

VALUTAZIONE DEL POTENZIALE TOSSICOLOGICO DI PARTICELLE ULTRAFINI PRESENTI IN AMBIENTI DI LAVORO: RISULTATI PRELIMINARI

L. TAGLIERI¹, F. RUSPOLINI¹, L. LATTERINI²

¹INAIL – Direzione Regionale Umbria – Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione

²Università degli Studi di Perugia – Dipartimento di Chimica

RIASSUNTO

E' in fase di realizzazione un progetto di ricerca congiunto INAIL – Dipartimento di Chimica dell'Università degli Studi di Perugia che ha come obiettivo generale lo sviluppo di una metodologia di indagine che permetta di testare direttamente il particolato campionato negli ambienti di lavoro con opportuni substrati cellulari al fine di osservare e studiare gli eventuali effetti di citotossicità (danno cellulare) e gli specifici meccanismi di degradazione del materiale cellulare (DNA, proteine endocellulari).

SUMMARY

A research project between INAIL (Italian workers' compensation authority) and department of Chemistry of the University of Perugia is realizing. The aim of the project is the development of a methodology for testing the effect of cytotoxicity (cellular damage) and specific mechanisms of cellular material degradation (DNA and endocellular proteins).

1. INTRODUZIONE

Recenti studi hanno individuato azioni tossiche correlabili a particelle di dimensioni ultrafini e nano particelle che si originano in particolari settori operativi in cui le procedure prevedono fasi di combustione o trattamenti ad alta temperatura e trattamenti meccanici ad alta velocità. Le difficoltà igienistiche per caratterizzare queste azioni riguardano soprattutto gli aspetti analitici in quanto richiedono sofisticate tecniche di microanalisi che ben difficilmente possono trovare larga diffusione per la necessaria valutazione del rischio. L'idea che si vorrebbe sviluppare riguarda il tentativo di superare lo specifico aspetto analitico e di testare direttamente il particolato campionato negli ambienti di lavoro con gli opportuni substrati cellulari al fine di osservare e studiare gli eventuali effetti di citotossicità (danno cellulare) e gli specifici meccanismi di degradazione del materiale cellulare (DNA, proteine endocellulari). Questa soluzione porterebbe a definire in maniera abbastanza semplice le eventuali azioni citotossiche della matrice inquinante contribuendo efficacemente, dal punto di vista prevenzionale, a caratterizzare il rischio da sostanze chimiche e cancerogene aerodisperse in ambienti di lavoro e a permettere, anche, di predisporre opportuni protocolli sanitari. D'altra parte è chiara l'indicazione strategica data dai vertici dell'Istituto di provvedere alla realizzazioni di una rete di collaborazioni, in un ottica di sistema, con altri settori della Pubblica Amministrazione compresa l'area universitaria, anche, attraverso la stipula di specifici protocolli di ricerca. Partendo dalle considerazioni appena riportate, è stato intrapreso un progetto di ricerca in collaborazione con il Dipartimento di Chimica dell'Università degli Studi di Perugia, che sarà sviluppato attraverso le seguenti fasi:

FASE 1. Si procederà all'ottimizzazione dei metodi di campionamento. Saranno valutate le prestazioni di varie membrane filtranti (PVC, MCE, PTFE, fibra di argento, policarbonato) per individuare i migliori supporti da utilizzarsi in fase di campionamento soprattutto in considerazione delle successive fasi di interazione tra substrati e sistemi cellulari. Saranno ottimizzati i metodi di captazione, i tempi e i flussi di campionamento anche in funzione delle frazioni granulometriche da campionare della saturazione delle stesse membrane di raccolta.

FASE 2. Si procederà con la caratterizzazione chimica e dimensionale (fisica) del particolato campionato. Tale fase prevede l'eventuale messa a punto di metodi identificativi (fluorescenza, scattering della luce, introduzione di cromofori nelle particelle oggetto di studio, ecc.) delle particelle ultrafini interferenti con i sistemi biologici. In questa fase sarà effettuata anche la scelta degli idonei sistemi cellulari da utilizzarsi nella valutazione della interazione con le particelle ultrafini. Studio di meccanismi di enucleazione cellulare del particolato ultrafine. Studio delle caratteristiche citotossicologiche delle particelle ultrafini.

FASE 3. Studio degli effetti diretti di danno al DNA e al materiale cellulare indotto dall'enucleazione cellulare di particelle ultrafini.

2. MATERIALI E METODI

Data la complessità dei metodi messi in campo, che spaziano dal campionamento del materiale particellare, alla sua caratterizzazione chimico fisica, fino all'utilizzo di membrane fosfolipidiche per la valutazione della capacità delle particelle ultrafini di essere internalizzate dalle barriere cellulari, si procederà ad una descrizione qualitativa delle metodologie congiuntamente alla presentazione dei risultati parziali sinora ottenuti. Inoltre le stesse metodologie d'indagine sono in fase di validazione.

3. RISULTATI

I risultati preliminari ottenuti riguardano la:

- Ottimizzazione dei metodi di captazione, i tempi e i flussi di campionamento anche in funzione delle frazioni granulometriche da campionare della saturazione delle stesse membrane di raccolta.
- Valutazione delle caratteristiche di varie membrane filtranti (PVC, MCE, PTFE, fibra di argento, policarbonato) per individuare i migliori supporti da utilizzarsi in fase di campionamento soprattutto in considerazione delle successive fasi di interazione tra substrati e sistemi cellulari.
- Valutazione della potenziale enucleazione cellulare di particelle ultrafini campionate nel corso di alcuni processi lavorativi.

3.1 Ottimizzazione dei metodi di campionamento

Nella fase di campionamento sono stati utilizzati gli usuali metodi standardizzati per le indagini di igiene ambientale (UNI, UNICHIM, NIOSH). In generale il campionamento è stato condotto con l'uso di teste di campionamento a faccia aperta con flusso di aspirazione di 2,0 l/m per tempi variabili da 30 minuti a 2 ore.

Il particolato campionato in ambienti di lavoro è stato desorbito dalle membrane filtranti mediante contatto prolungato (circa 12 ore) con acqua MilliQ. La sospensione ottenuta è stata deposta su mica con la tecnica di spin-coating per evitare processi di agglomerazione del materiale. I campioni ottenuti sono stati investigati mediante microscopia a forza atomica (AFM). Con tale tecnica ad alta risoluzione spaziale è possibile ottenere immagini ed informazioni granulometriche più dettagliate dai campioni a bassa concentrazione di particolato. L'analisi statistica della granulometria indica che i campioni prelevati in ambienti durante lavorazioni di saldatura di acciaio inox, in fonderia di industria metallurgica e nel corso di varie operazioni della seconda lavorazione del legno, sono costituiti da particelle con diametro di alcune decine di nanometri che ad alte concentrazioni si aggregano formando agglomerati micrometrici. Attualmente sono allo studio campioni prelevati durante lavorazioni di cantieristica stradale in sottosuolo. Il prelievo di tali campioni è stato effettuato utilizzando campionatore a cascata tipo Sioutas, che consente la raccolta, lavorando ad un flusso di aspirazione di 9 l/min, di cinque frazioni granulometriche con tagli dimensionali di 2,5 – 1,0 – 0,50 – 0,25 e < 0,25 µm.

3.2 Valutazione delle caratteristiche delle membrane filtranti da utilizzarsi nella fase di campionamento

Le membrane filtranti vergini (PTFE, fibra di argento e di policarbonato), utilizzate nella fase di campionamento, sono state esaminate mediante AFM per determinare le loro caratteristiche superficiali, in particolare rugosità e porosità. In tutti i casi si è riscontrata una superficie con un elevato grado di rugosità (da alcune centinaia di nm fino a 1-2 μm); in Figura 1 è riportata l'immagine superficiale di una membrana in PTFE, esaminata con la tecnica appena descitta. Questo risultato indica che la topografia delle membrane interferisce fortemente con l'analisi e la caratterizzazione dimensionale del particolato campionato che quindi non può essere direttamente esaminato sulle membrane filtranti.

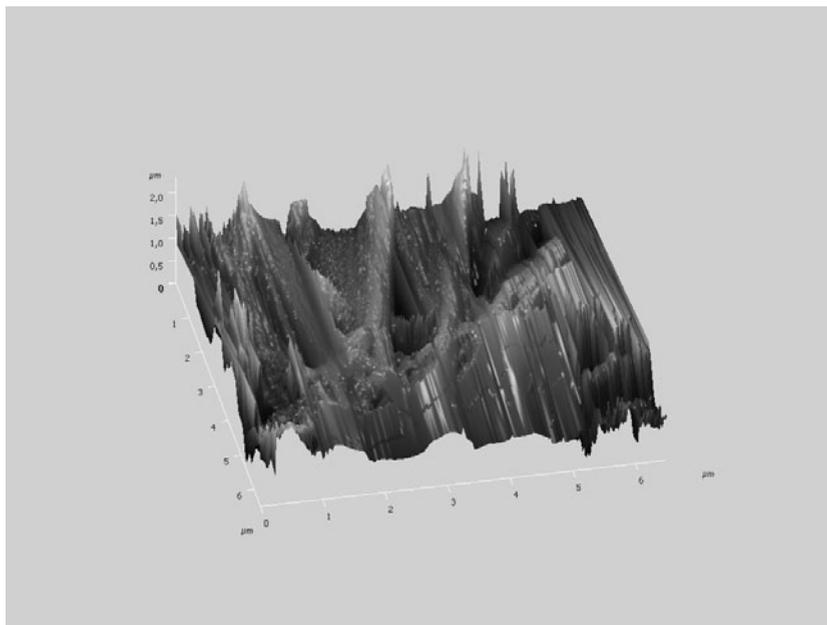


Figura 1: Immagine AFM di membrana in PTFE.

E' necessario quindi procedere al desorbimento dei campioni raccolti e alla loro deposizione su supporti non rugosi (lamine di mica) adatti ad essere usati con la tecnica AFM disponibile. Il metodo di trattamento dei campioni è stato validato mediante analisi con microscopia elettronica a scansione (SEM) con cui si è analizzata la composizione attraverso sonda a fluorescenza di raggi X (EDX). Il confronto dei dati ottenuti direttamente dalle membrane di campionamento e dai campioni desorbiti e depositati su supporti non rugosi (mica, silicio) indicano che i campioni hanno una composizione chimica confrontabile in termini di Al e Si, ma si è riscontrata una percentuale di sodio nei campioni desorbiti, la cui origine deve essere investigata in maggior dettaglio. Dal punto di vista morfologico i campioni captati in ambienti di lavoro hanno granuli di dimensioni micrometriche, mentre i campioni desorbiti e depositati su mica presentano dimensione nanometriche non risolvibile mediante SEM (limite risoluzione ca. 300 nm), ma visualizzabili mediante AFM e con dimensioni di qualche decina di nanometri. In Figura 2 è riportata l'immagine AFM di un campione di fumi di saldatura, desorbito dal filtro e depositato su supporto di mica. Sono presenti particelle con dimensionalità di qualche decina di nanometri.

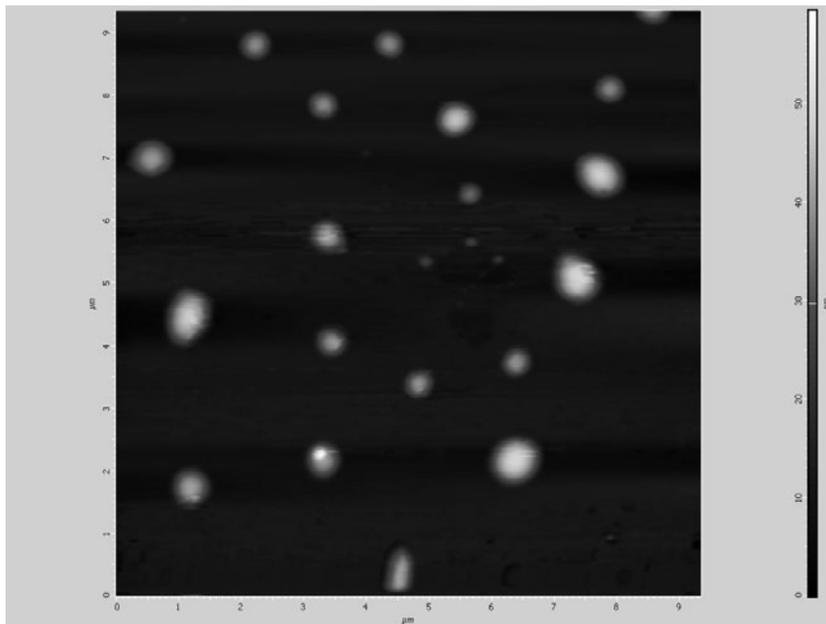


Figura 2: Immagine AFM di particelle da fumi di saldatura.

3.3 Valutazione della potenziale enucleazione cellulare di particelle ultrafini campionate nel corso di alcuni processi lavorativi

Il particolato sospeso in acqua MilliQ senza ulteriori manipolazioni è stato messo in contatto con membrane fosfolipidiche (globuli rossi svuotati) per valutare la capacità delle particelle ultrafini ad essere internalizzate dalle barriere cellulari. Le membrane caricate con il particolato proveniente da campioni di fumi di saldatura, sono state visualizzate mediante microscopia confocale (MCF) grazie alla luce diffusa dal particolato ultrafine in seguito ad interazione con la sorgente laser. Membrane fosfolipidiche non trattate con particolato sono state usate come bianco. Le immagini raccolte indicano la penetrazione del particolato all'interno delle membrane. In Figura 3 è riportata un'immagine tipica, letta in microscopia confocale, di membrane fosfolipidiche non trattate: l'intensità della luce diffusa appare alquanto attenuata. In Figura 4 è riportata l'immagine di membrane caricate con il particolato, l'intensità della luce diffusa appare notevolmente potenziata a testimonianza della presenza, nelle membrane fosfolipidiche, di particelle per l'appunto in grado di diffondere la luce proveniente dalla sorgente laser.



Figura 3: Immagine in microscopia confocale di membrane fosfolipidiche non trattate.



Figura 4: Immagine in microscopia confocale di membrane fosfolipidiche trattate.

3.3.1 Prove di contatto del particolato con DNA

Il particolato campionato in ambienti di lavoro (fonderia di industria metallurgica), desorbito dalle membrane filtranti mediante contatto prolungato (circa 12 ore) con acqua MilliQ, è stato messo in contatto con concentrazioni crescenti di DNA di vitello e batterico. In Figura 5 è riportata l'immagine AFM di frammenti di DNA batterico depositato su supporto di mica. L'analisi spettrofotometrica mirata sui segnali delle basi del DNA non evidenzia modifiche sostanziali

indotte dal particolato. Tale risultato è stato confermato anche da test condotti su particelle metalliche (oro ed argento) di riferimento opportunamente preparate in laboratorio con dimensioni variabili tra 15 e 50 nm. L'analisi AFM invece mostra che in presenza di particolato il DNA forma delle super-strutture intorno alle particelle. In Figura 6 un esempio di immagine AFM delle superstrutture DNA-particelle ultrafini. Una conferma di quanto osservato in AFM, è data dall'analisi in microscopia elettronica a trasmissione (TEM) dei medesimi campioni. Anche in questo caso i risultati ottenuti da saggi condotti con particelle ultrafini provenienti da ambiente di lavoro, sono stati confrontati con quelli ottenuti utilizzando nano particelle di sintesi. Questi dati indicano che il particolato interagisce con il DNA inducendone agglomerazione che potrebbe interferire con i naturali processi di duplicazione dell'acido nucleico. La natura delle interazioni deve essere ulteriormente investigata, al fine di comprendere quali parametri (composizione, dimensione, stabilità) controllano queste interazioni. In Figura 7 è riportata un'immagine TEM che evidenzia la formazione di superstrutture DNA-particelle ultrafini, saggiando campioni aerodispersi prelevati in fonderia di industria metallurgica. In Figura 8 è riportata immagine TEM di superstruttura DNA-particelle ultrafini ottenuta dal contatto con particelle di sintesi.

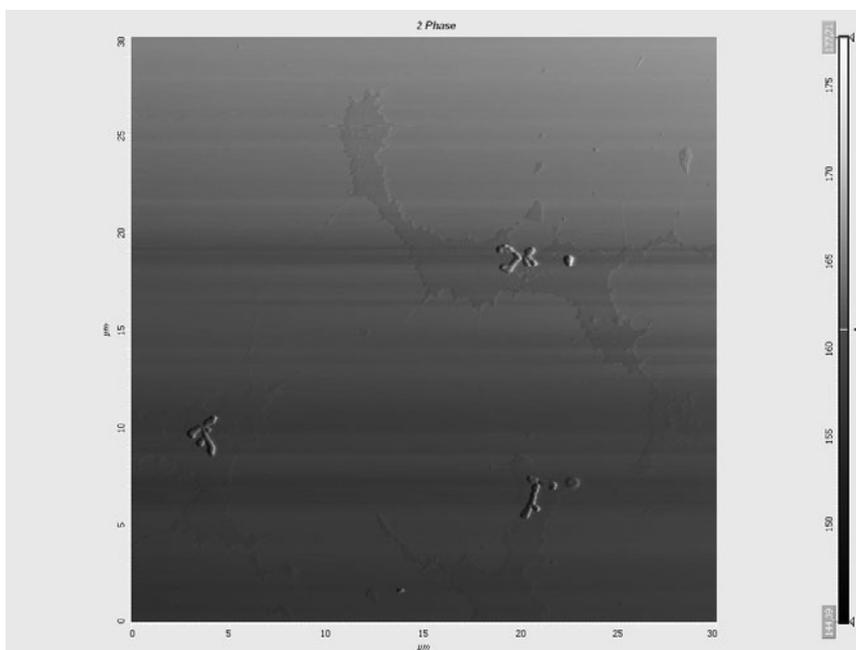


Figura 5: Immagine AFM di frammenti di DNA batterico.

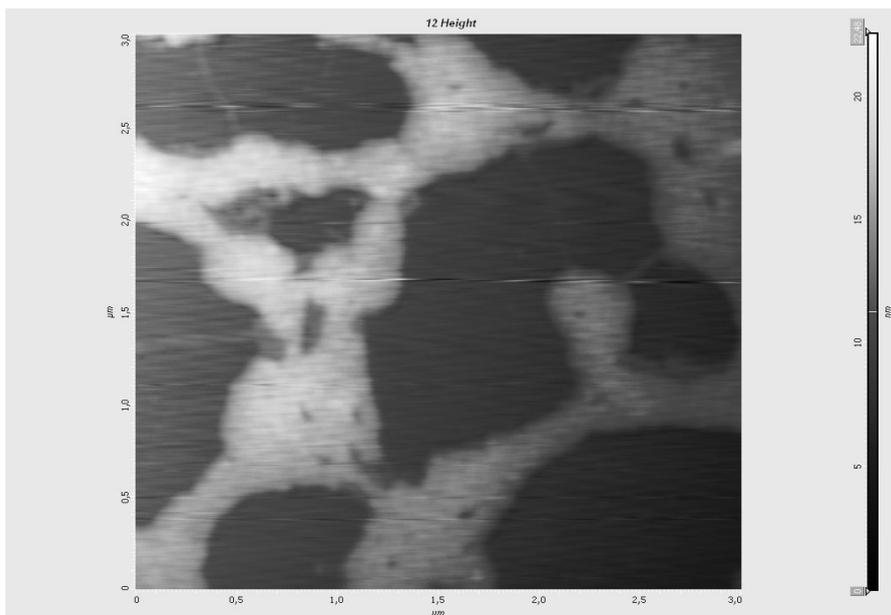


Figura 6: Immagine AFM delle superstrutture DNA-particelle ultrafini da ambiente di lavoro.

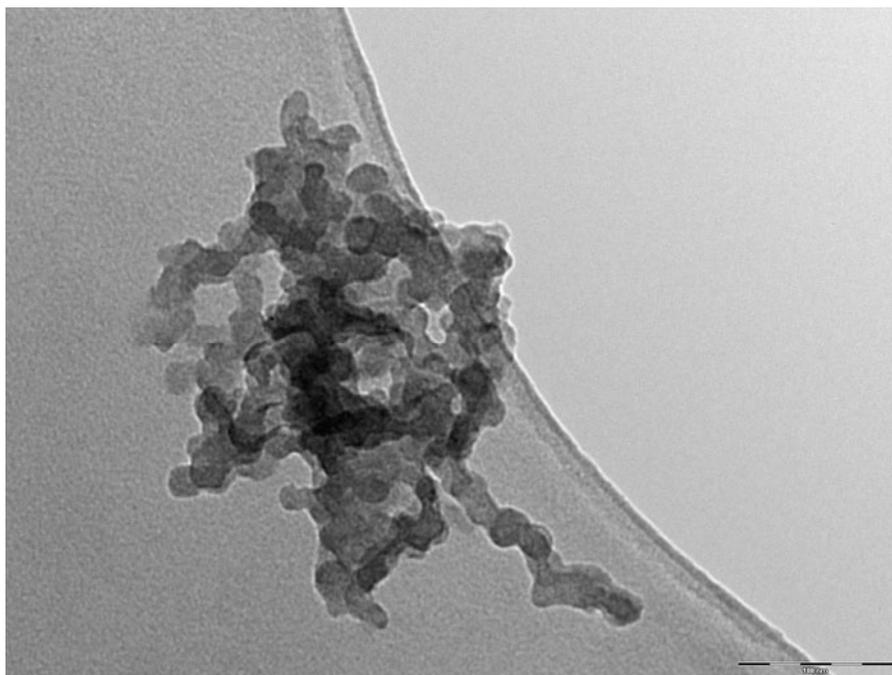


Figura 7: Immagine TEM di superstruttura DNA- particelle ultrafini da ambiente di lavoro.

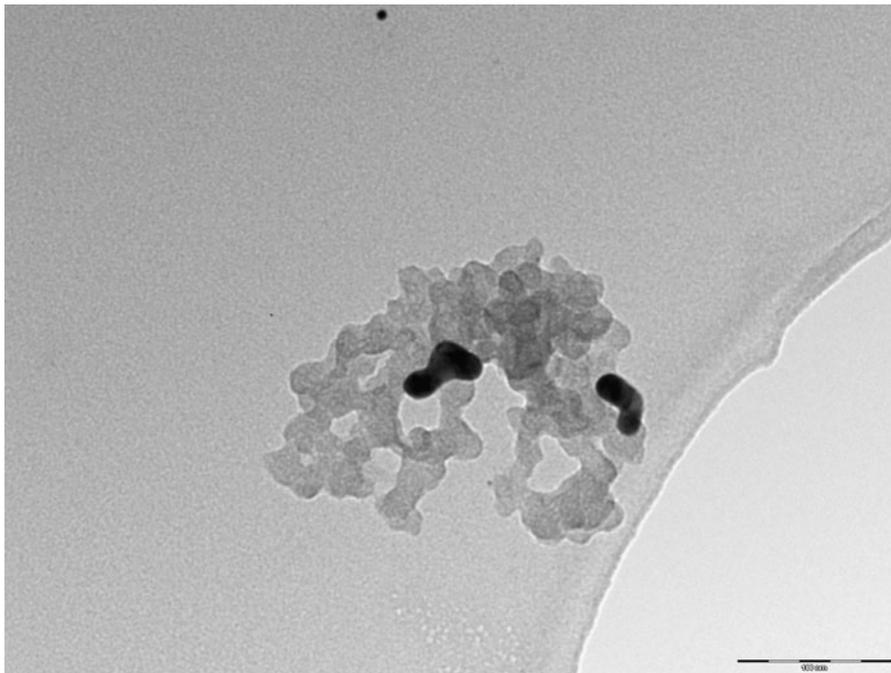


Figura 8: Immagine TEM di superstruttura DNA- particelle ultrafini di sintesi.

4. CONCLUSIONI

Gli esperimenti condotti con la tecnica AFM sulle membrane filtranti vergini utilizzate per il campionamento del particolato in ambiente di lavoro hanno mostrato l'impossibilità di eseguire direttamente misure dimensionali del nano particolato aderente alle membrane a causa della rugosità di tutte le membrane esaminate. Tali misure sono possibili se il particolato viene rimosso dai filtri ed depositato su superfici uniformi come quelle delle lamine di mica.

Esperimenti eseguiti con tecnica MCF su membrane fosfolipidiche (cellule del sangue vuote) messe a contatto con il particolato rimosso dai filtri e sospeso in acqua hanno mostrato che il particolato può penetrare nelle membrane fosfolipidiche e quindi verosimilmente nelle cellule. Globalmente la ricerca ha mostrato che le due tecniche microscopiche utilizzate sono adatte all'obiettivo generale illustrato nell'introduzione. In futuro si intende estendere gli esperimenti utilizzando tecniche microscopiche, tipo microscopia elettronica a scansione (SEM) e/o TEM, che possano dare informazioni di natura chimica sul particolato ultrafine. Inoltre si faranno tentativi per marcare il particolato con sonde fluorescenti in modo da investigare la dinamica della sua penetrazione nella cellula. Gli esperimenti condotti con la tecnica SEM e con la tecnica AFM sui particolati campionati in ambiente di lavoro e successivamente desorbiti e depositati su supporti non rugosi, hanno consentito di validare la procedura di trattamento dei campioni che consente di raggiungere risoluzioni spaziali dell'ordine dei nanometri. Esperimenti eseguiti con AFM e spettrofotometria nell'ultravioletto, hanno consentito di stabilire che il particolato interagisce con l'acido nucleico inducendo la formazione di super-strutture intorno alle particelle. I dati fin qui ottenuti non consentono di ottenere informazioni sulla natura di tali interazioni, ma è necessario approfondire lo studio con tecniche ed esperimenti mirati. Sono stati avviati esperimenti per marcare il particolato con sonde fluorescenti e renderlo stabile in condizioni fisiologiche in modo da investigare con tecniche ottiche la dinamica di penetrazione e la localizzazione in sistemi cellulari.

BIBLIOGRAFIA

- C. Buzea, I. I. Pacheco Blandino, K. Robbie:** "Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity", 2007, *Biointerphases* – Vol. 2
- G. Castellet y Ballarà, A. Marconi:** "Strumenti e tecniche per la misura dell'esposizione a particelle nanometriche negli ambienti di lavoro", 2008, *Giornale degli igienisti industriali*, Vol. 33, pag. 23
- D. Cottica, E. Grignani:** "La valutazione del rischio associato all'esposizione lavorativa a nanoparticelle: valutazione preliminare alle misure sperimentali", 2008, *Giornale degli igienisti industriali*, Vol. 33, pag. 14
- A. D'Anna, A. Ciajolo:** "Caratterizzazione chimico-fisica del particolato nanometrico (ultrafine) emesso dai sistemi di combustione", 2008, *Giornale degli igienisti industriali*, Vol. 33, pag. 47
- R. J. Delfino, C. Sioutas, S. Malik:** "Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health", 2005, *Environmental health perspectives*, Vol. 113, pag. 934
- N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezec:** "Cytotoxicity of nanoparticles", 2008 *Small*, Vol. 4, pag. 27
- A. Marconi, C. Fanizza, G. Castellet y Ballarà:** "Polveri ultrafini e nanoparticelle: tecniche di misura convenzionali ed avanzate per la determinazione dell'esposizione inalatoria", 2007 *Rivista degli infortuni e delle malattie professionali*, fasc. n. 2/2007, pag. 261
- A. Marconi, M. Inglessis, M. Ferdinandi, G. Cattani:** "Livelli di materiale particolato ultrafine nell'atmosfera e relazione con il traffico veicolare", 2008, *Giornale degli igienisti industriali*, Vol. 33, pag. 36
- A. Nel, Tian Xia, Lutz Ning Li:** "Toxic potential of materials at nanolevel", 2006, *Science*, Vol. 311, pag. 622
- G. Oberdöster, E. Oberdöster, J. Oberdöster:** "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles", 2005, *Environmental health perspectives*, Vol. 113, pag. 823
- C. Sioutas, R. Delfino, M. Singh:** "Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles and implication in epidemiologic research", 2005, *Environmental Health Perspectives*, Vol. 113, pag. 947