

F. Sabbadini<sup>1</sup>, M. Corradi<sup>1</sup>, M. Goldoni<sup>2</sup>, G. De Palma<sup>3</sup>, P. Gergelova<sup>1,4</sup>, I.C. Toma<sup>1</sup>, R. Andreoli<sup>1</sup>, P. Mozzoni<sup>1</sup>, S. Pinelli<sup>1</sup>, R. Alinovi<sup>1</sup>, P. Apostoli<sup>3</sup>, A. Mutti<sup>1</sup>

## Monitoraggio biologico ed esposizione a silice: applicazione di nuovi indicatori di dose e di effetto

<sup>1</sup> Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Sez. di Medicina del Lavoro, Università di Parma

<sup>2</sup> Centro di ricerca INAIL (EX ISPESL) presso Università di Parma

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Sez. Medicina del Lavoro e Igiene Industriale, Università di Brescia

<sup>4</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Trnava, Slovacchia

**RIASSUNTO.** In 16 addetti alla produzione di marmi ricomposti è stato misurato Si-CAE, è stata eseguita una spirometria e sono stati dosati 8oxoGua, 8oxoGuo, 8oxodGuo, SP-A, SP-D, CC16 e HO-1. Si sono osservati valori spirometrici (FVC e FEV1) più bassi nei lavoratori rispetto ai controlli. Nei lavoratori abbiamo osservato livelli più elevati dei seguenti marcatori: Si-CAE, 8oxoGuo ed espressione di HO-1. Lo studio evidenzia che l'esposizione a silice può aumentare i livelli di Si-CAE, che può essere usato per stimare la dose al bersaglio. Infine si evidenziavano aspecifiche alterazioni spirometriche ed un aumento di biomarcatori d'effetto.

**ABSTRACT.** BIOLOGICAL MONITORING AND EXPOSURE TO SILICA: APPLICATION OF NEW DOSE AND EFFECT BIOMARKERS. Si-CAE was measured in 16 composite marble industry workers furthermore, a spirometry was performed and 8oxoGua, 8oxoGuo 8oxodGuo, SP-A, SP-D, CC16 and HO-1 were dosed. A lower spirometric values (FEV1 and FVC) were observed among workers compared with controls and the following markers were increased: Si-CAE, 8oxoGuo and HO-1 expression. This study shows that exposure to silica can increase the levels of Si-CAE, which can be used to estimate the dose to the target. Finally, nonspecific spirometric abnormalities and an increase in biomarkers of effect were observed.

**Key words:** silica, styrene, biological monitoring.

### Introduzione

Il monitoraggio biologico (MB) è definito come "misura periodica in matrici biologiche accessibili (tessuti, secreti o aria espirata) del soggetto esposto, degli agenti presenti nel luogo di lavoro o dei loro metaboliti o di indicatori del loro effetto biologico, al fine della valutazione dell'esposizione e del rischio per la salute in rapporto ad appropriati riferimenti". Si è applicata una batteria di indicatori non invasivi di esposizione e di effetto in una popolazione lavorativa di addetti alla di produzione di quarzi ricomposti dopo che nell'azienda oggetto di studio è stato modificato il ciclo produttivo, con l'eliminazione di cristobalite come materia prima. Il processo produttivo dell'azienda in esame prevede la miscelazione di inerti (quarzo, marmo) di diversa granulometria, coloranti organici e resina strutturale poliestere. L'indurimento delle lastre si effettua nella camera di catalisi ad una temperatura sui 80-85°C, capaci di sviluppare una solidificazione dell'impasto pressato in lastre che così ottenute subiscono successivamente le operazioni di finitura.

### Materiali e metodi

Nei lavoratori coinvolti nello studio sono stati indagati i seguenti indicatori già risultati in precedenti studi sensibili ai tossici aerodispersi: ossido nitrico nell'aria esalata (1), pneumoproteine SP-A SP-D e CC16 (2-5), basi ossidate 8-oxo-guanina, 8-oxo-guanosina e 8-oxo-desossiguanina (6, 7), acqua ossigenata nel condensato dell'aria esalata (8), espressione di EME ossigenasi 1A (9, 10) e parametri di funzionalità respiratoria oltre a silice nel CAE come potenziale indicatore di dose al bersaglio. Oltre a questi sono stati misurati gli indicatori biologici di esposizione a stirene, componente importante nel ciclo produttivo. Sono, inoltre, stati resi disponibili dal Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata dell'Università di Brescia i dati storici, relativi al monitoraggio ambientale dell'esposizione a polveri, stirene ed acetone.

### Popolazione

Durante la campagna di monitoraggio sono stati reclutati e sono stati sottoposti a tutte le indagini previste 16

soggetti, tutti maschi; di questi, due sono stati esclusi dall'analisi dei dati in quanto affetti da evidente patologia polmonare (asma). Nei soggetti idonei l'età media era di 38 anni (range 24-53 anni). 6 soggetti sono fumatori con una media di 7,20 pacchi/anno (p/y) (range 5-11,25 p/y). Le mansioni in cui erano impiegati erano formatura: 6 soggetti, finitura: 5 soggetti, manutenzione: 3 soggetti, magazzino imballo lastre: 1 soggetto e laboratorio: 1 soggetto. Al momento dei prelievi, l'anzianità lavorativa media era di 12,56 anni (range 2-31 anni). Si deve inoltre segnalare un uso incostante dei dispositivi di protezione individuali.

### Raccolta dei campioni biologici

La campagna di campionamento biologico è stata eseguita in un'unica giornata. Prima dell'inizio del turno i lavoratori sono stati sottoposti a prelievo ematico (2 provette da 6 ml con EDTA e 1 da 6 ml senza anticoagulante) hanno effettuato spirometria, misurazione del FeNo e raccolta del CAE; sono inoltre stati invitati a fornire un campione di urina. Il sangue è stato centrifugato in loco e approntate 4 aliquote di siero e 4 di plasma, le aliquote e la parte corpuscolata sono state refrigerate a -20° C in ghiaccio secco. Analogamente, sono state aliquote e refrigerate le urine e il CAE. Una provetta di sangue con EDTA è stata stabilizzata e refrigerata a 4°C. Tale procedura è stata ripetuta a fine turno. Nella stessa giornata i campioni sono stati trasportati presso il nostro laboratorio e congelati a -80°C in attesa dell'esecuzione delle analisi. I dati ottenuti sono stati confrontati, quando possibile, con i valori rilevati nei lavoratori della stessa azienda prima dell'eliminazione di cristobalite dal ciclo produttivo (2007) o con una popolazione di riferimento non esposta a sostanze pneumotossiche.

### Analisi statistica

Per l'analisi statistica sono stati utilizzati per i parametri con distribuzione normale il test parametrico One-way ANOVA con test *post hoc* Bonferroni e per i parametri con distribuzione non normale i test non parametrici di Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Per la valutazione delle correlazioni si sono utilizzati i test di Pearson e Spearman. È stato scelto un livello di significatività  $P = 0,05$ . Alcuni lavoratori sono stati reclutati in entrambe le campagne di monitoraggio ma, dato il loro ridotto numero, non è stato ritenuto indicato ai fini dell'analisi statistica utilizzare i tests per campioni appaiati nei confronti tra i gruppi, mentre tali strumenti sono stati utilizzati nei confronti effettuati tra le misure effettuate a inizio e fine turno.

## Risultati

### Monitoraggio ambientale e biologico

La concentrazione di polveri inalabili è risultata in tutte le stazioni di campionamento inferiore al TLV-TWA (10 mg/m<sup>3</sup> fissato dall'ACGIH nel 2009) con valore massimo pari al 21% del TLV-TWA come la concentrazione di polveri respirabili con la postazione a concentrazione maggiore con un valore pari al 40% del limite. Le concentrazioni di acetone sono risultate sempre inferiori ai limiti (giorno 8 giugno mediana 6,3 mg/m<sup>3</sup> range IQ 3,3-51,1 e 10 giugno mediana 4,5 mg/m<sup>3</sup> range IQ 2,8-89,3). Mentre la concentrazione di stirene è risultata in 17 postazioni su 44 superiore al TLV-TWA (85 mg/m<sup>3</sup>) e in nove anche allo STEL (170 mg/m<sup>3</sup>) con mediana 64 mg/m<sup>3</sup> (range IQ 15-120,3 mg/m<sup>3</sup>) il giorno 8 e mediana 30,7 mg/m<sup>3</sup> (range IQ 16,3-152,6 mg/m<sup>3</sup>) il giorno 10 giugno. Come prevedibile in base alla tossicocinetica, si è osservato un incremento delle concentrazioni urinarie dei metaboliti dello stirene durante la giornata e la settimana lavorativa. In particolare, si è osservato un incremento significativo dell'ac. Mandelico tre inizio turno inizio settimana lavorativa e fine turno fine settimana lavorativa ( $p < 0,01$ ) e tra inizio turno fine settimana lavorativa e fine turno fine settimana lavorativa ( $p < 0,001$ ). Tuttavia, i valori di metaboliti urinari dello stirene appaiono tutti inferiori al 50% del BEI proposto dall'ACGIH per la somma di acido mandelico e fenilgliosilico espressi in funzione della creatinina, con una mediana di 77,9 mg/g creatinina (range IQ 65,8 - 92,2 mg/g creatinina) con un valore massimo di 154,2 mg/g creatinina, pari al 38,5% del BEI.

### Spirometria

I lavoratori presentavano valori di FVC (98,9%±8,31 vs 107,8%±10,5) e FEV1 (94,8%±10,5 vs 104,8%±10,5) minori rispetto ai controlli ( $p=0,03$  e  $p=0,0026$ ), pur in assenza di valori francamente patologici polmonare (Figura 1).

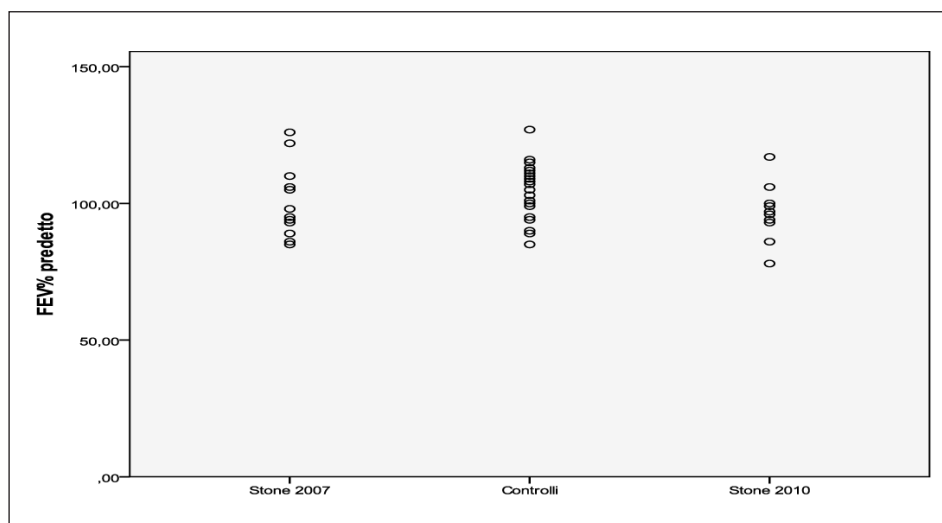


Figura 1. Raffronto dei valori di FEV1 nei gruppi indagati

### Biomarcatori di dose e effetto

Il Si-CAE era superiore ( $p < 0.001$ ) negli esposti in entrambi i campionamenti [106 (range IQ: 73-173) e 122 (range IQ: 59-182)  $\mu\text{g/l}$ ] rispetto ai controlli [19 (range IQ: 1-71)  $\mu\text{g/l}$ ]. I livelli di 8oxoGuo erano superiori ( $p < 0.001$ ) nei lavoratori 2010 rispetto ai controlli ( $2,9 \pm 0,7$  vs  $2,0 \pm 0,5$  pmol/nmol creatinina) ed ai lavoratori 2007 ( $1,8 \pm 0,4$  pmol/nmol creatinina) (Figura 2).

Erano presenti concentrazioni superiori di  $\text{H}_2\text{O}_2$ -CAE negli esposti a cristobalite ( $0,13 \mu\text{M}$ , range  $0,07-0,25 \mu\text{M}$ ), dove tra l'altro Si e  $\text{H}_2\text{O}_2$  correlavano significativamente ( $p = 0,03$ ,  $R = 0,59$ ), rispetto ai controlli ( $0,07 \mu\text{M}$  range IQ  $0,02-0,14 \mu\text{M}$ ) (Figure 3 e 4).

L'espressione di HO-1 era maggiore negli esposti a inizio ( $0,36 \pm 0,07$  vs  $0,26 \pm 0,10$   $p = 0,013$ ) con una correlazione con l'anzianità lavorativa ( $p = 0,008$ ,  $r = 0,7$ ) ma senza correlazione con l'età anagrafica (Figure 5 e 6).

Infine, si è osservata una correlazione ( $p = 0,004$ ,  $r = 0,741$ ) tra SP-D e numero di sigarette/die. È inoltre da rilevare la presenza di una correlazione tra le concentrazioni di  $\text{H}_2\text{O}_2$  nel CAE come indicatore locale d'inflammazione - indicatore di effetto e SiCAE come indicatore di dose al bersaglio. Infine si osserva un'aumentata espressione di eme ossigenasi nei leucociti dei soggetti esposti a silice.

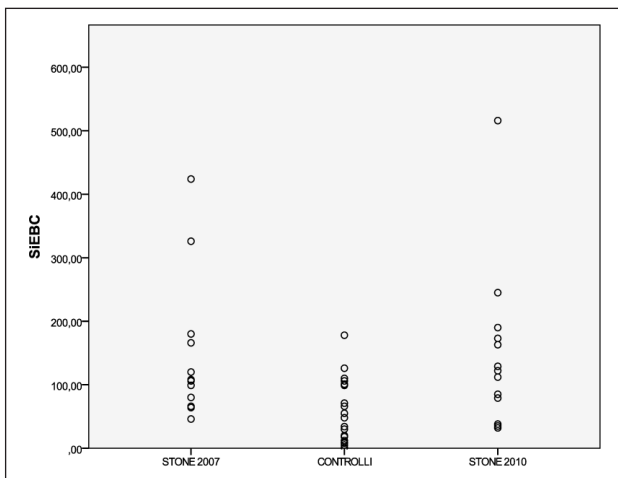


Figura 2. Concentrazione di Si nel CAE

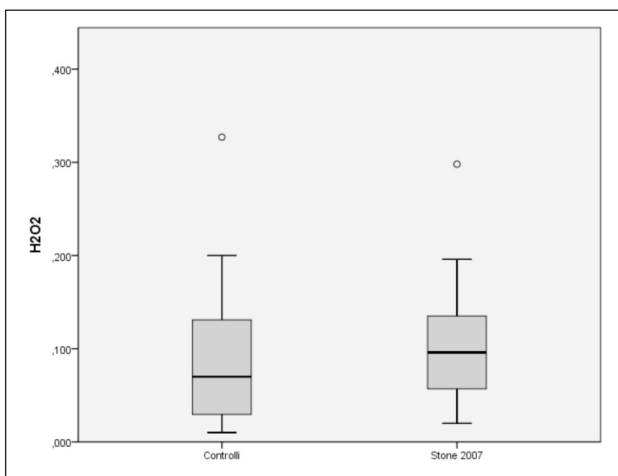


Figura 3. Concentrazioni  $\text{H}_2\text{O}_2$  nel CAE

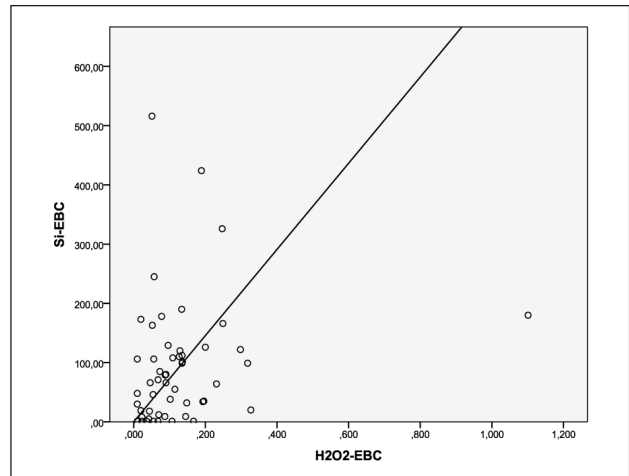


Figura 4. Correlazione  $\text{H}_2\text{O}_2$  e Si nel CAE

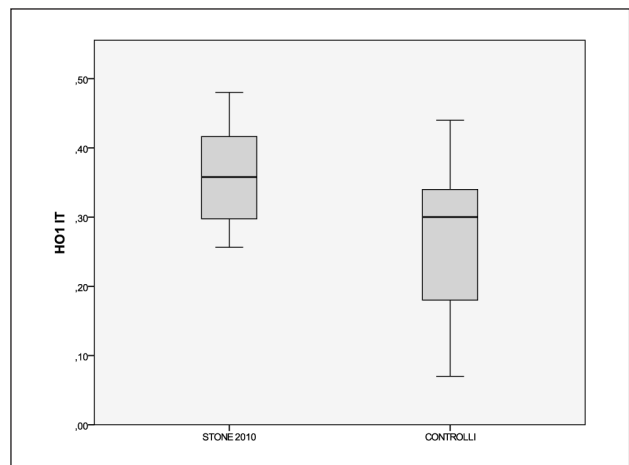


Figura 5. Espressione EME ossigenasi 1 inizio turno

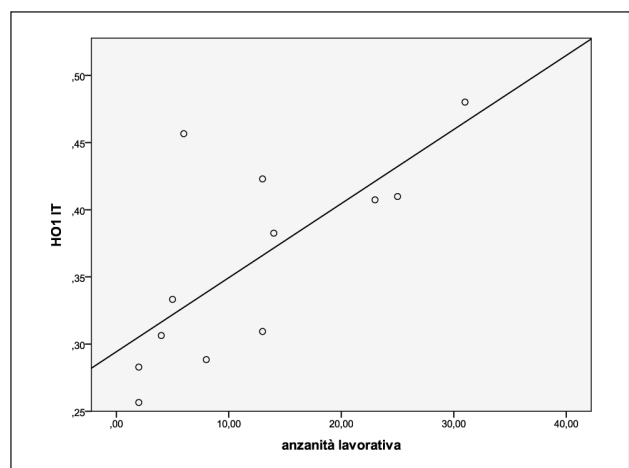


Figura 6. Correlazione tra espressione EME ossigenasi 1 inizio turno e anzianità lavorativa

### Discussione

Benché il quadro di esposizione contemporanea a silice e stirene sia assolutamente particolare e quindi renda complesso il confronto delle nostre indagini con la letteratura scientifica si possono fare alcune considerazioni. Si con-

ferma il dato già riportato in letteratura (11) di un' aumentata espressione di eme ossigenasi come reazione adattativa allo stress ossidativo derivante dall'esposizione cronica a Si libera cristallina con un' interessante correlazione con l'anzianità lavorativa. Più agevole appare la spiegazione dell'interessante relazione che intercorre tra Si e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel CAE, basata sullo stimolo pro infiammatorio della silice secondario all'attivazione macrofagica, benché supportata da un ridotto numero di osservazioni, costituisce un importante supporto all'uso de CAE come strumento per la misura della dose al bersaglio di Si al di fuori della esposizione come, peraltro, già avviene in maniera analoga per altre sostanze aerodisperse (12). L'evidenza di una riduzione dei parametri funzionali respiratori nei lavoratori esposti rispetto ai controlli non appare influenzata dalla diversa abitudine tabagica nei due gruppi consentendo quindi di individuare nelle esposizioni professionali un importante determinante di queste differenze. Tuttavia va sottolineato come l'indagine spirometrica abbia evidenziato alterazioni aspecifiche e più caratteristiche di un quadro ostruttivo che restrittivo ponendo come causa di tali effetti più i fattori bronco irritanti (stirene) che la silice libera cristallina. Per quanto riguarda i dati riguardanti la caratterizzazione dell'esposizione, devono essere avanzate due considerazioni. Va sottolineato come i campionamenti ambientale e dei metaboliti dello stirene siano stati effettuati in giornate diverse da quelle delle nostre analisi, ciò introduce un importante fattore di variabilità costituito dalla possibilità che, in un ambito industriale non controllato, si possano verificare operazioni insolite tali da rendere queste misure non rappresentative dell'esposizione usuale. Inoltre la discrepanza esistente tra i risultati del campionamento ambientale di stirene e i valori dei suoi metaboliti urinari porta alla conclusione che il monitoraggio ambientale rispetto a quello biologico appare più suscettibile a perturbazioni esterne, come ad esempio imbrattamenti accidentali dei campionatori, rendendolo meno affidabile del monitoraggio biologico nella valutazione dell'esposizione lavorativa. L'interpretazione dei dati relativi ai prodotti dell'ossidazione della guanina appare complessa in quanto la difficoltà nella corretta caratterizzazione dell'esposizione a stirene impedisce una ponderazione degli effetti di questo tossico rispetto a quelli della silice. In prospettiva l'applicazione di questo protocollo di studio in una popolazione di maggiori dimensioni potrà apportare sostanziali miglioramenti all'accuratezza delle nostre valutazioni. Viste le correlazioni che si sono individuate tra i livelli di alcuni indicatori e l'anzianità lavorativa di particolare interesse sarebbe l'applicazione di uno schema di studio di tipo longitudinale al fine di fare emergere gli effetti a medio e lungo termine dell'esposizione a silice cristallina e stirene su questi indicatori.

## Conclusioni

I dati ottenuti in questa campagna di monitoraggio biologico, benché esigui per numero, possono suggerire

alcune osservazioni. In primo luogo si può affermare che nei lavoratori esposti a silice l'esame spirometrico è una metodica che difficilmente può identificare alterazioni precoci e specifiche. L'analisi del CAE appare una metodica sensibile e di facile applicazione in campo lavorativo benché le metodiche analitiche, date le bassissime concentrazioni delle sostanze di interesse, rimangono tuttora di non facile applicazione su larga scala. L'individuazione di significativi incrementi di Si al di fuori dell'attività nei lavoratori esposti suggerisce la possibilità dell'utilizzo dell'analisi di questa matrice come una metodica praticabile per la stima della dose al bersaglio. Da valutare con attenzione appare il dato relativo all'elevazione di 8oxo-Guo in quanto tale indicatore è noto per essere fortemente influenzato dall'esposizione a diversi tossici. Si evidenzia quindi la presenza di numerosi indicatori di effetto sia sistemici sia locali che possono essere ulteriormente indagati per confermarne e validarne l'uso nel monitoraggio biologico dei lavoratori esposti a silice e stirene oltre al dosaggio della silice stessa come indicatore di dose al bersaglio.

## Bibliografia

- 1) Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, Folkerts G. Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 8: 731-765.
- 2) Haagsman HP. Surfactant proteins A and D. *Biochem. SocTrans* 1993; 22: 100-106.
- 3) Kuroki, Y, and D. R. Voelker. Pulmonary surfactant proteins. *J Biol Chem* 1994; 269: 25943-25946.
- 4) Pison, U, M. Max, A. Neuendan, S. Weissbach, and S. Pietschmann. Host defence capacities of pulmonary surfactant: evidence for 'non-surfactant' functions of the surfactant system. *Eur J Clin Invest* 1994; 24: 586-599.
- 5) Wright JR. Immunomodulatory functions of surfactant. *Physiol Rev* 1997; 77: 931-962.
- 6) Marczynski B, Peel M, Baur X. New aspects in genotoxic risk assessment of styrene exposure - a working hypothesis. *Medical Hypotheses* 2000; 54: 619-623.
- 7) Andreoli R, Mutti A, Goldoni M, Mainimi P, Apostoli P, De Palma G. Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy) ribonucleotides and nucleic acid. *Free radical Biology and Medicine* 2011; 254-261.
- 8) Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 1507-1516.
- 9) Otterbein LE, Choi A M. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000; 279(6): L1029-37.
- 10) Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004; 339: 1-9.
- 11) Takashi S et al. Heme oxygenase 1, a potential biomarker of chronic silicosis, attenuates silica-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174: 906-14.
- 12) Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, Bergonzi R, Apostoli P, Mutti A. Exhaled Breath Condensate as a Suitable Matrix to Assess Lung Dose and Effects in Workers Exposed to Cobalt and Tungsten. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1293-1298.