioni raggiunte nei tessuti, i legami e le interazioni che si stabiliscono con i componenti cellulari e la forma chimica in cui il metallo stesso viene assorbito.

Essi sono presenti in tutte le matrici ambientali (acqua, aria e terra). Nell'atmosfera le sorgenti predominanti di origine antropica sono la combustione e i processi industriali. I metalli pesanti, come del resto gli inquinanti organici persistenti, si trovano nell'aria prevalentemente nel particolato.

I metalli che esistono in più di uno stato stabile di valenza possono direttamente partecipare alle reazioni di trasferimento elettronico e possiedono perciò la capacità di generare ossidanti. I metalli che assumono solo uno stato stabile di valenza possono anch'essi determinare stress ossidativo attraverso la deplezione dei gruppi sulfidrilici o interferendo con il metabolismo di altri metalli. Il tempo di residenza in atmosfera dei metalli associati con le particelle è tipicamente minore di 40 giorni. Essi sono preferenzialmente associati con particelle che hanno un diametro minore di 2.5 μm , derivate dall'incompleta combustione di materiali contenenti carbonio nelle centrali elettriche, acciaierie, inceneritori, cementifici, veicoli a motore, ecc. La loro composizione non è omogenea, ma generalmente contengono Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , Al_2O_3 , SiO_2 , e varie quantità di composti carboniosi con vario grado di ossidazione (Greenberg et al., 1978).

Un inceneritore di rifiuti rilascia normalmente Zn, Fe, Hg, Pb, Sn, As, Cd, Co, Cu, Mn, Ni e Sb (Schroeder et al., 1987). Il trattamento termico a cui sono sottoposti i rifiuti inceneriti non può eliminare i metalli presenti nei rifiuti stessi ma l'incenerimento, a causa delle complesse reazioni che avvengono durante la combustione dei rifiuti, può trasformarli in forma chimica più tossica o più facilmente biodisponibile per organismi viventi che ne venissero a contatto.

Introduzione

Un esempio è quello del cadmio che nei materiali post consumo può essere presente sotto forma di solfuro, ossido o metallo. In queste forme la tossicità del cadmio è molto ridotta, in quanto poco solubili in acqua e quindi, se inalati o ingeriti, sono difficilmente assorbiti dall'organismo ospite. Tuttavia, nei fumi di un inceneritore sono sempre presenti elevate quantità di acido cloridrico, che, reagendo con ossido o solfuro di cadmio, forma cloruro di cadmio, un sale molto volatile, molto solubile in acqua, molto tossico perché soggetto a fenomeni di bioaccumulo lungo la catena alimentare. A seguito dell'incenerimento anche zinco e piombo possono dare origine ai rispettivi cloruri volatili (Valerio, 2008).

Le varie normative di settore indicano il tipo di analisi, le modalità di campionamento e i quantitativi massimi nelle varie matrici a seconda dei diversi metalli. È competenza delle Agenzie ambientali a livello regionale insieme ad altri soggetti istituzionali verificare che i limiti imposti dalla legge (decreto ministeriale 60/2002 per il piombo e decreto legislativo 152 del 2006 per arsenico, cadmio e nichel) non vengano superati. Inoltre, il decreto ministeriale 471/99 stabilisce i criteri, le procedure e le modalità per la messa in sicurezza, la bonifica ed il ripristino ambientale dei siti inquinati, definendo i limiti di accettabilità della contaminazione da metalli pesanti dei suoli in base alla determinazione del loro contenuto totale (ARPAV, 2010).

1.3 EFFETTI DEL PARTICOLATO SULLA SALUTE

Gli effetti dell'inquinamento atmosferico sulla salute sono correlati ad esposizioni sia a breve termine (poche ore o giorni), che causano disturbi di tipo acuto, che a lungo termine (per mesi o anni), che inducono patologie croniche. È importante notare che la percentuale

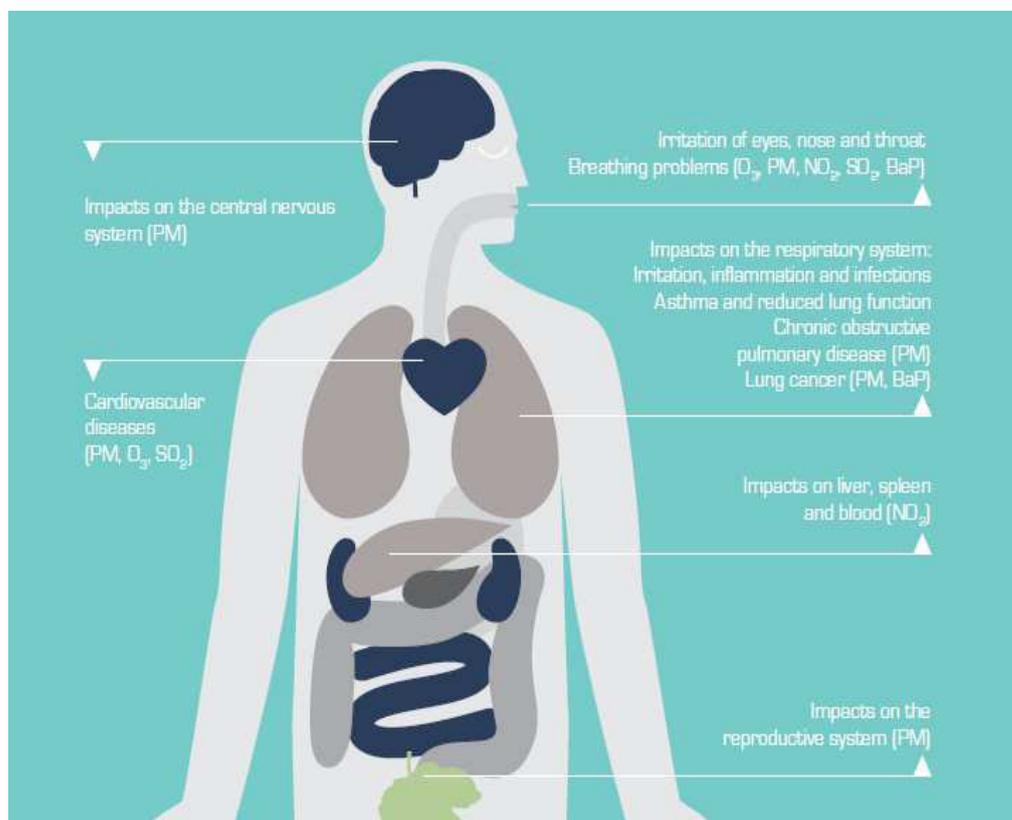


Fig. 9: Impatti sulla salute dell'inquinamento dell'aria (EEA, 2013).

di popolazione esposta a livelli più bassi di inquinamento atmosferico e colpita da effetti meno gravi è di gran lunga maggiore della percentuale di popolazione che presenta conseguenze più serie per la salute. Tuttavia, anche gli effetti meno gravi possono avere notevoli implicazioni per la salute pubblica, in quanto coinvolgono un elevato numero di persone, soprattutto nelle grandi città (EEA, 2013).

Gli impatti sulla salute sono quantificabili in termini di mortalità (nel senso della riduzione dell'aspettativa di vita) e morbilità (riferita al numero dei casi di malattia registrati durante un periodo di tempo, in rapporto al numero complessivo delle persone prese in esame). Uno studio del 2013 dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO, 2013) ha correlato l'esposizione a lungo termine a $PM_{2.5}$ con numerose morti per patologie respiratorie e cardiovascolari (EEA, 2013).

La diversa composizione degli inquinanti atmosferici, la dose ed il tempo di esposizione e il fatto che l'uomo è di solito esposto a miscele di inquinanti e non alle sostanze singole, può portare a impatti diversi sulla salute. Gli effetti possono variare da nausea, difficoltà respiratorie o irritazione cutanea, fino all'insorgenza di cancro. Da segnalare anche la comparsa di difetti congeniti, gravi ritardi nello sviluppo nei bambini, e ridotta attività del sistema immunitario. Inoltre, esistono diversi fattori di suscettibilità quali l'età, lo stato nutrizionale e le condizioni predisponenti. Studi epidemiologici e in modelli animali evidenziano che i sistemi principalmente colpiti sono il tratto respiratorio e il sistema cardiovascolare. Tuttavia, possono essere compromesse le funzioni di diversi altri organi (Kampa, Castanas, 2008):

- **SISTEMA RESPIRATORIO**

L'esposizione ad alti livelli di anidride solforosa, ossidi di azoto e alcuni metalli pesanti come arsenico, nichel o vanadio provocano irritazione del naso e della gola, a cui segue broncocostrizione e dispnea, soprattutto in soggetti asmatici. La frazione di particolato che penetra l'epitelio alveolare e l'ozono possono inoltre indurre fenomeni infiammatori polmonari. In pazienti con lesioni o malattie polmonari già in essere, l'infiammazione indotta da sostanze inquinanti può significativamente peggiorare le loro condizioni. L'esposizione cronica ad alcuni metalli pesanti riduce la funzionalità polmonare e può sfociare in asma, enfisema e cancro polmonare.

- **SISTEMA CARDIOVASCOLARE**

L'inquinamento atmosferico (in particolare il PM) può influenzare il processo di coagulazione del sangue e portare ad ostruzione dei vasi sanguigni cardiaci, provocando angina o addirittura infarto del miocardio. Sintomi come tachicardia, aumento della pressione sanguigna e anemia sono stati osservati in seguito ad esposizione a metalli pesanti (in particolare mercurio, nichel e arsenico). Studi epidemiologici hanno correlato l'esposizione a diossine ad un aumento della mortalità causata da malattie cardiache ischemiche, mentre nei topi, è stato dimostrato che i metalli pesanti possono anche aumentare i livelli di trigliceridi.

- **SISTEMA NERVOSO**

Il sistema nervoso è influenzato principalmente dall'esposizione a metalli pesanti (piombo, mercurio e arsenico) e diossine. La neurotossicità da arsenico, piombo e mercurio si manifesta con disturbi della memoria e del sonno, rabbia, stanchezza, tremori alle mani, visione offuscata e difficoltà di parola. In particolare, l'esposizione al piombo provoca danni al sistema dopaminergico, a quello del glutammato e al complesso recettoriale N-metil-D-aspartato (NMDA), che svolgono un ruolo importante nelle funzioni della memoria. Il mercurio è inoltre responsabile di alcuni casi di tumore al cervello. Le diossine diminuiscono la velocità di conduzione nervosa e compromettono lo sviluppo mentale dei bambini.

- **SISTEMA URINARIO**

I metalli pesanti possono indurre danni renali quali la disfunzione tubulare, evidenziata da un aumento dell'escrezione di proteine a basso peso molecolare, e conseguente diminuzione della velocità di filtrazione glomerulare. Inoltre aumentano il rischio di formazione di calcoli (nefrocalinosi) e di carcinoma renale.

- **APPARATO DIGERENTE**

Le diossine causano danni alle cellule epatiche, evidenziati dall'aumento dei livelli ematici di alcuni enzimi (Citocromi, Glutazione-Transferasi, Tirosin Kinasi, ecc.), e possono indurre tumori gastrointestinali ed epatici.

- **ESPOSIZIONE DURANTE LA GRAVIDANZA**

L'inquinamento atmosferico può influire sullo sviluppo del feto. L'esposizione materna a metalli pesanti (soprattutto al piombo) aumenta il rischio di aborto spontaneo e di ridotta crescita fetale. Ci sono inoltre evidenze che suggeriscono che l'esposizione dei genitori al piombo sia causa di malformazioni congenite e di danni nello sviluppo del sistema nervoso del feto, con conseguenti compromissioni motorie e cognitive. Le diossine attraversano la placenta, agiscono come interferenti endocrini e influenzano la crescita e lo sviluppo del sistema nervoso centrale del feto.

L'ultimo rapporto dell'Agenzia Europea dell'Ambiente (EEA, *European Environment Agency*) relativo al periodo 2009-2011, sottolinea che oltre il 90% degli europei che vive in città respira un livello troppo elevato di polveri ultrafini (fino al 96% dei cittadini UE per il PM_{2,5}) e di ozono (fino al 98%). Nonostante il calo degli inquinanti registrato nell'ultimo decennio, i livelli di particolato e ozono rimangono problematici. L'Italia, ed in particolare la Pianura Padana, è fra le aree maggiormente a rischio (EEA, 2013).

Il progetto europeo ESCAPE (*European Study of Cohortes for Air Pollution Effects*), condotto in Svezia, Norvegia, Danimarca, Olanda, Regno Unito, Austria, Spagna, Grecia e Italia, ha analizzato i dati provenienti da 17 coorti per un totale di 312,944 persone di età compresa tra i 45 e i 73 anni, valutando in particolare l'inquinamento da polveri sottili tossiche presenti nell'aria (PM₁₀ e PM_{2,5}). Durante il follow-up (circa 13 anni) sono stati diagnosticati 2,095 casi di cancro ai polmoni, casi che sono stati correlati al grado di esposizione all'inquinamento atmosferico. Le meta-analisi hanno evidenziato una significativa correlazione tra rischio di cancro ai polmoni e le concentrazioni di PM nelle zone

di residenza dei pazienti (Raaschou-Nielsen et al., 2013).

Molto recentemente (ottobre 2013) lo IARC (*International Agency for Research on Cancer*) ha incluso l'inquinamento dell'aria e anche il solo particolato, tra le sostanze cancerogene per l'uomo (gruppo 1, *the agent is carcinogenic to humans*). L'Agenzia ha concluso che ci sono sufficienti evidenze scientifiche che correlano l'inalazione di aria inquinata all'aumento del rischio di sviluppare tumore ai polmoni e alla vescica (IARC, 2013).

Le maggiori fonti di emissione di sostanze inquinanti dell'aria sono i trasporti, la produzione di energia, le emissioni industriali e agricole e il riscaldamento domestico, oltre alle fonti naturali. I livelli di esposizione negli ultimi anni sono aumentati in modo importante soprattutto nelle aree in rapida industrializzazione e molto popolate. Dati recenti indicano che nel 2010, 223,000 morti dovute a tumore ai polmoni sono correlate all'inquinamento dell'aria (IARC, 2013).

1.3.1 SISTEMA RESPIRATORIO

Tre sono le principali vie di esposizione a sostanze inquinanti dell'aria: l'inalazione, l'ingestione di cibo e acqua contaminati e, in misura minore, l'assorbimento cutaneo (Kampa, Castanas, 2007). La prima è ovviamente considerata la più importante per quanto riguarda l'esposizione diretta ad agenti inquinanti aerosospesi.

Il sistema respiratorio ha come funzione principale lo scambio dell'ossigeno con l'anidride carbonica ed è anatomicamente strutturato in modo tale da svolgere questa funzione; ha infatti un'ampia superficie alveolare, un flusso ematico molto elevato, che consente scambi gassosi giornalieri di oltre 10 m³, e un epitelio alveolare particolarmente permeabile.

Il sistema respiratorio può essere suddiviso in 3 regioni, ciascuna delle quali ha differenti funzioni ed è composta da diverse cellule:

1. *Naso-faringea* (tratto respiratorio superiore): comprende le cavità nasali e orale, l'epiglottide e la faringe. Il passaggio dell'aria attraverso questo tratto favorisce la raccolta di particelle per impaccamento o filtrazione e il raggiungimento di temperatura e umidità adeguati;
2. *Tracheo-bronchiale* (tratto respiratorio inferiore): comprende la laringe, la trachea fino ai bronchi. Il muco, prodotto dalle cellule calciformi e ciliate, funge da rivestimento protettivo e può catturare inquinanti e detriti cellulari;
3. *Polmonare* (tratto respiratorio distale): comprende bronchioli, dotti alveolari e alveoli. Ci sono più di 700 milioni di alveoli, che forniscono una vasta area superficiale per lo scambio di gas.

Il rivestimento epiteliale delle vie respiratorie è formato da una membrana mucosa che a partire dalla trachea fino ai bronchioli è progressivamente: pseudostratificata, ciliata e colonnare. Le cellule epiteliali ciliate, colonnari e cuboidali sono caratteristiche dei bronchioli e dei dotti alveolari; gli alveoli sono rivestiti soprattutto da cellule epiteliali squamose. Fanno parte dell'epitelio anche cellule specializzate tra cui le cellule olfattive delle cavità nasali, che producono citocromi P450, ossidasi ed altri enzimi di biotrasformazione (Ling et al., 2004) e le cellule mucipare calciformi che secernono muco per intrappolare le sostanze inalate. Il

Introduzione

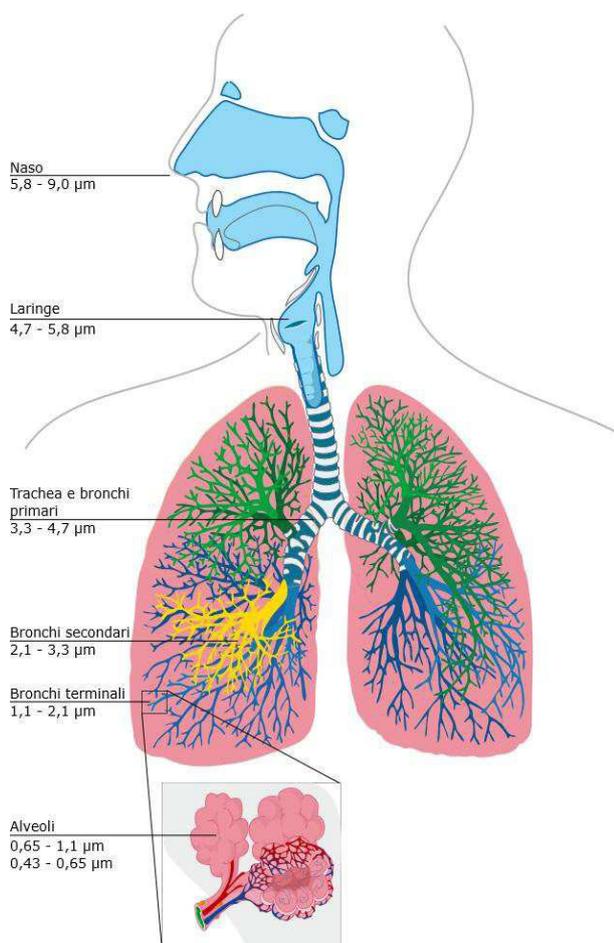


Fig. 7: Capacità di penetrazione del PM nell'apparato respiratorio umano.

muco è anche prodotto dalle ghiandole negli strati sub-epiteliali nasali e tracheo-bronchiali.

L'epitelio cuboidale dei bronchioli è composto soprattutto dalle cellule di Clara che sono non ciliate e producono ossidasi in risposta alla presenza di materiale tossico, irritazione e lesioni; producono inoltre il surfattante alveolare e i glicosaminoglicani (principale componente delle matrici extracellulari). Queste cellule e sono le principali responsabili della biotrasformazione dei composti chimici inalati attraverso la via dei citocromi (Coecke et al., 2006). Nell'uomo le cellule di Clara sono le principali cellule secretorie dell'epitelio bronchiolare, ma sono solo il 20% delle cellule epiteliali totali in questa regione.

L'epitelio che riveste i dotti alveolari e gli alveoli è composto da cellule alveolari di tipo I e di tipo II, sono inoltre presenti macrofagi. I fibroblasti che si trovano nell'interstizio agiscono come impalcatura

per mantenere la forma del sacco alveolare. I macrofagi situati negli alveoli migrano dal circolo sanguigno agli spazi alveolari, mentre la piccola quota che riveste il lume, sono in grado di fagocitare i materiali inalati e quindi rimuoverli attraverso il movimento mucociliare.

Le cellule di tipo I sono incapaci di dividersi, rivestono circa il 95% della superficie alveolare, formando una sottile barriera tra i capillari sanguigni e lo spazio alveolare al fine di facilitare lo scambio di gas.

Le cellule di tipo II rivestono il restante 5% della superficie alveolare, presentano corti microvilli lungo la superficie apicale, possono dividersi e differenziarsi sia nelle cellule di tipo I sia in quelle di tipo II. Queste cellule secernono nello spazio alveolare i corpi lamellari ricchi di fosfolipidi, che, con le proteine, rappresentano i principali componenti del surfattante (Fisher, Chander, 1985), il quale forma uno strato mono-molecolare sopra l'epitelio alveolare allo scopo di diminuire la tensione superficiale della superficie alveolare stessa, impedendo così agli alveoli di collassare e di distendersi eccessivamente durante la inspirazione e la espirazione. Il surfattante può essere danneggiato dall'inalazione di sostanze tossiche (Müller et al., 1998).

1.3.2 INTERAZIONE TRA PARTICOLATO E SISTEMA RESPIRATORIO

Ad ogni respiro milioni di particelle penetrano nel tratto respiratorio. La parte luminale dell'albero respiratorio è formata da una serie di barriere protettive tra le quali: il sottile film formato dal surfactante, il sistema muco-ciliare, i macrofagi ad intensa attività fagocitica, l'epitelio con le giunzioni serrate (*tight junctions*) e le cellule dendritiche. Non tutte le particelle inalate che si depositano nel tratto vengono rimosse dal sistema muco-ciliare, il loro destino dipende, dalle loro proprietà aerodinamiche e caratteristiche fisico-chimiche, come pure dalla natura della loro interazione con il film tensioattivo all'interfaccia aria-liquido (Blank et al., 2006).

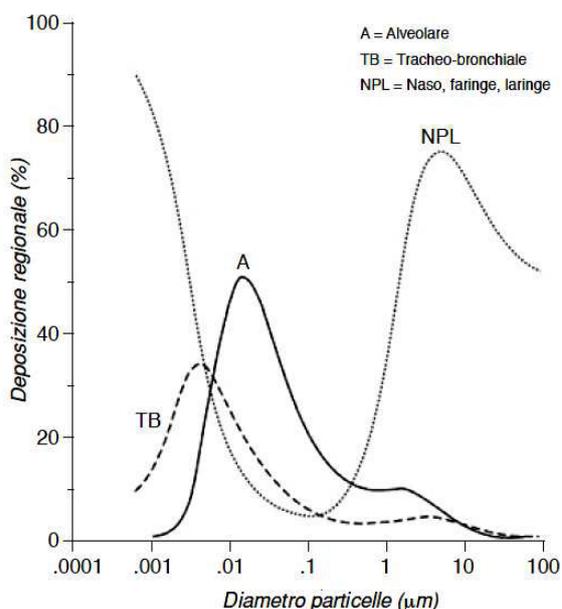


Fig. 8: Depositione delle particelle inalate nelle varie regioni dell'apparato respiratorio in funzione delle dimensioni delle particelle (Marconi, 2003).

L'albero respiratorio è una via di assorbimento molto ampia e permeabile: la barriera aria-sangue è molto sottile (0.1-0.2 µm di spessore) e la superficie alveolare totale è compresa tra 80 e 140 m² (Fröhlich et al., 2013); questo tratto è esposto giornalmente a diverse migliaia di litri d'aria inspirata, per cui le cellule delle diverse aree dell'epitelio sono bersaglio dei materiali inalati. Le particelle più piccole sono in grado di raggiungere la circolazione sanguigna e di indurre danni non prevedibili anche in organi lontani dal tratto respiratorio. Di conseguenza, poiché l'effetto varia in relazione al tipo, all'estensione della deposizione e alla clearance, il sistema respiratorio non è solo un sito di tossicità per gli inquinanti inalabili, ma anche un'importante

via d'accesso all'intero organismo (Geys et al., 2005; Bérubé et al., 2009).

Tra le molteplici componenti presenti nel PM, ci sono molte sostanze tossiche, ma nessuna di queste raggiunge concentrazioni di rilevanza tossicologica come invece avviene nelle esposizioni di tipo occupazionale (Valberg, 2004). Gli effetti avversi sulla salute sono quindi difficilmente correlabili ad una singola componente, ma più verosimilmente ad una complessa interazione sinergica delle varie componenti con l'apparato respiratorio ed altri organi bersaglio.

Le caratteristiche chimico-fisiche e aerodinamiche degli inquinanti inalati sono fondamentali per la determinazione del sito di assorbimento, di deposito ed, in definitiva, del loro destino. In particolare, gli agenti che si presentano come gas o vapori si distinguono in: estremamente solubili in acqua (formaldeide, solfuro diossido, acido fluoridrico), che sono assorbiti pressoché completamente già a livello nasale; con bassa solubilità (diossido di azoto, ozono), che penetrano fino alla regione polmonare; insolubili (CO), che superano facilmente le membrane del tratto respiratorio e vengono distribuiti all'intero organismo.

Per quanto concerne invece le particelle il parametro che ne determina il destino è la

Introduzione

dimensione. Sono state identificate le seguenti categorie, in base alle frazioni dimensionali di aerosol che si depositano lungo il tratto respiratorio (Marconi, 2003):

- *frazione inalabile*, in grado di penetrare nel tratto superiore dell'apparato respiratorio (dal naso alla laringe);
- *frazione toracica*, la porzione della inalabile che penetra e si deposita oltre la laringe;
- *frazione respirabile*, che penetra e si deposita nel tratto inferiore dell'apparato respiratorio, dalla trachea fino agli alveoli polmonari.

Le particelle di 5-30 μm si fermano generalmente nella regione naso-faringea e non superano le prime biforcazioni bronchiali, il loro deposito è controllato dalla velocità del flusso di inalazione; quelle con dimensioni di 1-5 μm raggiungono il tratto tracheo-bronchiale, ove si depositano per sedimentazione e, se solubili, possono essere assorbite, se insolubili vengono rimosse per clearance muco-ciliare; le più piccole (<1 μm) possono penetrare profondamente nella regione alveolare dove i meccanismi di rimozione sono insufficienti; le particelle ultrafini (<100 nm) si comportano come molecole di gas, si disperdono stocasticamente per moto browniano e per uno scarso moto di sedimentazione e diffusione, penetrano in profondità, vengono assorbite e distribuite.

Nella Figura 8 vengono presentate in modo sintetico le curve di deposizione delle particelle inalate nelle varie regioni dell'apparato respiratorio in funzione delle loro dimensioni. Da notare come le particelle della frazione ultrafine si depositino in modo significativo sia nelle regioni alveolari sia, sebbene in percentuale inferiore, in quelle tracheobronchiali, ove la densità di particelle depositate è considerevolmente maggiore di

quella alveolare, in quanto l'area superficiale della regione tracheobronchiale è di gran lunga minore rispetto a quella della regione alveolare (Marconi, 2003).

Per la particolare struttura della loro superficie le particelle possono anche adsorbire sostanze chimiche cancerogene, veicolandole nei tratti respiratori, prolungandone i tempi di residenza e accentuandone gli effetti. Le particelle più piccole raggiungono i tratti più profondi del sistema respiratorio e possono necessitare di molto tempo prima di essere rimosse, per cui sono le più pericolose. Queste polveri possono esacerbare patologie respiratorie croniche come asma, bronchite ed enfisema (Künzli et al., 2005).

La maggior parte degli studi finora condotti sul particolato mostrano associazioni statistico-epidemiologiche, ovvero una consequenzialità causale tra l'aumento di inquinamento e l'aumento di patologie.

1.4 MECCANISMI DI TOSSICITÀ

Indipendentemente dalle dimensioni, gli effetti del PM sembrano essere correlati alla produzione di radicali e quindi a stress ossidativo ed infiammazione polmonare, con conseguente instaurarsi di uno stato infiammatorio e pro-coagulante sistemico (Balduzzi, 2003). Infatti uno dei principali meccanismi cellulari attraverso cui la maggior parte degli inquinanti atmosferici induce effetti avversi è la capacità di agire direttamente come pro-ossidanti di lipidi e proteine, o come generatori di radicali liberi, promuovendo così stress ossidativo e induzione di risposte infiammatorie (Kampa, Castanas, 2008).

Studi epidemiologici attribuiscono al PM la responsabilità dei più gravi danni alla salute indotti dall'inquinamento dell'aria. Alcuni idrocarburi policiclici aromatici, le diossine e alcuni metalli sono cancerogeni e spesso si trovano adsorbiti sulla superficie del particolato (EEA, 2013). L'effetto tossico del particolato aerodisperso è quindi da imputare alla somma degli effetti delle numerose sostanze pericolose presenti sulla sua superficie.

I metalli pesanti, oltre ad indurre stress ossidativo, possono anche sostituirsi a diversi cationi polivalenti (calcio, zinco, e magnesio) che fungono da portatori di carica, intermedi in reazioni catalizzate o come elementi strutturali per il mantenimento della conformazione delle proteine. I metalli infatti si accumulano negli organelli cellulari interferendo con le loro funzioni, si legano alle proteine ed inibiscono un gran numero di enzimi compresi quelli mitocondriali. È stato inoltre dimostrato che i metalli possono legarsi al DNA; il nichel, per esempio, entra nel nucleo, interagisce con la cromatina ed è in grado di silenziare l'espressione di geni, come quelli soppressori del tumore (tumor suppressor genes), inducendo carcinogenesi. Infine, alcuni metalli interferiscono con vari canali ionici, causando effetti neurotossici. Per esempio, il piombo compromette la funzionalità dei canali voltaggio-dipendenti e dei canali NMDA attivati e mima il calcio nei processi fisiologici e molecolari, alterandone l'omeostasi e mediando falsi segnali intracellulari (Kampa, Castanas, 2008).

Le diossine provocano un'ampia gamma di effetti negativi: alterano il metabolismo inducendo una serie di enzimi metabolici, l'omeostasi attraverso la modulazione di ormoni (estrogeni, androgeni glucocorticoidi, insulina, ormoni tiroidei) e dei loro recettori, modificano la crescita e la differenziazione cellulare interferendo con fattori di crescita (EGF, TGFA, TNF α) e i loro recettori. Interagiscono con il recettore arilico (AhR). Il complesso che si forma trasloca nel nucleo dove si lega a siti specifici sul DNA, alterando l'espressione di numerosi geni.

L'induzione di tumore è correlata a tutti i meccanismi sopra descritti, deve essere quindi sottolineato che la maggior parte degli inquinanti presenti in atmosfera può svolgere un ruolo importante nell'iniziazione, promozione e progressione del tumore (Kampa, Castanas, 2008).

L'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) considera il benzo(a)pirene (BaP) e il benzene cancerogeni, poiché, in seguito ad esposizione prolungata, il danno indotto al materiale genetico può portare al cancro. L'esposizione cronica può inoltre danneggiare il midollo osseo e causare effetti ematologici quali diminuita conta dei globuli rossi e bianchi. L'esposizione prenatale agli IPA è stata correlata ad una significativa riduzione del peso del bambino alla nascita e sembra influire negativamente sul suo sviluppo cognitivo (EEA, 2013).

1.4.1 STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo è un meccanismo di danno cellulare determinato da un'eccessiva produzione, soprattutto mitocondriale, di radicali liberi, i quali possiedono elevata reattività e instabilità chimica (Rotilio, 2007).

I radicali liberi sono in grado di indurre danni ai lipidi cellulari, alle proteine e al DNA nucleare o mitocondriale, e possono inoltre interferire con i pathway di segnali intracellulari.

Introduzione

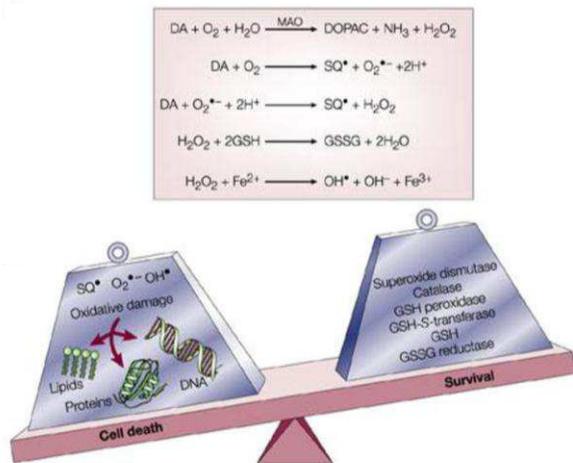


Fig. 10: Rappresentazione dello squilibrio tra difese antiossidanti e attacco radicalico (Nature Reviews).

possono essere estremamente gravi poiché sono teoricamente in grado di attaccare qualsiasi molecola del nostro organismo e provocare numerosi danni sia a livello cellulare che di organi ed apparati.

Fisiologicamente lo stress ossidativo è implicato nell'invecchiamento (Leoncini, 2009), come pure nell'eziopatogenesi di una grande varietà di malattie, quali aterosclerosi, infarto, ictus, malattie infiammatorie croniche (artrite reumatoide), cataratta, disturbi del sistema nervoso centrale (Morbo di Parkinson ed Alzheimer), disordini legati all'età e cancro (Kampa, Castanas, 2008).

In tutti gli organismi aerobi esiste un delicato equilibrio tra la produzione di sostanze ossidanti, tra cui le specie reattive dell'ossigeno (ROS), ed il sistema di difesa antiossidante, che ha il compito di prevenire e/o riparare l'eventuale danno prodotto. Di conseguenza, uno sbilanciamento tra produzione di specie reattive e l'efficacia del sistema di difesa antiossidante si traduce in una condizione di stress ossidativo (Fig. 10).

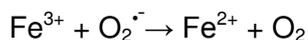
A seconda dell'atomo coinvolto le specie chimiche reattive possono essere classificate in specie reattive dell'ossigeno (ROS), specie reattive dell'azoto (RNS) e specie reattive del carbonio (RCS). I radicali liberi hanno un singolo elettrone spaiato nell'orbitale esterno, caratteristica che conferisce loro una configurazione instabile, che tende ad essere corretta mediante ossidazione di proteine, lipidi, carboidrati e acidi nucleici. In tal modo vengono prodotti altri radicali liberi secondo reazioni a cascata (Iorio, 2007).

È noto che le specie chimiche reattive hanno un ruolo benefico quando, ad esempio, nella risposta immunitaria vengono utilizzate per bloccare diversi patogeni, oppure quando nella comunicazione intra-cellulare mediano la trasmissione di segnali biochimici (Corti et al., 2009). Ma se le sostanze ossidanti sono presenti ad alte concentrazioni, e/o il sistema antiossidante non è in grado di neutralizzarle, i danni possono presentarsi a vari livelli: a carico dei fosfolipidi di membrana, con perdita di compartimentazione cellulare e dei trasportatori selettivi; a carico degli acidi nucleici, con accumulo di mutazioni ed alterazioni dell'espressione genica; a carico delle proteine, con modificazioni strutturali e perdita di funzione enzimatica, recettoriale e di trasporto (Corti et al., 2009).

Negli organismi aerobici eucarioti, tra cui gli esseri umani, i radicali liberi sono continuamente prodotti durante il normale metabolismo, come pure in risposta a stimoli ambientali, come radiazioni, fumo di sigaretta, metalli e ozono (Kampa, Castanas, 2008). Se la produzione delle specie reattive supera il valore soglia, esse non possono più essere neutralizzate dai sistemi antiossidanti, generando in tal modo una condizione di stress ossidativo che può condurre la cellula ad apoptosi (Maiese et al., 2008). Gli effetti dei radicali liberi

I ROS più comunemente prodotti a livello cellulare sono il radicale idrossile (OH^\cdot), l'anione superossido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e l'ossido nitrico (NO^\cdot). Anche le forme non radicaliche, come il perossido di idrogeno (H_2O_2) e il perossinitrito (ONOO^-), possono talvolta indurre danno cellulare generando radicali attraverso varie reazioni chimiche.

L' $\text{O}_2^{\cdot-}$ può ridurre lo ione ferrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}), il quale può reagire con H_2O_2 secondo la reazione di Fenton:



con produzione di un radicale (OH^\cdot) e di un anione (OH^-) idrossile (Iorio, 2007).

La quantità di specie chimiche reattive prodotte dalle cellule è determinata da diversi fattori, e possono avere sia origine endogena che esogena.

Fonti endogene di ROS sono i mitocondri, il reticolo endoplasmatico (citocromi P450), i microsomi e l'attivazione delle cellule coinvolte nei fenomeni infiammatori. L'eccessiva produzione di ROS dovuta a disfunzione mitocondriale può causare direttamente danno ossidativo con instabilità della membrana, accumulo di proteine modificate e mutazioni a carico del DNA (Chico, 2009).

Fonti endogene di ROS sono anche le cellule coinvolte nei fenomeni infiammatori come i neutrofili, gli eosinofili e i macrofagi. Questi ultimi, in particolare una volta attivati aumentano il consumo di ossigeno con formazione di ROS, tra cui anione superossido, ossido nitrico e perossido di idrogeno (Rahman, 2007).

I ROS possono essere prodotti anche attraverso numerosi processi esogeni, ad esempio, vari agenti ambientali possono generare ROS sia direttamente che indirettamente. Induzione di stress e danno ossidativo sono stati osservati dopo esposizione a diversi xenobiotici, quali ad esempio metalli (ridotti e non), ioni, radiazioni (UV, raggi gamma, raggi X), farmaci, contaminanti ambientali e agenti cancerogeni (Iorio et al., 2007).

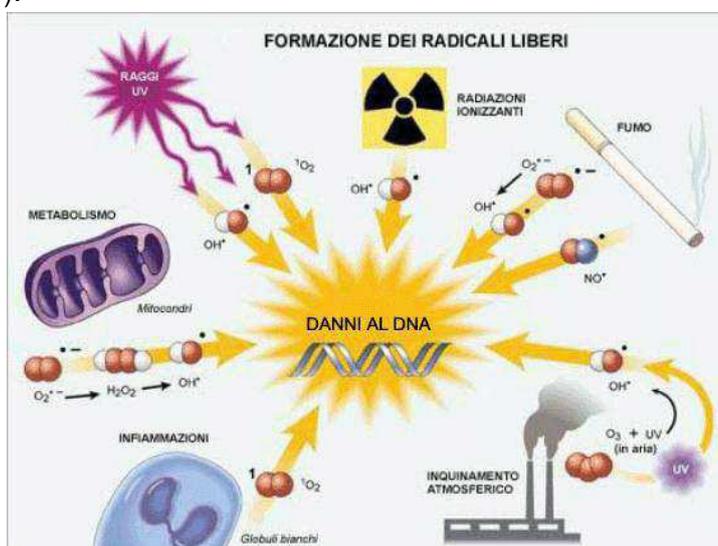


Fig. 11: Raffigurazione dei fattori scatenanti la formazione di radicali liberi.

L'organismo umano possiede dei sistemi di difesa estremamente efficaci, come enzimi in grado di sequestrare direttamente o indirettamente le specie reattive dell'ossigeno, o sostanze che funzionano da trappole chimiche nei confronti dei radicali liberi. Difese aggiuntive vengono fornite da vitamine, minerali ed altri elementi assunti con la dieta. In generale, queste sostanze non sono sintetizzate dall'organismo ed hanno funzioni correlate con i sistemi enzimatici quali cofattori, coenzimi, elementi in tracce legati a ligandi organici o hanno essi stessi proprietà antiossidanti (Leoncini, 2009).

Introduzione

Gli antiossidanti possono essere classificati in primari e secondari. Questa classificazione si basa non su un criterio di importanza, ma di sequenza temporale di azione. Fra i primari vi sono gli enzimi che catalizzano le trasformazioni dei ROS (SOD, CAT e GPx), le molecole chelanti i metalli e le molecole in grado di agire come scavenger dell'ossigeno singoletto (1O_2). Gli antiossidanti secondari hanno, invece, la funzione di implementare le difese antiossidanti; fra questi particolarmente importanti sono le vitamine A ed E, la vitamina C, il coenzima Q, e i polifenoli (Harris, 1992).

L'antiossidante ideale dovrebbe essere caratterizzato da un rapido assorbimento, alta capacità di eliminare i radicali liberi e di chelare i metalli ridotti ed essere attivo sia in condizioni idrofile che lipofile.

Tra gli antiossidanti si riconoscono molecole sia di natura enzimatica che non enzimatica. Antiossidanti enzimatici sono le catalasi (CAT), la glutatione perossidasi (GPx) e la superossido dismutasi (SOD).

La SOD è un enzima appartenente alla famiglia delle metalloproteine la cui funzione è quella di convertire il $O_2^{\cdot -}$ in O_2 e H_2O_2 . È presente in diverse isoforme che si differenziano in base agli ioni presenti nel sito attivo (rame, ferro o manganese), alla composizione aminoacidica e alla distribuzione tra gli organismi. Nell'uomo sono state identificate tre isoforme: la SOD1 citoplasmatica, la SOD2 mitocondriale e la SOD3 extracellulare. La SOD1 e la SOD3 contengono rame e zinco, mentre la SOD2 contiene il manganese nel suo centro di reazione.

Le catalasi sono metalloproteine localizzate a livello dei perossisomi, il cui gruppo prostetico è rappresentato da ferro, che hanno la capacità di proteggere i tessuti dai perossidi, catalizzando la riduzione del H_2O_2 ad H_2O ed O_2 .

Quando il perossido di idrogeno è presente in concentrazioni troppo basse per attivare le catalasi, la degradazione delle specie reattive avviene ad opera della glutatione perossidasi, enzima presente in due diverse forme, una selenio-dipendente (GPx) e l'altra selenio-indipendente (glutatione-S-tranferasi, GST). Le perossidasi agiscono in associazione con il glutatione (GSH) e catalizzano la conversione di H_2O_2 ad acqua (o alcol), ossidando il glutatione (Chico, 2009).

Negli organismi più evoluti la GPx sembra aver largamente soppiantato le catalasi nella difesa da stress ossidativo, è un enzima molto importante nel prevenire la perossidazione lipidica e quindi per mantenere la struttura e la funzione delle membrane cellulari (McCord, 2000).

La glutatione reduttasi, in stretta relazione con la glutatione perossidasi, catalizza la riduzione del glutatione ossidato GSSG.

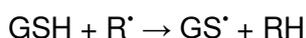
La glutatione sintetasi, localizzata principalmente nelle cellule epatiche, ove è presente in almeno 7 isoforme, è un enzima fondamentale per la detossificazione degli xenobiotici e la sua attività è in stretta relazione con le monossigenasi contenenti citocromo P-450.

Gli antiossidanti di tipo non enzimatico comprendono diverse molecole tra cui la vitamina E, che è presente nell'uomo in diverse forme, la più attiva delle quali è l' α -tocoferolo, principale antiossidante liposolubile, che previene l'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi

nelle membrane generando un radicale scarsamente reattivo che interrompe le reazioni a catena che caratterizzano questo processo. Importante antiossidante è anche la Vitamina C, *scavenger* diretto e idrosolubile dei radicali liberi nei liquidi intra ed extracellulari, che ha la capacità di rigenerare la vitamina E dopo che questa ha neutralizzato i radicali liberi (Montesano, 2007).

Tra i più importanti antiossidanti endogeni sono da menzionare il tripeptide glutatione e piccole proteine, come la tioredoxina, la glutaredoxina e la perossiredoxina che hanno la particolarità di possedere dei gruppi tiolici. Tra tutte queste molecole, il glutatione, fornisce il maggior contributo nel mantenimento dello stato redox (Leoncini, 2009). Il GSH è particolarmente presente nel citosol, ove raggiunge concentrazioni millimolari, nel nucleo e nei mitocondri ed è considerato il più efficace antiossidante solubile (Valko et al., 2006). Può essere presente sia in forma ridotta (GSH), che ossidata (GSSG) e partecipa alle reazioni redox attraverso l'ossidazione dei gruppi tiolici. Generalmente, l'attività antiossidante dei composti tiolici è dovuta all'atomo di zolfo, il quale favorisce la perdita di un singolo elettrone con formazione di specie radicaliche, come ad esempio il radicale tiile (GS[•]), caratterizzate da un'emivita significativamente più lunga rispetto a quella di molti altri radicali formati durante lo stress ossidativo.

La reazione del glutatione con un radicale R[•], può essere così descritta:



Il radicale (GS[•]) può dimerizzare per formare il prodotto non radicalico GSSG che si accumula nelle cellule.

Il GSH può reagire direttamente con i radicali liberi oppure fungere da substrato durante la detossificazione di idroperossidi lipidici, composti elettrofili ed acqua ossigenata.

Il glutatione è sintetizzato enzimaticamente dalla gamma-glutamylcisteina sintetasi (γGCS), enzima chiave, e dalla glutatione sintetasi (Fig. 12). Altri fattori importanti nella sintesi *ex novo* del GSH sono la stessa concentrazione di tripeptide che inibisce, attraverso un meccanismo a feed-back, l'attività della γGCS e la

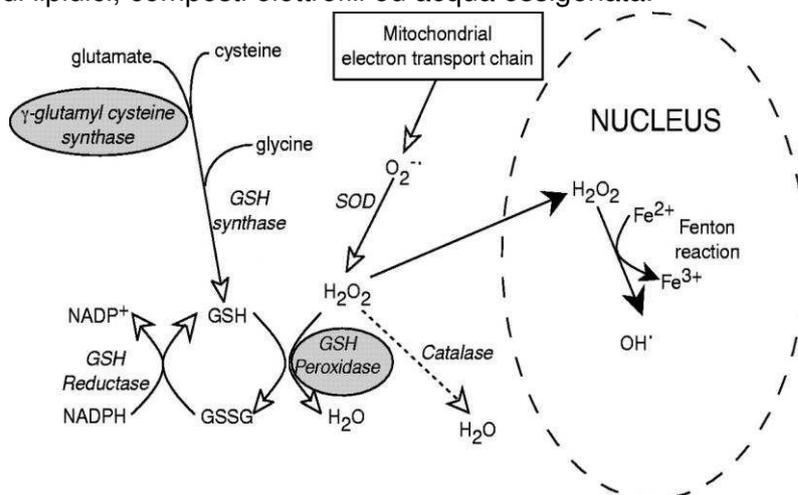


Fig. 12: Schema che sottolinea la posizione centrale del ciclo redox del glutatione nel processo di detossificazione intracellulare (Kurtz et al., 2004).

disponibilità di cisteina (amminoacido fondamentale della molecola). Le variazioni del rapporto GSH/GSSG hanno come importanti conseguenze il fatto che lo stato redox dei tioli cellulari viene modificato, attivando alcune risposte trascrizionali antiossidanti. Inoltre, poiché GSSG viene degradato principalmente all'esterno della cellula, aumenta la richiesta intracellulare di sintesi *ex novo* di GSH (Leoncini, 2009).

Introduzione

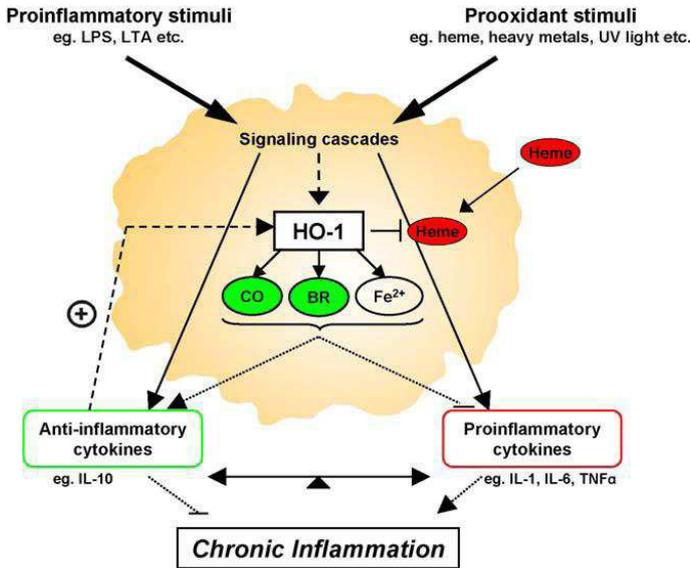


Fig. 13: Regulatory role of HO-1 in the inflammatory response.

Un altro importante meccanismo di difesa dell'organismo contro lo stress ossidativo è l'eme ossigenasi (*heme oxygenase, HO*). Vi sono tre isoforme dell'enzima nell'uomo: l'HO-1 (inducibile) e l'HO-2 (costitutiva), che condividono per il 42% gli stessi residui, e l'HO-3, che ha un'omologia del 90% con l'isoforma 2, ma non risulta essere funzionale. L'HO-1 è ampiamente diffusa in tutto l'organismo; l'HO-2 è concentrata soprattutto nel cervello e nei testicoli; l'HO-3 è localizzata a livello di prostata, fegato e reni. Mentre l'HO-1 è indotta per svolgere ruoli protettivi negli stati patologici, l'HO-2 sembra svolgere funzioni più routinarie, quali controllo della pressione arteriosa e della neurotrasmissione. L'eme ossigenasi-1 ha duplice ruolo all'interno delle cellule: il catabolismo dell'eme e ha una potente attività citoprotettiva, grazie alle sue proprietà antiossidanti, antiapoptotiche e antiinfiammatorie (Conti et al., 2007).

Dal punto di vista biochimico, come mostrato in Figura 14, in presenza di O₂, NADPH e citocromo P-450 reductasi, l'HO-1 converte l'eme a biliverdina IXα, con rilascio di ferro(II) e monossido di carbonio (CO). La biliverdina IXα viene convertita a bilirubina IXα, un potente antiossidante endogeno con proprietà antiinfiammatorie, mentre il ferro viene sequestrato dalla ferritina, antiossidante con attività antiapoptotica. CO ha numerose funzioni biologiche, tra le quali proprietà antiinfiammatorie, e, analogamente all'ossido nitrico (NO), inibisce la proliferazione delle cellule della muscolatura liscia e l'aggregazione piastrinica, e modula il tono vascolare, aumentando i livelli di cGMP.

Nel polmone, l'eme-ossigenasi-1 è espressa in vari tipi di cellule, inclusi i pneumociti di tipo II ed i macrofagi alveolari; viene indotta principalmente dalla presenza di eme, da ipossia, ma anche da iperossia, NO, endotossine e citochine proinfiammatorie (IL-6, TNF-α). L'espressione dell'HO-1 è up-regolata in diverse patologie polmonari, tra cui la sindrome da

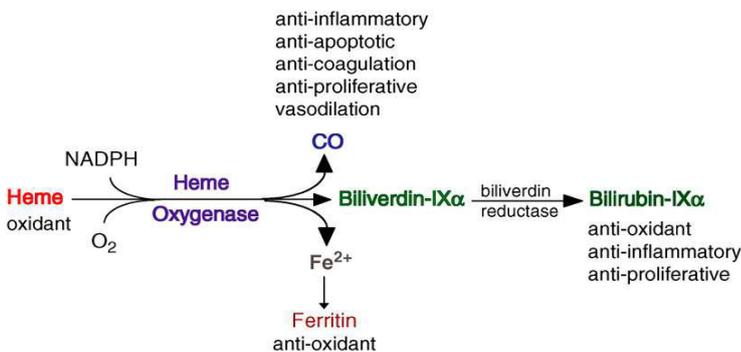


Fig.14: Degradazione dell'eme da parte dell'HO-1 (Fredenburgh, 2007).

distress respiratorio acuto (ARDS, *Acute Respiratory Distress Syndrome*), la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), l'asma, la fibrosi cistica (CF), la fibrosi polmonare idiopatica (IPF) e il rigetto dopo trapianto di polmone (Fredenburgh et al., 2007).

1.4.2 INFIAMMAZIONE

L'infiammazione è una risposta difensiva cellulare e tissutale a danni e incidenti. Lo scopo di questo processo è distruggere e rimuovere gli agenti nocivi e i tessuti lesi, così da promuovere la riparazione tissutale. Quando questa risposta benefica si attua in modo incontrollato, il risultato è un eccessivo danno cellulare o tissutale che si traduce in uno stato di infiammazione cronica e di distruzione di tessuto normale (Lee, Yang, 2013).

In base alla durata e al tipo di cellule coinvolte, l'infiammazione è caratterizzata da:

- una fase acuta o transitoria, in cui vi è vasodilatazione locale ed incremento della permeabilità capillare;
- una fase subacuta ritardata, caratterizzata principalmente da infiltrazione di leucociti e fagociti;
- una fase cronica proliferativa, nella quale si manifestano degenerazione tissutale e fibrosi.

Le varie fasi rappresentano il risultato dell'azione di molecole diverse, che, a loro volta, dipendono dal tipo di danno e dai meccanismi attivati (Fрати, Russo, 2000).

La risposta infiammatoria è scatenata dal danno prodotto da agenti fisici (calore, radiazioni), chimici (veleni, inquinanti ambientali, solventi) e biologici (batteri, virus, altri parassiti e loro prodotti). Il danno primario si manifesta con la necrosi o con alterazioni sub-letali delle cellule presenti nel sito di azione (sito infiammatorio): cellule tessutali, leucociti, piastrine e cellule endoteliali. Questo permette la genesi dei primi segnali responsabili della liberazione di molecole attive (mediatori) responsabili della sequenza dei fenomeni flogistici nell'area direttamente interessata dal danno (Balduzzi, 2003).

L'infiammazione delle vie respiratorie e le malattie polmonari come l'asma o la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), sono caratterizzate da infiammazione cronica. Molte delle proteine infiammatorie bersaglio, come la metalloproteinasi di matrice 9 (MMP-9, *Matrix Metalloproteinase-9*), la molecola di adesione intercellulare 1 (ICAM-1, *Intracellular Adhesion Molecule-1*), la molecola di adesione vascolare 1 (VCAM-1, *Vascular Cell Adhesion Molecule-1*), la cicloossigenasi-2

(COX-2, *Cyclooxygenase-2*) e la fosfolipasi A2 citosolica (cPLA₂, *Cytosolic Phospholipase A₂*), sono associate a vie di segnalazione infiammatoria indotta da vari stimoli, compresi il fattore di necrosi tumorale α (TNF- α , *Tumor Necrosis Factor- α*), l'interleuchina-1 β (IL-1 β),

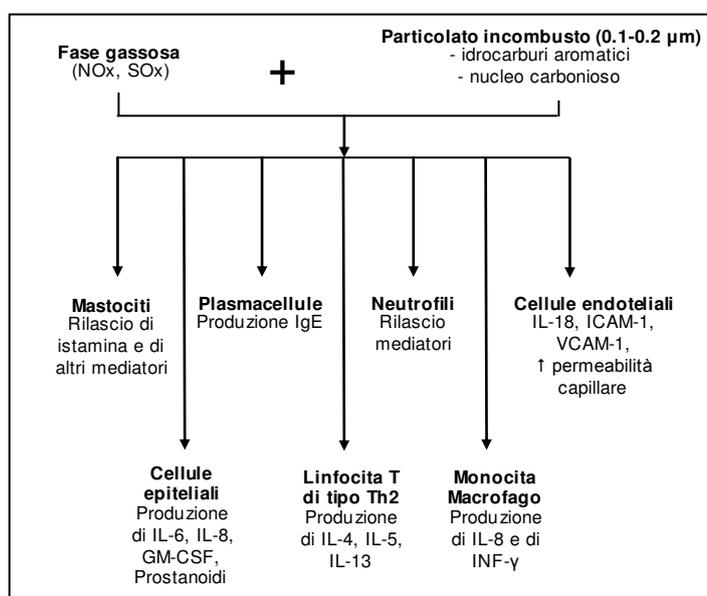


Fig. 15: Processi infiammatori attivati dal particolato.

Introduzione

l'adenosina trifosfato (ATP), l'estratto di fumo di sigaretta, l'acido lipoteicoico (LTA) o il lipopolisaccaride (LPS) (Lee, Yang, 2013).

I macrofagi e le cellule epiteliali polmonari che per primi entrano in contatto con le particelle inalate, costituiscono una barriera metabolicamente attiva deputata ai meccanismi di difesa e di rimozione. I macrofagi alveolari, dopo aver fagocitato le particelle inalate, vengono attivati e rilasciano una serie di mediatori infiammatori, immunitari e fattori pro-coagulanti. È stato dimostrato che anche l'epitelio polmonare è attivamente coinvolto nella risposta alle sostanze tossiche inalate e che il contatto con le particelle induce la liberazione di citochine e chemochine, con conseguente richiamo nel polmone di cellule infiammatorie e danno tissutale. I risultati di questi studi dimostrano che l'esposizione a particelle ambientali induce citotossicità, diminuzione della funzionalità macrofagica, aumento dell'espressione di fattori di trascrizione (NF- κ B, AP-1 e AP-2) e rilascio nel mezzo di coltura di citochine e chemochine (IL-1, IL-6, IL-8, GM, CSF, TNF), specie reattive dell'ossigeno e nitrossido (Balduzzi, 2003).

Le cellule polmonari, in particolare le cellule epiteliali alveolari di tipo II, sono sensibili agli effetti dannosi degli stimoli ossidanti, rilasciano mediatori dell'infiammazione e attivano cascate di segnalazione di fattori di trascrizione, quali NF- κ B e AP-1, con conseguente modulazione dell'espressione dei geni infiammatori.

NF- κ B è considerato un importante regolatore delle risposte infiammatorie, in quanto svolge un ruolo essenziale nell'evoluzione e anche nella fase di risoluzione dell'infiammazione. Esso controlla un ampio spettro di effetti biologici che vanno dalle risposte immunitarie ed induzione di stress, fino al destino delle cellule. Regola infatti la proliferazione, la differenziazione, la tumorigenesi, l'apoptosi e il rimodellamento tissutale. NF- κ B è generalmente presente come eterodimero delle subunità p50 e p65/RelA. In cellule non stimolate, il complesso si trova nel citoplasma in forma inattiva, associato alla proteina inibitoria I κ B, che blocca il segnale di traslocazione nucleare ed impedisce a NF- κ B di entrare nel nucleo. In seguito a stimolazione cellulare con vari induttori di NF- κ B, I κ B α viene rapidamente fosforilato da una chinasi sui residui di serina 32 e 36, con conseguente poli-ubiquitinazione e successiva degradazione da parte del proteasoma 26S. NF- κ B dimero rilasciato può così traslocare nel nucleo e attivare la trascrizione di geni bersaglio (Fig. 16).

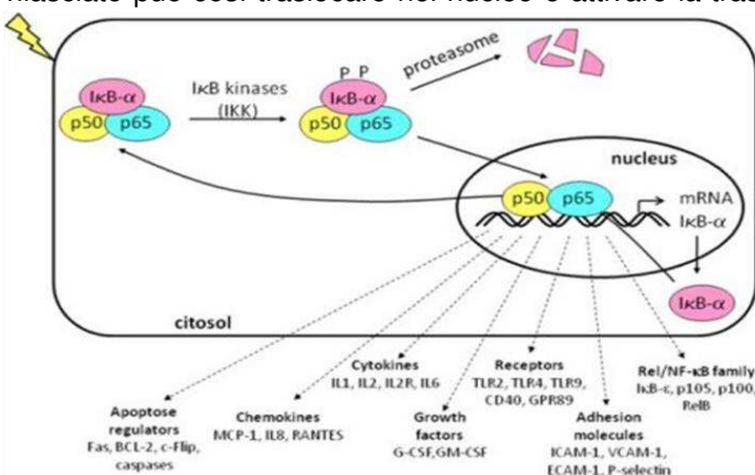


Fig. 16: Meccanismo di attivazione di NF- κ B.

NF- κ B viene attivato da numerosi stimoli extracellulari, tra cui citochine e chemochine, quali TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, virus, particolato ambientali (PM₁₀, PM_{2.5}) e stress ossidativo (Lee, Yang, 2013); inoltre, l'attivazione stessa di NF- κ B controlla la sintesi di queste citochine pro-infiammatorie (Tak, Firestein, 2001).

1.5 NORMATIVA SULLE EMISSIONI IN ATMOSFERA

Le direttive sulla qualità dell'aria stabiliscono i limiti di concentrazione del livello base degli inquinanti atmosferici. Gli elementi chiave della legislazione che riguarda la qualità dell'aria sono (EEA, 2013):

- **Valori limite stabiliti dall'Unione Europea:** sono valori soglia vincolanti di concentrazione che non devono essere superati. I limiti sono stabiliti per ogni singolo inquinante e comprendono il limite di concentrazione, un tempo medio durante il quale l'inquinante deve essere misurato o valutato, il numero di superamenti autorizzati all'anno (se previsti) e la data entro la quale il valore soglia deve essere raggiunto. Alcune sostanze inquinanti hanno più di un valore soglia. I valori limite sono vincolanti per gli Stati dell'UE.
- **Valori target:** sono da attuare, ove possibile, adottando tutte le misure necessarie, che non comportano costi esagerati. I valori target non sono vincolanti.
- **Obbligo di ridurre l'esposizione:** Le concentrazioni devono essere ridotte di una determinata percentuale a seconda delle concentrazioni medie triennali di PM_{2.5} urbano dal 2008-2010 al 2018-2020.

La norma quadro in materia di **controllo dell'inquinamento atmosferico** è rappresentata dal Decreto Legislativo n.155/2010 che ha abrogato il Decreto Legislativo n.351/99 e i rispettivi decreti attuativi (il DM 60/02, il Decreto Legislativo n.183/2004 e il DM 261/2002). Il Decreto Legislativo n.155/2010 contiene le definizioni di valore limite, valore obiettivo, soglia di informazione e di allarme, livelli critici, obiettivi a lungo termine e valori obiettivo. Il Decreto individua l'elenco degli inquinanti per i quali è obbligatorio il monitoraggio (NO₂, NO_x, SO₂, CO, O₃, PM₁₀, PM_{2.5}, Benzene, Benzo(a)pirene, Piombo, Arsenico, Cadmio, Nichel, Mercurio, precursori dell'ozono) e stabilisce le modalità della trasmissione e i contenuti delle informazioni, sullo stato della qualità dell'aria, da inviare al Ministero dell'Ambiente.

Il provvedimento individua nelle Regioni le autorità competenti per effettuare la valutazione della qualità dell'aria e per la redazione dei Piani di Risanamento della qualità dell'aria nelle aree nelle quali sono stati superati i valori limite. Ai sensi dell'art.10 del decreto sono le Regioni che devono predisporre anche i Piani di Azione per la riduzione del rischio di superamento dei valori limite, valori obiettivo e soglie di allarme.

Sono stabilite le modalità per la realizzazione o l'adeguamento delle reti di monitoraggio della qualità dell'aria (Allegato V e IX). L'allegato VI del decreto contiene i metodi di riferimento per la determinazione degli inquinanti. Gli allegati VII e XI, XII, XIII e XIV riportano i valori limite, i livelli critici, gli obiettivi a lungo termine e i valori obiettivo rispetto ai quali effettuare la valutazione dello stato della qualità dell'aria.

Di recente sono stati emanati il DM Ambiente 29 novembre 2012 che, in attuazione del Decreto Legislativo n.155/2010, individua le stazioni speciali di misurazione della qualità dell'aria e il Decreto Legislativo n.250/2012 che modifica ed integra il Decreto Legislativo n.155/2010 definendo anche il metodo di riferimento per la misurazione dei COV (composti organici volatili) (ARPAV, 2013).

Introduzione

La norma quadro in materia di **prevenzione e limitazione delle emissioni in atmosfera** è costituita dal Decreto Legislativo 3 aprile 2006 n.152 (parte V) che si applica a tutti gli impianti (compresi quelli civili) ed alle attività che producono emissioni in atmosfera e stabilisce i valori di emissione, le prescrizioni, i metodi di campionamento e di analisi delle emissioni ed i criteri per la valutazione della conformità dei valori misurati ai limiti di legge.

Il decreto non prende in considerazione gli impianti per l'incenerimento dei rifiuti, disciplinati invece dal D.Lgs. 11 maggio 2005, n. 33. Il Decreto è stato aggiornato con l'entrata in vigore del D.Lgs. 128/2010.

Per gli impianti sottoposti ad autorizzazione integrata ambientale (AIA) vale quanto previsto dal D.Lgs. 152/2006 (parte II) che ha ripreso *in toto* i contenuti del D.Lgs. 18 febbraio 2005, n.59 (abrogato) relativo alla prevenzione e riduzione integrate dell'inquinamento.

Il decreto 152/2006 ha abrogato anche il DPR 203/88 (precedente norma quadro in materia di inquinamento dell'aria prodotto dagli impianti industriali), il DM 10 marzo 1987 n.105, il DM 8 maggio 1989 (impianti di combustione con potenza termica inferiore a 50 MW), il DPCM 21 luglio 1989, il DM 12 luglio 1990 (linee guida per il contenimento delle emissioni inquinanti e disciplina per gli impianti di combustione con potenza termica entro i 50 MW), il DPR 25 luglio 1991 (impianti con emissioni a ridotto inquinamento, procedure semplificate), il DM 21 dicembre 1995, il DM 16 maggio 1996, DM 20 gennaio 1999, n.76, il DM 21 gennaio 2000 n. 107 ed il DM 16 gennaio 2004 n.44 (ARPAV, 2013).

Per quanto attiene alla tematica relativa al **contenimento dei gas serra**, il Decreto Legislativo n.171 del 21 maggio 2004 (attuazione della Direttiva 2001/81/CE), stabiliva i limiti nazionali di emissione di SO₂, NOX, COV, NH₃ da raggiungere entro il 2010. La Legge n.316 del 30 dicembre 2004 (conversione in legge, con modificazioni, del decreto-legge 12 novembre 2004, n.273) contiene le disposizioni per l'applicazione della Direttiva 2003/87/CE in materia di scambio di quote di emissione dei gas ad effetto serra nella Comunità Europea ed in materia di autorizzazioni ad emettere gas ad effetto serra. Il 13 aprile 2013 è stato emanato il Decreto Legislativo n.30 "Attuazione della direttiva 2009/29/CE che modifica la direttiva 2003/87/Ce al fine di perfezionare ed estendere il sistema comunitario per lo scambio di quote di emissione di gas a effetto serra". Tale decreto abroga il precedente in materia (Decreto Legislativo n.216/2006). Il 16 aprile 2013 è stato emanato il DPR n.74/2013 che concerne il Regolamento recante definizione dei criteri generali in materia di esercizio, conduzione, controllo, manutenzione e ispezione degli impianti termici per la climatizzazione invernale ed estiva degli edifici e per la preparazione dell'acqua calda per usi igienici sanitari. Di recente il Ministro dell'Ambiente (Corrado Clini) ha presentato al Comitato interministeriale per la programmazione economica (Cipe) il Piano per la riduzione delle emissioni al 2020 per l'Italia. Il Piano prevede la riduzione delle emissioni di anidride carbonica e degli altri gas serra per il rispetto, da parte dell'Italia, del pacchetto UE clima energia (20-20-20) (ARPAV, 2013).

NORMATIVA INTERNAZIONALE

- **Protocollo di Kyoto** - È stato adottato a Kyoto, in Giappone, l'11 dicembre 1997 ed entrato in vigore il 16 febbraio 2005 (Nazioni Unite).
- **Protocollo di Kyoto** - Decisione del Consiglio Europeo (Direttiva 2002/358/CE), del 25 aprile 2002, relativa all'approvazione, in nome della Comunità Europea, del Protocollo di Kyoto alla Convenzione quadro delle Nazioni Unite sui cambiamenti climatici e l'esecuzione congiunta degli impegni che ne derivano (G.U. dell'Unione Europea).

NORMATIVA EUROPEA

- **Direttiva 2011/850/CE** - Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio, del 16 dicembre 2011, disposizioni di attuazione delle direttive 2004/107/CE e 2008/50/CE del Parlamento europeo e del Consiglio per quanto riguarda lo scambio reciproco e la comunicazione di informazioni sulla qualità dell'aria ambiente (G.U. dell'Unione Europea).
- **Raccomandazione 2011/696/UE** - Raccomandazione della Commissione europea, del 18 ottobre 2011, sulla definizione di nano materiale (G.U. dell'Unione Europea).
- **Direttiva 2010/75/EU** - Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio, del 24 novembre 2010, relativa alla qualità dell'aria ambiente e alle emissioni industriali, prevenzione e riduzione integrate dell'inquinamento (G.U. dell'Unione Europea).
- **Direttiva 2008/50/CE** - Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 maggio 2008, relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita (G.U. dell'Unione Europea).
- **Direttiva 2002/358/CE** - Direttiva del Parlamento europeo e del Consiglio, del 25 aprile 2002, riguardante l'approvazione, a nome della Comunità europea, del protocollo di Kyoto allegato alla convenzione quadro delle Nazioni Unite sui cambiamenti climatici e l'adempimento congiunto dei relativi impegni (G.U. dell'Unione Europea).

NORMATIVA NAZIONALE

- **Decreto Legislativo 24 dicembre 2012, n.250** - Modifiche ed integrazioni al decreto legislativo 13 agosto 2010, n.155, recante attuazione della direttiva 2008/50/CE relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa. (13G00027) Entrata in vigore del provvedimento: 12/02/2013 (Gazzetta Ufficiale n.23 del 28 gennaio 2013).
- **DM Ambiente 29 dicembre 2012, n.299** - Individuazione delle stazioni speciali di misurazione della qualità dell'aria previste dall'articolo 6, comma 1, e dall'articolo 8, commi 6 e 7 del decreto legislativo 13 agosto 2010, n.155. (12A13349) (G.U. n.299 del 24 dicembre 2012).

Introduzione

- **Decreto Legislativo 13 agosto 2010, n.155** - Attuazione della direttiva 2008/50/CE relativa alla qualità dell'aria ambiente e per un'aria più pulita in Europa. Tratta gli aspetti del monitoraggio e della pianificazione relativa alla qualità dell'aria (G.U. n.216 del 15 settembre 2010 - Supplemento Ordinario n.217).
- **Decreto Legislativo 3 aprile 2006, n.152** - Norme in materia ambientale. In particolare il decreto legislativo disciplina, in attuazione della legge 15 dicembre 2004, n.308, le materie seguenti (G.U. n.88 del 14 aprile 2006 - Supplemento Ordinario n.96 note: Le disposizioni della Parte seconda entrano in vigore dal 12 agosto 2006):
 1. le procedure per la valutazione ambientale strategica (VAS), per la valutazione d'impatto ambientale (VIA) e per l'autorizzazione ambientale integrata (IPPC);
 2. la difesa del suolo e la lotta alla desertificazione, la tutela delle acque dall'inquinamento e la gestione delle risorse idriche;
 3. la gestione dei rifiuti e la bonifica dei siti contaminati;
 4. la tutela dell'aria e la riduzione delle emissioni in atmosfera;
 5. la tutela risarcitoria contro i danni all'ambiente.
- **Decreto Legislativo 11 maggio 2005, n.133** - Attuazione della direttiva 2000/76/CE, in materia di incenerimento rifiuti (G.U. n.163 del 15 luglio 2005 - Supplemento Ordinario n.122).

Capitolo 2

SCOPO DELLA TESI

Il sistema respiratorio rappresenta una delle maggiori vie di ingresso per gli xenobiotici nell'organismo e l'inquinamento ambientale è un rilevante fattore di rischio per la salute; numerosi studi epidemiologici correlano la presenza di particolato aerodisperso all'insorgere di numerose patologie. L'esposizione ad alcuni agenti, quali gas e materiali volanti, come fibre, particelle e nanoparticelle, può essere causa di malattie acute o croniche, che vanno dall'irritazione irreversibile delle vie aeree, a patologie severe, debilitanti o fatali quali l'asma, la broncopneumopatia cronica ostruttiva, la fibrosi polmonare e il cancro (Schwartz et al., 2002; Ayres et al., 2008).

L'aumentata produzione di rifiuti solidi urbani, ha portato all'utilizzo sempre più diffuso del processo di incenerimento, al fine di diminuire il volume di rifiuti e recuperare parte dell'energia. Il processo porta però alla formazione di ceneri, pesanti e leggere, con caratteristiche molto pericolose e all'emissione in atmosfera di fumi contenenti sostanze tossiche, che apportano ulteriore inquinamento dell'aria.

I moderni dispositivi di abbattimento degli inceneritori trasferiscono il carico tossico (in particolare i metalli pesanti e in modo minore le diossine) dalle emissioni in aria al *Fly Ash*. Queste ceneri sono leggere, facilmente trasportate dal vento e soprattutto di dimensione inalabile (Thompson, Anthony, 2008).

Riuscire a comprendere i meccanismi del danno polmonare e della sua possibile riparazione a seguito dell'esposizione a sostanze tossiche presenti nell'ambiente atmosferico è uno dei principali *focus* di studio nel campo della medicina respiratoria (BéruBé et al., 2009).

L'approccio tradizionale per la valutazione degli effetti tossici propri dei contaminanti inalati si basa su modelli *in vivo*, che quindi utilizzano animali. I dati tossicologici ottenuti sugli animali sono però oggetto di dibattiti e controversie nell'ambito della comunità scientifica, anche per motivi di natura etica.

Nonostante vi siano delle linee guida internazionalmente riconosciute per approntare ed eseguire sia test di tossicità per inalazione acuta (OECD 403), sia test per somministrazioni ripetute (OECD 412), che test di tossicità sub cronica (OECD 413), sono state identificate alcune difficoltà peculiari degli studi per inalazione:

- la scelta della specie animale e le sue peculiari caratteristiche polmonari modulano il deposito e l'assorbimento della sostanza chimica presente nell'aria, potendo così influenzare i risultati degli studi *in vivo* e, di conseguenza, la valutazione degli effetti avversi sulla salute dell'uomo;

Scopo della Tesi

- generare e caratterizzare elevati volumi di aria-test e riprodurre le condizioni di esposizione richiede procedure complesse e costose che comportano l'utilizzo di attrezzature e l'impiego tecniche specializzate per mantenere e misurare le atmosfere-test;
- le motivazioni etiche, che richiedono che l'impiego degli animali nei test sperimentali debba essere ridotto e quando possibile sostituito.

Negli ultimi 20 anni la tossicologia *in vitro* è divenuta una delle aree di maggior sviluppo per la ricerca di metodi e applicazioni pratiche alternative all'utilizzo del modello animale. Numerosi test *in vitro* sono stati validati ed accettati dal punto di vista regolatorio, come quelli per la valutazione della tossicità oculare o cutanea (Klein et al., 2011). Ancora oggi, tuttavia, non sono disponibili linee guida validate per la valutazione delle sostanze chimiche nell'aria.

Utilizzando modelli *in vitro* di cellule delle vie respiratorie, cellule o tessuti polmonari con adeguati bio-marker di esposizione, è possibile soddisfare domande a cui gli studi classici di tossicologia non danno risposta (Veranth et al., 2007). Questi modelli hanno un ruolo importante soprattutto nello *screening* della tossicità del particolato atmosferico e delle particelle inalabili.

È noto che il *Fly Ash*, così come il materiale particolato (PM), contengono adsorbite sulla loro ampia superficie elevate quantità di sostanze tossiche quali diossine, idrocarburi policiclici aromatici e metalli (Pb, Cd, Ni, Cu, Zn, Mn, Fe). Queste componenti hanno la capacità di indurre la produzione di radicali liberi nel tratto respiratorio, causando stress ossidativo. Numerosi studi hanno dimostrato che alti livelli di ROS possono innescare una cascata di eventi associati ad infiammazione e, a concentrazioni più elevate, ad apoptosi (Xiao et al., 2003; Schafer et al., 2003; Donaldson et al., 2003). L'infiammazione può, a sua volta, aggravare lo stress ossidativo attraverso l'attività dei leucociti (Li et al., 2003).

Elevati livelli di particolato sono stati associati ad un aumento della comparsa di asma e broncopneumopatia cronica ostruttiva. L'inalazione di metalli tossici adsorbiti sulla superficie delle particelle (soprattutto il mercurio) è stata correlata con l'insorgenza di problemi emotivi e comportamentali nei bambini (autismo, dislessia, iperattività, difficoltà di apprendimento) e in negli adulti (violenza, demenza, depressione, morbo di Parkinson). Spesso la tossicità del particolato e del *Fly Ash* è il risultato di un effetto sinergico dei vari componenti tossici presenti. È noto che alcuni idrocarburi policiclici aromatici e metalli pesanti sono in grado di indurre modificazioni genetiche, che rappresentano un rischio non solo per le generazioni presenti, ma anche per quelle future (Thompson, Anthony, 2008).

Lo studio riportato nella prima parte di questa tesi ha lo scopo di definire il profilo tossicologico di un campione di *Fly Ash* ottenuto dall'inceneritore di rifiuti solidi urbani di Bolzano. Le ceneri leggere prodotte a seguito dei processi di combustione, in normali condizioni di esercizio vengono trattenute dai sistemi di filtraggio dell'inceneritore, ma, in caso d'incidente o malfunzionamento dell'impianto, potrebbero essere rilasciate nell'atmosfera e quindi entrare in contatto con l'uomo.

Lo studio è stato condotto sul *Fly Ash* tal quale (*Frazione Totale*, sospeso in terreno di coltura cellulare) e su tre frazioni (*Idrosolubile*, *Non-Idrosolubile* e *DMSO-solubile*

(dimetilsolfossido), ottenute al fine di poter meglio definire l'effetto tossico dovuto alla parte solubile in solvente acquoso, alla frazione estratta in solvente organico e alla parte non solubile.

Tutti gli esperimenti sono stati condotti su due linee cellulari polmonari umane immortalizzate:

- Cellule BEAS-2B, ottenute a partire da cellule di epitelio bronchiale umano normale e immortalizzate attraverso trasformazione con adenovirus 12-SV40 (Reddel et al., 1988);
- Cellule A549 (adenocarcinoma bronchiolo-alveolare), che mantengono un fenotipo alveolare umano (Giard et al., 1973).

Per delineare i meccanismi molecolari alla base dell'attività tossica del *Fly Ash* è stata innanzitutto valutata la capacità delle frazioni di influenzare la vitalità cellulare, utilizzando diversi tempi di esposizione e diverse concentrazioni. È stata quindi determinata la potenzialità dei vari trattamenti nell'indurre stress ossidativo attraverso la valutazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), la variazione dei livelli di glutatione (tGSH), principale antiossidante intracellulare, e l'espressione di un importante enzima up-regolato in presenza di stimoli pro-ossidanti: l'eme-ossigenasi-1 (HO-1).

Al fine di correlare lo stress ossidativo con l'infiammazione è stata valutata la capacità del *Fly Ash* e delle sue frazioni di indurre l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF-κB e la produzione di due interleuchine (IL-6 e IL-8) coinvolte nel processo infiammatorio polmonare.

Per meglio comprendere il contributo dello stress ossidativo all'effetto tossico delle frazioni, gli esperimenti sono stati condotti anche pretrattando le cellule con un antiossidante (N-acetilcisteina), esponendole poi alle stesse condizioni sperimentali già utilizzate.

La seconda parte del lavoro ha come obiettivo lo studio della tossicità di alcuni campioni di aria estratti da filtri posti in punti diversi della città di Bolzano e sul camino dell'impianto di incenerimento dei rifiuti, per poter valutare l'influenza delle emissioni in atmosfera dell'inceneritore, rispetto a campioni che risentono di altre fonti di inquinamento (traffico veicolare, riscaldamento domestico, emissioni naturali).

I campioni sono stati ottenuti con due diversi metodi di campionamento:

- *Campionamento attivo direzionale*: in grado di campionare su tre distinte cartucce, due delle quali vengono attivate in funzione della direzione del vento, mentre la terza si attiva quando c'è calma di vento. I campioni provenienti da questo sistema di filtri sono denominati: *Calma di vento*, *Settore 1*, che raccoglie il vento proveniente da nord, e *Settore 2*, che raccoglie il vento proveniente da sud, quindi dalla zona dell'inceneritore di Bolzano.
- *Campionamento a camino*: permette di dosare gli inquinanti in emissione, direttamente a camino dell'inceneritore, e consente di frazionare anche le particelle fini.

I meccanismi di tossicità sono stati studiati sulle due linee cellulari valutando sia l'influenza sulla proliferazione cellulare, che la capacità di indurre stress ossidativo (valutando la produzione di ROS) e risposta pro-infiammatoria (quantificando la secrezione nel terreno di coltura di IL-6 e IL-8).

MATERIALI E METODI

3.1 RACCOLTA E PREPARAZIONE DEI CAMPIONI

I campioni oggetto dello studio sono stati forniti dal Dott. Werner Tirler dell'EcoResearch di Bolzano.

FLY ASH

Il campione di *Fly Ash* (cenere leggera) è stato prelevato dal filtro a maniche della linea 1 dell'inceneritore di rifiuti solidi urbani di Bolzano, durante la marcia dell'impianto in ingresso al silos di stoccaggio. Il prelievo è stato eseguito nel mese di gennaio 2012.

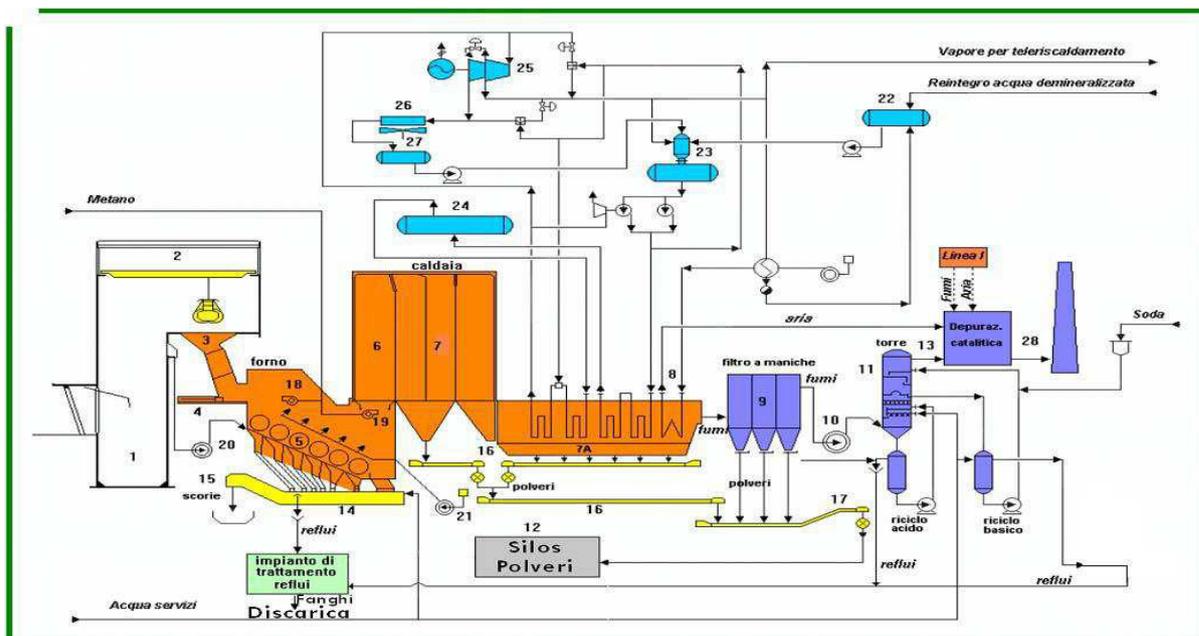


Fig. 1: Schema dell'impianto di incenerimento di rifiuti solidi urbani di Bolzano.

La cenere è stata suddivisa in aliquote: la prima è stata utilizzata tale quale, pesata e sospesa in terreno di coltura, contenente il 5% di siero fetale bovino, in modo da avere una concentrazione finale di 6 mg/ml (*Frazione Totale*); la seconda è stata pesata, sospesa in acqua bidistillata alla concentrazione di 60 mg/ml e lasciata in agitazione per 48 ore. Il campione è stato quindi centrifugato a 1200 x g in modo da separare il surnatante, contenente la frazione idrofila estratta dall'acqua (*Frazione Idrosolubile*), dal precipitato, contenente la frazione non idrofila. Il pellet restante è stato quindi risospeso in acqua bidistillata (*Frazione Non-Idrosolubile*). Infine un'ultima aliquota (*Frazione DMSO-solubile*) è stata ottenuta estraendo la parte organica della cenere tal quale mediante DMSO (dimetil-solfossido; Sigma-Aldrich, USA): la polvere è stata sospesa in DMSO alla concentrazione di 600 mg/ml e lasciata in agitazione per 48 ore. Il campione è stato quindi centrifugato per

Materiali e Metodi

separare il pellet dal surnatante contenente la frazione solubile. I campioni della *Frazione Idrosolubile* e *Non-Idrosolubile* (60 mg/ml in acqua) sono stati inizialmente diluiti 1:10 in terreno di coltura con 5% FBS, mentre la *Frazione DMSO-solubile* (600 mg/ml in DMSO) è stata diluita 1:100, in modo da non avere nel *medium* più del 10% d'acqua e più dell'1% di DMSO.

Le quattro frazioni estratte sono state estemporaneamente diluite in terreno di coltura contenente il 5% di siero alle concentrazioni: 0.046875; 0.09375; 0.1875; 0.375; 0.75; 1.5; 3 e 6 mg/ml. In base a prove preliminari, per lo studio sono state scelte tre concentrazioni: 0.046875 mg/ml, 0.375 mg/ml e 6 mg/ml.

CAMPIONI DERIVATI DA FILTRI DELL'ARIA

I campioni estratti dai filtri dell'aria sono ottenuti da due diversi metodi di campionamento:

- Campionamento attivo direzionale: in grado di campionare su tre distinte cartucce, due delle quali vengono attivate in funzione della direzione del vento, permettendo così di individuare la direzione di un eventuale flusso di inquinanti, mentre la terza si attiva quando c'è calma di vento (Windselect, Monitoring Systems).

I campioni provenienti da questo sistema di filtri sono stati denominati: *Calma di Vento*, *Settore 1*, che raccoglie il vento proveniente da nord, e *Settore 2*, che raccoglie il vento proveniente da sud, quindi dalla zona in cui è situato l'inceneritore di Bolzano.

- Campionamento a camino: permette di dosare gli inquinanti in emissione, direttamente a camino e permette di frazionare anche le particelle fini.

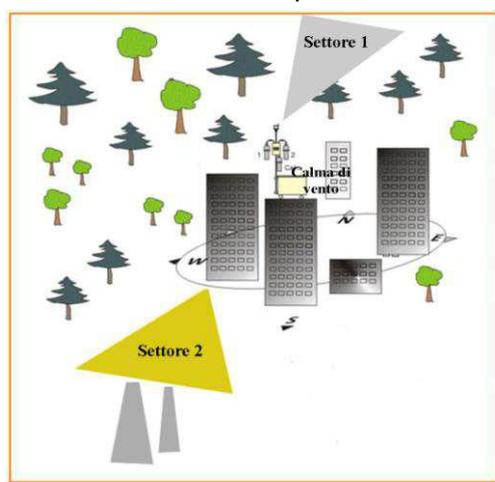
I campioni studiati provengono dal camino dell'inceneritore di Bolzano (*Camino dell'Inceneritore*) e dal camino di una classica stufa economica in cui sono stati volutamente bruciati materiali inquinanti, per ottenere un campione di controllo positivo (*Camino della Stufa*), altamente concentrato in diossine e idrocarburi policiclici aromatici.

I diversi campionatori sono stati posizionati nel mese di febbraio 2011 e i campioni analizzati subito dopo l'estrazione dai filtri.

Per ciascuno dei campioni ottenuti, il filtro della cartuccia di campionamento (in fibra di quarzo senza leganti, Munktell MK 360) è stato diviso a metà. Un'aliquota è stata estratta con toluene in soxhlet e purificata mediante sistema PowerPrep per le analisi chimiche, mentre la seconda aliquota è stata estratta utilizzando una miscela di diclorometano/acetone (1:1) in ultrasuoni per 30 min. Il solvente è stato evaporato in un evaporatore a controcorrente e l'estratto finale è stato ripreso in 1 ml di DMSO.

A questo trattamento è stato sottoposto anche un filtro nuovo, per valutare l'eventuale estrazione di sostanze rilasciate dal solo filtro al quarzo, il campione così ottenuto è stato impiegato come bianco per tutti gli esperimenti.

In base a prove preliminari, sono state utilizzate le diluizioni 1:10000, 1:1000 e 1:100 per il



campione *Camino della Stufa* e 1:200 e 1:100 per tutti gli altri campioni. Le varie diluizioni sono state preparate estemporaneamente con terreno di coltura con 5% FBS, in modo da avere una concentrazione finale di DMSO non superiore all'1%.

3.2 ANALISI DELLA DISTRIBUZIONE GRANULOMETRICA

L'analisi granulometrica del *Fly Ash* è stata effettuata mediante analizzatore granulometrico (TSI APS 3321, *Aerodynamic Particle Sizer*), strumento che, in base al tempo di volo, permette di rilevare le diverse classi granulometriche in funzione di un reale diametro aerodinamico (quello previsto per la determinazione delle frazioni di PM in aria ambiente) da 0.5 a 20 μm .

L'analizzatore utilizza il principio di inerzia per separare le particelle in base alle loro dimensioni. Le particelle vengono accelerate dal flusso d'aria in misura diversa a seconda della superficie delle particelle e della loro massa ed escono con velocità proporzionali al loro diametro aerodinamico. L'analizzatore misura la velocità delle particelle mentre passano attraverso due raggi laser separati di circa 200 μm e uno specchio ellittico raccoglie la luce dispersa e la convoglia su un rilevatore fotoelettrico.

Per l'analisi del *Fly Ash*, 10 g di polvere sono stati agitati a mano in un contenitore di alluminio di 500 ml di volume. Dopo sistemazione in posizione verticale del contenitore è stata aspirata una porzione di aerosol soprastante, che ha determinato l'analisi della granulometria dopo agitazione.

3.3 ANALISI DELLA SUPERFICIE PARTICELLARE E DELLA POROSITÀ

La tecnica di fisisorbimento di azoto permette di determinare l'area superficiale specifica di campioni solidi (tramite il modello di calcolo B.E.T) e la loro porosità usando i principi di adsorbimento e desorbimento fisico di gas (in questo caso l'azoto, N_2).

Il fisisorbimento di gas è un fenomeno di interazione superficiale tra gas e solido che è favorito dalla diminuzione di temperatura o dall'incremento di pressione; è un processo esotermico. La curva isoterma che si determina rappresenta la quantità molare di gas entrato in contatto con una fase solida ad una data temperatura in funzione della pressione relativa del sistema, ossia il rapporto tra pressione del gas soprastante il solido ma non interagente con esso e il valore di pressione di saturazione del gas alla temperatura di analisi. Lo strumento viene mantenuto a temperatura costante tramite immersione del porta-campione in azoto liquido. Il volume è espresso in condizioni normali (0 °C e 760 torr).

Attraverso una serie di operazioni di regressione lineare sui dati della curva isoterma, si ottiene una serie di grafici (area superficiale B.E.T. vs pressione relativa, volume assorbito vs spessore dello strato interessato dal fisisorbimento) tra i quali si riporterà quello della distribuzione dei pori espressa come derivata della curva di volume cumulativo dei pori vs diametro pori, utilizzando il metodo di calcolo BJH.

Le analisi sono state effettuate con lo strumento ASAP (*Accelerated Surface Area Porosimeter*) 2010 (Micrometrics). Il porosimetro per fisisorbimento si usa in genere per determinare pori dai 1.7 ai 300 nm di diametro.

3.4 ANALISI SEM-EDX

Il SEM (*Scanning Electron Microscopy*) è uno strumento che, come un microscopio ottico, permette di produrre una immagine ingrandita del campione in analisi. Il principio di funzionamento dell'apparecchiatura implica che un fascio di elettroni colpisca un'area del campione. In seguito agli urti si producono: gli elettroni secondari (espulsi dal campione a causa della ionizzazione generata dal fascio incidente per urti anelastici), quelli di *backscattering* (elettroni retrodiffusi, quindi elettroni del fascio originario che urtano in modo elastico la superficie del campione), i raggi X di fluorescenza e la catodoluminescenza (fascio di luce generato in seguito all'eccitazione da parte di un fascio elettronico). Tutti i segnali generati vengono letti da rivelatori che permettono di ricostruire un'immagine ingrandita in bianco e nero dell'area analizzata in base al tipo di segnale acquisito per ogni punto.

Le immagini sono state acquisite con diversi ingrandimenti mediante microscopio elettronico a scansione (Jeol-5500). Sono state condotte diverse analisi su un campione di *Fly Ash* il più possibile rappresentativo della cenere campionata.

L'analisi semi-quantitativa è stata eseguita mediante metodica EDX (*Energy Dispersive X-ray Microanalysis*), metodica analitica strumentale che sfrutta l'emissione caratteristica di raggi X generati da un fascio elettronico accelerato di elettroni incidente sul campione. La metodica di analisi EDX, non distruttiva e veloce, permette di analizzare campioni solidi stabili a bassa pressione e sotto l'azione del bombardamento elettronico. Questa tecnica consente di analizzare e riconoscere gli elementi chimici che costituiscono il campione. Quando ci si avvale dell'ausilio del SEM, è possibile abbinare le due tecniche e correlare la caratterizzazione morfologica con quella composizionale.

3.5 ANALISI HRGC-HRMS

L'analisi dei PCDD/F e degli IPA è stata effettuata mediante HRGC-HRMS (*High Resolution Gas Chromatography–High Resolution Mass Spectrometry*, gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa ad alta risoluzione) seguendo le metodiche US-EPA 1613/94 e US-EPA 1668A/99, che prevedono l'utilizzo della gascromatografia accoppiata alla spettrometria ad alta risoluzione, utilizzando la tecnica della diluizione isotopica (standards marcati ^{13}C) per compensare le eventuali perdite di analita.

Con questa metodica le varie specie chimiche che compongono il campione vengono separate durante il loro percorso nella colonna cromatografica e rilevate dallo spettrometro di massa. L'analisi gas-cromatografica accoppiata alla spettrometria di massa fornisce il profilo molecolare dettagliato dei composti organici, che vengono identificati mediante confronto con composti standard o librerie di spettri di massa.

Una parte dei filtri delle cartucce di campionamento ed un campione di *Fly Ash* sono stati estratti con toluene in soxhlet e purificati mediante sistema PowerPrep e quindi analizzati in HRGC-HRMS (ThermoFinnigan MAT 95 XP).

3.6 ANALISI ICP

La tecnica analitica di spettroscopia di emissione atomica è basata sull'acquisizione dello spettro emesso dagli atomi presenti in una soluzione incognita, preventivamente portati ad alta temperatura, i quali danno luogo a transizioni elettroniche da stati eccitati a stati a più bassa energia con l'emissione di radiazioni. L'insieme delle radiazioni emesse, o spettro, viene confrontato con apposite banche dati strumentali in cui sono riportate le principali frequenze di risonanza degli elementi conosciuti.

Infatti, nel caso particolare della tecnica ICP (*Inductively Coupled Plasma*), il gas argon viene ionizzato da una scarica elettrica e accelerato da un campo magnetico oscillante, generato da una bobina a radiofrequenze. Il plasma, un gas elettricamente neutro costituito da ioni ed elettroni, è un ottimo conduttore elettrico, con temperature operative di circa 5000-7000 K.

Lo strumento utilizzato è uno spettrometro ICP-OES-CCD (Spectro Ciro) con un sistema ottico circolare e schermo in cristalli al fluoruro di magnesio, il quale permette di operare a lunghezze d'onda inferiori ai 180 nm, e raggiungere così sensibilità maggiori (da 1 ppb a 100 ppm).

La *Frazione Idrosolubile* è stata analizzata tal quale, senza alcun pretrattamento. Per quanto riguarda la *Frazione DMSO-solubile*, invece, si è provveduto a diluire la soluzione in rapporto 1/50 sia in acqua distillata che in soluzione acida (HCl) 0.05 M. Infine la *Frazione Totale* è stata trattata con acqua regia (HCl/HNO₃) per 15 minuti, per permettere la totale solubilizzazione della cenere.

Analizzati i diversi campioni e confrontati i picchi di emissione degli spettri corrispondenti con le frequenze di risonanza tipiche per i vari elementi (ottenuti dall'analisi della soluzione standard di riferimento), è stato possibile determinare qualitativamente la composizione chimica della soluzione.

3.7 MODELLI CELLULARI

Sono state utilizzate due linee cellulari polmonari immortalizzate:

Cellule BEAS-2B - Le cellule della linea continua sono state ottenute a partire da cellule di epitelio bronchiale umano normale e sono state immortalizzate attraverso trasformazione con l'adenovirus 12-SV40 (Reddel et al., 1988). Tali cellule hanno un fenotipo di epitelio bronchiale, non sono cellule maligne, ma sono cellule in coltura continua, facilmente espandibili in laboratorio e in grado di generare dati confrontabili da laboratorio a laboratorio. La linea è stata fornita dall'Istituto di Ricerche Farmacologiche "Mario Negri" di Milano. Le cellule sono state coltivate in terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F-12), arricchito con 10% di siero fetale di bovino inattivato, 1% di glutammina 200 mM e 1% di soluzione penicillina/streptomina (10.000 U/10.000 µg/ml).

Cellule A549 - Linea cellulare di cellule neoplastiche in coltura continua ottenute da un paziente affetto da carcinoma bronchiolo-alveolare (Giard et al., 1973). Sebbene si tratti di cellule maligne, esse hanno la caratteristica di essere le uniche cellule in coltura che mantengono un fenotipo alveolare umano. La linea alveolare epiteliale umana è stata fornita dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia (BS). Le cellule sono

state coltivate in terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), arricchito con 10% di siero fetale di bovino inattivato, 2% di glutammina 200 mM e 1% di soluzione penicillina/streptomina (10.000 U/10.000 µg/ml).

Le due linee cellulari sono state coltivate in flasks da 25 cm² (BD Falcon, UK) e incubate a 37 °C con il 95% di umidità e il 5% di CO₂. Ogni due giorni sono state staccate con tripsina 0.25%, neutralizzate con siero fetale bovino, centrifugate per 10 minuti a 400 x g e risospese in terreno di coltura completo.

I terreni di coltura, la tripsina, la glutammina e la soluzione di pen/strep sono stati riforniti dalla Lonza (Switzerland); il siero fetale di bovino (FBS) è dell'EuroClone (Milano, Italia); il materiale plastico monouso utilizzato è della ditta DB Falcon (Plymouth, UK) e le sostanze impiegate sono state acquistate da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.8 ANALISI DELLA MORFOLOGIA CELLULARE: MICROSCOPIA OTTICA

I microscopi ottici trovano numerose applicazioni che sfruttano fonti luminose diverse e metodi differenti di formazione dell'immagine. Una metodica largamente utilizzata è la microscopia a contrasto di fase, utile nell'osservazione di oggetti molto trasparenti, come le cellule o i microrganismi, anche senza colorazione.

Le due linee cellulari sono state centrifugate per 10 minuti a 400 x g, seminate in piastre da 6 pozzetti ad una densità di 1×10^5 cellule/pozzetto. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, le cellule sono state trattate per 1 o 24 ore con la *Frazione Totale* di *Fly Ash* a concentrazioni comprese tra 0.046875 e 6 mg/ml. Al termine dell'esposizione, le cellule sono state lavate tre volte con PBS e mantenute in terreno completo.

L'analisi della morfologia cellulare è stata effettuata al microscopio ottico a contrasto di fase (Nikon Eclipse Ti-S, ingrandimento 20X) e le immagini sono state acquisite con fotocamera Nikon DS-FI1 mediante il software NIS Elements F.

3.9 ANALISI TEM

Il microscopio elettronico a trasmissione (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) è in grado di fornire informazioni circa la struttura interna del campione analizzato. Gli elettroni emessi dal catodo vengono accelerati dalla differenza di potenziale tra catodo e anodo e il fascio viene convogliato da una lente elettromagnetica sul campione biologico. Gli elettroni attraversano tutto il tubo cavo, in cui è applicato il vuoto, e raggiunto il preparato vengono in parte assorbiti (zone elettrondense), in parte deviati e in parte trasmessi, continuando poi il loro percorso attraverso le lenti (obiettivo e intermedia) che ingrandiscono l'immagine. I raggi elettronici sono dotati di scarso potere di penetrazione, pertanto è necessario che il materiale da osservare sia fissato, disidratato e ridotto in sezioni estremamente sottili (50-100 nm di spessore).

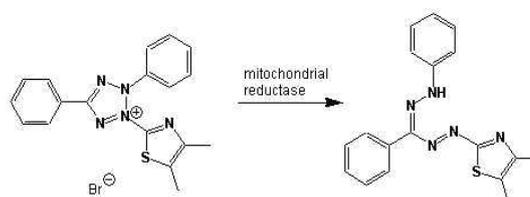
Le due linee cellulari sono state seminate in piastre da 6 pozzetti ad una densità di 2×10^5 cellule/pozzetto. Dopo 24 ore di incubazione, le cellule sono state trattate per 1 ora con la *Frazione Totale* di *Fly Ash* a concentrazione 0.046875 e 0.375 mg/ml. Al termine

dell'esposizione, le cellule sono state lavate con PBS, fissate per 1 ora a 4 °C in glutaraldeide 2.5% in tampone cacodilato di sodio 0.1 M pH 7.6. Dopo lavaggio con il tampone, sono state fissate con tetrossido di osmio 1% e ferricianuro di potassio 1% in tampone cacodilato 0.1M, disidratate in etanolo e incluse in Epon Araldite resin 812. Tutti passaggi sono stati condotti direttamente nella piastra. I campioni tagliati con lama di diamante allo spessore di 100nm sono stati contrastati con acetato di uranile e citrato di piombo e osservati al TEM FEI Tecnai G12 operando a 100KV.

3.10 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO

Per valutare l'influenza del trattamento con i campioni in esame sulla capacità di crescita cellulare, sono stati utilizzati due diversi saggi colorimetrici che agiscono con diverso meccanismo.

- **MTT TEST:** saggio che si basa sulla riduzione dei sali di tetrazolio a formazano da parte di un enzima respiratorio mitocondriale, la succinato-tetrazolio reductasi, attiva solo nelle cellule vive (Mossman T., 1983).

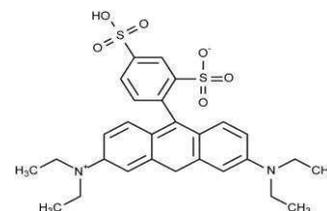


Le cellule sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di 5×10^4 cellule/pozzetto almeno in triplo. Dopo 24 ore dalla semina sono state trattate e lasciate in incubatore per 24, 48 e 72 ore. Al termine dei vari tempi di esposizione i pozzetti sono stati aspirati e lavati delicatamente con PBS per eliminare eventuali tracce dei trattamenti. Sono stati aggiunti 200 μ l di soluzione di MTT alla concentrazione di 0.5 mg/ml. La polvere di MTT (3-(4,5-dimetiltiazolo-2-1)-2,5-difeniltetrazolio bromuro) è stata pesata e sciolta in PBS in modo da ottenere una soluzione 5 mg/ml, che è stata poi diluita estemporaneamente 1:10 nel terreno di coltura cellulare con il 5% di siero.

Dopo 4 ore di incubazione ciascun pozzetto è stato svuotato e trattato con 150 μ l di DMSO per solubilizzare i cristalli viola di formazano.

L'assorbanza è stata poi valutata mediante un lettore di piastre (VICTOR™X3 2030 Multilabel Reader, Perkin Elmer, USA) a 570 nm, utilizzando il DMSO come bianco.

- **SRB ASSAY:** test che si basa sulla capacità della sonda colorata Sulforodamina B (SRB; Sigma-Aldrich, USA) di legarsi, in seguito a interazioni elettrostatiche e pH-dipendenti, ai residui aminoacidici basici delle proteine cellulari (Skehan et al., 1990).



Al termine dei trattamenti (gli stessi utilizzati con l'MTT test), i pozzetti sono stati aspirati e sono stati aggiunti 200 μ l di terreno incompleto fresco. Subito dopo, delicatamente, sono stati stratificati 25 μ l di acido tricloroacetico al 50% freddo (TCA), per fissare le cellule al fondo del pozzetto, la piastra è stata quindi lasciata in incubazione a 4 °C per 1 ora. Dopo 5 lavaggi effettuati con acqua bidistillata per eliminare l'acido tricloroacetico ed ogni possibile residuo proteico, la piastra è stata lasciata overnight a temperatura ambiente per permettere ai pozzetti di asciugarsi completamente. Sono stati poi aggiunti in ogni pozzetto 50 μ l della

Materiali e Metodi

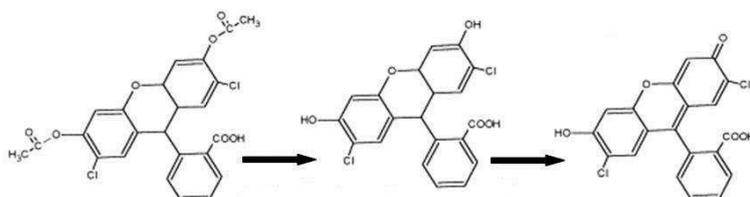
soluzione di SRB 0.4% (sciolta in acido acetico 1%) e la piastra è stata lasciata a temperatura ambiente per 30 minuti, al termine dei quali sono stati effettuati, velocemente, 4 lavaggi con 100 µl acido acetico 1%, sono stati quindi aggiunti in ciascun pozzetto 150 µl di Tris 10 mM a pH 10,5 per solubilizzare l'SRB legato alle proteine cellulari.

L'assorbanza è stata valutata mediante lettore di piastre (VICTOR™X3 2030 Multilabel Reader, Perkin Elmer, USA) a 570 nm; alcuni pozzetti privi di cellule sono stati trattati come sopra e utilizzati come bianco.

3.11 VALUTAZIONE DELLA PRODUZIONE DI ROS

Le cellule, seminate in piastre da 96 pozzetti con pareti nere ad una densità di 5×10^3 cellule/pozzetto, sono state trattate per 1 ora con i vari campioni alle solite concentrazioni. Durante gli ultimi 30 minuti di incubazione è stata aggiunta la sonda diclorofluorescina diacetato (DCFH-DA) sciolta in DMSO alla concentrazione 25 µM. Al termine del trattamento e dopo aspirazione, ai pozzetti sono stati aggiunti 150 µl di una soluzione di PBS con 2% di FBS e 0.02% di sodio azide (NaN_3).

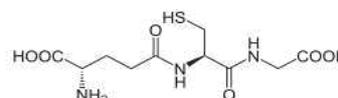
La DCFH-DA, nella forma acetilata, entra liberamente nelle cellule ove viene deacetilata ad opera di esterasi citoplasmatiche diventando impermeabile alla membrana plasmatica. In presenza di sostanze ossidanti, quali i ROS ed in particolare il perossido di idrogeno, la diclorofluorescina dà un prodotto fluorescente rilevabile nel verde (Nie, 2009).



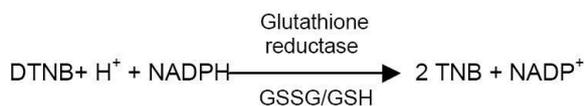
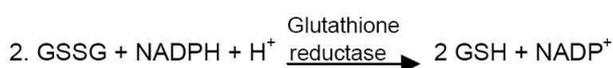
Per valutare i ROS prodotti in assenza di cellule, dovuti quindi alla sola interazione tra il *Fly Ash* e le componenti del siero presente nel *medium* di coltura, la soluzione di diclorofluorescina diacetato è stata sottoposta ad un pre-trattamento con NaOH 0.1 M e neutralizzazione con HCl 0.1 M (Deshpande, 2002), in modo da mimare la deacetilazione solitamente compiuta dalle esterasi citoplasmatiche; il composto che si forma è suscettibile all'ossidazione ad opera delle specie reattive dell'ossigeno. La fluorescenza emessa è stata immediatamente valutata mediante un lettore di piastre, a $\lambda_{ec/em} = 488/525$ nm (VICTOR™X3 2030 Multilabel Reader, Perkin Elmer, USA).

3.12 DOSAGGIO DEL GLUTATIONE RIDOTTO TOTALE

La concentrazione di glutathione ridotto totale (tGSH) presente nei campioni è stata valutata utilizzando il Glutathione Assay Kit (Sigma-Aldrich) che si basa su un metodo cinetico in cui il GSH



riduce l'acido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) ad acido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB di



colore giallo), mentre il GSSG che si forma viene riutilizzato dalla glutatione riduttasi in presenza di NADPH.

Le cellule, seminate in Petri da 10 cm di diametro alla densità di 5×10^6 cellule/Petri, sono state trattate per 1 ora con le varie diluizioni delle diverse frazioni. Le cellule sono state quindi staccate dal substrato di crescita, lavate con PBS, risospese in 1 ml di PBS in modo da avere almeno 10^6 cellule/ml, centrifugate in microcentrifuga a $600 \times g$. Al pellet sono stati aggiunti 3 volumi di soluzione di SSA (acido solfo salicilico) al 5% in modo da eliminare le proteine. Le sospensioni ottenute sono state congelate (in azoto liquido) e scongelate (in bagno a $37^\circ C$) per 2 volte, lasciate a $2-8^\circ C$ per 5 minuti e quindi centrifugate a $10000 \times g$ per 10 minuti. Il surnatante è stato raccolto, misurato il volume per il calcolo della quantità di glutatione, e conservato a $-80^\circ C$.

In una piastra da 96 pozzetti sono stati aggiunti in duplicato $10 \mu l$ dei vari campioni e $150 \mu l$ di una soluzione contenente glutatione riduttasi (6 unità/ml) e DTNB (1.5 mg/ml). La piastra è stata lasciata per 5 minuti a temperatura ambiente e quindi sono stati aggiunti $50 \mu l$ della soluzione contenente NADPH (0.16 mg/ml). Per la curva di taratura sono state utilizzate soluzioni standard di glutatione.

Il contenuto di glutatione totale nei campioni, proporzionale alla quantità di TNB che si forma, è stato valutato spettrofotometricamente. L'assorbanza è stata misurata (VICTOR™X3 2030 Multilabel Reader, Perkin Elmer, USA) a 405 nm ad intervalli di 1 minuto per 5 minuti. All'assorbanza dei campioni è stato sottratto il valore del bianco.

I valori di assorbanza delle soluzioni a concentrazione nota di glutatione permettono di costruire la curva di taratura ed inoltre di calcolare la $\Delta A_{405}/min$ equivalente ad 1 nmole di GSH per pozzetto. La concentrazione di GSH presente nei campioni è data dalla formula:

$$\text{Npmoli GSH/ml di campione} = \frac{\Delta A_{405}/min (\text{campione}) \times \text{dil}}{\Delta A_{405}/min (1 \text{ nmole}) \times \text{vol}}$$

Dove $\Delta A_{405}/min (\text{campione})$ è la pendenza generata dai campioni, $\Delta A_{405}/min (1 \text{ nmole})$ è la pendenza calcolata dalla curva standard per 1 nmole di GSH, dil è il fattore di diluizione del campione e vol il volume del campione in ml.

3.13 ESPRESSIONE DI HO-1 E NF-KB p65: WESTERN BLOTTING

Le due linee cellulari sono state seminate in piastra da 6 pozzetti ad una densità di 10^5 cellule/pozzetto. Dopo 24 ore di incubazione, le cellule sono state esposte per 1 ora al *Fly Ash* e alle sue frazioni a concentrazioni di 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml o per 24 ore alle due concentrazioni più basse.

Al termine dei trattamenti i pozzetti sono stati lavati accuratamente con PBS a temperatura ambiente, mantenuti in ghiaccio e trattati con $90 \mu l$ di *RIPA Buffer* contenente gli inibitori delle proteasi (Protease inhibitor cocktail tablets, Roche Diagnostics, Germany). Dopo 5 minuti le cellule sono state staccate dal substrato di crescita e centrifugate a $4^\circ C$ per 10 minuti a $14000 g$. Il contenuto totale di proteine è stato quantificato mediante il kit *DC Protein Assay* (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) usando come standard per la retta di taratura albumina bovina a concentrazioni comprese tra 0 e 10 mg/ml. Ai lisati è stato aggiunto

Materiali e Metodi

Laemmli Buffer 5X [250 mM Tris-HCl pH=6.8, 50% glicerolo, 10% SDS, 500 mM β -mercaptoetanol, 0.004% blu di bromofenolo, in H₂O], lasciati a 100 °C per 5 minuti per denaturare le proteine e quindi conservati a -80 °C.

L'espressione delle proteine è stata valutata mediante il saggio di *Western Blotting* (Bio-Rad Mini-PROTEAN® Tetra System). I lisati sono stati caricati su gel di acrilamide al 10%, in modo da caricare 40 μ g di proteine per ciascun campione, le proteine sono state quindi separate mediante corsa elettroforetica in *Running Buffer* [25 Mm TRIS, 250 mM glicina, 0.1% SDS, in H₂O] mantenendo il voltaggio costante a 200 V.

Terminata la corsa elettroforetica, le proteine sono state trasferite dal gel ad una membrana di PVDF (polivinilidenefluoruro) attivata in metanolo (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) in *Transfer Buffer* [25 mM Tris, 192 mM glicina, in H₂O] mantenendo per 1 ora e 45 minuti una corrente costante di 250 mA. La membrana è stata quindi immersa in una soluzione di latte al 10% in TBS-T 1X [10 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20, in H₂O] per 1 ora per saturare tutti i siti aspecifici. Dopo alcuni lavaggi con TBS-T 1X è stato aggiunto l'anticorpo primario monoclonale anti HO-1 da *mouse* (Abcam, Cambridge, UK), diluito 1:250 in latte al 2%, la membrana è stata poi incubata in agitazione a 4 °C overnight. Dopo 3 lavaggi in TBS-T 1X la membrana è stata immersa in una soluzione di anticorpo secondario policlonale anti-*mouse* IgG, coniugato alla perossidasi di rafano (Dako, Glostrup, Denmark), diluito 1:10000 in TBS-T 1X, e lasciata ad incubare per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente.

La membrana è stata marcata anche con un anticorpo primario policlonale anti NF- κ B p65 da *rabbit* (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg, Germany), diluito 1:200 in latte al 5% ed incubata in agitazione a 4 °C overnight. Dopo 3 lavaggi in TBS-T 1X la membrana è stata immersa in una soluzione di anticorpo secondario anti-*rabbit* IgG, coniugato alla perossidasi di rafano (PerkinElmer, USA) diluito 1:3300 in TBS-T 1X, e lasciata ad incubare per 1 ora in agitazione a temperatura ambiente.

Per normalizzare i risultati ottenuti è stata valutata, anche l'espressione della β -actina. In questo caso la membrana è stata marcata con anticorpo primario monoclonale anti β -actina da *mouse* (Abcam, Cambridge, UK), diluito 1:7000 in latte al 2% e quindi anticorpo secondario policlonale anti-*mouse* IgG, coniugato alla perossidasi di rafano, diluito 1:10000 in TBS-T 1X.

Il segnale è stato visualizzato utilizzando un kit chemiluminescente (Luminata Classico Western HRP Substrate, Millipore, Charlottesville, VA, USA) e analizzato mediante il VersaDoc MP 4000 Imaging System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

3.14 TRASLOCAZIONE NUCLEARE DI NF- κ B p65: IMMUNOCITOCHIMICA

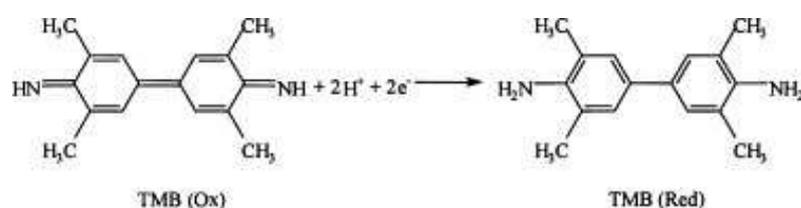
Il microscopio confocale è formato da diversi elementi: un microscopio ottico tradizionale con obiettivo invertito, caratteristica che agevola l'intervento sul campione che si sta osservando; un modulo di scansione che permette la scansione del fascio luminoso sul campione; un modulo di eccitazione composto da tre linee laser di diversa lunghezza d'onda (blu: 488 nm, verde: 543 nm, rosso: 633 nm) che vengono utilizzate per eccitare le molecole

fluorescenti. Questo microscopio permette di effettuare il cosiddetto “sezionamento ottico” cioè di ricavare in successione immagini dei piani del campione (piani xy, così come xz o yz). Il campione viene illuminato con un fascio di luce laser focalizzato su di un punto molto piccolo, la cui emissione di luce è vista da un sistema di collettori che analizzano solo il segnale emesso da questo punto. La caratteristica del confocale è proprio quella di visualizzare ogni singolo strato eliminando le componenti di luce emessa al di sopra e al di sotto del piano focale in analisi. È possibile variare il piano focale muovendosi lungo l’asse ottico e quindi ricostruire, dall’unione di tutte le sezioni, la struttura tridimensionale del campione.

Le cellule sono state seminate su vetrini posti in piastre da 24 pozzetti ad una densità di 1×10^5 cellule/ml. Dopo 24 ore di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO₂, le cellule sono state esposte per 2 ore a 0.046875 e 0.375 mg/ml di *Frazione Totale*. Le cellule sono state quindi lavate con PBS, fissate con p-formaldeide 4% per 15 minuti e quindi lavate per 3 volte con PBS. Ogni pozzetto è stato trattato per 5 minuti con una soluzione di Triton X-100 (0.1% in PBS) per permeabilizzare le membrane e quindi per 20 minuti con una soluzione di PBS contenente il 7% di FBS per togliere l’aspecificità dell’anticorpo. I vetrini sono stati lavati ed esposti all’anticorpo primario anti NF-kB p65 diluito 1:200 in PBS contenente il 7% di FBS. Dopo 1 ora di incubazione a 37 °C e 3 lavaggi in PBS, i vetrini sono stati trattati con anticorpo secondario policlonale DyLight-488 anti rabbit IgG coniugato a DyLight 488, segnale verde (Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove, PA, USA) diluito 1:1000 e con TOTO-3 iodide (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) diluito 1:500, fluoroforo intercalante che permette di evidenziare i nuclei ($\lambda_{ec/em} = 642/660$ nm), in PBS con il 3% di FBS. Dopo 5 minuti i vetrini sono lavati con PBS e con acqua bidistillata per eliminare tutti i sali e quindi fissati a vetrini porta-oggetto mediante Mowiol. La fluorescenza è stata rilevata al microscopio confocale (Nikon Eclipse-1, obiettivo Nikon PlanApo 60X 1.40 oil) mediante il software Nikon EZ-C1, versione 3.91.

3.15 DOSAGGIO DELLE INTERLEUCINE

Il test ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*), è una tecnica utilizzata per il rilevamento e la quantificazione delle proteine tipicamente secrete o rilasciate dalle cellule. Immobilizzando un anticorpo specifico per la cattura del target su una proteina ad elevata capacità di legame, l’ELISA è capace di catturare la proteina bersaglio che viene poi rilevata attraverso l’anticorpo specifico coniugato con la biotina. La proteina bersaglio viene quantificata mediante una reazione colorimetrica basata sull’attività della perossidasi legata alla streptavidina, che si lega all’anticorpo coniugato con la biotina, su un substrato specifico (TMB, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina).



Materiali e Metodi

Le cellule sono state seminate in piastre da 24 pozzetti alla concentrazione di 2.5×10^4 cellule/pozzetto e trattate per 24 ore con le diluizioni delle varie frazioni. I medium di coltura sono stati raccolti, centrifugati a $1500 \times g$ per 10 minuti e congelati a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

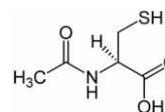
Il kit utilizzato (Instant ELISA, eBioscience, USA) contiene una piastra da 96 pozzetti rivestiti sul fondo da un anticorpo monoclonale specifico per l'IL-6 o per l'IL-8 umane, dall'anticorpo coniugato con la biotina (anticorpo di rilevamento) e la streptavidina legata alla perossidasi (enzima tracciante) utilizzata per legare l'anticorpo di rilevamento. In questi pozzetti pretrattati sono stati aggiunti $100 \mu\text{l}$ di acqua distillata e $50 \mu\text{l}$ di ciascun campione. La piastra è stata lasciata in agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. In questo unico passaggio avviene il legame dell'interleuchina con l'anticorpo sul fondo del pozzetto, l'anticorpo coniugato con la biotina si lega all'IL legata e la streptavidina coniugata con la perossidasi del rafano si lega a sua volta alla biotina, per la quale ha un'elevata affinità.

Dopo l'incubazione, i surnatanti sono stati aspirati e i pozzetti sono stati lavati sei volte per eliminare eventuali residui e rimuovere la streptavidina-HRP non legata. Sono stati quindi aggiunti $100 \mu\text{l}$ di una soluzione contenente la 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB), la quale porta alla formazione di un composto color blu in proporzione alla quantità di analita presente nel campione. Dopo 10 minuti, si aggiungono $100 \mu\text{l}$ di *Stop Solution*, contenente acido fosforico 1 M, che blocca la reazione e fa virare il colore verso il giallo. L'intensità della colorazione del pozzetto è proporzionale alla quantità di IL-6 o IL-8 presente nel campione e viene quantificata valutando l'assorbanza a 450 nm mediante un lettore di piastre (VICTOR™X3 2030 Multilabel Reader, Perkin Elmer, USA).

Utilizzando concentrazioni note delle due interleuchine vengono ricavate le curve di taratura per determinarne la concentrazione nei campioni testati.

3.16 PRE-TRATTAMENTO CON N-ACETILCISTEINA

Per stabilire le condizioni sperimentali per la valutazione dell'effetto del pre-trattamento con N-acetilcisteina (NAC) è stato necessario valutare preventivamente la sua influenza sulla crescita cellulare dopo 24 ore di esposizione.



Le due linee cellulari sono state seminate in piastre da 96 pozzetti alla densità di 5×10^3 cellule/pozzetto, sono state lasciate in incubazione per 24 ore a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ in presenza del 5% di CO_2 e quindi trattate per 24 ore con NAC alle concentrazioni 1, 10, 100, 1000 e 10000 μM . Al termine del trattamento sono stati condotti in parallelo MTT test e SRB assay. Gli altri esperimenti sono stati condotti con NAC alla concentrazione di 10 mM.

Per valutare l'effetto del pre-trattamento con NAC, le cellule sono state seminate alle stesse condizioni utilizzate in precedenza e quindi trattate con N-acetilcisteina 10 mM. Dopo 24 ore il NAC è stato aspirato, le cellule lavate delicatamente con PBS e quindi esposte per 1 ora alla sola *Frazione Totale* alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml.

Sono stati quindi nuovamente studiati con i medesimi protocolli sopra riportati: la variazione della produzione delle specie reattive dell'ossigeno, il dosaggio del glutatione ridotto totale, la secrezione di interleuchina 6 e 8 e l'influenza sulla vitalità cellulare.

3.17 ANALISI STATISTICA

Tutti gli esperimenti sono stati condotti almeno in triplo ed i risultati sono stati espressi come valore medio \pm deviazione standard (SD). I gruppi di dati sono stati comparati rispetto al gruppo di controllo utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) seguita dal test di Dunnett. Per valutare la significatività dei pre-trattamenti con NAC, rispetto alle cellule esposte alla sola *Frazione Totale*, i dati sono stati comparati mediante *t*-test. Un valore di $P < 0.05$ indica una significativa differenza tra i gruppi di valori confrontati. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il programma Prism 3.03 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Capitolo 4

RISULTATI

4.1 PROFILO TOSSICOLOGICO DEL FLY ASH

Lo studio delle proprietà tossicologiche dei sottoprodotti del processo di incenerimento di rifiuti solidi urbani si è inizialmente incentrato sulla caratterizzazione chimico-fisica del *Fly Ash* (cenere leggera bloccata dai filtri prima dell'emissione del camino), al fine di valutare il potenziale tossico dovuto alle dimensioni particellari e ai composti adsorbiti sulla superficie della cenere.

L'indagine è poi proseguita analizzando gli effetti tossici su due linee cellulari polmonari di derivazione umana, ponendo particolare attenzione ai meccanismi molecolari coinvolti. In particolare, è stata valutata l'induzione di stress ossidativo, quantificando la produzione di ROS, i livelli di tGSH e l'espressione dell'HO-1, correlandolo con il possibile innesco di meccanismi associati all'infiammazione, analizzando l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B e la secrezione di IL-6 e IL-8. È stato inoltre studiato l'effetto del pre-trattamento con N-acetilcisteina, che, grazie alle sue proprietà, funge da *scavenger*, ristabilendo così le difese antiossidanti intracellulari.

4.1.1 DISTRIBUZIONE GRANULOMETRICA

Lo studio della distribuzione granulometrica del *Fly Ash* prelevato dall'impianto di Bolzano, evidenzia che la maggior parte delle particelle ha un diametro aerodinamico inferiore ai 10 μ m (PM₁₀). L'analisi è stata condotta anche dopo blanda agitazione, in modo da mimare un aerosol inalabile, in tal caso è stato evidenziato un picco massimo

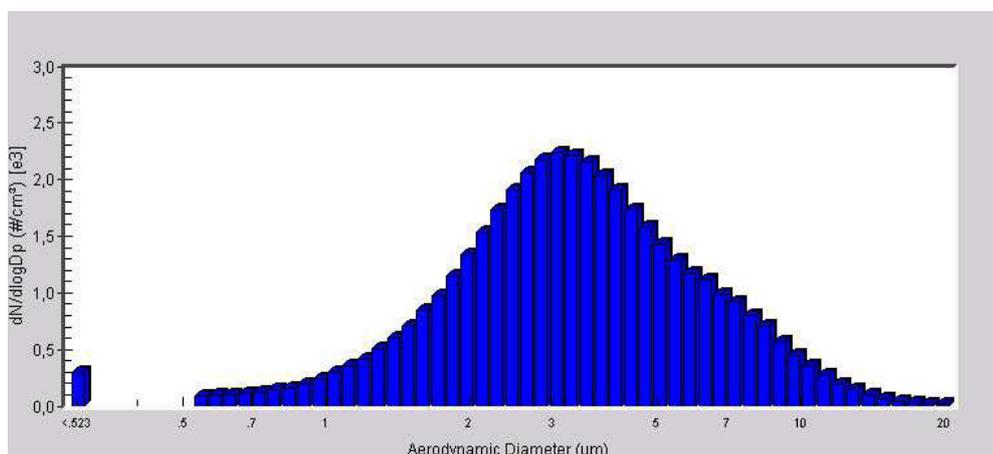


Fig. 1a: Determinazione della distribuzione granulometrica durante agitazione blanda.

Risultati

di particelle con diametro aerodinamico attorno ai 3 μm (Fig. 1a).

La distribuzione cambia di poco quando, per scuotimento violento, si cerca di sospendere il massimo delle particelle. Si ottiene così un leggero aumento di quelle con diametro di circa 7 μm e di quelle con diametro inferiore a 0.5 μm (Fig. 1b), fatto che suggerisce una rottura meccanica dei grossi agglomerati con liberazione di piccole particelle.

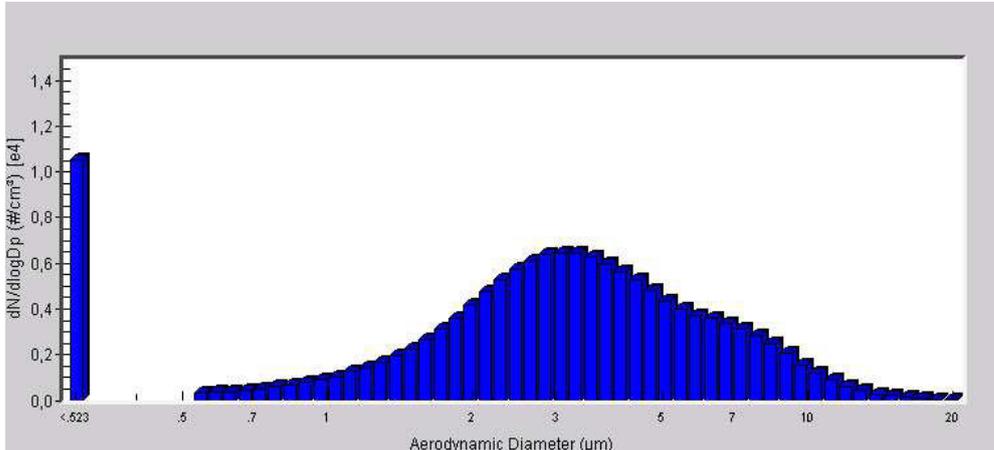


Fig. 1b: Determinazione della distribuzione granulometrica durante agitazione violenta.

4.1.2 ANALISI DELLA SUPERFICIE PARTICELLARE E DELLA POROSITÀ

La tecnica permette di determinare l'area superficiale specifica delle particelle del *Fly Ash* (tramite il modello di calcolo B.E.T.) e la loro porosità usando i principi di adsorbimento e desorbimento fisico di azoto (N_2).

La forma dell'isoterma (Fig. 2) è riconducibile al tipo IIb (secondo la classificazione IUPAC), indicando quindi un solido dalla superficie non porosa o comunque che presenta diverse eterogeneità per quanto riguarda l'interazione con il gas adsorbito.

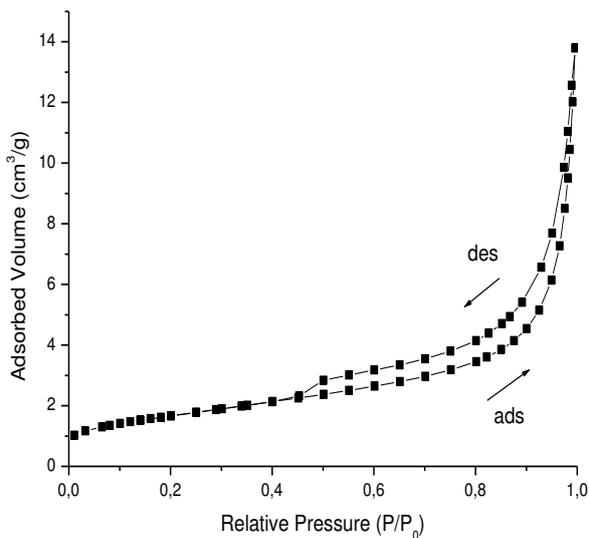


Fig. 2: Curva isoterma di fisisorbimento.

L'esistenza poi di un ciclo di isteresi riconducibile al tipo H3 è probabilmente dovuto alla presenza di aggregati di particelle solide di forma discoidale con pori a simmetria cilindrica (*slit-shape*) non rigidi; quindi la presenza di pori è legata essenzialmente alla formazione di vuoti tra i diversi aggregati.

Il valore di area superficiale specifica, calcolato secondo il metodo B.E.T., risulta essere pari a $5.93 \pm 0.04 \text{ m}^2/\text{g}$.

4.1.3 ANALISI SEM-EDX

Sono state condotte diverse analisi SEM (microscopia elettronica a scansione) su un campione il più possibile rappresentativo della cenere.

Le immagini indicano notevoli disomogeneità morfologiche soprattutto per quanto riguarda le dimensioni delle particelle che compongono la cenere (Fig. 3a).

Si è quindi proceduto con l'analisi semi-quantitativa del campione, relativa all'immagine acquisita, mediante tecnica EDX (analisi elementare di fluorescenza X).

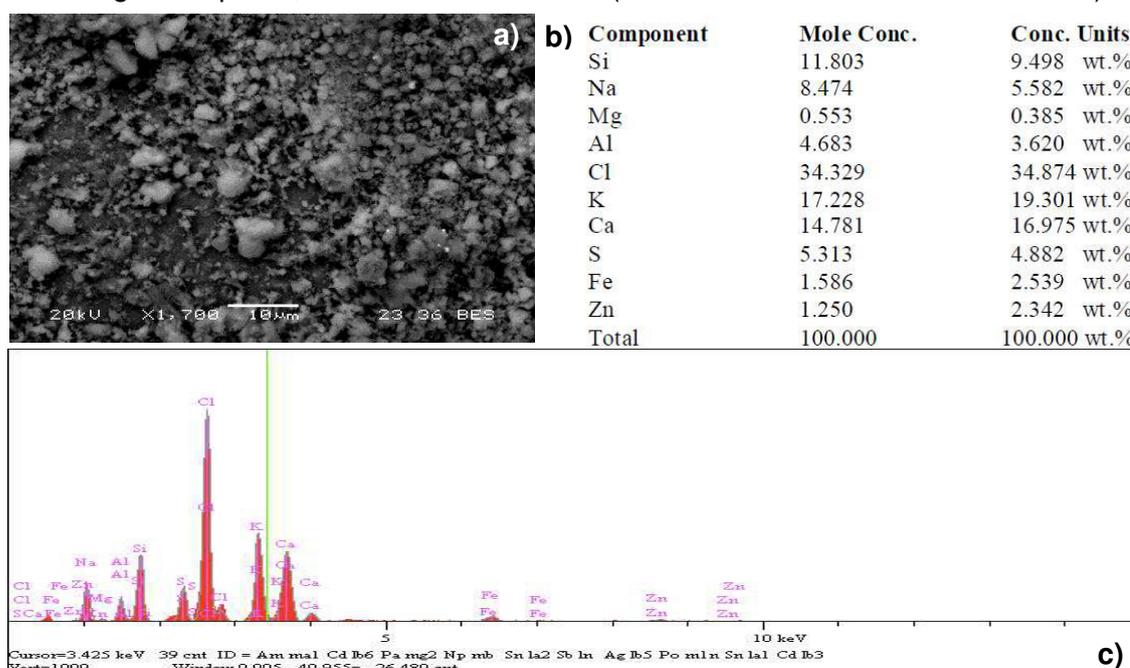


Fig. 3: Immagine SEM (a), spettro dell'analisi elementare di fluorescenza X (c) e tabella riassuntiva dell'analisi semi-quantitativa (b) della porzione di Fly Ash scansionata.

L'analisi (Fig. 3b e 3c) ha messo in luce una notevole presenza di cloro (Cl), potassio (K), sodio (Na) e calcio (Ca). Inoltre, la presenza di silicio (Si) e alluminio (Al) fa supporre la presenza di materiale silico-alluminato. A concentrazioni minori, si riscontra la presenza anche di ferro (Fe), zinco (Zn), zolfo (S) e magnesio (Mg).

Durante l'analisi si sono evidenziati numerosi grani con morfologia globulare, che sono stati analizzati più nel dettaglio nell'immagine SEM mostrata in Figura 4. L'analisi EDX ha rivelato la presenza di argento (zona 1), confermata anche nell'analisi della zona 3, mentre nella zona 4 sono presenti soprattutto cloro, potassio, sodio e silicio.

In conclusione, dopo l'analisi di numerosi campi, si è evidenziata la presenza di una frazione a base di cloruri, quindi solubili in acqua, ed una frazione di minerali silico-alluminatici. Inoltre è accertata la presenza di particelle metalliche (nel caso specifico Ag) riconoscibili per la loro morfologia tondeggiante e per la loro conducibilità, che le fa apparire più chiare di colore rispetto alle altre polveri presenti.



Fig. 4: Immagine SEM del Fly Ash.

4.1.4 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA HRGC-HRMS

I risultati ottenuti studiando la composizione chimica del *Fly Ash* tal quale mediante HRGC-HRMS (Gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione) evidenziano la presenza, seppur esigua, di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e di para-dibenzo-diossine e para-dibenzo-furani, mentre è presente una notevole concentrazione di cloruri (Tab. 1).

Per quanto riguarda i metalli pesanti tra quelli classificati come tossici sono da segnalare significative quantità di zinco (Zn) e stagno (Sn), mentre tra quelli classificati come molto tossici sono presenti importanti concentrazioni di piombo (Pb), antimonio (Sb), cadmio (Cd), cromo (Cr) e nichel (Ni).

Composizione	Concentrazione (mg/Kg)	Composizione	Concentrazione (mg/Kg)
IPA	0.857	Molibdeno	43
Dibenzodiossine	0.019	Nichel	136
Dibenzofurani	0.006	Piombo	3390
Antimonio	1250	Selenio	10.3
Arsenico	59	Stagno	1350
Cadmio	412	Tallio	22
Cobalto	22	Tellurio	< 3
Cromo (VI)	< 1	Vanadio	5.9
Cromo totale	510	Zinco	15600
Mercurio	21	Cloro	184000

Tab. 1: Caratterizzazione chimica del *Fly Ash* mediante HRGC-HRMS.

4.1.5 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA ICP

Le *Frazioni Totale, Idrosolubile e DMSO-solubile* sono state poi analizzate mediante tecnica di emissione atomica con utilizzo di plasma prodotto per accoppiamento induttivo (ICP). Le analisi, riportate in Tabella 2, hanno rivelato la presenza nel *Fly Ash* tal quale di importanti concentrazioni di calcio, sodio e potassio e confermato la presenza di metalli pericolosi evidenziati nelle precedenti analisi (Cr, Cd, Pb, Zn).

L'analisi della *Frazione Idrosolubile* (Tab. 2b) evidenzia l'assenza di numerosi elementi, soprattutto di metalli pesanti. Nella *Frazione DMSO-solubile*, infine, è presente pressoché tutto ciò che si trova nella *Frazione Totale* (ad eccezione del Co), anche se a concentrazioni generalmente inferiori (Tab. 2c).

Frazione Totale (mg/l)		Frazione Idrosolubile (mg/l)		Frazione DMSO-solubile (mg/l)	
Ag 0.006	K 7.8	Ag ---	K 33.22	Ag 0.006	K 5.2
Al 5.6	Li 0.017	Al 102.7	Li 0.0113	Al 0.025	Li 0.0065
Ba 0.3	Mg 5.6	Ba 0.0128	Mg 0.0219	Ba 0.014	Mg 0.007
Ca 68.9	Mn 0.3	Ca 28.67	Mn ---	Ca 17.6	Mn 0.003
Cd 0.1	Na 24	Cd ---	Na 35.6	Cd 0.4215	Na 22.4
Co 0.02	Pb 1.3	Co ---	Pb ---	Co ---	Pb 1.25
Cr 0.1	Sr 0.1	Cr 0.0238	Sr 0.04	Cr 0.0015	Sr 0.0035
Cu 0.47	Zn 10.4	Cu ---	Zn ---	Cu 0.089	Zn 2.2
Fe 2.3	a)	Fe ---	b)	Fe 0.017	c)

Tab. 2: Analisi ICP della *Frazione Totale* (a), *Idrosolubile* (b) e *DMSO-solubile* (c).

4.1.6 INFLUENZA SULLA MORFOLOGIA CELLULARE

Le cellule BEAS-2B e A549, esposte per 1 ora a 2 diverse concentrazioni della *Frazione Totale*, sono state analizzate al microscopio ottico a contrasto di fase.

Come evidenziato in Figura 5, già alla concentrazione minore (0.046875 mg/ml) le particelle di cenere sono in grado di entrare nelle cellule, in modo particolarmente evidente nelle cellule BEAS-2B (Fig. 5b). All'aumentare della concentrazione (0.375 mg/ml), il fenomeno è ancor più rilevante, come mostrato in Figura 5c, per quanto riguarda le cellule BEAS-2B, ed in Figura 5f, per le cellule A549.

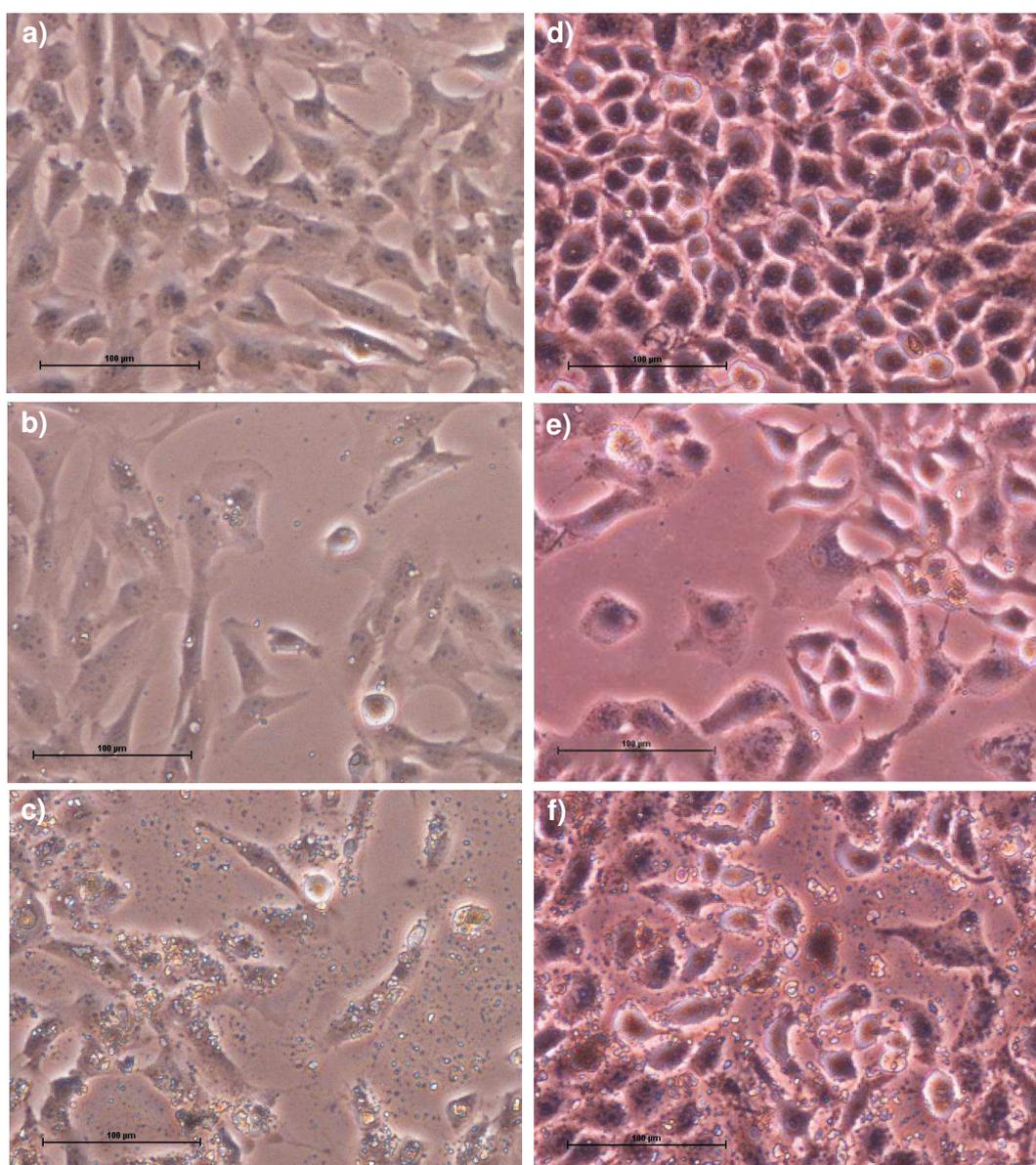


Fig. 5: Immagini di microscopia ottica a contrasto di fase (ingrandimento 20x) dopo 1 ora di esposizione alla *Frazione Totale* delle cellule BEAS-2B: Controllo (a), 0.046875 mg/ml (b) e 0.375 mg/ml (c) e delle cellule A549: Controllo (d), 0.046875 mg/ml (e) e 0.375 mg/ml (f).

4.1.7 ANALISI TEM

Le analisi effettuate mediante microscopia elettronica a trasmissione (TEM) chiariscono i meccanismi di internalizzazione del *Fly Ash* nelle cellule. Come mostrato in Figura 6, dopo 1 ora di esposizione alla *Frazione Totale*, le particelle di cenere, di forma e dimensione estremamente variabile, vengono endocitate dalle BEAS-2B, risultano infatti ben evidenti vescicole citoplasmatiche (Fig. 6c-6f).

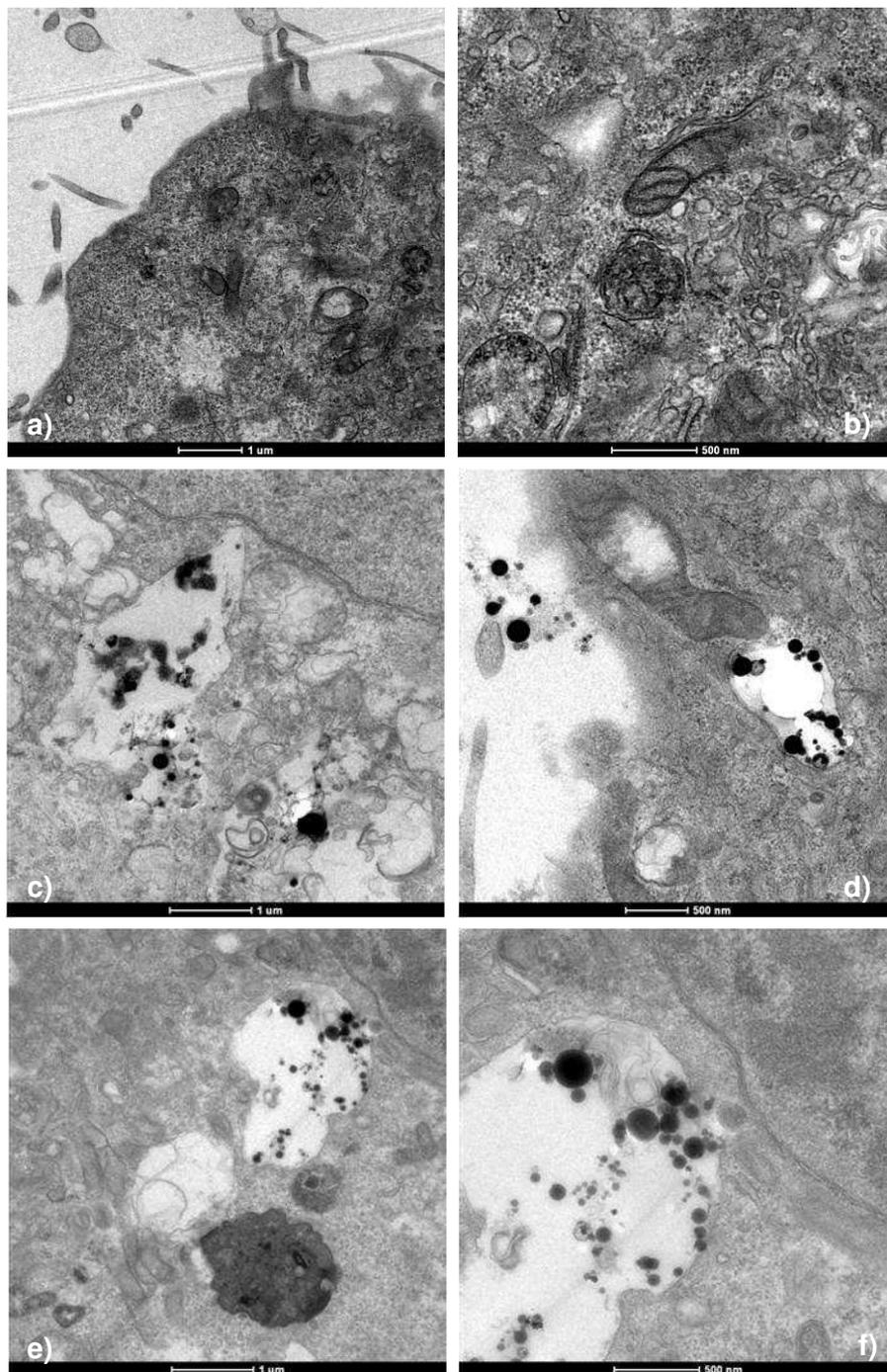


Fig. 6: Immagini di microscopia elettronica a trasmissione dopo 1 ora di esposizione alla *Frazione Totale* delle cellule BEAS-2B: Controllo (a,b), 0.046875 mg/ml (c,d) e 0.375 mg/ml (e,f).

Anche le cellule A549 internalizzano il *Fly Ash*, tuttavia il meccanismo coinvolto sembra essere diverso: infatti, più che essere incluse in vescicole, sembrano essere libere nel citosol, tra un organello e l'altro (Fig. 7c-7f).

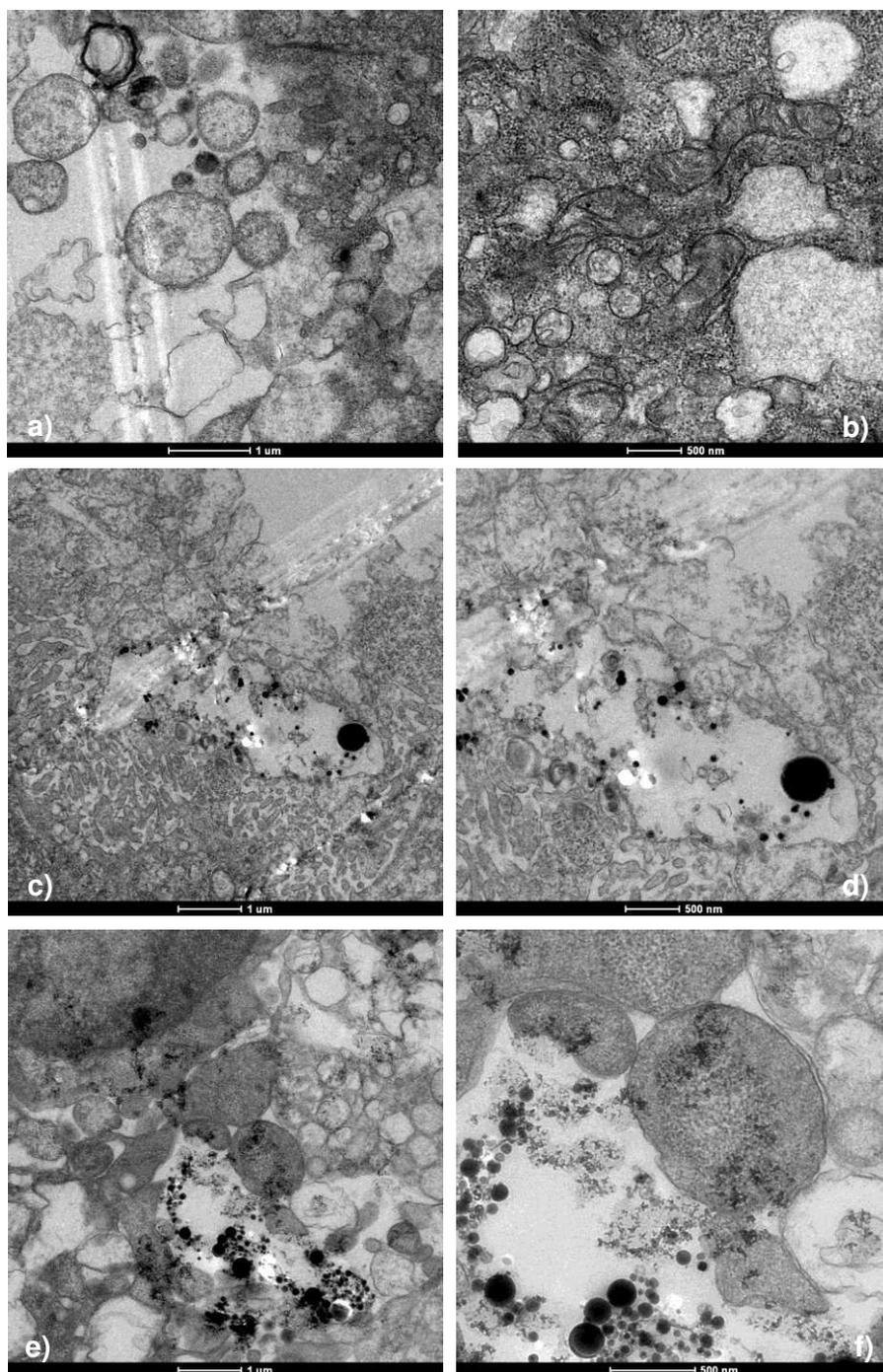


Fig. 7: Immagini di microscopia elettronica a trasmissione dopo 1 ora di esposizione alla Frazione Totale delle cellule A549: Controllo (a,b), 0.046875 mg/ml (c,d) e 0.375 mg/ml (e,f).

4.1.7 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO

L'influenza sulla crescita è stata valutata su entrambe le linee cellulari dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione a tre concentrazioni (0.046875, 0.375 e 6 mg/ml) di *Fly Ash* tal quale (*Frazione Totale*) e delle *Frazioni Idrosolubile, Non-Idrosolubile, DMSO-solubile*.

È stato dimostrato che in alcuni test vi possono essere interazioni con il campione in esame, che possono dare falsi positivi o negativi. Questi problemi possono essere particolarmente importanti nel caso di ceneri complesse come il *Fly Ash*, le cui particelle possono aderire alla superficie cellulare, da cui difficilmente possono essere rimosse. Le proprietà ottiche delle varie componenti del *Fly Ash* sono in grado di interferire con l'assorbimento della luce o con la fluorescenza, compromettendo in tal modo la validità del metodo utilizzato. Sono possibili inoltre reazioni chimiche tra le componenti del *Fly Ash* ed i substrati dei vari test o, ancora, fenomeni di adsorbimento dei componenti del saggio sulla superficie della cenere. Questi fattori potrebbero quindi alterare una risposta al test di vitalità (Holder et al., 2012).

Per questi motivi l'effetto antiproliferativo è stato valutato utilizzando sia il classico test MTT che l'SRB assay, il quale si basa sulla capacità della Sulforodamina B di legarsi ai residui aminoacidici basici delle proteine cellulari.

I risultati ottenuti con le due diverse metodiche sono del tutto sovrapponibili.

FRAZIONE TOTALE

Le cellule BEAS-2B trattate con la *Frazione Totale* presentano in generale un'apprezzabile diminuzione della proliferazione, indipendentemente dal tempo di esposizione. In particolare, tale riduzione risulta statisticamente significativa già alla dose di 0.375 mg/ml e diventa particolarmente importante dopo esposizione alla concentrazione più elevata (6 mg/ml), alla quale si evidenzia anche una riduzione tempo correlata della vitalità, che dopo 24, 48 e 72 ore risulta del 41, 27 e 17% rispetto al controllo (Fig. 7a).

La linea tumorale (A549) risulta decisamente meno sensibile al *Fly Ash* tal quale rispetto alle cellule BEAS-2B. Come riportato in Figura 7b, solo con la concentrazione maggiore (6 mg/ml) e solo dopo 48 ore di esposizione si ottiene una lieve riduzione della vitalità.

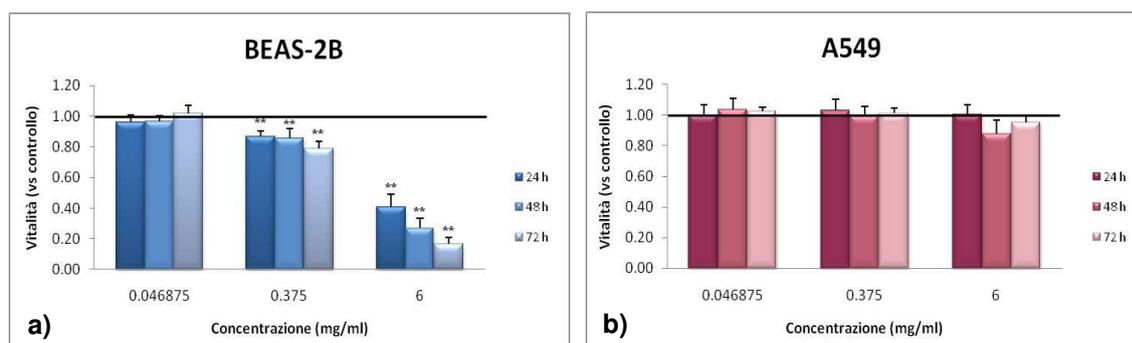


Fig. 7: Variazione rispetto al controllo (barra nera) della vitalità delle cellule BEAS-2B (a) e A549 (b) dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione alla *Frazione Totale* alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

FRAZIONE IDROSOLUBILE

Anche la *Frazione Idrosolubile* induce una riduzione concentrazione-dipendente della proliferazione delle BEAS-2B, significativa già a 0.375 mg/ml e particolarmente importante e tempo-dipendente alla concentrazione maggiore, dove risulta rispettivamente del 43, 78 e 89% rispetto al controllo (Fig. 8a).

Ancora una volta le cellule A549 risultano meno sensibili. Si ottiene una significativa riduzione tempo-dipendente della vitalità solo dopo esposizione alla concentrazione di 6 mg/ml; dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione infatti, le cellule vitali sono rispettivamente il 62, 50 e 30% (Fig. 8b).

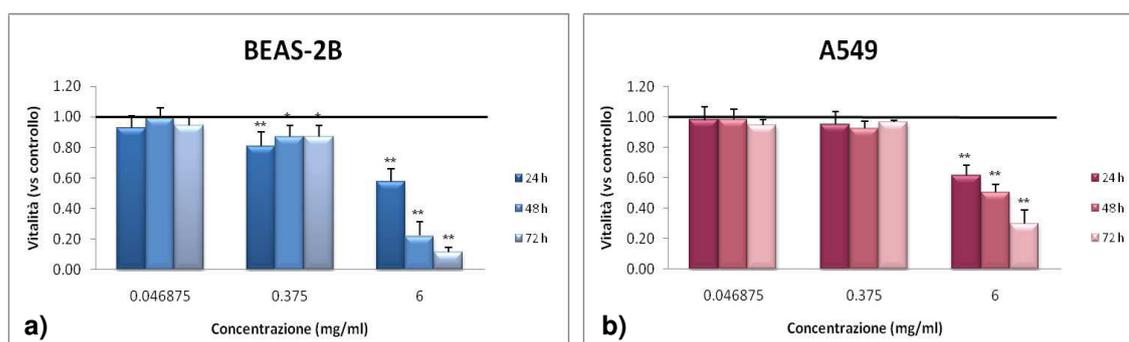


Fig. 8: Variazione rispetto al controllo (*barra nera*) della vitalità delle cellule BEAS-2B (a) e A549 (b) dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione alla *Frazione Idrosolubile* alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

FRAZIONE NON-IDROSOLUBILE

Anche l'esposizione alle dosi maggiori (6 mg/ml) della *Frazione Non-Idrosolubile* induce una significativa e tempo-dipendente riduzione della proliferazione delle cellule BEAS-2B. In questo caso, tuttavia, la risposta è significativa già dopo 24 ore di esposizione alla concentrazione di 0.375 mg/ml (Fig. 9a).

La Figura 9b mostra come il tempo di esposizione, più che la concentrazione, influenzi l'effetto antiproliferativo della *Frazione Non-Idrosolubile* sulla linea tumorale. Infatti, risultati significativi si osservano solo dopo 72 ore di esposizione.

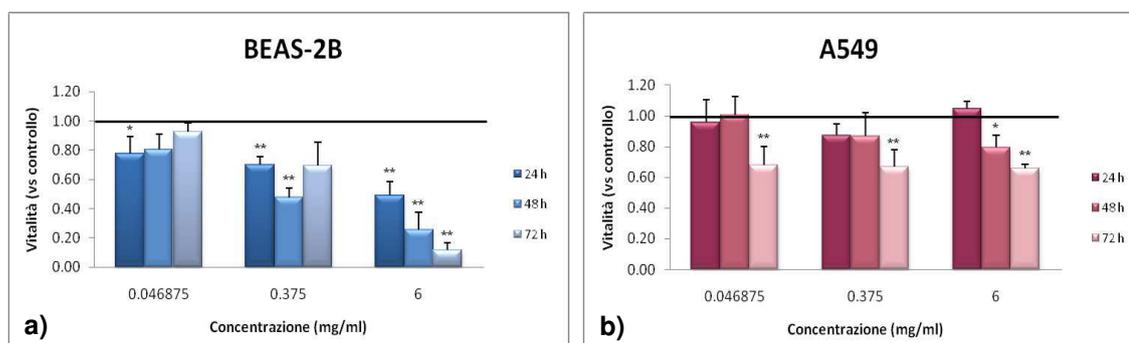


Fig. 9: Variazione rispetto al controllo (*barra nera*) della vitalità delle cellule BEAS-2B (a) e A549 (b) dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione alla *Frazione Non-Idrosolubile* alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Risultati

FRAZIONE DMSO-SOLUBILE

La *Frazione DMSO-solubile* induce una significativa riduzione della vitalità delle cellule non tumorali solo dopo esposizione alle concentrazioni 0.375 e 6 mg/ml. Tale effetto non risente invece dei diversi tempi di esposizione (Fig. 10a).

Anche la risposta delle cellule A549 alla frazione non è influenzata dal tempo di esposizione, ma piuttosto dalla concentrazione. I risultati più rilevanti si ottengono solo con l'esposizione alla concentrazione maggiore (Fig. 10b).

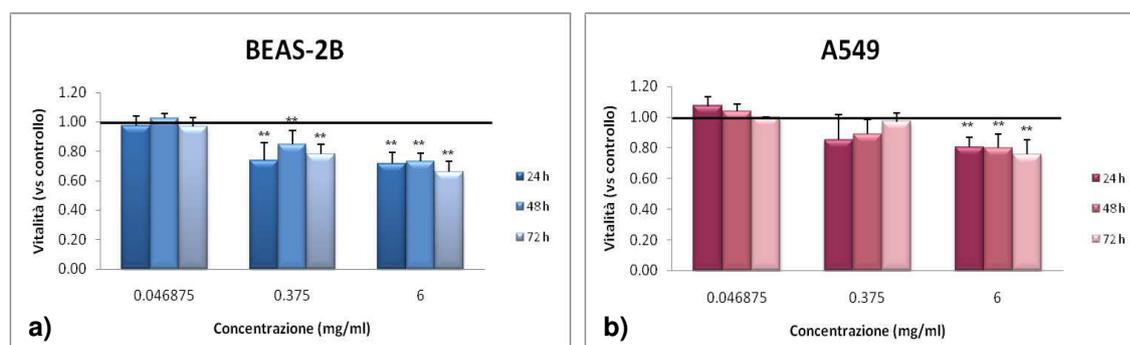


Fig. 10: Variazione rispetto al controllo (barra nera) della vitalità delle cellule BEAS-2B (a) e A549 (b) dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione alla *Frazione DMSO-solubile* alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml. ** $P < 0.01$.

4.1.8 PRODUZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)

La capacità dei campioni di indurre produzione di ROS è stata studiata su entrambe le linee cellulari. Poiché alcune forme di particolato possono interagire direttamente con i fluidi extracellulari delle vie respiratorie favorendo un'ulteriore produzione ROS (Deshpande, 2002), questi ultimi sono stati valutati anche in assenza di cellule.

La sonda utilizzata (DCFH-DA) diffonde liberamente attraverso la membrana plasmatica e viene deacetilata dalle esterasi citoplasmatiche e resta all'interno della cellula. In presenza di specie reattive dell'ossigeno, soprattutto del radicale idrossile e del perossido di idrogeno, viene rapidamente ossidata a diclorofluoresceina, composto altamente fluorescente. L'intensità di fluorescenza è direttamente proporzionale ai livelli intracellulari di ROS (Nie, 2009).

FRAZIONE TOTALE

La Figura 11 mostra come in seguito all'esposizione di entrambe le linee cellulari alla *Frazione Totale* si verifichi un aumento concentrazione-dipendente della produzione di ROS. In particolare, esponendo le cellule BEAS-2B e A549 alla concentrazione più alta si ottiene una produzione di ROS rispettivamente 5 e 7 volte maggiore rispetto al controllo. Da sottolineare l'aumento particolarmente importante della produzione di radicali ottenuto con la *Frazione Totale* in assenza di cellule, incremento che, alla concentrazione di 6 mg/ml risulta di quasi 18 volte maggiore rispetto al controllo. Questi risultati indicano chiaramente un'interazione diretta tra i componenti del *Fly Ash* e quelli del terreno di coltura, in particolare il siero.

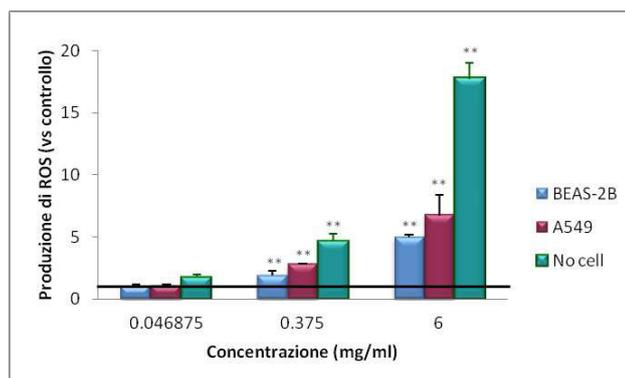


Fig. 11: Variazione dell'intensità di fluorescenza di DCF rispetto al controllo (*barra nera*) in cellule BEAS-2B, A549 e in assenza di cellule in seguito ad 1 ora di esposizione alla Frazione Totale alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml. ** $P < 0.01$.

FRAZIONE IDROSOLUBILE

La frazione non influisce sulla produzione di ROS, indipendentemente dalla presenza di cellule (Fig. 12). Quindi la riduzione della proliferazione cellulare osservata non è imputabile alla produzione di specie reattive dell'ossigeno.

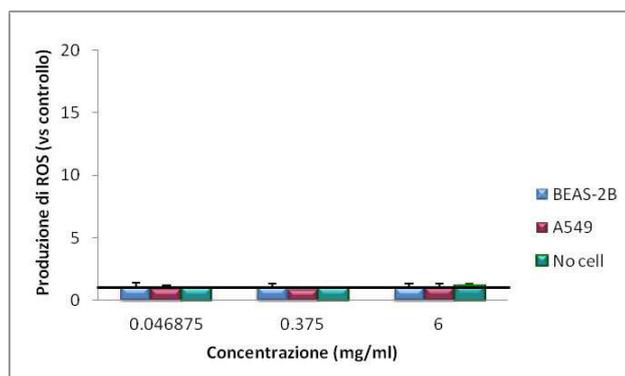


Fig. 12: Variazione dell'intensità di fluorescenza di DCF rispetto al controllo (*barra nera*) in cellule BEAS-2B, A549 e in assenza di cellule in seguito ad 1 ora di esposizione alla Frazione Idrosolubile alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml.

FRAZIONE NON-IDROSOLUBILE

Anche la *Frazione Non-Idrosolubile*, analogamente a quella *Totale*, induce un netto incremento dose-dipendente della produzione di ROS nelle due linee cellulari. Ancora una volta il risultato è particolarmente significativo in assenza di cellule, anche se quantitativamente meno rilevante rispetto a quello indotto dal *Fly Ash* (Fig. 13).

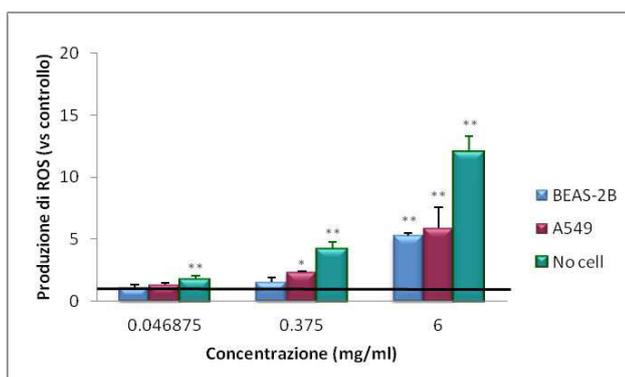


Fig. 13: Variazione dell'intensità di fluorescenza di DCF rispetto al controllo (*barra nera*) in cellule BEAS-2B, A549 e in assenza di cellule in seguito ad 1 ora di esposizione alla Frazione Non-Idrosolubile alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Risultati

FRAZIONE DMSO-SOLUBILE

La *Frazione DMSO-solubile* stimola una leggera produzione di ROS da parte delle cellule BEAS-2B indipendentemente dalla concentrazione, mentre le cellule tumorali rispondono solo alla concentrazione maggiore, la quale, in assenza di cellule, provoca un significativo aumento di ROS (circa il 60% rispetto al controllo (Fig. 14).

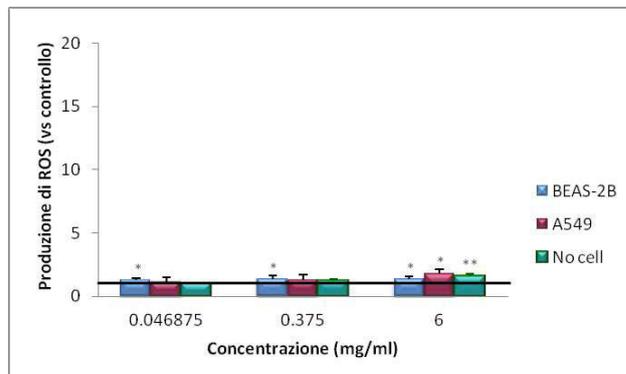


Fig. 14: Variazione dell'intensità di fluorescenza di DCF rispetto al controllo (*barra nera*) in cellule BEAS-2B, A549 e in assenza di cellule in seguito ad 1 ora di esposizione alla *Frazione DMSO-solubile* alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4.1.9 DOSAGGIO DEL GLUTATIONE RIDOTTO TOTALE (tGSH)

Il glutatione ridotto è tra i più efficaci antiossidanti solubili intracellulari, è particolarmente abbondante nel citosol, nei mitocondri e a livello nucleare (Valko et al., 2006). È stata quindi studiata la capacità del *Fly Ash* tal quale e delle sue frazioni di influenzare i livelli di glutatione delle due linee cellulari. Il contenuto di glutatione ridotto totale è stato valutato mediante un test colorimetrico quantitativo.

FRAZIONE TOTALE

I risultati riportati in Figura 15 evidenziano come in entrambe le linee cellulari l'esposizione alla *Frazione Totale* provochi una drastica diminuzione dose-dipendente del contenuto di GSH totale. Questa diminuzione è particolarmente significativa con le BEAS-2B già alla concentrazione minore e diviene considerevole, nell'ordine del 90%, a 6 mg/ml. Anche le cellule A549 rispondono all'esposizione con un netto calo di GSH totale, che raggiunge l'89% alla concentrazione maggiore.

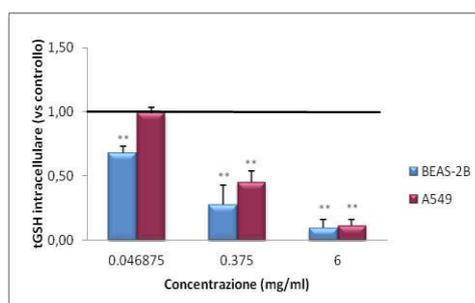


Fig. 15: Variazione della concentrazione di GSH totale rispetto al controllo (*barra nera*) in cellule BEAS-2B e A549 in seguito ad 1 ora di esposizione alla *Frazione Totale* alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml. ** $P < 0.01$.

FRAZIONE IDROSOLUBILE

L'esposizione alla *Frazione Idrosolubile* non influenza la quantità intracellulare di GSH totale; quando esposte alla concentrazione intermedia le cellule A549 rispondono addirittura con un incremento di produzione (Fig. 16).

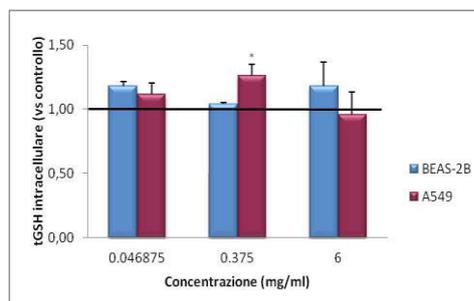


Fig. 16: Variazione della concentrazione di GSH totale rispetto al controllo (**barra nera**) in cellule BEAS-2B e A549 in seguito ad 1 ora di esposizione alla Frazione Idrosolubile alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml. * $P < 0.05$.

FRAZIONE NON-IDROSOLUBILE

Anche dopo esposizione alla *Frazione Non-Idrosolubile* (Fig. 17) entrambe le linee cellulari rispondono con un drastico calo della concentrazione di GSH totale. Tale diminuzione, ancora una volta dose-dipendente è sovrapponibile a quanto ottenuto con esposizione alla *Frazione Totale* per le BEAS-2B, mentre risulta meno importante per le A549.

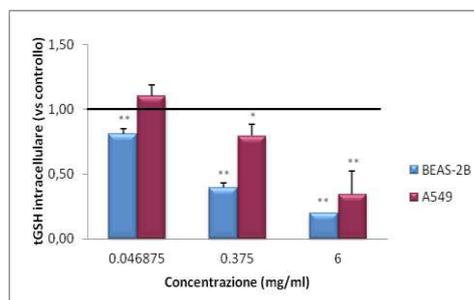


Fig. 17: Variazione della concentrazione di GSH totale rispetto al controllo (**barra nera**) in cellule BEAS-2B e A549 in seguito ad 1 ora di esposizione alla Frazione Non-Idrosolubile alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml. ** $P < 0.01$.

FRAZIONE DMSO-SOLUBILE

Esponendo le cellule alla *Frazione DMSO-solubile* (Fig. 18), la concentrazione del GSH totale rimane prossima a quella del controllo in entrambe le linee. Nelle BEAS-2B si evidenzia una tendenza alla diminuzione dell'antiossidante intracellulare anche se non statisticamente significativa.

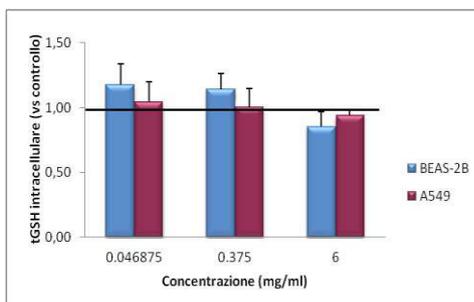


Fig. 18: Variazione della concentrazione di GSH totale rispetto al controllo (**barra nera**) in cellule BEAS-2B e A549 in seguito ad 1 ora di esposizione alla Frazione DMSO-solubile alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml.

Risultati

4.1.10 ESPRESSIONE DELL'EME-OSSIGENASI-1 (HO-1)

L'enzima eme-ossigenasi (HO) è presente in tre isoforme. Tra queste l'HO-1 ha un duplice ruolo all'interno delle cellule: il catabolismo dell'eme e una potente attività citoprotettiva, grazie alle sue proprietà antiossidanti, antiapoptotiche e antiinfiammatorie (Conti et al., 2007). Essa è ubiquitariamente espressa nell'organismo e viene indotta in seguito all'insorgere di numerose patologie che colpiscono il tratto respiratorio (Fredenburgh et al., 2007).

La valutazione dell'espressione dell'HO-1 è stata eseguita mediante *Western Blotting* su lisati totali delle due linee cellulari dopo 1 e 24 ore di esposizione alle *Frazioni Totale, Idrosolubile e DMSO-solubile*.

FRAZIONE TOTALE

L'esposizione delle cellule A549 alla *Frazione Totale* non induce alcuna variazione dell'espressione dell'HO-1 ad entrambi i tempi considerati. Le BEAS-2B, invece, rispondono con un significativo aumento dell'espressione dell'enzima già dopo 1 ora di esposizione alla dose maggiore (circa il doppio rispetto al controllo, Fig. 19a); l'espressione dell'enzima aumenta di quasi 20 volte rispetto al controllo dopo 24 ore di esposizione a 0.375 mg/ml (Fig. 19b).

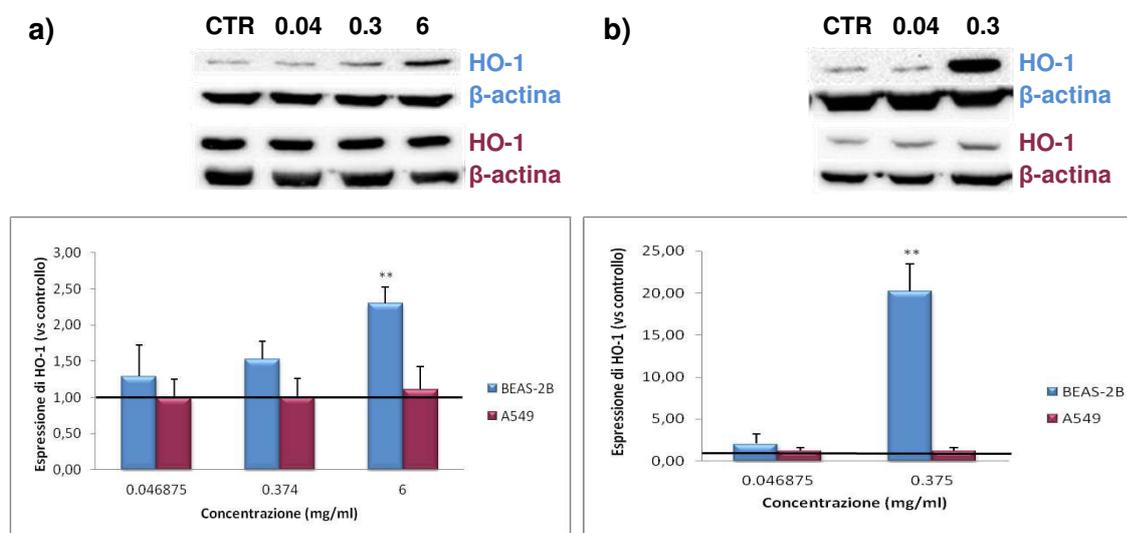


Fig. 19: Western Blotting dell'espressione dell'HO-1 in cellule BEAS-2B e A549 in seguito ad 1 ora (a) e 24 ore (b) di esposizione alla *Frazione Totale* (Controllo (CTR), 0.046875 (0.04), 0.375 (0.3) e 6 mg/ml (6)) e grafico quantitativo della variazione rispetto al controllo non trattato (barra nera). ** $P < 0.01$.

FRAZIONE IDROSOLUBILE

Ancora una volta l'esposizione alla frazione solubile in acqua non provoca una risposta significativamente diversa rispetto ai controlli non trattati nelle due linee cellulari ad entrambi i tempi saggiati (Fig. 20a e 20b). Questo risultato conferma quelli ottenuti in precedenza e permette di escludere un contributo dell'attività pro-ossidante nel meccanismo citotossico indotto dalla *Frazione Idrosolubile*.

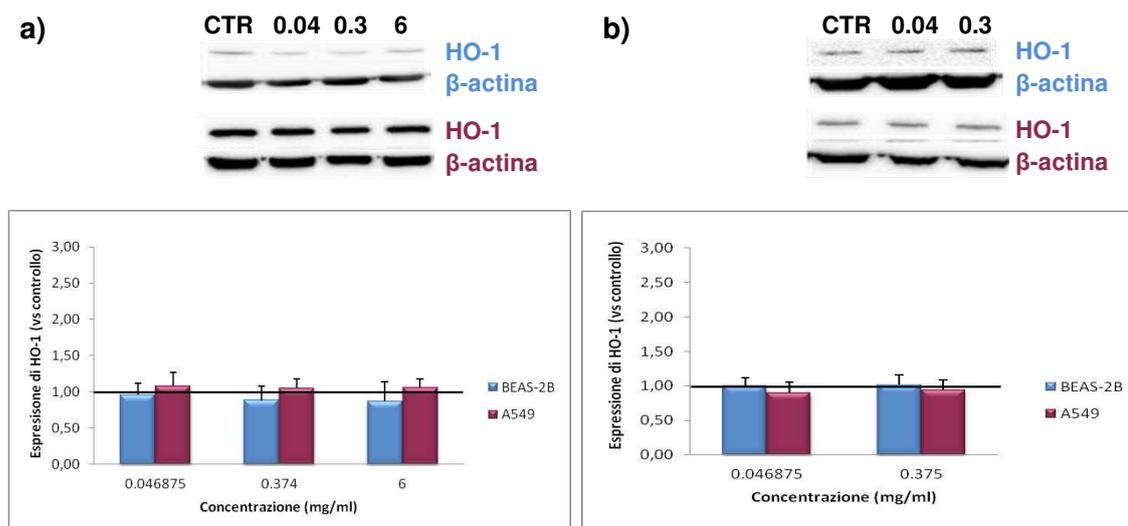


Fig. 20: Western Blotting dell'espressione dell'HO-1 in cellule BEAS-2B e A549 in seguito ad 1 ora (a) e 24 ore (b) di esposizione alla Frazione Idrosolubile (Controllo (CTR), 0.046875 (0.04), 0.375 (0.3) e 6 mg/ml (6)) e grafico quantitativo della variazione rispetto al controllo non trattato (barra nera).

FRAZIONE DMSO-SOLUBILE

Come riportato in Figura 21a, la frazione provoca un significativo aumento dell'espressione dell'enzima (paragonabile a quello indotto della *Frazione Totale*) esclusivamente sulle cellule non tumorali (BEAS-2B) già dopo 1 ora. In questo caso il tempo non gioca un ruolo importante, infatti dopo 24 ore l'espressione dell'enzima sostanzialmente non cambia (Fig. 21b).

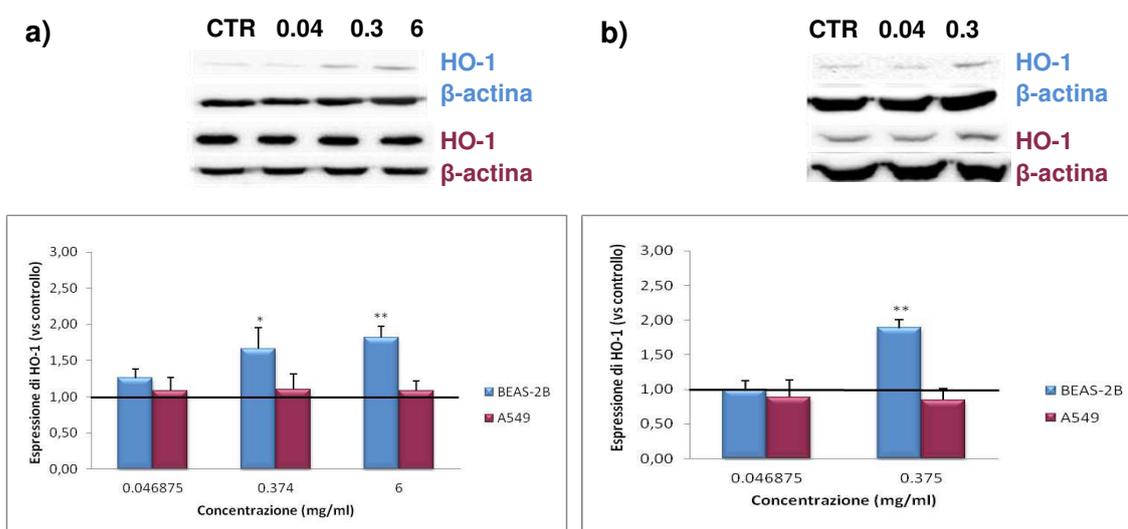


Fig. 21: Western Blotting dell'espressione dell'HO-1 in cellule BEAS-2B e A549 in seguito ad 1 ora (a) e 24 ore (b) di esposizione alla Frazione DMSO-solubile (Controllo (CTR), 0.046875 (0.04), 0.375 (0.3) e 6 mg/ml (6)) e grafico quantitativo della variazione rispetto al controllo non trattato (barra nera). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4.1.11 ESPRESSIONE E TRASLOCAZIONE NUCLEARE DI NF-κB

È noto dalla letteratura che l'attività biologica del particolato può essere imputata alla produzione di radicali e all'induzione di stress ossidativo, fenomeni che si accompagnano ad infiammazione dell'epitelio delle vie respiratorie (Balduzzi, 2003).

In base ai risultati ottenuti studiando l'induzione di stress ossidativo, si è ritenuto interessante verificare l'induzione di stimolo pro-infiammatorio provocato da *Fly Ash* sulle due linee cellulari in esame, valutando l'espressione e la traslocazione nel nucleo del fattore di trascrizione NF-κB (subunità p65).

L'espressione di NF-κB p65 è stata valutata mediante *Western Blotting* su lisati totali delle due linee cellulari dopo 1 e 24 ore di esposizione alle *Frazioni Totale*, *Idrosolubile* e *DMSO-solubile*, mentre la sua traslocazione nel nucleo è stata studiata mediante microscopia confocale dopo 2 ore di esposizione alla sola *Frazione Totale*.

FRAZIONE TOTALE

L'esposizione delle A549 alle due dosi maggiori della *Frazione Totale* provoca un precoce e significativo aumento dell'espressione della subunità p65 di NF-κB (Fig. 22a). Per quanto riguarda la risposta delle BEAS-2B, solo dopo 24 ore di esposizione alla concentrazione 0.375 mg/ml si ottiene un aumento di circa il 50% dell'espressione di NF-κB p65 rispetto al controllo (Fig. 22b).

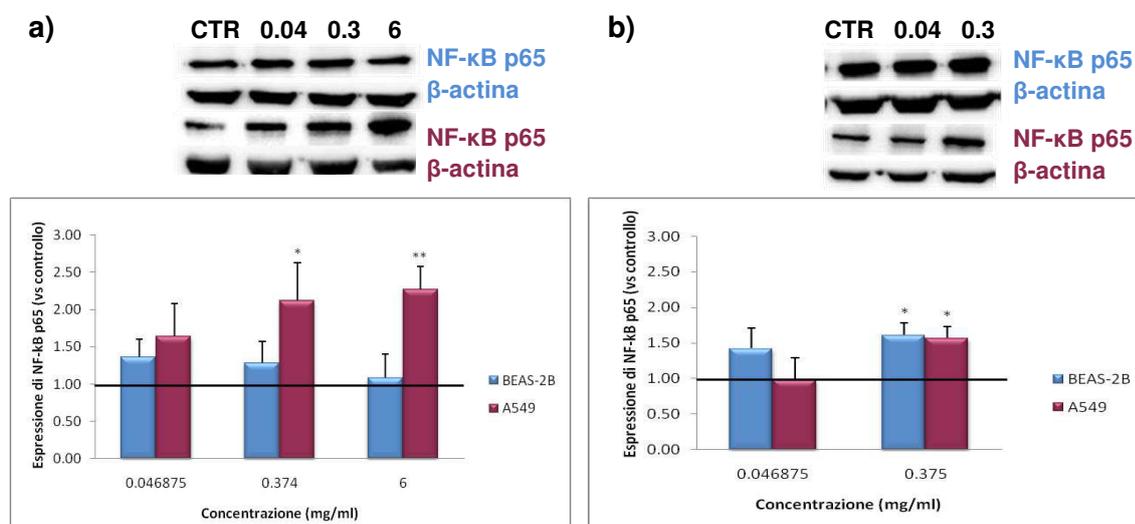


Fig. 22: Western Blotting dell'espressione di NF-κBp65 in cellule BEAS-2B e A549 in seguito ad 1 ora (a) e 24 ore (b) di esposizione alla *Frazione Totale* (Controllo (CTR), 0.046875 (0.04), 0.375 (0.3) e 6 mg/ml (6)) e grafico quantitativo della variazione rispetto al controllo non trattato (barra nera). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Il fattore di trascrizione NF-κB, complesso eterodimero delle subunità p50-p65, è presente in forma inattiva nel citoplasma, associato alla proteina inibitoria IκB. In seguito a stimolazione, IκBα viene rapidamente fosforilato, rilasciando NF-κB dimero che può quindi traslocare nel nucleo e attivare la trascrizione di geni bersaglio (Lee, Yang, 2013). Per comprendere se l'aumentata espressione di NF-κB osservata fosse dovuta alla sua attivazione e traslocazione nel nucleo, è stata valutata la localizzazione intracellulare della subunità p65.

Le due linee cellulari esposte per 2 ore alla *Frazione Totale*, sono state marcate con anticorpo fluorescente anti NF- κ B p65 (in verde) e TOTO-3 intercalante del DNA fluorescente per evidenziare i nuclei (in blu). L'analisi è stata eseguita con microscopio confocale.

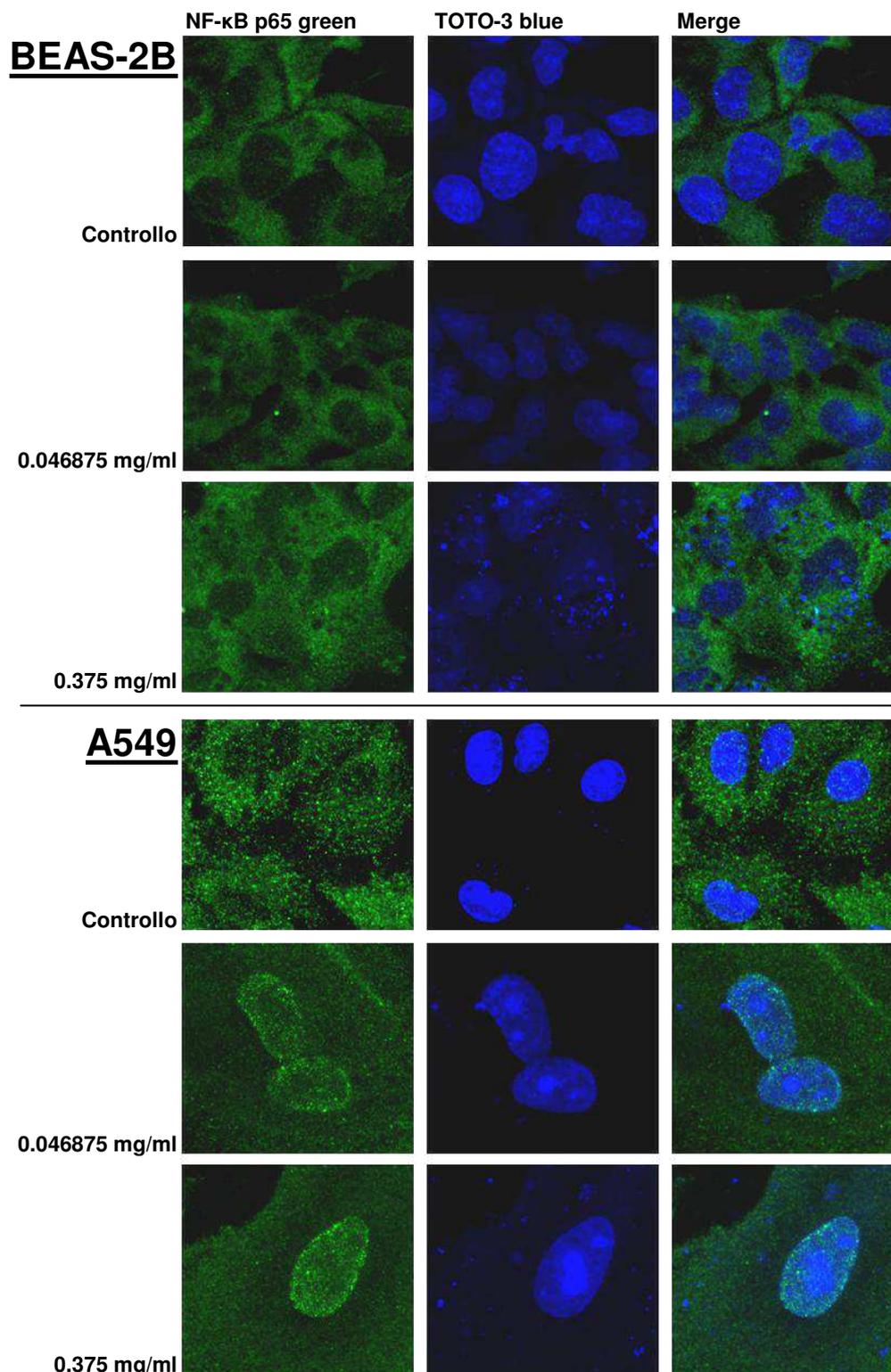


Fig. 23: Valutazione della localizzazione di NF- κ B p65 in cellule BEAS-2B e A549 in seguito ad 2 ore di esposizione alla *Frazione Totale* alle concentrazioni 0.046875 e 0.375 mg/ml. Immagini acquisite al microscopio confocale (obiettivo 60X in olio), NF- κ B p65 marcato in verde, i nuclei marcati in blu.

Risultati

Come ben evidenzia la Figura 23, nelle cellule A549 di controllo NF- κ B p65 è localizzato prevalentemente nel citoplasma. L'esposizione alla *Frazione Totale* provoca un aumento del segnale di fluorescenza verde che colocalizza con il segnale blu del nucleo, aumento già evidente dopo esposizione alla concentrazione di 0.046875 mg/ml e ancor di più significativo alla concentrazione 0.375 mg/ml. Questo risultato conferma quindi che dopo attivazione, la subunità p65 di NF- κ B trasloca nel nucleo. Le immagini acquisite mostrano inoltre un notevole aumento delle dimensioni sia delle cellule che dei nuclei contenenti la forma attiva di NF- κ B.

Nelle cellule BEAS-2B l'esposizione alla *Frazione Totale* non provoca migrazione di NF- κ B p65 all'interno del nucleo; indipendentemente dalla concentrazione utilizzata esso rimane prevalentemente localizzato nel citoplasma. Da sottolineare tuttavia, che le immagini evidenziano la presenza di alcuni "buchi" nel segnale fluorescente verde, che potrebbero suggerire la presenza di vescicole contenenti materiale internalizzato per endocitosi, già evidenziate dalle analisi di microscopia elettronica.

FRAZIONE IDROSOLUBILE

Come mostrato in Figura 24, la frazione non induce alcuna variazione significativa dell'espressione di NF- κ B p65.

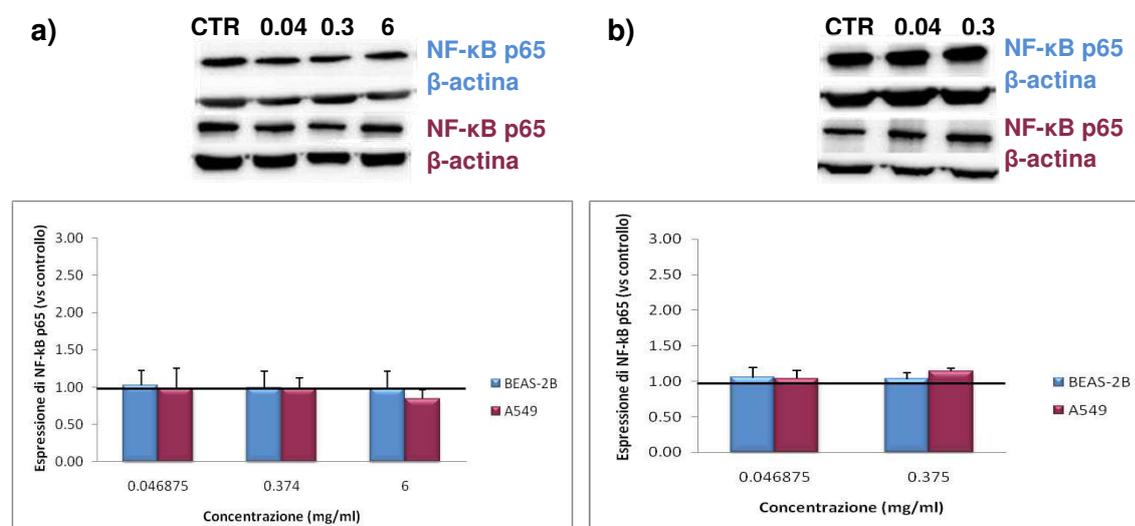


Fig. 24: Western Blotting dell'espressione di NF- κ B p65 in cellule BEAS-2B e A549 in seguito ad 1 ora (a) e 24 ore (b) di esposizione alla *Frazione Idrosolubile* (Controllo (CTR), 0.046875 (0.04), 0.375 (0.3) e 6 mg/ml (6)) e grafico quantitativo della variazione rispetto al controllo non trattato (barra nera).

FRAZIONE DMSO-SOLUBILE

Ancora una volta la risposta delle due linee cellulari all'esposizione a questa frazione è sovrapponibile a quanto ottenuto con la *Frazione Totale*, seppur di minore entità. Nelle cellule A549, infatti, l'aumentata espressione del fattore di trascrizione rilevabile già dopo 1 ora di esposizione, persiste anche dopo 24 ore (Fig. 25a e 25b). Anche in questo caso la risposta delle cellule BEAS-2B è influenzata più dal tempo di esposizione che dalla dose. Significativo aumento dell'espressione di NF- κ B p65, circa

il 50% rispetto al controllo, si ottiene solo dopo 24 ore di esposizione, indipendentemente dalla concentrazione (Fig. 25b).

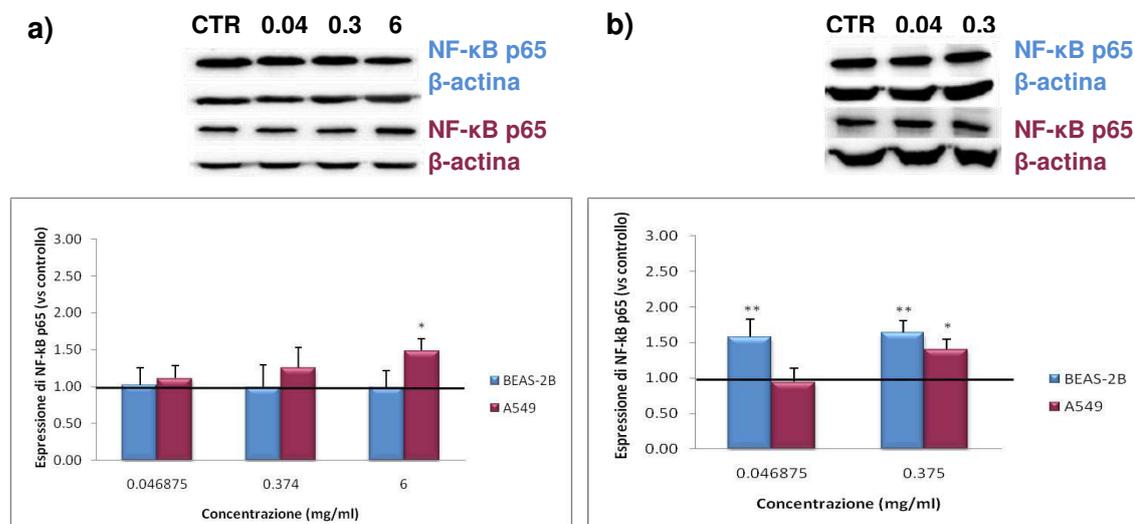


Fig. 25: Western Blotting dell'espressione di NF- κ B p65 in cellule BEAS-2B e A549 in seguito ad 1 ora (a) e 24 ore (b) di esposizione alla Frazione DMSO-solubile (Controllo (CTR), 0.046875 (0.04), 0.375 (0.3) e 6 mg/ml (6)) e grafico quantitativo della variazione rispetto al controllo non trattato (barra nera). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4.1.12 DOSAGGIO DELLE INTERLEUCHINE 6 E 8

È stato dimostrato che l'epitelio polmonare è attivamente coinvolto nella risposta alle sostanze tossiche inalate e che il contatto con il particolato induce liberazione di citochine e chemochine (quali IL-1, IL-6, IL-8, TNF) con conseguente richiamo nel polmone di cellule infiammatorie (Balduzzi, 2003).

Il dosaggio delle interleuchine 6 e 8, implicate nel processo infiammatorio del tratto respiratorio, è stato effettuato mediante kit ELISA, metodo colorimetrico che rileva la presenza di IL attraverso il legame con l'anticorpo monoclonale, che le riconosce specificatamente, ed una razione colorimetrica, che permette di quantificarne la concentrazione nel terreno di coltura cellulare.

L'influenza del trattamento con *Fly Ash* tal quale (*Frazione Totale*), *Frazioni Idrosolubile*, *Non-Idrosolubile* e *DMSO-solubile* sulla produzione cellulare di interleuchina IL-6 e IL-8 è stata studiata dopo 24 ore di esposizione alle concentrazioni 0.046875 e 0.375 mg/ml.

FRAZIONE TOTALE

Particolarmente interessanti sono i risultati ottenuti con le BEAS-2B, le quali rispondono all'esposizione alla *Frazione Totale* con un aumento significativo e dose-dipendente della produzione delle due interleuchine (Fig. 26a e 26b). In particolare, la concentrazione di IL-6 nel *medium* di coltura raddoppia e quasi quadruplica rispetto al controllo all'aumentare della dose. Ancora più importante è l'aumento di produzione

Risultati

dell'interleuchina 8 che, dopo esposizione alla concentrazione 0.375 mg/ml, risulta circa 6 volte maggiore rispetto al controllo.

L'esposizione alla Frazione Totale non influenza la produzione di IL-6 da parte delle cellule A549 (Fig. 26a), che però rispondono con un significativo aumento, circa doppio rispetto al controllo, della secrezione di IL-8 (Fig. 26b).

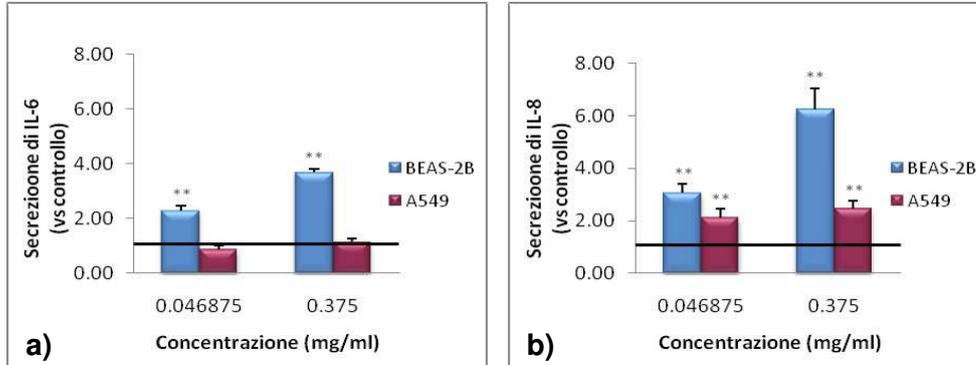


Fig. 26: Variazione della concentrazione di IL-6 (a) e IL-8 (b) rispetto al controllo (barra nera) in cellule BEAS-2B e A549 in seguito a 24 ore di esposizione alla Frazione Totale alle concentrazioni 0.046875 e 0.375 mg/ml. ** $P < 0.01$.

FRAZIONE IDROSOLUBILE

L'esposizione delle cellule BEAS-2B a questa frazione provoca un aumento statisticamente significativo della produzione di IL-6 (Fig. 27a), senza tuttavia influenzare la secrezione di interleuchina 8 (Fig. 27b).

Il rilascio delle due interleuchine da parte delle cellule tumorali A549, invece, non è minimamente influenzato dall'esposizione alla frazione solubile in acqua (Fig. 27a e 27b).

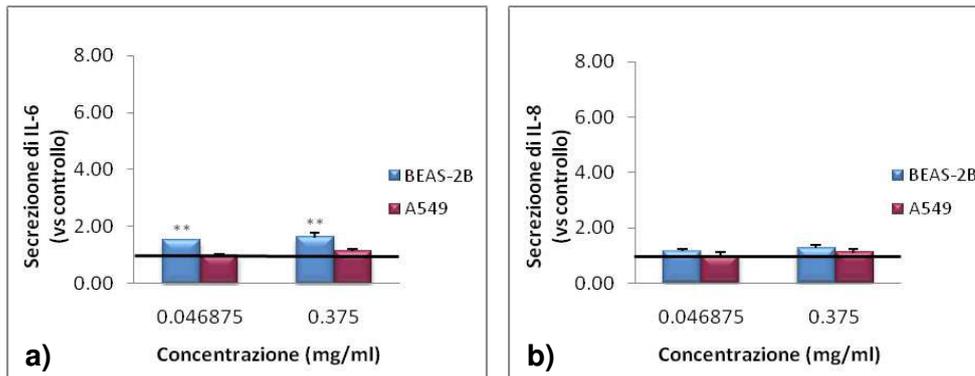


Fig. 27: Variazione della concentrazione di IL-6 (a) e IL-8 (b) rispetto al controllo (barra nera) in cellule BEAS-2B e A549 in seguito a 24 ore di esposizione alla Frazione Idrosolubile alle concentrazioni 0.046875 e 0.375 mg/ml. ** $P < 0.01$.

FRAZIONE NON-IDROSOLUBILE

La risposta delle due linee cellulari all'esposizione alla Frazione Non-Idrosolubile è analogo a quello ottenuto con la Frazione Totale, anche se quantitativamente meno importante. Significativo e dose-correlato aumento della produzione di entrambe le

interleuchine si ottiene solo con delle cellule BEAS-2B (Fig. 28a e 28b). Mentre ancora una volta le cellule tumorali rispondono al trattamento aumentando la secrezione della sola IL-8, aumento che peraltro risulta statisticamente significativo solo alla concentrazione maggiore (Fig. 27b).

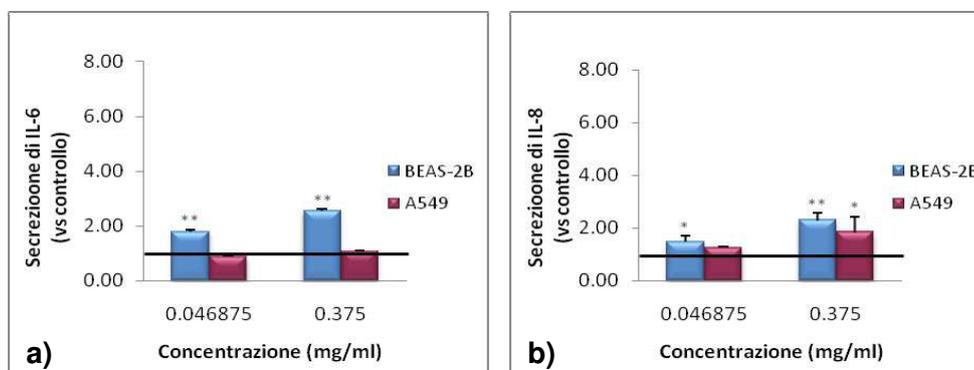


Fig. 28: Variazione della concentrazione di IL-6 (a) e IL-8 (b) rispetto al controllo (**barra nera**) in cellule BEAS-2B e A549 in seguito a 24 ore di esposizione alla Frazione Non-Idrosolubile alle concentrazioni 0.046875 e 0.375 mg/ml. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

FRAZIONE DMSO-SOLUBILE

La frazione solubile in DMSO, in generale, non induce importanti variazioni della produzione delle due interleuchine. Si ottiene infatti un aumento statisticamente significativo della sola IL-8 dopo esposizione delle A549 alla concentrazione 0.375 mg/ml (Fig. 29b) e un leggero aumento di entrambe le interleuchine dopo esposizione delle cellule non tumorali (Fig. 29a e 29b).

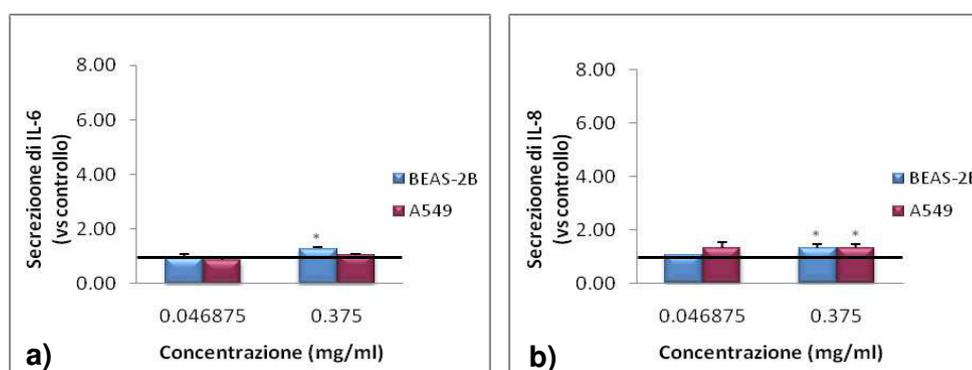


Fig. 29: Variazione della concentrazione di IL-6 (a) e IL-8 (b) rispetto al controllo (**barra nera**) in cellule BEAS-2B e A549 in seguito a 24 ore di esposizione alla Frazione DMSO-solubile alle concentrazioni 0.046875 e 0.375 mg/ml. * $P < 0.05$.

4.1.13 EFFETTO DEL PRE-TRATTAMENTO CON N-ACETILCISTEINA

L'N-acetilcisteina (NAC) è un noto antiossidante, che è in grado di entrare facilmente nelle cellule, ove viene deacetilata a L-cisteina, aminoacido indispensabile per la sintesi del glutathione. NAC svolge quindi un ruolo di primaria importanza nel mantenimento di adeguati livelli di glutathione, contribuendo così alla difesa verso l'insulto di agenti dannosi.

Alla luce dei risultati ottenuti lo studio è proseguito valutando se il pre-trattamento con l'antiossidante fosse in grado di preservare le cellule dallo stress ossidativo e dall'infiammazione innescati dall'esposizione al *Fly Ash* tal quale (*Frazione Totale*).

Sono state innanzitutto valutate le condizioni di esposizione al NAC, studiando l'influenza di varie dosi sulla proliferazione delle due linee cellulari.

Il protocollo, adottato in base ai risultati ottenuti, prevedeva 24 ore di pre-trattamento con NAC alla concentrazione 10 mM, seguite dall'esposizione alla *Frazione Totale*.

PRODUZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)

Il risultati riportati in Figura 30 evidenziano come il pretrattamento con NAC provochi su entrambe le linee cellulari una riduzione della produzione di ROS rispetto alle cellule trattate con il solo *Fly Ash*. Questo risultato è particolarmente importante con le cellule A549 ove il NAC riduce del 56% la produzione di ROS indotta da 0.375 mg/ml di *Frazione Totale* e di ben il 74% quella indotta dalla concentrazione maggiore (6 mg/ml). Anche le BEAS-2B sono influenzate dal pre-trattamento, ma l'effetto protettivo dell'antiossidante risulta significativo solo alla dose maggiore, dove la riduzione è di circa il 46%.

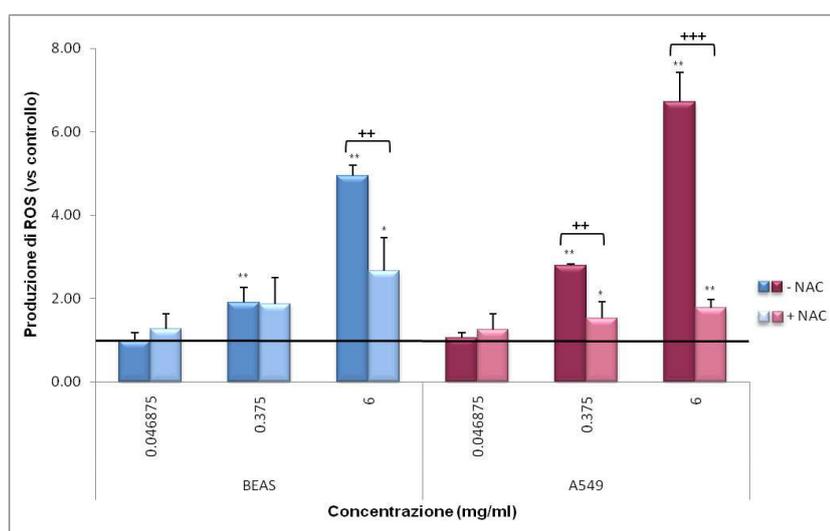


Fig. 30: Variazione dell'intensità di fluorescenza di DCF rispetto al controllo (*barra nera*) in cellule BEAS-2B e A549 dopo 1 ora di esposizione alla *Frazione Totale* alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml e dopo 24 ore di pre-trattamento con NAC 10 mM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, rispetto al controllo non trattato, e ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$, rispetto alle cellule non pre-trattate.

DOSAGGIO DEL GLUTATIONE RIDOTTO TOTALE (tGSH)

In generale, come prevedibile, il pre-trattamento con N-acetilcisteina, determina un marcato aumento della quantità di GSH totale (Fig. 31).

In particolare, le cellule BEAS-2B rispondono al pre-trattamento con un aumento statisticamente significativo della concentrazione di GSH, che è in grado di riportare il glutatione intracellulare totale a livelli molto prossimi a quelli del controllo non trattato.

L'effetto del NAC sul contenuto di GSH totale delle cellule A549 è decisamente meno evidente. Si ottiene un significativo incremento solo dopo pre-trattamento seguito dall'esposizione alla concentrazione maggiore (6 mg/ml), anche se i livelli di tGSH rimangono lontani da quelli delle cellule di controllo.

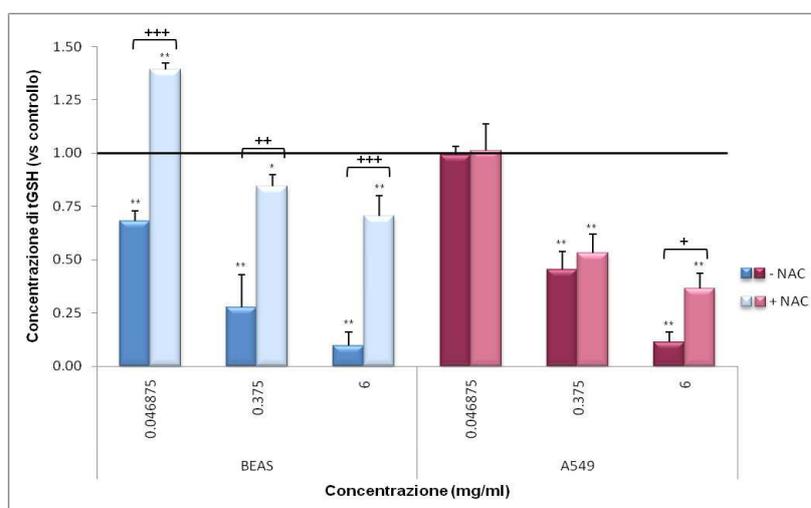


Fig. 31: Variazione della concentrazione di GSH totale rispetto al controllo (*barra nera*) in cellule BEAS-2B e A549 dopo 1 ora di esposizione alla *Frazione Totale* alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml e dopo pre-trattamento di 24 ore con NAC 10 mM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, rispetto al controllo non trattato, e + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, +++ $P < 0.001$, rispetto alle cellule non pre-trattate.

DOSAGGIO DELLE INTERLEUCINE 6 E 8

L'effetto del pre-trattamento con NAC sulla produzione di interleuchine pro-infiammatorie ottenuta per esposizione alla *Frazione Totale* è particolarmente importante e significativo. In entrambe le linee cellulari, infatti, è in grado di riportare la quantità di IL-6 e IL-8 ai livelli del controllo o addirittura a concentrazioni significativamente minori (Fig. 32a e 32b).

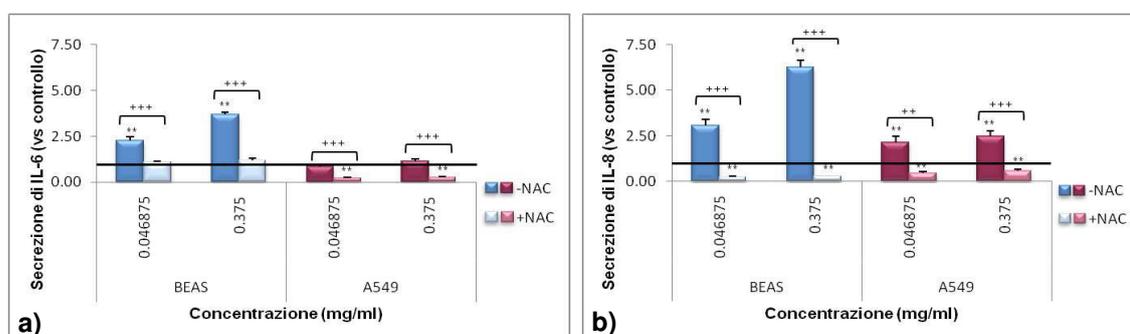


Fig. 32: Variazione della concentrazione IL-6 (a) e IL-8 (b) rispetto al controllo (*barra nera*) in cellule BEAS-2B e A549 dopo 24 ore di esposizione alla *Frazione Totale* alle concentrazioni 0.046875 e 0.375 mg/ml e dopo 24 ore di pre-trattamento con NAC 10 mM. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, rispetto al controllo non trattato, e +++ $P < 0.001$, rispetto alle cellule non pre-trattate.

EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO

La crescita delle cellule BEAS-2B è influenzata in modo dipendente alla concentrazione dall'esposizione per 24 ore alla *Frazione Totale*. Questo effetto antiproliferativo è significativamente contrastato dal pre-trattamento con NAC ed è particolarmente evidente e dopo esposizione alla concentrazione maggiore (6 mg/ml).

La crescita delle cellule tumorali A549 non è significativamente influenzata né dall'esposizione al *Fly Ash* tal quale che dal pre-trattamento con NAC (Fig. 33).

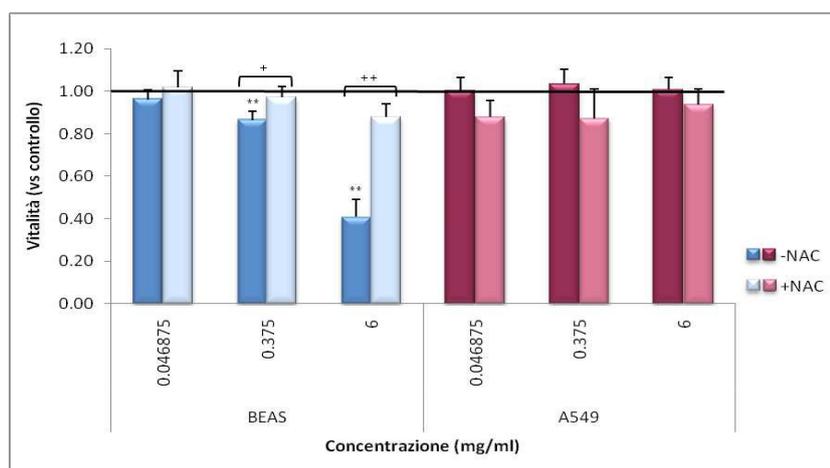


Fig. 33: Variazione della vitalità rispetto al controllo (**barra nera**) in cellule BEAS-2B e A549 dopo 24 ore di esposizione alla *Frazione Totale* alle concentrazioni 0.046875, 0.375 e 6 mg/ml e dopo pre-trattamento di 24 ore con NAC 10 mM. ** $P < 0.01$, rispetto al controllo non trattato, e + $P < 0.05$, ++ $P < 0.01$, rispetto alle cellule non pre-trattate.

4.2 PROFILO TOSSICOLOGICO DEI CAMPIONI DERIVATI DA FILTRI DELL'ARIA

Per completare il quadro tossicologico dei prodotti e delle emissioni associati al processo di incenerimento di rifiuti solidi urbani, sono stati valutati anche gli effetti tossici di alcuni campioni ottenuti da filtri d'aria posti in diverse zone della città di Bolzano, più o meno influenzate dalle emissioni dell'impianto stesso.

I campioni sono stati innanzitutto caratterizzati dal punto di vista chimico per quanto riguarda il contenuto di diossine e idrocarburi policiclici aromatici (IPA), mentre lo studio tossicologico si è incentrato sui loro effetti cellulari. In particolare è stata studiata la loro capacità di influenzare la crescita cellulare, di indurre stress ossidativo (produzione di ROS) ed infiammazione (dosaggio di IL-6 e IL-8).

4.2.1 CARATTERIZZAZIONE CHIMICA HRGC-HRMS

L'analisi chimica del contenuto in diossine e IPA dei vari campioni ottenuti da un campionario direzionale posizionato in centro città a Bolzano (*Calma di vento, Settore 1* e *Settore 2*) e da filtri posti a camino dell'inceneritore e di una stufa economica (controllo positivo), è stata effettuata mediante HRGC-HRMS (Gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione).

Come riportato in Tabella 3, il campione ottenuto dalla stufa economica è particolarmente ricco in diossine e IPA. In realtà il risultato era atteso, poiché nella stufa sono stati volutamente bruciati materiali inquinanti, per ottenere un campione di controllo positivo altamente concentrato. Per quanto riguarda gli altri campioni, il *Settore 1*, che raccoglie il vento proveniente da nord, è quello a minore contenuto in IPA, mentre i campioni *Calma di Vento* (che rileva l'inquinamento del background cittadino) e *Settore 2* (che raccoglie il vento proveniente da sud, in cui è localizzato l'inceneritore) contengono quantità di IPA e diossine pressoché analoghe. Anche il campione ottenuto da filtri posti a camino dell'inceneritore contiene una quantità di IPA sovrapponibile a quella degli altri campioni, mentre la sua concentrazione in diossine è circa 1000 volte superiore.

Campioni	IPA	Diossine
<i>Calma di Vento</i>	134.1 pg/m ³	4.7 fg TEQ/m ³
<i>Settore 1</i>	58.6 pg/m ³	6.2 fg TEQ/m ³
<i>Settore 2</i>	144.1 pg/m ³	8.5 fg TEQ/m ³
<i>Camino dell'Inceneritore</i>	<100 pg/m ³	1000 fg TEQ/m ³
<i>Camino della Stufa</i>	892.8 µg/m ³	722.9 ng TEQ/m ³

Tab. 3: Caratterizzazione chimica dei campioni ottenuti dai filtri mediante HRGC-HRMS.

4.2.2 EFFETTO ANTIPROLIFERATIVO

CALMA DI VENTO

Il campione derivato dal campionatore direzionale, estratto dalla cartuccia attivata in condizioni di assenza di vento, raccoglie l'inquinamento dell'aria dovuto alle emissioni della città e quindi essenzialmente dovute al traffico veicolare, al riscaldamento domestico e a stufe economiche.

Come evidenziato in Figura 34a, l'esposizione al campione *Calma di Vento* non induce alcuna variazione della vitalità delle cellule BEAS-2B.

Le cellule A549 risultano leggermente più sensibili al trattamento. Entrambe le diluizioni utilizzate, infatti, riducono in modo significativo la vitalità cellulare dopo 72 ore di esposizione (Fig. 34b).

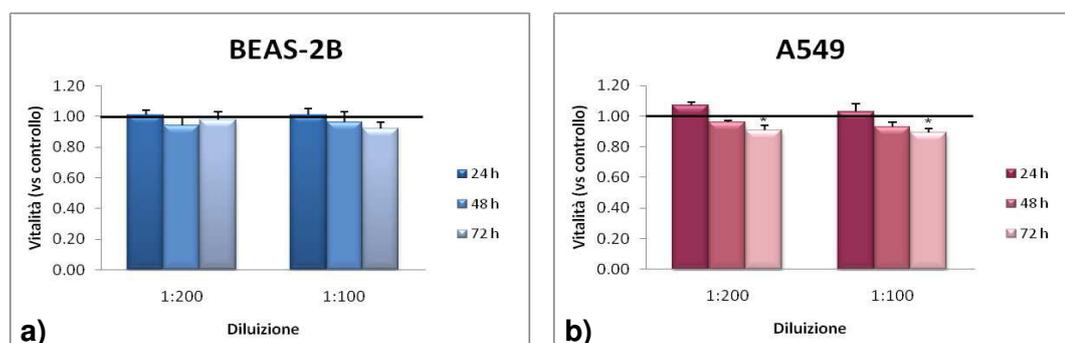


Fig. 34: Variazione rispetto al controllo (barra nera) della vitalità delle cellule BEAS-2B (a) e A549 (b) dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione al campione *Calma di Vento* diluito 1:200 e 1:100. * $P < 0.05$.

Risultati

SETTORE 1

La Figura 35a mostra come l'esposizione al campione *Settore 1*, che raccoglie il vento proveniente da nord, interferisca sulla vitalità delle BEAS-2B solo dopo esposizione alla concentrazione maggiore e solo dopo 72 ore.

Analoga è la risposta delle cellule A549, anche se l'entità della diminuzione di vitalità è più significativa, rispetto alle cellule non tumorali (Fig. 35b).

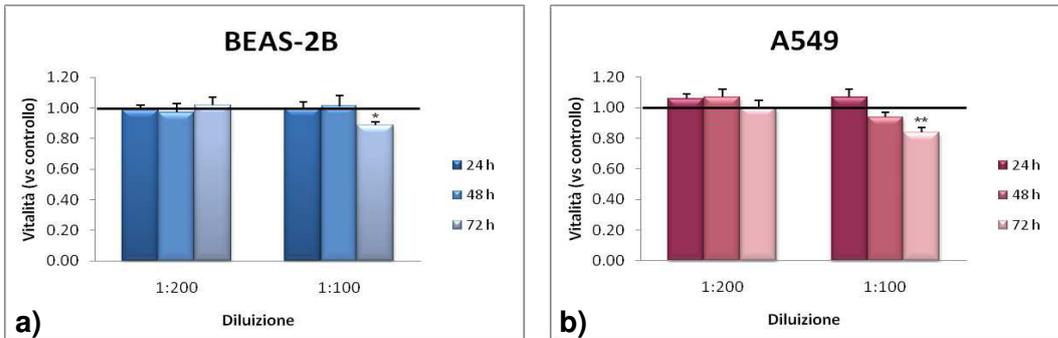


Fig. 35: Variazione rispetto al controllo (*barra nera*) della vitalità delle cellule BEAS-2B (a) e A549 (b) dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione al campione *Settore 1* diluito 1:200 e 1:100. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

SETTORE 2

Anche l'esposizione al campione che raccoglie il vento proveniente da sud, zona dell'inceneritore, influenza la proliferazione delle BEAS-2B solo alla concentrazione maggiore e solo dopo 72 ore (Fig. 36a).

In modo simile rispondono le cellule broncoalveolari tumorali con significativa diminuzione della vitalità solo dopo 72 ore di esposizione alla concentrazione più alta (Fig. 36b).

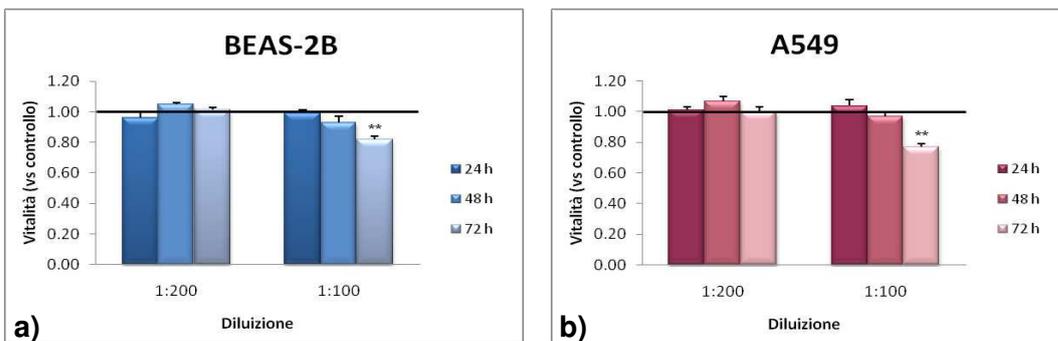


Fig. 36: Variazione rispetto al controllo (*barra nera*) della vitalità delle cellule BEAS-2B (a) e A549 (b) dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione al campione *Settore 1* diluito 1:200 e 1:100. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

CAMINO DELL'INCENERITORE

Anche con il campione ottenuto da filtri posti a camino dell'inceneritore (*Camino dell'Inceneritore*) non si evidenzia una sostanziale differenza tra le due linee cellulari. Ancora una volta, le cellule BEAS-2B mostrano una significativa diminuzione della vitalità solo in seguito a 72 ore di esposizione alla concentrazione più alta (Fig. 37a).

La proliferazione delle A549 risulta significativamente ridotta dopo 72 ore di esposizione alla concentrazione minore mentre a quella maggiore (1:100) si ottiene una riduzione della crescita cellulare anche dopo 48 ore di esposizione (Figura 37b).

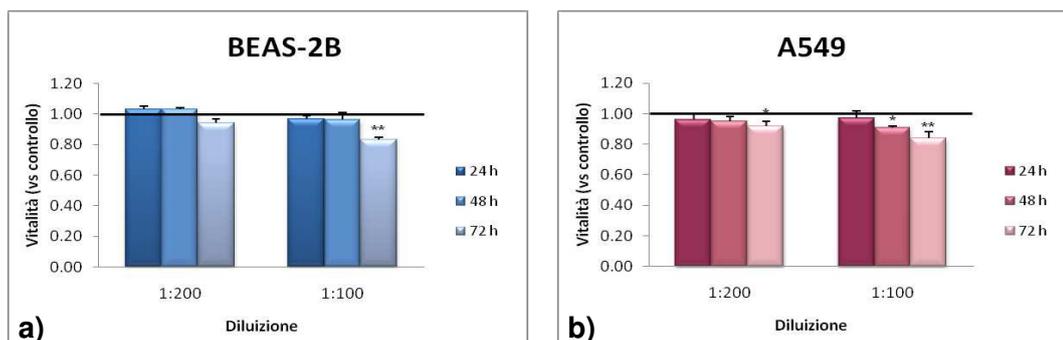


Fig. 37: Variazione rispetto al controllo (*barra nera*) della vitalità delle cellule BEAS-2B (a) e A549 (b) dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione al Campione Camino dell'Inceneritore diluito 1:200 e 1:100.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

CAMINO DELLA STUFA

Come riportato in Figura 38a, le cellule BEAS-2B risultano più sensibili all'azione antiproliferativa del campione concentrato. Dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione ad una diluizione particolarmente elevata (1:1000) si ottiene una significativa e non tempo-dipendente riduzione della crescita cellulare, che alla concentrazione più alta (1:100) diventa decisamente apprezzabile e tempo-dipendente, rispettivamente del 48, 63 e 83% rispetto al controllo.

La linea cellulare tumorale è decisamente meno sensibile, in questo caso, infatti, si ottiene un significativo effetto antiproliferativo (riduzione del 62%) solo dopo 72 ore di esposizione alla concentrazione maggiore (Fig. 38b).

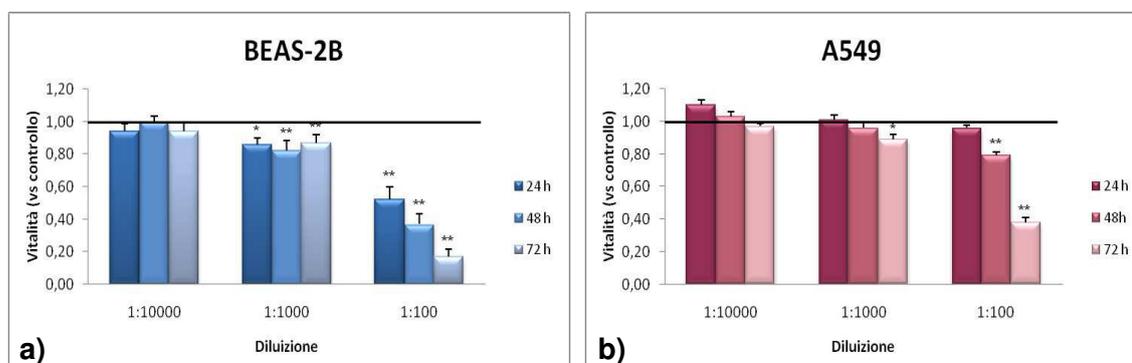


Fig. 38: Variazione rispetto al controllo (*barra nera*) della vitalità delle cellule BEAS-2B (a) e A549 (b) dopo 24, 48 e 72 ore di esposizione al Campione Camino dell'Inceneritore diluito 1:10000, 1:1000 e 1:100.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

4.2.3 PRODUZIONE DI SPECIE REATTIVE DELL'OSSIGENO (ROS)

CALMA DI VENTO

L'esposizione di entrambe le linee cellulari a questo campione non induce alcuna variazione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (Fig. 39a). Anche l'interazione tra il campione e le componenti del siero (ROS in assenza di cellule) non porta ad alcun aumento delle specie radicaliche.

Risultati

SETTORE 1

Solo le cellule BEAS-2B rispondono, dopo 1 ora di esposizione al campione *Settore 1*, con un aumento della produzione dei ROS intracellulari (del 54% rispetto al controllo). Nessuna variazione di ROS si ottiene utilizzando le A549, come pure nelle prove eseguite in assenza di cellule (Fig. 39b).

SETTORE 2

L'esposizione delle BEAS-2B a questo campione non induce variazione dei ROS intracellulari, mentre l'interazione tra il particolato ed il siero provoca un aumento del 37% rispetto a controllo. Aumento analogo si ottiene anche esponendo le cellule tumorali (Fig. 39c).

CAMINO DELL'INCENERITORE

La Figura 39d mostra come l'esposizione delle BEAS-2B al campione si traduca in un incremento molto significativo della produzione di ROS intracellulari che risulta di circa il 150% rispetto al controllo. Negli altri sistemi sperimentali non è stato invece rilevato alcun aumento della produzione di ROS.

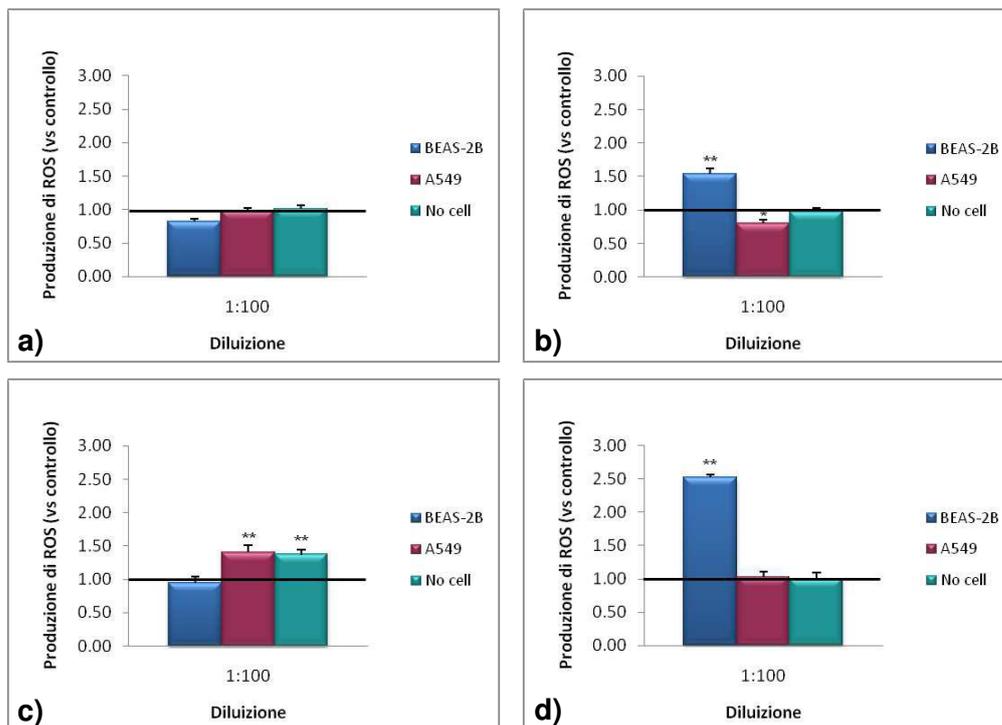


Fig. 39: Variazione dell'intensità di fluorescenza di DCF rispetto al controllo (barra nera) in cellule BEAS-2B, A549 e in assenza di cellule dopo 1 ora di esposizione ai campioni *Calma di Vento* (a), *Settore 1* (b), *Settore 2* (c), *Camino dell'Inceneritore* (d) diluiti 1:100. ** $P < 0.01$.

CAMINO DELLA STUFA

L'esposizione di entrambe le linee cellulari a questo campione, considerato come controllo positivo, induce un significativo aumento della produzione di specie reattive dell'ossigeno, che con la diluizione 1:100 raggiunge valori quasi doppi rispetto ai controlli.

Il risultato più interessante si ottiene ancora una volta dall'interazione del campione con le componenti del siero, in assenza di cellule; in questo caso si ottiene infatti un aumento concentrazione-dipendente, rispettivamente del 55, 440 e 1035% rispetto al controllo (Fig. 40).

Questo sottolinea come l'elevato contenuto in IPA e diossine del campione lo renda enormemente reattivo e che l'entità del danno ossidativo, evidenziato valutando la produzione di ROS intracellulari, è probabilmente dovuto anche all'insulto pro-ossidante indotto dalle specie radicaliche extracellulari, presenti nel terreno di coltura.

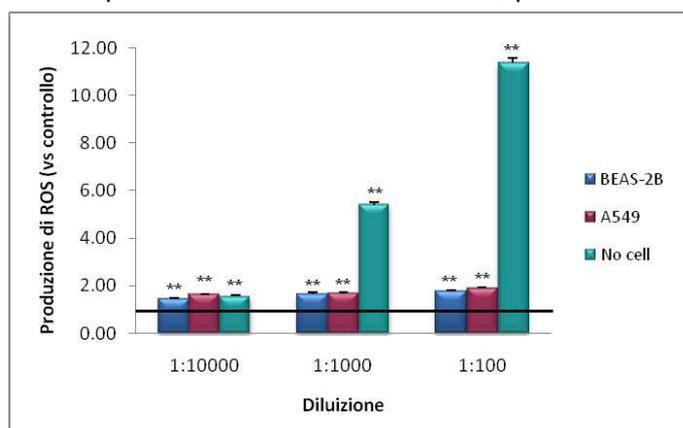


Fig. 40: Variazione dell'intensità di fluorescenza di DCF rispetto al controllo (*barra nera*) in cellule BEAS-2B, A549 e in assenza di cellule in seguito ad 1 ora di esposizione al campione *Camino della Stufa* diluito 1:10000, 1:1000 e 1:100. ** $P < 0.01$.

4.2.4 DOSAGGIO DELLE INTERLEUCINE 6 E 8

CALMA DI VENTO

In entrambe le linee cellulari, dopo 24 ore di esposizione al campione, non solo non si ottiene alcun aumento della secrezione delle due interleuchine, ma addirittura all'aumentare della concentrazione del campione diminuisce la loro quantità (Fig. 41a e 41b). Questo risultato (che si conferma anche dopo esposizione agli altri campioni) potrebbe essere dovuto ad interferenze tra ciò che è presente nei vari campioni con i componenti del kit di quantificazione utilizzato. Queste interferenze potrebbero tradursi in spiazzamento o occupazione di siti di legame, tali da non permettere una reale quantificazione delle due proteine pro-infiammatorie.

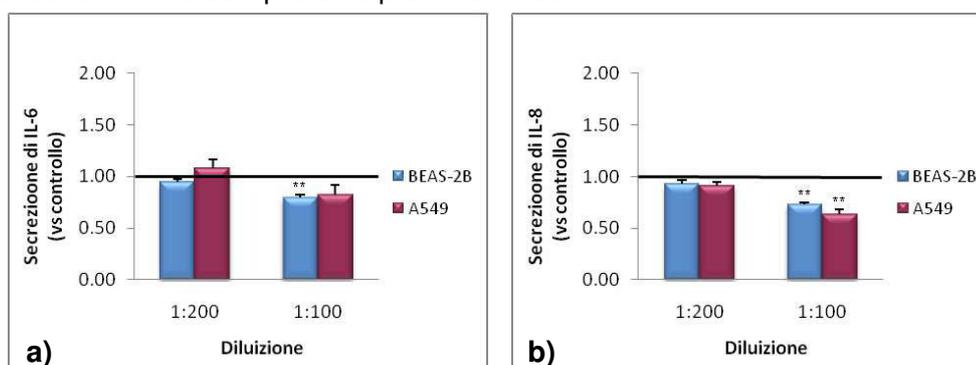


Fig. 41: Variazione della concentrazione di IL-6 (a) e IL-8 (b) rispetto al controllo (*barra nera*) in cellule BEAS-2B e A549 dopo 24 ore di esposizione al campione *Calma di Vento* diluito 1:200 e 1:100. ** $P < 0.01$.

Risultati

SETTORE 1

L'effetto dell'esposizione al campione *Settore 1* è del tutto analogo a quello ottenuto con il campione *Calma di Vento*. In entrambe le linee cellulari non si osserva alcuna variazione significativa della secrezione delle due interleuchine alla concentrazione minore, mentre si ottiene un drastico crollo alla concentrazione più alta (Fig. 42a e 42b).

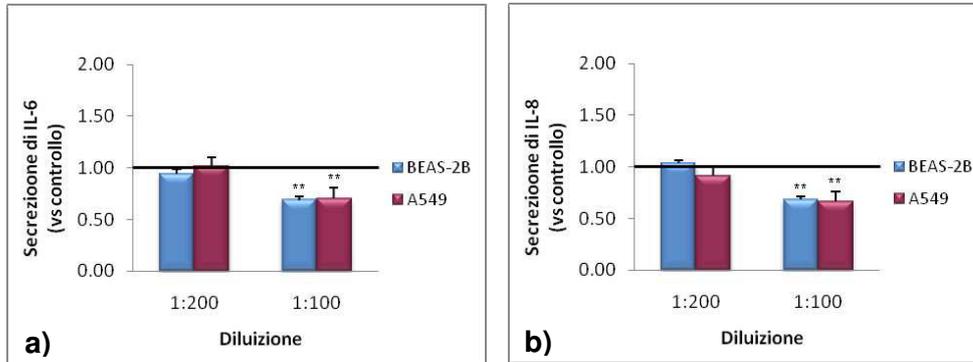


Fig. 42: Variazione della concentrazione di IL-6 (a) e IL-8 (b) rispetto al controllo (barra nera) in cellule BEAS-2B e A549 dopo 24 ore di esposizione al campione *Settore 1* diluito 1:200 e 1:100. ** $P < 0.01$.

SETTORE 2

In generale, l'esposizione al campione non modifica la concentrazione di IL-6, eccezion fatta per le A549, ove dopo esposizione alla concentrazione maggiore si ha un drastico calo (Fig. 43a).

Significativo aumento di IL-8 (circa il 15%) si ottiene solo per esposizione delle cellule tumorali alla concentrazione minore (Fig. 43b).

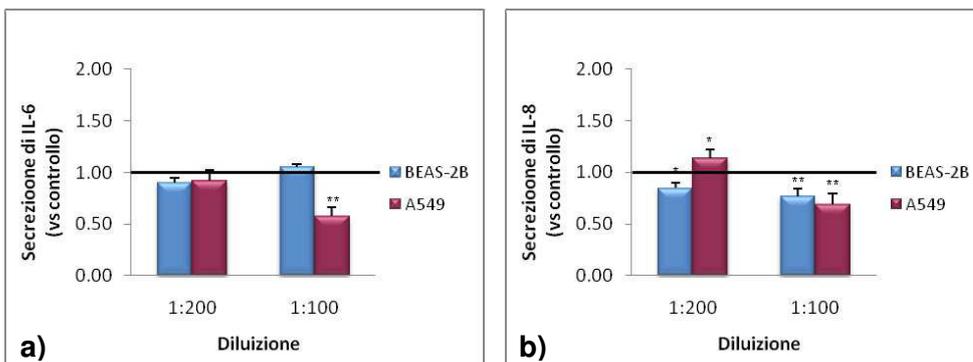


Fig. 43: Variazione della concentrazione di IL-6 (a) e IL-8 (b) rispetto al controllo (barra nera) in cellule BEAS-2B e A549 dopo 24 ore di esposizione al campione *Settore 2* diluito 1:200 e 1:100. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

CAMINO DELL'INCENERITORE

La Figura 44a evidenzia un significativo aumento (dell'ordine del 50%) dei livelli di IL-6, dopo 24 ore di esposizione delle cellule BEAS-2B ad entrambe le diluizioni del campione. Ancora più evidente è in queste cellule l'aumento della secrezione di IL-8, che supera di quasi il 70% quella del controllo già alla concentrazione minore (Fig. 44b).

Il campione *Camino dell'Inceneritore* provoca nelle cellule tumorali un significativo aumento (circa del 30%) della produzione di sola IL-8 indipendentemente dalla concentrazione (Fig. 44b).

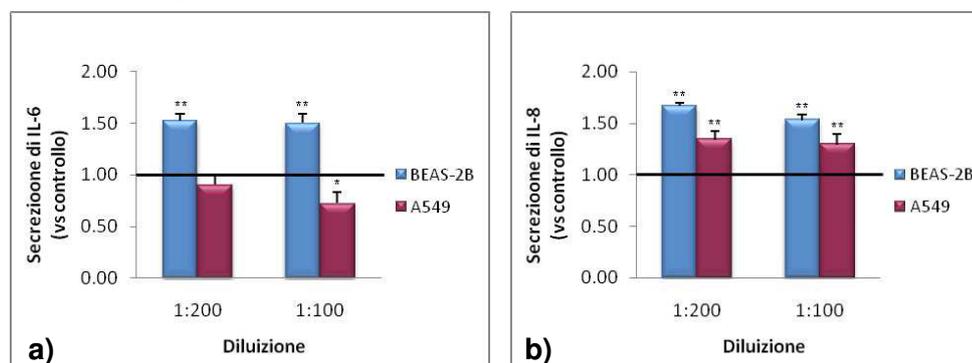


Fig. 44: Variazione della concentrazione di IL-6 (a) e IL-8 (b) rispetto al controllo (barra nera) in cellule BEAS-2B e A549 dopo 24 ore di esposizione al campione *Camino dell'Inceneritore* diluito 1:200 e 1:100. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

CAMINO DELLA STUFA

Come riportato in Figura 45a, l'esposizione delle cellule epiteliali non tumorali al campione concentrato induce un significativo aumento dei livelli di IL-6 alle diluizioni 1:10000 e 1:1000, rispettivamente del 50 e 69% rispetto al controllo. Da sottolineare che ancora una volta l'esposizione alla diluizione minore (1:100) si traduce in un significativo calo della concentrazione di interleuchina.

Per quanto concerne l'IL-8, si ottiene un aumento particolarmente importante dopo l'esposizione delle BEAS-2B alla diluizione 1:1000, dove la concentrazione della proteina risulta quasi doppia rispetto al controllo.

Per quanto riguarda le cellule A549, l'esposizione alla diluizione intermedia (1:1000) provoca un aumento di circa il 20% di entrambe le interleuchine.

Da segnalare ancora una volta, il crollo della quantità delle due interleuchine dopo esposizione alla diluizione maggiore (1:100).

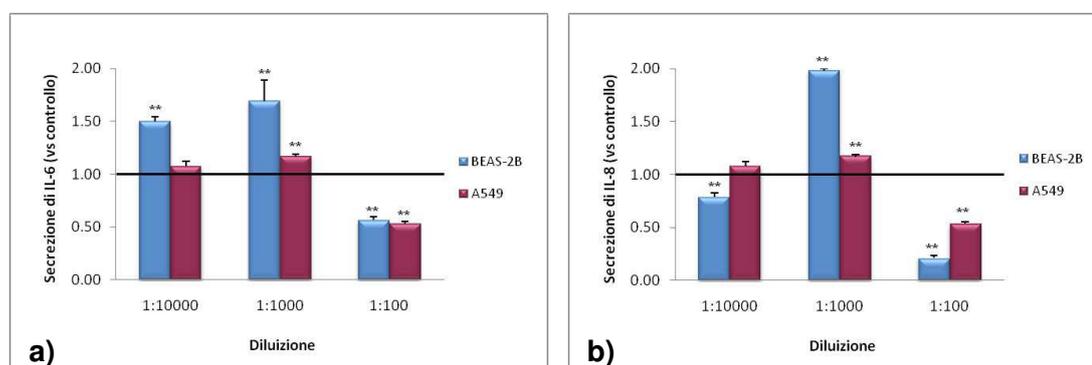


Fig. 45: Variazione della concentrazione di IL-6 (a) e IL-8 (b) rispetto al controllo (barra nera) in cellule BEAS-2B e A549 dopo 24 ore di esposizione al campione *Camino della Stufa* diluito 1:10000, 1:1000 e 1:100. ** $P < 0.01$.

Capitolo 5

DISCUSSIONE

Per definizione, è considerato “inquinante atmosferico” qualsiasi composto in grado di nuocere alla salute dell'uomo o degli animali e di danneggiare la vegetazione e il suolo (Kampa, Castanas, 2008). Numerose sono le attività naturali (vulcani, incendi, erosione dei venti, ecc.) che possono rilasciare inquinanti nell'ambiente, tuttavia le attività umane sono attualmente la maggior causa dell'inquinamento dell'aria. Alcune sostanze pericolose possono venir emesse per cause accidentali, ma la gran parte delle emissioni provengono da impianti industriali e da altre attività.

L'inquinamento dell'aria dovuto al materiale particolato (PM) è un importante fattore di rischio per la salute, tanto da essere ormai ritenuto il responsabile di numerose patologie. Molti studi epidemiologici hanno infatti evidenziato una correlazione diretta tra l'esposizione al PM e l'insorgere di infezioni respiratorie acute, tumore polmonare e malattie croniche del tratto respiratorio e del sistema cardiovascolare (de Kok et al., 2006).

Le caratteristiche chimico-fisiche e aerodinamiche degli inquinanti inalati, così come le caratteristiche fisiologiche e anatomiche dell'albero respiratorio, sono fondamentali per la determinazione del sito di assorbimento, di deposito e, in definitiva, del loro destino (Bonetta et al., 2009; Bakand, Hayes, 2010). In base alla loro solubilità e grandezza i composti nocivi inalati, tra cui il PM, possono raggiungere le diverse regioni del tratto respiratorio ed, eventualmente, essere assorbiti. Di conseguenza, il sistema respiratorio non è solo un sito di tossicità, ma anche un'importante via d'accesso di contaminanti che possono raggiungere altri organi, ove esercitare i loro effetti tossici (Ovrevik et al., 2009).

Le cellule dell'epitelio respiratorio proteggono la mucosa mediante numerosi meccanismi di difesa e di omeostasi, quali la *clearance* mucociliare, la secrezione di ioni, la regolazione del contenuto in acqua del liquido superficiale (che se sregolato diminuisce le difese contro le infezioni) e la secrezione nel muco di molecole antiinfiammatorie, antibatteriche e antiossidanti. Nonostante questi meccanismi difensivi, l'epitelio delle vie aeree è costantemente esposto a sostanze inalabili, come il particolato, sia di origine naturale che antropogenica, fibre e composti chimici, le quali possono indurre alterazioni della struttura e della funzione delle sue cellule (BéruBé et al., 2010).

I meccanismi attraverso i quali il particolato inalabile, indipendentemente dalle sue caratteristiche chimico-fisiche, provoca effetti sulla salute non sono ancora completamente chiari, ma probabilmente molti di questi sono dovuti a formazione di specie reattive dell'ossigeno a livello cellulare (Balduzzi, 2003). Numerosi studi riportati in letteratura confermano la capacità del PM di indurre effetti proinfiammatori a livello nasale, polmonare e a carico del sistema vascolare (Ayres et al., 2008). Ad esempio gli studi del gruppo di

Discussione

Diabaté (2011) hanno messo in evidenza come l'inalazione di particelle derivate dai processi di combustione sia strettamente correlata all'insorgere di numerose patologie del tratto respiratorio.

I risultati della ricerca tossicologica *in vitro* hanno evidenziato il coinvolgimento di alcuni meccanismi cellulari, quali citotossicità, mutagenesi, danni al DNA e stimolazione della produzione di citochine pro-infiammatorie (de Kok et al., 2006). Numerosi sono gli studi presenti in letteratura che dimostrano una diretta correlazione tra il contenuto in sostanze pericolose in campioni d'aria e l'attivazione di meccanismi di tossicità cellulare *in vitro* (Gualtieri et al., 2010; Steenhof et al., 2011; Manzano-León et al., 2013).

Riuscire a comprendere i meccanismi del danno polmonare e della sua possibile riparazione, a seguito dell'esposizione a sostanze tossiche presenti nell'ambiente atmosferico, è uno dei principali *focus* di studio in campo della medicina e della tossicologia respiratorie.

Anche l'incenerimento dei rifiuti solidi urbani può contribuire all'inquinamento atmosferico; infatti i moderni stili di vita portano alla produzione di una grande quantità di rifiuti, che tende costantemente ad aumentare (McKay, 2002). Il modo più efficace per tentare di risolvere questo problema è quello di ridurre il volume di rifiuti generati: gli odierni inceneritori di rifiuti solidi urbani sono in grado di diminuire la massa dei rifiuti di circa il 90% e consentono di recuperare gran parte dell'energia dal processo di combustione. Il processo porta però alla formazione di ceneri, pesanti e leggere, con caratteristiche molto pericolose e quindi l'incenerimento dei rifiuti solidi urbani può essere considerato una fonte secondaria di inquinamento (Steenhof et al., 2011).

Essenzialmente due sono i sottoprodotti che si formano: *Bottom Ash* (cenere pesante) e *Fly Ash* (cenere leggera). Quest'ultima, pur rappresentando la parte percentualmente minore dei residui totali (5-20%), contiene notevoli quantità di sostanze tossiche, come metalli pesanti (Pb, Cd, Zn), idrocarburi policiclici aromatici (IPA), diossine e furani (Kalogirou et al., 2010; Yao et al., 2012).

Per quanto riguarda l'emissione di polveri, gli attuali impianti d'incenerimento sono dotati di filtri a manica in grado di garantire concentrazioni di polveri in uscita di gran lunga inferiori ai limiti di legge. La parte più fine della cenere (*Fly Ash*), che non viene scaricata dalla griglia perché troppo leggera, viene trascinata dai fumi e bloccata dai filtri prima della sua emissione nell'ambiente.

L'obiettivo di questo studio è stato inizialmente quello di caratterizzare dal punto di vista tossicologico il *Fly Ash* ottenuto dall'inceneritore di rifiuti solidi urbani di Bolzano. Questa cenere leggera viene normalmente trattenuta dai sistemi di filtraggio ma, in caso d'incidente o malfunzionamento, potrebbe essere rilasciata in atmosfera e quindi entrare in contatto con l'uomo. Per completare lo studio sull'impatto dell'impianto sulla salute è stato definito anche il profilo tossicologico di alcuni campioni ottenuti da filtri di aria posti in diverse posizioni della città di Bolzano, influenzati in maniera più o meno importante dalla presenza di diverse fonti di emissione, tra cui l'inceneritore di rifiuti solidi urbani.

Lo studio è stato condotto utilizzando due linee cellulari del tratto respiratorio. Sono state

scelte due linee immortalizzate per assicurare la standardizzazione degli esperimenti e quindi la riproducibilità dei risultati. In particolare, sono state utilizzate una linea di cellule neoplastiche, le A549 (carcinoma bronchiolo-alveolare), le quali mantengono in coltura un fenotipo alveolare umano (Giard et al., 1973) ed una linea ottenuta a partire da cellule di epitelio bronchiale umano normale e immortalizzate mediante trasformazione con il virus SV40, le BEAS-2B (Reddel et al., 1988).

Il campione di *Fly Ash*, prelevato dall'inceneritore urbano durante la marcia dell'impianto, dopo i filtri a manica, in ingresso al silos di stoccaggio, è stato innanzitutto studiato dal punto di vista chimico-fisico.

La caratterizzazione granulometrica ha evidenziato che la maggior parte delle particelle ha diametro aerodinamico $<10 \mu\text{m}$. Inoltre l'analisi condotta dopo agitazione, che mima un aerosol di possibile inalazione, evidenzia un picco massimo di particelle con diametro aerodinamico di circa $3 \mu\text{m}$. Studi approfonditi sulla porosità della superficie della cenere hanno messo in luce la presenza di aggregati di particelle solide di forma discoidale con pori a simmetria cilindrica non rigidi, essenzialmente dovuti alla formazione di vuoti tra i diversi aggregati.

Dalle analisi chimiche risulta la presenza di idrocarburi policiclici aromatici, para-dibenzo-diossine, para-dibenzo-furani ed una notevole concentrazione di cloruri. Per quanto riguarda i metalli pesanti tra quelli classificati come tossici sono da segnalare significative quantità di zinco e stagno, mentre tra quelli classificati come molto tossici sono presenti importanti concentrazioni di piombo, antimonio, cadmio, cromo e nichel.

Poiché la capacità del PM di raggiungere i vari tratti dell'albero respiratorio ed eventualmente di essere assorbito dipendono non solo dalle dimensioni ma anche dalla sua solubilità, il *Fly Ash* utilizzato negli studi *in vitro* è stato suddiviso in tre aliquote: la prima è stata utilizzata tal quale (*Frazione Totale*); la seconda è stata sospesa in acqua bidistillata, agitata e centrifugata al fine di separare il surnatante o *Frazione Idrosolubile*, dal precipitato o *Frazione Non-Idrosolubile*; la terza è stata sospesa in DMSO in modo da estrarre la parte organica (*Frazione DMSO-solubile*).

Le analisi ICP (spettrometria di massa a plasma induttivamente accoppiato) condotte sulle diverse frazioni hanno evidenziato che la *Frazione DMSO-solubile* contiene pressoché tutti gli elementi presenti nella *Frazione Totale* (ad eccezione del Co), ma a concentrazioni generalmente inferiori, mentre nella *Frazione Idrosolubile* sono presenti in piccole quantità o addirittura del tutto assenti.

Le analisi ottenute al microscopio a contrasto di fase, e soprattutto quelle con microscopia elettronica a trasmissione, hanno messo in evidenza come le particelle di cenere siano internalizzate dalle cellule, in modo particolare nelle BEAS-2B si osservano vescicole citoplasmatiche contenenti numerose particelle di forma e dimensione variabili.

È stato dimostrato che alcuni classici test di vitalità cellulare possono essere falsati da interazioni con il campione in esame; questi problemi potrebbero essere particolarmente importanti nel caso di ceneri complesse come il *Fly Ash*, le cui particelle possono aderire alla superficie cellulare ed interferire con l'assorbimento della luce o con la fluorescenza,

Discussione

compromettendo in tal modo la validità del metodo utilizzato. Sono possibili inoltre reazioni chimiche tra le componenti del *Fly Ash* ed i substrati dei vari test o, ancora, fenomeni di adsorbimento dei componenti del saggio sulla superficie della cenere. Questi fattori potrebbero quindi falsare la risposta al test di vitalità (Holder et al., 2012). Per questi motivi l'effetto antiproliferativo è stato studiato utilizzando il classico MTT test e l'SRB assay, ottenendo comunque risultati del tutto sovrapponibili.

I risultati ottenuti a diversi tempi di esposizione (24, 48 e 72 ore) dimostrano una maggiore sensibilità delle cellule BEAS-2B all'esposizione al *Fly Ash* e alle sue frazioni rispetto alle cellule tumorali, inoltre la diminuzione di vitalità risulta significativa soprattutto dopo 72 ore di esposizione alla concentrazione maggiore. Le cellule A549 presentano una significativa diminuzione della vitalità solo in seguito a trattamento con la *Frazione Idrosolubile*, soprattutto alla concentrazione maggiore.

I risultati degli studi *in vivo* e *in vitro* concordano nell'attribuire un ruolo fondamentale per la tossicità del particolato alla capacità di produrre radicali dell'ossigeno, dovuta ai metalli di transizione e ai composti organici adsorbiti sulla superficie e facilmente solubilizzabili (Balduzzi, 2003). Considerando la composizione chimica della cenere, è stata studiata la capacità delle varie frazioni di *Fly Ash* di influenzare la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Poiché alcune forme di particolato possono interagire direttamente con i fluidi extracellulari delle vie respiratorie favorendo un'ulteriore produzione ROS (Deshpande, 2002), quest'ultima è stata valutata anche in assenza di cellule, evidenziando in tal modo una produzione dovuta all'interazione tra il *Fly Ash* e i componenti del siero del *medium* di coltura.

I risultati ottenuti indicano che, in seguito ad esposizione alle *Frazioni Totale* e *Non-Idrosolubile*, in entrambe le linee cellulari si verifica un netto incremento dose-dipendente della produzione di ROS. Aumento particolarmente importante si ha in assenza di cellule, in particolare con la concentrazione maggiore (6 mg/ml) della *Frazione Totale*, dove è di quasi 18 volte rispetto al controllo, mentre con la *Frazione Non-Idrosolubile* si ottiene ancora significativa produzione di ROS, anche se quantitativamente meno rilevante. Per contro, l'esposizione di entrambe le linee cellulari alla *Frazione Idrosolubile* non influenza minimamente la produzione di ROS, mentre è un leggero aumento di ROS, soprattutto nelle cellule non tumorali ed in assenza di cellule, si ottiene dopo esposizione alla *Frazione DMSO-solubile*.

Questi risultati trovano giustificazione nel diverso contenuto di sostanze pro-ossidanti presenti nelle varie frazioni, come dimostrato dalle analisi chimiche.

La significativa produzione di ROS ottenuta in assenza di cellule sottolinea chiaramente l'esistenza di importanti interazioni tra i vari componenti del *Fly Ash* e quelli del terreno di coltura. Alcune forme di particolato, soprattutto quelle contenenti metalli, possono produrre loro stesse specie radicaliche, che vanno a sommarsi ai ROS prodotti dalle cellule in seguito a stimolo pro-ossidante (Martin et al., 1997).

L'organismo umano possiede dei sistemi di difesa estremamente efficaci nei confronti dei radicali liberi. Tra i più importanti antiossidanti endogeni sono da menzionare il tripeptide

glutazione e piccole proteine, come la tioredoxina, la glutaredoxina e la perossiredoxina, che hanno la particolarità di possedere dei gruppi tiolici.

Il glutatione ridotto (GSH) è tra i più efficaci antiossidanti solubili presente a livello intracellulare, è particolarmente abbondante nel citosol, nei mitocondri e a livello (Valko et al., 2006). Il GSH è in grado di reagire direttamente con numerose specie radicaliche dotate di elevata tossicità tra cui le specie reattive dell'ossigeno, evitando in tal modo importanti danni alle macromolecole biologiche. Quindi è stata saggiata la capacità delle due linee cellulari di rispondere allo stress ossidativo indotto dal *Fly Ash* tal quale e dalle sue frazioni valutando la variazione del contenuto cellulare di glutatione ridotto totale.

I risultati dimostrano come, in entrambe le linee cellulari, il trattamento con la *Frazione Totale* provochi una diminuzione dose-dipendente del contenuto di GSH totale. Questo risultato, particolarmente significativo con le BEAS-2B già alla concentrazione minore saggiata, diviene decisamente considerevole, nell'ordine del 90%, a quella. Anche le cellule A549 rispondono all'esposizione con un netto calo di GSH totale, che è del 89% alla concentrazione maggiore.

Risultati sovrapponibili ma di minore entità si ottengono dopo trattamento con la *Frazione Non-Idrosolubile*.

In seguito all'esposizione alle frazioni solubili in acqua e DMSO, il contenuto totale di GSH totale rimane, in entrambe le linee cellulari, pressoché prossimo a quella del controllo. Le cellule A549 invece, quando esposte alla concentrazione intermedia della *Frazione Idrosolubile*, rispondono con un incremento dell'antiossidante.

Questi risultati ben si correlano con la produzione delle specie reattive dell'ossigeno. Infatti le cellule esposte alle frazioni *Totale* e *Non-Idrosolubile* presentano un significativo aumento di ROS a cui si accompagna una netta diminuzione della quantità di glutatione, consumato dalle cellule per sopperire allo stress ossidativo.

Un altro importante meccanismo di difesa dell'organismo verso lo stress ossidativo è rappresentato dall'eme ossigenasi (*heme oxygenase*, HO). Nell'uomo vi sono tre isoforme: l'HO-1 (inducibile) e l'HO-2 (costitutiva) e l'HO-3, che ha un'omologia del 90% con l'isoforma 2, ma non risulta essere funzionale. L'eme ossigenasi-1, enzima inducibile, ha un duplice ruolo all'interno delle cellule: il catabolismo dell'eme e una potente attività citoprotettiva, grazie alle sue proprietà antiossidanti, antiapoptotiche e antiinfiammatorie (Conti et al., 2007).

Lo studio è quindi proseguito valutando l'influenza dell'esposizione delle due linee cellulari alle varie frazioni di *Fly Ash* sull'espressione dell'eme-ossigenasi-1.

L'esposizione delle cellule A549 alla *Frazione Totale* non induce alcuna variazione degna di nota dell'espressione dell'enzima, mentre le BEAS-2B rispondono con un significativo aumento che risulta circa il doppio rispetto al controllo già dopo 1 ora di esposizione alla dose maggiore, per raggiungere livelli quasi 20 volte maggiori dopo 24 ore.

Anche la *Frazione DMSO-solubile* provoca un significativo aumento dell'espressione dell'enzima, paragonabile a quello della *Frazione Totale*, ma esclusivamente sulle cellule non tumorali (BEAS-2B). In questo caso inoltre il tempo non gioca un ruolo importante, infatti

Discussione

dopo 1 e 24 ore l'espressione dell'enzima sostanzialmente non cambia.

Ancora una volta, l'esposizione di entrambe le linee cellulari alla *Frazione Idrosolubile* non provoca una risposta diversa rispetto ai controlli non trattati, contribuendo così a confermare che l'attività pro-ossidante non interviene nel meccanismo citotossico di questa frazione

I radicali liberi generati dal particolato inducono danno ossidativo ed attivazione dei macrofagi con conseguente rilascio di specie reattive dell'ossigeno e molecole pro-infiammatorie, le quali danno inizio alla risposta infiammatoria acuta nel polmone. Le cellule epiteliali polmonari, anch'esse in grado di fagocitare le particelle, amplificano la risposta infiammatoria e rispondono allo squilibrio nel bilancio redox cellulare indotto dai radicali liberi con l'attivazione di fattori di trascrizione (NF- κ B, AP-1 e AP-2) e il rilascio di citochine pro-infiammatorie, chemochine, molecole di adesione cellulare e recettori per i mediatori dell'infiammazione. Le particelle ultrafini, penetrando nelle regioni interstiziali del polmone, entrano in contatto con i macrofagi interstiziali ed inducono la liberazione di mediatori dell'infiammazione che possono entrare nel circolo sanguigno e produrre una risposta infiammatoria sistemica (Balduzzi, 2003).

In base ai risultati ottenuti, si è quindi ritenuto interessante verificare se il *Fly Ash* e le sue frazioni fossero in grado di indurre di stimolo pro-infiammatorio.

Poiché il fattore nucleare NF- κ B è considerato il principale regolatore delle risposte infiammatorie, in quanto svolge un ruolo essenziale sia nell'evoluzione che nella fase di risoluzione dell'infiammazione, è stato innanzitutto studiato l'effetto del trattamento sulla sua espressione e traslocazione nucleare.

L'esposizione delle A549 alle due dosi maggiori della *Frazione Totale* provoca un precoce e significativo aumento dell'espressione della subunità p65 di NF- κ B, associato anche alla sua traslocazione nel nucleo. NF- κ B, infatti, è di solito presente in forma inattiva nel citoplasma, associato a I κ B α . Stimoli pro-infiammatori inducono una rapida fosforilazione di I κ B α , rilasciando NF- κ B dimero che può quindi traslocare nel nucleo e attivare la trascrizione di geni bersaglio (Lee, Yang, 2013). Il tempo di esposizione, risulta particolarmente importante per quanto riguarda la risposta delle BEAS-2B, espressione degna di nota si ottiene infatti solo dopo 24 ore. Tuttavia in questa linea cellulare non si evidenzia alcuna traslocazione della sub unità p65 all'interno del nucleo.

Tra le varie frazioni saggiate solo la *Frazione DMSO-solubile* è in grado di indurre in entrambe le linee cellulari una variazione dell'espressione di NF- κ B paragonabile a quella causata dalla *Frazione Totale*.

Spesso l'attivazione di del fattore nucleare κ B porta alla trascrizione di citochine e chemochine pro-infiammatorie. D'altro canto anche l'aumento della produzione di specie radicaliche è sovente associata alla secrezione di interleuchine.

Le interleuchine 6 e 8 sono particolarmente importanti nei processi infiammatori del tratto respiratorio.

L'IL-6, citochina pro-infiammatoria, è secreta dai Linfociti T e dai macrofagi in seguito a danni tissutali che portano ad infiammazione. Essa stimola la sintesi delle proteine di fase acuta e la produzione di neutrofili da parte del midollo osseo, favorisce la crescita dei linfociti

B ed è antagonista dei linfociti T regolatori (Kanazawa, 2005).

L'interleuchina 8 è una chemochina prodotta anche a livello polmonare da macrofagi e da altri tipi cellulari, tra cui le cellule epiteliali. È caratterizzata essenzialmente da due funzioni: induce chemiotassi delle cellule bersaglio (neutrofili ma anche altri granulociti), le quali migrano verso il sito di infezione, ed inoltre ne induce la capacità fagocitica. Lo stress ossidativo aumenta la produzione di interleuchina 8, che, a sua volta, con il reclutamento di cellule infiammatorie, provoca un ulteriore aumento di mediatori di stress ossidativo (Kanazawa, 2005).

Per quanto concerne la produzione di IL-6 i risultati ottenuti indicano che le due linee cellulari rispondono in modo diverso alle frazioni di *Fly Ash*. Infatti, mentre le cellule A549 non sono particolarmente influenzate dal trattamento, risultati particolarmente interessanti si ottengono con le BEAS-2B, ove il trattamento con la *Frazione Totale* e quella *Non-Idrosolubile* induce un significativo e dose-dipendente aumento della produzione dell'interleuchina. Da sottolineare che all'aumentare della concentrazione della *Frazione Totale*, i livelli di citochina rilevati nel *medium* di coltura raddoppiano e quasi quadruplicano rispetto al controllo. L'esposizione delle cellule BEAS-2B alla *Frazione Idrosolubile* induce una produzione statisticamente significativa di IL-6, anche se quantitativamente inferiore rispetto a quanto ottenuto con il *Fly Ash* tal quale e con la *Frazione Non-Idrosolubile*, mentre con la *Frazione DMSO-solubile* non si ottengono risultati degni di nota.

Entrambe le linee cellulari rispondono all'esposizione alle diverse frazioni di *Fly Ash* producendo interleuchina 8, anche se in maniera quantitativamente diversa. In particolare, concentrazioni elevate si ottengono dopo esposizione alla *Frazione Totale*; meno importante, ma ancora statisticamente significativa, è la produzione di citochina indotta dall'esposizione alla *Frazione Non-Idrosolubile*.

Questi risultati sono in linea con il significativo aumento di ROS indotto da queste due frazioni, dimostrando quindi come i due fenomeni (stress ossidativo ed infiammazione) siano correlati.

Ulteriore conferma è data dagli esperimenti di pre-trattamento con N-acetilcisteina. Questo noto antiossidante, grazie alle sue caratteristiche, è in grado di entrare facilmente nelle cellule, ove viene deacetilato a L-cisteina, aminoacido indispensabile per la sintesi del glutatione. Il NAC svolge quindi un ruolo di primaria importanza nel mantenimento di adeguati livelli di glutatione, contribuendo così alla difesa verso l'insulto da agenti dannosi.

Il pre-trattamento con l'antiossidante è infatti in grado preservare le cellule dallo stress ossidativo e dall'infiammazione innescati dall'esposizione al *Fly Ash* tal quale (*Frazione Totale*), come dimostrato dalla diminuzione della produzione di ROS, dal marcato aumento della quantità di GSH totale e dalla diminuzione del rilascio di interleuchine.

In definitiva, risultati ottenuti permettono di iniziare a delineare il profilo tossicologico del *Fly Ash*, cenere leggera ottenuta dall'incenerimento di rifiuti tossici urbani, che:

- se rilasciata nell'ambiente può depositarsi nell'albero respiratorio, come indicato dallo studio delle sue caratteristiche fisiche;
- può essere internalizzata nelle cellule, come dimostrato dagli studi di microscopia;

Discussione

- può innescare meccanismi tossici di tipo ossidativo, confermati dall'aumento della produzione di ROS, a cui si accompagnano una diminuzione dose-dipendente dei livelli di GSH totale e ad un aumento dell'espressione di HO-1. Questi risultati sono ottenuti sia dopo esposizione al *Fly Ash* tal quale che alla *Frazione DMSO-solubile*;
- può innescare meccanismi infiammatori, come dimostrato dall'aumento dell'espressione del fattore di trascrizione NF-kB p65 e dalla sua, almeno parziale, traslocazione nel nucleo e dall'aumento della produzione di IL-6 e IL-8, ottenuti sia dopo esposizione al *Fly Ash* tal quale che alla *Frazione DMSO-solubile*;
- entrambi i meccanismi di tossicità possono essere contrastati dal pre-trattamento con un antiossidante (NAC), che è in grado di diminuire significativamente la produzione di ROS, di contrastare la deplezione di tGSH e la secrezione di IL-6 e IL-8; inoltre il pre-trattamento con NAC è in grado di influenzare anche la citotossicità indotta dal *Fly Ash*.

Quindi lo stress ossidativo è l'*input* scatenante la risposta tossica che caratterizza questa miscela complessa di inquinanti eventualmente immessa nell'ambiente.

Per completare il quadro tossicologico dei prodotti e delle emissioni associati al processo di incenerimento di rifiuti solidi urbani, lo studio è proseguito valutando anche gli effetti tossici di alcuni campioni ottenuti da filtri d'aria posti in diverse zone della città di Bolzano e a camino dell'impianto di incenerimento dei rifiuti, in modo da valutare l'influenza delle emissioni in atmosfera dell'inceneritore, rispetto a campioni che risentono di altre fonti di inquinamento (traffico veicolare, riscaldamento domestico, emissioni naturali).

In particolare sono stati testati:

- tre campioni ottenuti da un campionatore direzionale, che si attiva in funzione al vento: campione *Calma di Vento*, filtro che si attiva solo in assenza di vento, che indica quindi il *background* della città; campione *Settore 1*, che raccoglie il vento proveniente da nord; campione *Settore 2*, che raccoglie il vento proveniente da sud, quindi dalla zona ove è posizionato l'inceneritore di Bolzano;
- un campione denominato *Camino dell'Inceneritore* che permette di dosare gli inquinanti in emissione direttamente a camino dell'inceneritore e permette di frazionare anche le particelle fini.

Quale controllo positivo è stato utilizzato un campione ottenuto da filtri posti a camino di una stufa economica, in cui sono stati bruciati diversi materiali, in modo da ottenere un campione ricco in diossine e IPA, denominato *Camino della Stufa*.

Le analisi di gascromatografia accoppiata a spettrometria di massa ad alta risoluzione hanno evidenziato che il campione *Settore 1* è quello a minore contenuto in IPA, mentre i campioni *Calma di Vento* e *Settore 2* contengono quantità di IPA e diossine pressoché analoghe. Anche il campione ottenuto da filtri posti a camino dell'inceneritore contiene una quantità di IPA sovrapponibile a quella degli altri campioni, mentre la sua concentrazione in diossine è circa di tre ordini di grandezza superiore rispetto agli altri campioni, ma in ogni caso entro i limiti stabiliti dalla vigente normativa.

Anche in questo caso la risposta delle due linee cellulari non sempre è sovrapponibile e

talvolta le cellule normali (BEAS-2B) risultano più sensibili di quelle tumorali (A549).

Una significativa, tempo- e concentrazione-dipendente, riduzione della proliferazione cellulare si ottiene solo dopo esposizione al controllo positivo (*Camino della Stufa*); in questo caso le cellule BEAS-2B si rivelano nettamente più sensibili delle A549. I diversi campioni influenzano la proliferazione cellulare di entrambe le linee solo dopo esposizione alla concentrazione maggiore e solo dopo lunghi tempi di esposizione (72 ore).

I risultati ottenuti valutando la capacità dei diversi campioni di influenzare la produzione di specie reattive dell'ossigeno non sono univoci. Infatti, dopo 1 ora di trattamento con il campione *Settore 1* e soprattutto con il campione *Camino dell'Inceneritore* si ottiene un netto incremento di produzione ROS da parte delle sole cellule BEAS-2B. Per contro il campione *Settore 2* stimola la produzione di specie reattive dell'ossigeno da parte delle cellule tumorali.

Per evidenziare la possibilità di un'interazione diretta tra il contenuto dei vari campioni con i fluidi extracellulari delle vie respiratorie, che potrebbe favorire un'ulteriore produzione ROS (Deshpande et al., 2002), quest'ultima è stata valutata anche in assenza di cellule. In queste condizioni solo con campione *Camino della Stufa*, cioè il controllo positivo, evidenzia una significativa interazione con il siero, che si concretizza in un aumento concentrazione-dipendente della produzione di ROS, che alla dose maggiore è pari al 1035% rispetto al controllo. Questo sottolinea come l'elevato contenuto in IPA e diossine di questo campione lo renda enormemente reattivo e che l'entità del danno ossidativo, evidenziato valutando la produzione di ROS intracellulari, è probabilmente dovuto anche all'insulto pro-ossidante indotto dalle specie radicaliche extracellulari, formate nel terreno di coltura.

Per evidenziare se, come per il *Fly Ash*, anche con questi campioni esista una stretta correlazione tra produzione di ROS ed induzione di infiammazione, è stata studiata la capacità dei vari campioni di stimolare le due linee cellulari a produrre due interleuchine coinvolte nell'induzione e nella progressione del processo infiammatorio polmonare (IL-6 e IL-8).

Trattando per 24 ore le cellule BEAS-2B con il controllo positivo (campione *Camino della Stufa*) si ottiene una produzione di IL-6 che alle due concentrazioni minori è circa doppia rispetto al controllo. Risultato analogo si ottiene considerando la produzione di IL-8. Le cellule A549 sono invece solo marginalmente influenzate da questo trattamento.

Tra i campioni studiati, solo quello che raccoglie le emissioni a camino dell'inceneritore provoca un netto aumento del rilascio di IL-6 da parte delle cellule BEAS-2B e di IL-8 in entrambe le linee cellulari. Questo risultato non solo ben si correla con quanto osservato studiando lo stress ossidativo, ma evidenzia anche che le diverse concentrazioni di inquinanti presenti nei vari campioni giocano un ruolo determinante nella risposta cellulare. Infatti solo il campione *Camino dell'Inceneritore*, quello a maggior carico di diossine, è in grado di indurre la produzione di interleuchine che più si avvicina a quella indotta dal controllo positivo.

Da sottolineare che, trattando le cellule con la concentrazione maggiore dei vari campioni (1:100), si osserva generalmente una diminuzione della produzione delle due interleuchine; il risultato, ancora una volta, è particolarmente eclatante per esposizione al campione *Camino*

Discussione

della Stufa, suggerendo l'instaurarsi di interferenze tra ciò che è presente nei vari campioni e i componenti del kit ELISA utilizzato. Queste interferenze potrebbero tradursi in spiazzamento o occupazione di siti di legame, tali da non permettere una reale quantificazione delle due proteine pro-infiammatorie (Veranth et al., 2007).

In definitiva, i risultati ottenuti indicano una buona efficienza dei sistemi di filtrazione dei fumi dell'impianto di incenerimento, che sono in grado di diminuire notevolmente la quantità di IPA e diossine emesse in atmosfera e quindi di limitare i danni dal punto di vista biologico. Infatti, nel modello *in vitro* scelto, si ottiene una riduzione degna di nota della vitalità cellulare solo dopo almeno 72 ore di esposizione e solo con i due campioni maggiormente influenzati dall'inceneritore, *Settore 2* e *Camino dell'Inceneritore*. Quest'ultimo, inoltre, è in grado di attivare un'importante risposta infiammatoria dovuta a stress ossidativo. Da sottolineare che in ogni caso i risultati ottenuti sono molto lontani da quelli ottenuti con il controllo positivo (*Camino della Stufa*).

In conclusione, i risultati ottenuti in questo studio, utilizzando un modello *in vitro* basato su cellule immortalizzate del tratto respiratorio, permettono di delineare il profilo tossicologico di inquinanti ambientali inalabili correlati al processo di incenerimento dei rifiuti solidi urbani della città di Bolzano.

Lo studio condotto su *Fly Ash*, cenere leggera normalmente trattenuta dai sistemi di filtraggio, permette di affermare che, se accidentalmente rilasciata in atmosfera, potrebbe provocare seri danni alla salute.

Presenta infatti notevoli concentrazioni di sostanze tossiche che sono in grado di indurre un notevole insulto pro-ossidante e pro-infiammatorio a carico delle cellule del tratto respiratorio.

Il fatto che le frazioni estratte in acqua e DMSO siano notevolmente meno tossiche rispetto alle frazioni *Totale* e *Non-Idrosolubile*, indica che la risposta tossica provocata sia da imputare soprattutto alla frazione particellare, quindi all'internalizzazione della cenere stessa, piuttosto che alle sostanze tossiche estratte dai due solventi.

I risultati ottenuti studiando alcuni campioni ottenuti da filtri di aria posti in diverse posizioni della città, sottolinea innanzitutto la buona efficienza dei sistemi di filtrazione dei fumi dell'impianto di incenerimento, che sono in grado di diminuire notevolmente la quantità di IPA, diossine e soprattutto metalli emessi in atmosfera e quindi di limitare notevolmente la possibilità di danni dal punto di vista biologico. Infatti tra i vari campioni studiati, influenzati in maniera più o meno importante dalla presenza di diverse fonti di emissione, tra cui l'inceneritore di rifiuti solidi urbani, solo quello ottenuto dal filtro posto a camino dell'inceneritore stesso è in grado di attivare un'importante risposta infiammatoria dovuta a stress ossidativo, indicando quindi un significativo contributo all'emissione di sostanze tossiche, anche se nettamente inferiori ai limiti imposti dalle vigenti normative di legge.

BIBLIOGRAFIA

Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (2006). Diossine, furani e PCB. APAT, Roma.

Ayres J.G., Borm P., Cassee F.R., Castranova V., Donaldson K., Ghio A., Harrison R.M., Hider R., Kelly F., Kooter I.M., Marano F., Maynard R.L., Mudway I., Nel A., Sioutas G., Smith S., Baeza-Squiban A., Cho A., Duggan S., Froines J. (2008). Evaluating the Toxicity of Airborne Particulate Matter and Nanoparticles by Measuring Oxidative Stress Potential, A Workshop Report and Consensus Statement. *Inhalation Toxicology, Informa Healthcare USA*, **20**:75-99.

Baciacchi R., Costa G., Zingaretti D., Cazzotti M., Werner M., Poletti A., Pomi R., Falasca M. (2010). Studio sulle potenzialità della carbonatazione di minerali e residui industriali per lo stoccaggio di anidride carbonica prodotta da impianti di piccola/media taglia. Report RdS/2010/48. Agenzia Nazionale per le Nuove Tecnologie, l'Energia e lo Sviluppo Economico Sostenibile (ENEA) e Ministero dello Sviluppo Economico.

Baird W.M., Hooven L.A., Mahadevan B. (2005). Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **4**(5):106-114.

Bakand S., Hayes A. (2010). Troubleshooting methods for toxicity testing of airborne chemicals in vitro. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **61**(2):76-85.

Balduzzi M. (2003). Effetti biologici del PM10 rilevanti per la salute dell'uomo. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità, Sezione di Tossicologia e Scienze Biomediche, Ente per le Nuove Tecnologie, l'Energia e l'Ambiente*, Roma, **39**(3):411-417.

BéruBé K., Aufderheide M., Breheny D., Clothier R., Combes R., Duffin R., Forbes B., Gaça M., Gray A., Hall I., Kelly M., Lethem M., Liebsch M., Merolla L., Morin J.P., Seagrave J., Swartz M.A., Tetley T.D., Umachandran M. (2009). "In vitro models of inhalation toxicity and disease". The report of a FRAME workshop. *Alternatives to Laboratory Animals*, **37**: 89-141.

BéruBé K., Pitt A., Hayden P., Prytherch Z., Job C. (2010). Filter-well technology for advanced three-dimensional cell culture: perspectives for respiratory research. *Alternatives to Laboratory Animals*, **38**(1):49-65.

Blank F., Rothen-Rutishauser B., Schurch S., Gehr P. (2006). An optimized in vitro model of the respiratory tract wall to study particle cell interactions. *Air Medical Journal*. **19**(3):392-405.

Bonetta Sa., Gianotti V., Bonetta Si., Gosetti F., Oddone M., Gennaro M.C., Carraro E. (2009). DNA damage in A549 cells exposed to different extracts of PM_{2.5} from industrial, urban and highway sites. *Chemosphere*, **77**:1030-1034.

Chico L., (2010). Valutazione di parametri di stress ossidativo in pazienti affetti da Malattia di Alzheimer e Decadimento Cognitivo Lieve in una popolazione della Lunigiana. Università di Pisa.

Coecke, S., Ahr, H., Blaauboer, B.J., Bremer, S., Casati, S., Castell, J., Combes, R., Corvi, R., Crespi, C.L., Cunningham, M.L., Elaut, G., Eletti, B., Freidig, A., Gennari, A., Ghersi-Egea, J-F., Guill ouzo, A., Hartung, T., Hoet, P., Ingelman-Sundberg, M., Munn, S., Jassens, W., Ladstetter, B., Leahy, D., Long, A., Meneguz, A., Monshouwer, M., Morath, S., Nagelkerke, F., Pelkonen, O., Ponti, J., Prieto, P., Richert, L., Sabbioni, E., Schaack, B.,

Steiling, W., Testai, E., Vericat, J-A. & Worth, A. (2006). "Metabolism: abottleneck in in vitro toxicological test development". The report and recommendations of ECVAM Workshop 54. *Alternatives to Laboratory Animals*, **34**:49-84.

Conti G., Iannuzzi E., Imperatore F. (2007). Terapia intensiva. *Elsevier*. Pp. 225-226.

Corti A., De Tata V., Pompella A. (2009). Agenti e meccanismi di stress ossidativo nella patologia umana. *Ligand Assay*, **14** (1):9-16.

De Kok T.M., Drieste H.A., Hogervorst J.G., Briede J.J. (2006). Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mutation Research*, **613**(2-3):103-122.

Deshpande A., Narayanan P.K. and Lehnert B.E. (2002). Silica-induced generation of extracellular factor(s) increases reactive oxygen species in human bronchial epithelial cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, **67**(2):275-283.

Diabaté S., Bergfeldt B., Plaumann D., Ubel C., Weiss C. (2011). Anti-oxidative and inflammatory responses induced by fly ash particles and carbon black in lung epithelial cells. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **401**(10):3197–3212.

Donaldson K., Stone V., Borm P.J., Jimenez L.A., Gilmour P., Schins R.P. Knaapen AM, Rahman I, Faux SP, Brown DM, MacNee W (2003). Oxidative stress and calcium signaling in the adverse effects of environmental particles (PM10). *Free Radical Biology and Medicine*, **34**:1369-1382.

European Environment Agency (2013). Air quality in Europe: report 2013. EEA Report No 9/2013.

United States Environmental Protection Agency (2010). Our Nation's Air - Status and Trends through 2008, US EPA Report 454/R-09-002.

Fisher A.B. and Chander A. (1985). Intracellular processing of surfactant lipids in the lung. *Annual Review of Physiology*, **47**:789-802.

Fredenburgh L.E., Perrella M.A. and Mitsialis S.A. (2007). The Role of Heme Oxygenase-1 in Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **36**:158-165.

Fröhlich E., Bonstingl G., Höfler A., Meindl C., Leitinger G., Pieber T.R., Roblegg E. (2013). Comparison of two in vitro systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols. *Toxicology In Vitro*, **27**:409-417.

Geys J., Coenegrachts L., Vercammen J., Engelborghs Y., Nemmar A., Nemery B., Hoet P.H.M. (2006). In vitro study of the pulmonary translocation of nanoparticles: A preliminary study. *Toxicology Letters*, **160**:218-226.

Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Dosik H. and Parks W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, **51**(5):1417-1423.

Greenberg R., Zoller W.H., Gordon G.E. (1978). Composition and size distributions of particles released in refuse incineration. *Environmental Science and Technology*, **12**:566-573.

Gualtieri M., Ovrevik J., Holme J.A., Perrone M.G., Bolzacchini E., Schwarze P.E., Camatini M. (2010). Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM

fractions in human epithelial lung cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **24**(1), pp. 29-39.

Hayes J.D., Flanagan J.U., Jowsey I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **45**:51-88.

Holder A.L., Goth-Goldstein R., Lucas D., Koshland C., (2012). Particle-Induced Artifacts in the MTT and LDH Viability Assays. *Chemical Research in Toxicology*, **25**:1885–1892.

IARC (2011). Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer.

IARC (2013). Outdoor air pollution. Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. International Agency for Research on Cancer.

International Ash Working Group (IAWG): Chandler A.J., Eighmy T.T., Hartlén J., Hjelm O., Kosson D.S., Sawell S.E., van der Sloot H.A., Vehlow J. (1997), *Municipal Solid Waste Incinerator Residues*, Elsevier, Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Tokyo.

Iorio E.L. (2007). *Specie chimiche reattive e radicali liberi*. Radicali liberi e antiossidanti in medicina nello sport, atti del convegno.

Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA). Rapporto Rifiuti Urbani, Edizione 2013, Rapporti n. 176/2013.

Johnson C.A., Brandenderger S., Baccini P. (1995). Acid neutralizing capacity of municipal waste incinerator bottom ash. *Environmental Science and Technology*, **29**(1):142-147.

Jung C.H., Matsuto T., Tanaka N., Okada T. (2004), Metal distribution in incineration residues of municipal solid waste (MSW) in Japan. *Waste Management*, **24**:381-91.

Kalogirou E., Themelis N., Samaras P., Karagiannidis A., Kontogianni S.T. (2010). Fly ash characteristics from waste-to-energy facilities and processes for ash stabilization. *ISWA World Congress*, atti del convegno Hamburg, Germany, 2010.

Kampa M., Castanas E. (2008). Human health effects of air pollution. *Environmental Pollution*, **151**:362-367.

Kanazawa H., Yoshikawa J. (2005). Elevato stress ossidativo e riduzione inversamente proporzionale dei livelli di vascular endothelial growth factor rispetto al grado di gravità della BPCO. *CHEST Edizione Italiana*, **4**:39-45.

Kennedy T., Ghio A. J., Reed W., Samet J., Zagorski J., Quay J., Carter J., Dailey L., Hoidal J.R., Devlin R.B. (1998). Copper-dependent inflammation and nuclear factor-kappaB activation by particulate air pollution. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, **19**:366-378.

Klein S.G., Hennen J., Serchi T., Blomeke B., Gutleb A.C. (2011). Potential of coculture in vitro models to study inflammatory and sensitizing effects of particles on the lung. *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, **25**(8):1516-1534.

Künzli N., Tager I. (2005). Air Pollution: From Lung to Heart. *Swiss Medicine Weekly*, **135**:697-702.

Kurz D.J., Decary S., Hong Y., Trivier E., Akhmedov A., Erusalimsky J.D. (2004). Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, **117**:2417-2426.

Leduc D., De Vuyst P., Yernault J.C.. (1995). Respiratory toxicity due to atmospheric pollutants. General review and a study of the relation to respiratory infections. *Revue des Maladies Respiratoires*, **12**:13-23.

Lee I.T. and Yang C.M. (2013). Inflammatory Signalings Involved in Airway and Pulmonary Diseases. *Mediators of Inflammation*. **2013**:1-12.

Leonicini E. (2009) Alimenti funzionali e componenti nutraceutici come biomodulatori. Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.

Ling G., Gu, J., Genter, M.B., Zhuo, X. & Ding, X. (2004). Regulation of cytochrome P450 gene expression in the olfactory mucosa. *Chemicobiological Interactions*, **147**:247-258.

Liu C.Y., Lee C.F., Wei Y.H. (2009). Role of Reactive Oxygen Species-elicited Apoptosis in the Pathophysiology of Mitochondrial and Neurodegenerative Diseases Associated With Mitochondrial DNA Mutations. *Journal of the Formosan Medical Association*, **108**(8):599-611.

MacKenzie F.T. and MacKenzie J.A. (1995). Our Changing Planet, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 288-307.

Maiese K., Chong Z.Z., Hou J., Shang Y.C. (2008). Erythropoietin and Oxidative Stress. *Current Neurovascular Research*, **5**(2):125-142.

Manzano-León N., Quintana R., Sánchez B., Serrano J., Vega E., Vásquez-López I., Rojas-Bracho, López-Villegas T., O'Neill M.S., Vadillo-Ortega F., De Vizcaya-Ruiz A., Rosas I., Osornio-Vargas A.R. (2013). Variation in the composition and in vitro proinflammatory effect of urban particulate matter from different sites. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, **27**(1):87-97.

Marconi A. (2003). Materiale particellare aerodisperso: definizioni, effetti sanitari, misura e sintesi delle indagini ambientali effettuate a Roma. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità*, **39**(3):329-342.

Martin L.D., Krunkosky T.M., Dye J.A., Fischer B.M., Jiang N.F., Rochelle L.G., Akley N.J., Dreher K.L., Adler K.B. (1997). The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates. *Environmental Health Perspectives*, **105**(5):1301-1307.

McCord JM. (2000). The Evolution of Free Radicals and Oxidative Stress. *American Journal of Medicine*, **8**:652-659.

McKay G. (2002). Dioxin characterisation, formation and minimisation during municipal solid waste (MSW) incineration: review. *Chemical Engineering Journal*, **86**:343-368.

Montesano Gesualdi N. (2007). Identificazione e caratterizzazione di geni coinvolti nell'adattamento allo stress ossidativo e nella chemioresistenza. Università degli Studi di Napoli "Federico II".

Mossmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, **65**:55.

Müller B., Seifart K., Barth F. (1998). Effect of air pollutants on the pulmonary surfactant system. *European Journal of Clinical Investigation*, **28**:762-777.

Nie F., Zhang X., Qi Q., Yang L., Yang Y., Liu W., Lu N., Wu Z., You Q., Guo Q. (2009). Reactive oxygen species accumulation contributes to gambogic acid-induced apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells. *Toxicology*, 260:60-67.

Ovrevik J., Lag M., Holme J.A., Schwarze P.E. and Refsnes M. (2009). Cytokine and chemokine expression patterns in lung epithelial cells exposed to components characteristic of particulate air pollution. *Toxicology*, 259(1-2):46-53.

Raaschou-Nielsen O., Andersen Z.J., Beelen R., Samoli E., Stafoggia M., Weinmayr G., Hoffmann B., Fischer P., Nieuwenhuijsen M.J., Brunekreef B., Xun W.W., Katsouyanni K., Dimakopoulou K., Sommar J., Forsberg B., Modig L., Oudin A., Oftedal B., Schwarze P.E., Nafstad P., De Faire U., Pedersen N.L., Östenson C.G., Fratiglioni L., Penell J., Korek M., Pershagen G., Eriksen K.T., Sørensen M., Tjønneland A., Ellermann T., Eeftens M., Peeters P.H., Meliefste K., Wang M., Bueno-de-Mesquita B., Key T.J., de Hoogh K., Concin H., Nagel G., Villier A., Grioni S., Krogh V., Tsai M.Y., Ricceri F., Sacerdote C., Galassi C., Migliore E., Ranzi A., Cesaroni G., Badaloni C., Forastiere F., Tamayo I., Amiano P., Dorronsoro M., Trichopoulou A., Bamia C., Vineis P. & Hoek G. (2013). Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). *The Lancet Oncology*, 14(9):813-822.

Radetski C.M., Ferrari B., Cotelle S., Masfaraud J.F., Ferard J.F. (2004). Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Science of the Total Environment*, 333:209-16.

Rahman K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical Interventions in Aging*, 2(2):219-236.

Reddel R.R., Ke Y., Gerwin B.I., Mcmenamin M.G., Lechner J.F., Su R.T., Brash D.E., Park J.B., Rhim J.S. and Harris C.C. (1988). Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Research*, 48(7):1904-1909.

Rekacewicz P. (2003). The 2003 Strategic Plan for the U.S. Climate Change Science Program (CCSP). Strategy Report.

Schafer M., Schafer C., Ewald N., Piper H.N., Noll Th. (2003). Role of redox signaling in the autonomous proliferative response of endothelial cell stohypoxia. *Circulation Research*, 92:1010-1015.

Schroeder, W. H., Dobson, M., Kane, D. M., and Johnson, N. D. (1987). Toxic trace elements associated with airborne particulate matter: a review, *Journal of the Air Pollution Control Association*, 37:1267-1285.

Schwartz J., Laden F., Zanobetti A. (2002). The concentration response relation between PM2.5 and daily deaths. *Environmental Health Perspectives*, 110:1025-1029.

Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *National Cancer Institute*, 82(13):1107-12.

Steenhof M., Gosens I., Strak M., Godri K.J., Hoek G., Cassee F.R., Mudway I.S., Kelly F.J., Harrison R.M., Lebret E., Brunekreef B., Janssen N.A. and Pieters R.H. (2011). In vitro toxicity of particulate matter (PM) collected at different sites in the Netherlands is associated with PM composition, size fraction and oxidative potential-the RAPTES project. *Particle and Fibre Toxicology*, 8:26.

Tak P.P. and Firestein G. (2001). NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *Journal of Clinical Investigation* **107**(1):7-11.

Thompson J. and Anthony H. (2008). The Health Effects of Waste Incinerators, *4th Report of the British Society for Ecological Medicine*. Second Edition.

Valberg, P.A. (2004). Is PM more toxic than the sum of its parts? Risk-assessment toxicity factors vs. PM-mortality effect functions. *Inhalation Toxicology*, **16**(suppl. 1):19-29.

Valerio F. (2008). Impatti ambientali delle ceneri e dei residui solidi prodotti dall'incenerimento di rifiuti urbani: rassegna bibliografica. *Epidemiologia e Prevenzione*, **32**(4-5).

Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, **160**:1-40.

Van Dingenen, R., Raes, F., Putaud, J. P., Baltensperger, U., Charron, A., Facchini, M. C., Decesari, S., Fuzzi S., Gehrig R., Hansson H.C., Harrison R.M., Hüglin C., Jones A.M., Laj P., Lorbeer G., Maenhaut W., Palmgren F., Querol X., Rodriguez S., Schneider J., Brink H.T., Tunved P., Tørseth K., Wehner B., Weingartner E., Wiedensohler A., Wählin P. (2004). "A European aerosol phenomenology-1: physical characteristics of particulate matter at kerbside, urban, rural and background sites in Europe, *Atmospheric Environment*, **38**(16):2561-2577.

Van Loveren H. (2003). Immunotoxicological consequences of perinatal chemical exposures: a plea for inclusion of immune parameters in reproduction studies. *Toxicology*, **185**:185-91.

Veranth J.M., Kaser E.G., Veranth M.M., Koch M. and Yost G.S. (2007). Cytokine responses of human lung cells (BEAS-2B) treated with micron-sized and nanoparticles of metal oxides compared to soil dusts. *Particle and Fibre Toxicology*, **4**:2.

Yao J., Li W., Xia F., Zheng Y., Fang C. and Shen D. (2012). Heavy metals and PCDD/Fs in solid waste incinerator fly ash in Zhejiang province, China: chemical and bio-analytical characterization. *Environmental Monitoring and Assessment*, **184**(6):3711-3720.

SITOGRAFIA

ARPA, Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente del Friuli Venezia Giulia, Normativa, http://www.arpa.fvg.it/cms/tema/aria/menu_dx/menu_dx_normativa.html, consultato il 22.12.2013.

APAT, Agenzia per la Protezione dell' Ambiente e per i servizi Tecnici Servizio Interdipartimentale per le Emergenze Ambientali, Settore Studi e Valutazione, *Progetto Diossina*, (Legge n. 268/2003); www.apat.it, consultato il 30.11.2012.

ARPAV, Agenzia Regionale per la Prevenzione e la Protezione Ambientale del Veneto, *A proposito di polveri atmosferiche*, www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/a-proposito-di-polveri-atmosferiche, consultato il 02.05.2013.

Cosa dice la normativa, qualità dell'aria ed emissioni, <http://www.arpa.veneto.it/temi-ambientali/aria/cosa-dice-la-normativa>, consultato il 22.12.2013.

Campanella L., *Inquinamento ambientale*, Enciclopedia della Scienza e della Tecnica (2007), www.treccani.it/enciclopedia/inquinamento-ambientale_%28Enciclopedia-della-Scienza-e-della-Tecnica%29/, consultato il 25.03.2013.

Eco Center SpA; *Bilancio energetico inceneritore di Bolzano dati 2012*, www.eco-center.it, consultato il 16.05.2013.

Frati L., Russo M.A., *Infiammazione*, Universo del Corpo - Enciclopedia Treccani (2000), www.treccani.it/enciclopedia/infiammazione_%28Universo_del_Corpo%29/, consultato il 15.05.2013.

Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea,
<http://eur-lex.europa.eu/JOIndex.do?ihmlang=it>, consultata il 22.12.2013.

Lancia A., Nigro R., *Inquinamento ambientale*, Enciclopedia Italiana - VII Appendice (2010), www.treccani.it/enciclopedia/inquinamento-ambientale_%28Enciclopedia-Italiana%29/, consultato il 14.04.2013.

Rotilio G., *Radicali liberi: biologia e patologia*, Enciclopedia della Scienza e della Tecnica (2007), www.treccani.it/enciclopedia/radicali-liberi-biologia-e-patologia_%28Enciclopedia_della_Scienza_e_della_Tecnica%29/, consultato il 28.04.2013.

United Nations (1998). *Kyoto Protocol to the United Nations Convention on Climate Change* http://unfccc.int/kyoto_protocol/items/2830.php, consultato il 27.12.2013)

U.S. EPA. (1994). *Proceedings Eighth Symposium on the Transfer and Utilization of Particulate Control Technology – Volume 1, Electrostatic Precipitators*. (EPA/600/R-94/049a),

U.S. EPA. (1994). *Proceedings Eighth Symposium on the Transfer and Utilization of Particulate Control Technology – Volume 2, Baghouses and Particulate Control for New Applications*. (EPA/600/R-94/049b), http://www.epa.gov/nrmrl/appcd/pubs_year19941990.html, consultato il 20.11.2012.