



**UNIVERSITÀ
DI PARMA**

UNIVERSITÀ DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE MEDICHE

CICLO XXX

EFFETTI RESPIRATORI DI ATTIVITÀ LAVORATIVE CON POTENZIALE ESPOSIZIONE A CROMO ESAVALENTE

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Carlo Ferrari

Tutor:
Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Dottoranda: Maria Grazia Riccelli

Anni 2014/2018

INDICE

1.	RIASSUNTO	4
2.	INTRODUZIONE	6
3.	LA VALUTAZIONE DEI RISCHI	8
3.1	Il monitoraggio ambientale	8
3.2	Il monitoraggio biologico.....	8
4.	IL CROMO	11
4.1	Generalità	11
4.2	Principali impieghi industriali	11
4.3	Tossicocinetica e tossicodinamica.....	11
4.4	Tossicità.....	13
4.5	Interazione fra Cr VI e fumo di sigaretta	16
4.6	I valori limite di esposizione professionale.....	16
4.7	Il monitoraggio biologico.....	17
5.	LA SALDATURA	19
5.1	Introduzione.....	19
5.2	I fumi di saldatura e la distribuzione delle particelle nell'apparato respiratorio.....	20
5.3	I rischi per la salute	22
5.3.1	<i>Il rischio chimico</i>	22
5.3.2	<i>Il rischio fisico</i>	23
5.3.3	<i>Il rischio cancerogeno</i>	23
5.4	Il nichel.....	24
5.4.1	<i>Generalità e principali impieghi industriali</i>	24
5.4.2	<i>Tossicocinetica e tossicodinamica del nichel</i>	25
5.4.3	<i>Tossicità del nichel</i>	25
5.4.4	<i>I valori limite di esposizione professionale</i>	27
5.4.5	<i>Il monitoraggio biologico</i>	27
5.5	Fattori che influenzano l'esposizione ai rischi da fumi di saldatura	27
5.6	L'apparato respiratorio come principale organo bersaglio: le malattie respiratorie dei saldatori	28
5.6.1	<i>Febbre da fumi metallici</i>	28
5.6.2	<i>Polmonite infettiva</i>	29
5.6.3	<i>Alterazioni della funzionalità respiratoria</i>	30
5.6.4	<i>Asma bronchiale</i>	31
5.6.5	<i>Bronchite Cronica e Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva</i>	32

5.6.6	<i>Malattie polmonari interstiziali e fibrosi polmonare</i>	33
5.6.7	<i>Cancro al polmone</i>	34
5.7	Altri effetti dei fumi di saldatura	35
5.8	I valori limite di esposizione professionale e il monitoraggio biologico	37
6.	L'INDUSTRIA AERONAUTICA E L'ESPOSIZIONE A CROMO ESAVALENTE	38
7.	LA CROMATURA GALVANICA	41
8.	MISURE DI PREVENZIONE	44
8.1	Prevenzione primaria	44
8.2	Prevenzione secondaria	44
9.	VALUTAZIONE NON INVASIVA DELL'APPARATO RESPIRATORIO	48
9.1	Il condensato dell'aria esalata	48
9.1.1	<i>Biomarcatori di esposizione nel CAE</i>	49
9.1.2	<i>Biomarcatori di stress ossidativo nel CAE</i>	50
9.2	Frazione di ossido nitrico esalato	52
9.3	Prove di funzionalità respiratoria	54
10.	DANNO OSSIDATIVO AGLI ACIDI NUCLEICI	56
11.	SCOPI	60
12.	MATERIALI E METODI	61
12.1	Disegno dello studio	61
12.1.1	<i>Saldatori</i>	61
12.1.2	<i>Montatori dell'industria aeronautica</i>	61
12.1.3	<i>Cromatori</i>	62
12.1.4	<i>Controlli 1</i>	62
12.1.5	<i>Controlli 2</i>	63
12.2	Il monitoraggio ambientale	63
12.2.1	<i>Saldatori</i>	63
12.2.2	<i>Montatori dell'industria aeronautica</i>	63
12.2.3	<i>Cromatori</i>	64
12.3	La spirometria e l'analisi dell'ossido nitrico esalato (FeNO)	65
12.4	Il monitoraggio biologico	65
12.4.1	<i>Determinazione dei biomarcatori di esposizione e di effetto nel CAE</i>	65
12.4.2	<i>Determinazione del materiale particolato nel CAE</i>	67
12.4.3	<i>Determinazione dei metalli nelle urine</i>	69
12.4.4	<i>Determinazione degli indicatori di stress ossidativo urinari</i>	70
12.5	Analisi statistiche	70

13.	RISULTATI	72
13.1	Saldatori.....	72
13.1.1	<i>Caratteristiche della popolazione in studio e degli ambienti di lavoro</i>	72
13.1.2	<i>Monitoraggio ambientale</i>	72
13.1.3	<i>Test di funzionalità respiratoria e FeNO</i>	72
13.1.4	<i>Biomarcatori di esposizione</i>	72
13.1.5	<i>Particolato nel CAE</i>	73
13.1.6	<i>Biomarcatori di effetto</i>	73
13.1.7	<i>Biomarcatori di danno ossidativo agli acidi nucleici</i>	74
13.1.8	<i>Correlazioni</i>	74
13.2	Montatori dell'industria aeronautica	75
13.2.1	<i>Caratteristiche della popolazione in studio e degli ambienti di lavoro</i>	75
13.2.2	<i>Monitoraggio ambientale</i>	76
13.2.3	<i>Test di funzionalità respiratoria</i>	76
13.2.4	<i>Biomarcatori di esposizione</i>	76
13.2.5	<i>Biomarcatori di effetto</i>	76
13.2.6	<i>Biomarcatori di danno ossidativo agli acidi nucleici</i>	77
13.2.7	<i>Correlazioni</i>	77
13.3	Cromatori.....	78
13.3.1	<i>Caratteristiche della popolazione in studio e degli ambienti di lavoro</i>	78
13.3.2	<i>Monitoraggio ambientale</i>	78
13.3.3	<i>Test di funzionalità respiratoria</i>	79
13.3.4	<i>Biomarcatori di esposizione</i>	79
13.3.5	<i>Biomarcatori di effetto</i>	79
13.3.6	<i>Biomarcatori di danno ossidativo agli acidi nucleici</i>	79
13.3.7	<i>Correlazioni</i>	80
14.	DISCUSSIONE	81
15.	CONCLUSIONI	90
	BIBLIOGRAFIA	92
	TABELLE	115
	FIGURE	131

1. RIASSUNTO

Il cromo esavalente (Cr VI) è un noto cancerogeno in grado di provocare tumore del polmone, delle cavità nasali e dei seni paranasali. Benché il Cr VI non sia in grado di reagire con il DNA, esso può attraversare le membrane plasmatiche; all'interno delle cellule, viene ridotto a Cr III, responsabile della formazione di addotti con gli acidi nucleici e di legami DNA-proteine. La riduzione del Cr VI a Cr III si associa inoltre a stress ossidativo. Le lavorazioni in cui si realizza una potenziale esposizione, principalmente per via inalatoria, a Cr VI sono diverse; quelle prese in considerazione in questo studio sono la saldatura di acciaio inox, la cromatura galvanica e l'utilizzo di vernici a base di cromato di stronzio. Lo scopo principale di questo studio è stato quello di utilizzare il condensato dell'aria esalata (CAE) per misurare biomarcatori di esposizione [(Cr e nel caso dei saldatori anche nichel e materiale particolato (PM)] e correlarli con biomarcatori di stress ossidativo, quali perossido di idrogeno (H_2O_2), malondialdeide (MDA), 4-idrossinonenale (HNE) e 8-isoprostano, integrando il monitoraggio biologico ed ambientale tradizionale. Per quantificare il danno ossidativo agli acidi nucleici sono stati valutati i rapporti tra le diverse forme ossidate e native della guanina urinaria. I risultati del monitoraggio ambientale hanno rilevato concentrazioni di Cr totale inferiori ai valori limite soglia (TLV) dell'ACGIH in tutte le categorie di lavoratori. Nei saldatori, nonostante la bassa esposizione, il Cr-CAE ha mostrato differenze tra il venerdì ad inizio e fine turno rispetto al lunedì dopo la pausa del fine settimana e le variazioni sono state osservate tra gli stessi tempi per il Cr urinario (Cr-U). Il Cr in aria ambiente correlava sia con Cr-CAE che con Cr-U. Il PM-CAE non ha mostrato differenze tra i tempi di campionamento, ma sono stati rilevati valori superiori rispetto a quelli misurati nei controlli. Tra i biomarcatori di effetto il H_2O_2 sembra essere influenzato dall'esposizione del singolo turno di lavoro, mentre la MDA e l'HNE dall'esposizione della settimana lavorativa. Le variazioni di MDA e HNE tra i tempi di campionamento sono state riscontrate anche nei montatori dell'industria aeronautica. Le due aldeidi correlavano tra loro in tutte le categorie di lavoratori ad indicare una via comune di induzione dello stress ossidativo. Sono state riscontrate

differenze dei rapporti delle diverse forme ossidate e native della guanina tra i tempi di campionamento e correlazioni tra la forma ossidata della guanina legata all'RNA e il Cr-U. Inoltre, nei saldatori il rapporto 8-oxodGuo/dGuo ha risentito dell'esposizione del singolo turno, ha mostrato valori superiori rispetto a quelli determinati nei controlli e correlava con Cr-U il venerdì a fine turno. Le variazioni dell'escrezione urinaria delle forme ossidate della guanina, in relazione all'esposizione a Cr e ad altri agenti tossici, potrebbe riflettere un aumento del danno ossidativo che si traduce in una maggiore attività dei sistemi di riparazione degli acidi nucleici e/o in un aumento del turnover cellulare. La possibilità di utilizzare il CAE per la determinazione di biomarcatori rappresenta un progresso notevole per la Medicina del Lavoro. L'assenza di correlazioni tra i biomarcatori di esposizione e di effetto determinati nel CAE lascia ipotizzare che le variazioni di questi ultimi potrebbero essere attribuite ad altri agenti presenti in ambiente di lavoro tra cui l'ozono ed il particolato ultrafine. I risultati dimostrano ancora che il Cr-CAE è un biomarcatore di esposizione sensibile in quanto nei saldatori anche in condizioni di bassa esposizione sono state riscontrate differenze tra i tempi di campionamento. L'elevata sensibilità della metodica per la rilevazione della frazione esavalente permette, inoltre, non solo di stimare l'esposizione a Cr VI a livello dell'organo bersaglio, ma anche di escluderla.

Parole chiave: cromo esavalente, stress ossidativo, malondialdeide, 4-idrossinonenale, condensato dell'aria esalata, acidi nucleici, fumi di saldatura.

2. INTRODUZIONE

La via inalatoria rappresenta una delle principali vie di esposizione in ambito occupazionale e l'apparato respiratorio è l'organo bersaglio di numerosi agenti pneumotossici. L'utilizzo di una matrice biologica come il condensato dell'aria esalata (CAE) fornisce informazioni aggiuntive al monitoraggio biologico (MB) tradizionale. Nel CAE è possibile determinare sia biomarcatori di esposizione che di effetto valutando quindi la dose e il danno ossidativo indotto dalle sostanze pneumotossiche direttamente a livello dell'organo bersaglio. In particolare i fumi e le nebbie che si generano rispettivamente durante il processo di saldatura di acciaio inox e di cromatura galvanica contengono elementi metallici di transizione tra cui il cromo esavalente (Cr VI) che possono agire localmente e causare effetti prevedibili in funzione dell'esposizione. La dose che raggiunge e causa il danno localmente non necessariamente corrisponde alla dose interna. In questi casi i dosaggi nelle matrici biologiche tradizionali, quali sangue e urine, sebbene forniscano informazioni importanti sull'esposizione sistemica, non risultano rappresentativi della dose depositata a livello dell'organo bersaglio, cioè delle vie respiratorie. Individuare le relazioni dose-effetto e dose-risposta delle sostanze pneumotossiche rilevabili nel CAE rappresenterebbe un progresso notevole nel campo della Medicina del Lavoro. La determinazione della dose al bersaglio risulta inoltre di fondamentale importanza nel caso di agenti cancerogeni, la maggior parte dei quali sono cancerogeni senza soglia e per i quali non è possibile costruire le curve dose-effetto. Questi cancerogeni sono linearmente correlati con l'effetto (stocastico) ovvero all'aumentare della dose non aumenta l'effetto ma la probabilità che esso si manifesti [1]. Il Cr VI è un noto cancerogeno classificato dall'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) come cancerogeno di gruppo 1 in grado di provocare tumore del polmone, delle cavità nasali e dei seni paranasali [2].

Numerose sono le attività lavorative nelle quali può realizzarsi una potenziale esposizione a Cr VI, quelle prese in considerazione in questo studio sono la saldatura di acciaio inox, la cromatura galvanica e l'utilizzo sporadico di vernici a base di cromato di stronzio (SrCrO_4) in montatori

dell'industria aeronautica. Nel caso specifico dei fumi di saldatura, questi sono stati recentemente classificati dalla IARC come cancerogeni di gruppo 1 [3] indipendentemente dalla composizione del metallo base, del materiale d'apporto (se presente) e dell'elettrodo. Tuttavia, essi sono costituiti da una miscela di numerose sostanze e risulta difficile comprendere se la cancerogenicità sia dovuta ad una o più specifiche sostanze oppure alla miscela come tale.

Nel nostro Paese il miglioramento delle condizioni lavorative, con l'entrata in vigore dapprima della legge 626/94 e successivamente del D.Lgs 81/2008, ha ridotto notevolmente l'esposizione professionale dei lavoratori e in alcuni settori le concentrazioni di pneumotossici in ambiente lavorativo spesso risultano molto basse e di gran lunga inferiori ai valori limite di esposizione professionale, e lo scrupoloso e corretto utilizzo dei dispositivi di protezione collettiva e individuale riduce ulteriormente l'esposizione.

3. LA VALUTAZIONE DEI RISCHI

La valutazione dei rischi riguarda la caratterizzazione di tutti i rischi per la salute e la sicurezza dei lavoratori presenti in ambiente di lavoro, con il fine di individuare le adeguate misure di prevenzione e di protezione e ad elaborare il programma per garantire il miglioramento nel tempo dei livelli di salute e sicurezza. La valutazione dei rischi comprende la stima delle potenzialità nocive degli agenti pericolosi e la definizione delle relazioni dose/risposta, a tal fine si avvale, per la determinazione qualitativa o quantitativa dell'esposizione, del monitoraggio ambientale (MA) e del MB [1].

3.1 Il monitoraggio ambientale

La misurazione periodica delle concentrazioni di un inquinante aerodisperso nell'ambiente di lavoro, con lo scopo di confrontare i dati ottenuti con appropriati valori limiti stabiliti dalle organizzazioni nazionali ed internazionali di igiene sul lavoro, è definita MA. I valori limite di esposizione professionale, generalmente espressi in mg/m^3 , sono le concentrazioni aeree di sostanze nocive al di sotto delle quali si presume non ci siano effetti dannosi, anche a lungo termine e nelle generazioni successive, sulla salute per le persone esposte da 8 a 10 ore al giorno e per 40 ore alla settimana [1, 4].

3.2 Il monitoraggio biologico

Il MB è definito come la misurazione periodica di una sostanza tossica, o dei suoi metaboliti, in matrici biologiche accessibili in una popolazione esposta, allo scopo di confrontare i livelli misurati con opportuni standard di riferimento. Il MB fornisce pertanto informazioni sull'esposizione, ma anche sugli effetti biologici conseguenti e sulla quantità di sostanza tossica che interagisce con specifici bersagli. Si avvale di indicatori di dose/esposizione, indicatori di effetto e indicatori di suscettibilità [5].

Gli indicatori di esposizione (o di dose), secondo il National Research Council (NCR), sono definiti come sostanze esogene, un loro metabolita o il prodotto derivato dall'interazione tra uno xenobiotico ed una molecola o una cellula bersaglio, misurato in un compartimento dell'organismo. Questi

indicatori consentono pertanto di caratterizzare la dose totale assorbita e l'accumulo legati alle diverse fonti di esposizione e vie di assorbimento. Gli indicatori di esposizione possono a loro volta essere suddivisi in indicatori di dose interna e indicatori di dose efficace. Gli indicatori di dose interna quantificano la quantità/concentrazione di xenobiotico presente o accumulata in un compartimento od organo. Gli indicatori di dose efficace rappresentano invece una misura dell'esposizione più vicina al bersaglio e forniscono indicazioni sensibili e specifiche della frazione di xenobiotico che, generalmente dopo attivazione metabolica, ha legato un determinato bersaglio. Il riscontro di concentrazioni superiori ai valori di riferimento per la popolazione non esposta impone la rimozione del rischio e/o il suo contenimento, ma va considerato che gli indicatori di esposizione non sono indicatori precoci di malattia [6].

Gli indicatori di effetto (o di risposta) sono alterazioni biochimiche o fisiologiche misurabili in un organismo che indicano un danno effettivo o potenziale alla salute, o una vera e propria malattia, a seguito dell'esposizione ad un determinato fattore di rischio e a seconda dell'entità dell'esposizione. L'utilizzo degli indicatori di effetto è volto ad identificare la relazione dose-effetto e dose-risposta per la stima del rischio di effetti a lungo termine, allo scopo di individuare eventuali interventi di prevenzione primaria. Sono utili in quelle lavorazioni in cui è difficile definire i singoli inquinanti responsabili dell'effetto, come nel caso dei fumi di saldatura per i quali nel caso dell'effetto cancerogeno sono state descritte relazioni esposizione-risposta in assenza di relazioni dose-effetto. Purtroppo, per molti di essi non esistono valori di riferimento e le metodiche utilizzate sono sufficientemente validate [7]. Inoltre, diversi fattori interferenti (abitudini di vita, BMI, patologie croniche) possono alterarne le concentrazioni nelle matrici biologiche [1].

Gli indicatori di suscettibilità valutano una riduzione intrinseca o acquisita della capacità di un organismo di rispondere ai possibili effetti conseguenti all'esposizione ad un determinato xenobiotico. In altre parole mostrano le possibili differenze tra gli individui per quanto riguarda il

metabolismo, le risposte immunitarie, le alterazioni dell'attività di oncogeni o di geni oncosoppressori [1, 5].

4. IL CROMO

4.1 Generalità

Il cromo (Cr) è un metallo duro, non infiammabile, con elevate temperature di fusione e molto resistente alla corrosione. È presente in natura in vari stati di ossidazione, principalmente come cromo metallico (Cr⁰), trivalente (Cr III) e Cr VI. Il Cr III è un oligoelemento essenziale per una corretta omeostasi glicemica e la sua tossicità è limitata in quanto non è capace di attraversare le membrane cellulari [8]. Benché il Cr VI non sia in grado di reagire con il DNA, esso può attraversare le membrane plasmatiche; all'interno delle cellule, viene ridotto a Cr III, responsabile della formazione di addotti con gli acidi nucleici e di legami tra il DNA e le proteine. La riduzione del Cr VI a Cr III si associa inoltre a stress ossidativo. Una piccola quota di Cr VI viene ridotto a Cr V e Cr IV instabili e anch'essi responsabili di effetti citotossici intracellulari [9].

4.2 Principali impieghi industriali

Le industrie e i processi produttivi in cui può verificarsi l'esposizione al Cr VI comprendono la produzione di cromati, la cromatura galvanica, la saldatura di metalli e leghe contenenti Cr (ad esempio acciai inossidabili e acciai speciali ad alto tenore di Cr). Ricordiamo, ancora, la produzione e l'uso di composti contenenti cromo quali pigmenti e vernici (ad esempio applicazione nell'industria aeronautica e rimozione in edilizia e industrie marittime), catalizzatori, acido cromico, agenti concianti e pesticidi [2]. La maggior parte delle attività sopracitate possono esporre i lavoratori a forme solubili ed insolubili di Cr III e di Cr VI, fanno eccezione l'industria conciaria e l'industria galvanica che espongono i lavoratori rispettivamente a Cr III solubile e Cr VI solubile [10].

4.3 Tossicocinetica e tossicodinamica

Il cromo può essere assorbito per via inalatoria, cutanea e gastrointestinale. La via principale di esposizione in ambito professionale è quella inalatoria, seguita dalla via cutanea.

Riguardo la via gastrointestinale le acque e cibi (specie se contaminate) sono fonte di Cr VI, tuttavia l'acidità gastrica favorendo la riduzione a Cr III ne riduce notevolmente l'assorbimento.

L'assorbimento per via inalatoria è influenzato da numerose variabili: la solubilità e le dimensioni delle particelle in cui è complessato il cromo, l'attività dei macrofagi alveolari e il tasso di riduzione di Cr VI a Cr III. De Flora ha calcolato una riduzione di 0,1-0,5 µg di Cr VI/die da parte dei macrofagi alveolari nelle vie aeree umane ed una capacità complessiva di riduzione del Cr VI di 136 mg per individuo [11, 12]. Goldoni et al. hanno valutato il potere riducente del fluido di rivestimento delle vie aeree terminali (*lining fluid*). I composti del Cr VI vengono in parte ridotti dal *lining fluid*, anche se con un'efficienza abbastanza bassa (persistenza del Cr VI anche dopo 48 h dall'inalazione), in parte esalati, in parte assorbiti e in parte permangono nel tessuto polmonare [13]. In particolare i composti solubili si distribuiscono nel flusso ematico, i composti insolubili, invece, tendono a depositarsi nel polmone. A livello ematico il Cr III si lega principalmente a proteine plasmatiche (albumina, transferrina, α e β globuline) formando dei composti non reattivi. Questi composti, dopo aver attraversato le membrane cellulari, si depositano principalmente nel fegato, nel rene, nella milza e nel tessuto osseo e, nei soggetti professionalmente esposti, nel polmone. Il Cr VI invece, entra quasi completamente nei globuli rossi attraverso lo scambiatore fosfato/solfato anione dove viene ridotto a Cr III da varie molecole quali glutazione, ascorbato e cisteina, generando talvolta anche forme intermedie instabili come il Cr V e il Cr IV. Durante questi processi di riduzione alla forma trivalente, il cromo può interagire con macromolecole cellulari, compreso il DNA, causando mutazioni geniche ed aberrazioni cromosomiche, alterando il normale ciclo cellulare e inducendo i geni responsabili dell'apoptosi [14-16]. Dopo l'assorbimento e l'interazione con vari meccanismi biologici il Cr si trova quasi esclusivamente in forma trivalente e come tale viene escreto per via renale (circa 50%); solo il 5% viene eliminato con le feci. L'esistenza di un'escrezione urinaria del Cr bi o trifasica (7 ore; 15-30 giorni; 4 anni) conferma l'ipotesi dell'esistenza di diversi compartimenti di accumulo a lento rilascio quali il tessuto osseo o i tessuti molli [17, 18].

4.4 Tossicità

La tossicità del Cr VI può essere acuta o cronica. Esposizioni acute, dopo ingestione accidentale di composti del Cr VI, possono determinare lesioni caustiche ed emorragie del tratto gastroenterico, dolori addominali, nausea e vomito, seguiti da shock ipovolemico e infine insufficienza renale acuta tubulo-necrotica. In seguito ad inalazione acuta di nebbie e vapori di acido cromico si possono verificare lesioni polmonari quali polmonite chimica ed edema polmonare acuto. Ustioni cutanee con acido cromico, solfato di cromo o dicromato di potassio possono causare danni che vanno dall'ulcerazione alla necrosi. A livello renale è stata descritta un'insufficienza tubulare acuta mediata da danno citotossico diretto [19-21].

Attualmente, esclusi i casi di infortunio, l'esposizione professionale ai composti del Cr VI è cronica e le manifestazioni riguardano principalmente la cute, l'apparato respiratorio e in minor misura il rene e l'apparato digerente. A livello cutaneo gli effetti da esposizione cronica possono manifestarsi in forma di dermatiti allergiche, provocate dalla sensibilizzazione al Cr VI (risposta immunitaria di tipo IV o cellulo-mediata), o ulcere cutanee per azione corrosiva diretta. A livello dell'apparato respiratorio il Cr VI può causare atrofia della mucosa nasale, ulcerazioni e perforazione del setto nasale, ma anche riniti, faringiti, bronchiti croniche e BPCO. Sono stati, inoltre, riportati diversi casi di asma professionale da Cr VI come risultato dell'esposizione a nebbie, vapori di acido cromico, metalli di rivestimento e vernici spray [22-24]. Il Cr VI è un cancerogeno certo per l'uomo (gruppo 1 della IARC); i composti del Cr VI causano carcinoma del polmone. Un'associazione positiva è stata dimostrata tra esposizione a Cr VI e carcinoma delle cavità nasali e dei seni paranasali. Gli studi finora condotti hanno dimostrato un'associazione certa fra neoplasia dell'apparato respiratorio ed esposizione ad alcuni composti del Cr VI (tra cui cromato di Ca durante il processo di produzione dei cromati e cromato di Zn, di Piombo e di Stronzio nella produzione di pigmenti) mentre per altri composti i dati sono ancora dubbi. Il rischio cancerogeno è quindi maggiore per i composti insolubili che depositandosi a livello dell'organo bersaglio causano gli effetti nocivi [2].

Studi di coorte condotti a partire dagli anni 70 hanno mostrato un eccesso di mortalità per cancro (Ca) al polmone, alle cavità nasali ed ai seni paranasali in lavoratori addetti alla produzione di cromati e bicromati esavalenti [16, 25, 26], alla produzione di pigmenti [27, 28] e alla cromatura galvanica [29, 30]. Per quanto riguarda altre attività quali la saldatura di acciaio inox non è ancora chiaro se l'esposizione a Cr VI sia la sola causa dell'eccesso di mortalità. In uno studio di coorte su due gruppi di saldatori esposti ad alti e bassi livelli di Cr VI era stato osservato un numero di decessi maggiore nel gruppo degli alti esposti rispetto sia quello dei bassi esposti sia ad un gruppo di controllo, queste differenze tuttavia non raggiungevano la significatività statistica [31]. Un recente studio caso-controllo ha mostrato invece un rischio significativamente più elevato di tumore al polmone nei saldatori di acciaio inox rispetto a quelli di acciaio dolce non esposti a Cr VI [32].

La cancerogenicità del Cr è legata al suo stato di ossidazione, il Cr VI non è in grado di interagire con il DNA ma, a differenza del Cr III, può attraversare le membrane plasmatiche e all'interno delle cellule viene ridotto a Cr III responsabile dell'effetto genotossico. Diversamente la riduzione del Cr (VI) a Cr (III) che avviene nei fluidi biologici e nelle cellule non bersaglio è un meccanismo di detossificazione poiché il Cr VI una volta ridotto Cr III non è più in grado di attraversare le membrane delle cellule e di raggiungere il DNA. La riduzione avviene sia ad opera dei fluidi biologici quali saliva, succo gastrico e *lining fluid* alveolare che ad opera di microrganismi, cellule isolate come i globuli rossi, o anche nel contesto dei tessuti epatico, polmonare e intestinale. Questi meccanismi limitano i possibili effetti tossici e cancerogeni a livello degli organi bersaglio e conferiscono un carattere di soglia al processo di carcinogenesi [12]. Il Cr VI sfuggito ai meccanismi di detossificazione raggiunge le cellule bersaglio e, prevalentemente come ione cromato (CrO_4^{2-}), attraversa le membrane cellulari per mezzo dei canali anionici dei solfati e dei fosfati. All'interno delle cellule il Cr VI viene rapidamente ridotto da molecole quali glutazione, ascorbato e cisteina a Cr III e una piccola quota viene ridotta a Cr IV e Cr V, intermedi instabili e di breve durata [9]. Durante le reazioni di riduzione del Cr VI vengono prodotte specie reattive dell'ossigeno (ROS): radicali

idrossili, ossigeno singoletto, superossido e perossido di idrogeno (H₂O₂) [33]. I ROS prodotti all'interno delle cellule sono responsabile di danni al DNA e alle proteine. Forme comuni di danno al DNA includono rotture di filamenti di DNA, addotti cromo-DNA, legami crociati DNA-DNA e DNA-proteina e danno ossidativo agli acidi nucleici [8, 14].

Rispetto all'apparato gastroenterico, la capacità di detossificazione è meno efficace nel sistema respiratorio dove è maggiore la superficie esposta e la dose depositata ed assorbita in relazione alla particolare via di esposizione inalatoria. Poiché la riduzione extracellulare e l'assorbimento del Cr VI sono processi concomitanti, piccole quantità di Cr VI possono essere assorbite anche se le dosi rientrano nella capacità di detossificazione del polmone. Queste piccole dosi, dopo essere state ridotte all'interno delle cellule, vengono probabilmente inattivate a questo livello senza causare ulteriori danni. Al contrario dosi maggiori e/o dosi di forme scarsamente solubili si accumulano nel polmone attraversano le membrane cellulari in maggior quantità e possono provocare alterazioni all'interno delle cellule epiteliali polmonari [34].

Non vi sono, al contrario, prove di rischio di cancro derivante dall'esposizione ad aerosol contenenti cromo metallico o composti del Cr III. Questi ultimi rientrano nel gruppo 3 della IARC ovvero non classificabili come cancerogeni per l'uomo [2].

Esposizioni croniche a Cr VI possono causare una nefropatia subclinica che si manifesta con alterazioni di proteinuria totale, di beta-glucoronidasi e di lisozima o con l'incremento dell'escrezione urinaria di beta-2 microglobulina e di proteina legante il retinolo (RBP). Tale nefropatia tende a limitarsi nel tempo, mostrando una correlazione inversa con la durata dell'esposizione; gli effetti del Cr sul rene sembrano quindi essere reversibili e riferibili ad un'esposizione recente. Questo fenomeno può spiegarsi col fatto che, nel corso di esposizioni prolungate, le cellule danneggiate del tubulo renale riescono a rigenerarsi completamente creando in tal modo una specie di refrattarietà ad ulteriori danni di natura tossica [22, 35, 36].

4.5 Interazione fra Cr VI e fumo di sigaretta

I livelli di Cr presenti nel fumo di una sigaretta variano da 0.0002 – 0.5 µg, pertanto i fumatori possono essere esposti a dosi di Cr più alte rispetto ai non fumatori [37]. I meccanismi molecolari dell'interazione tra fumo di sigaretta e Cr presente in ambiente lavorativo e i conseguenti effetti sulla salute non sono stati ancora completamente chiariti. Alcuni studi hanno mostrato che il condensato del fumo di sigaretta determina la riduzione del Cr VI a Cr III nelle vie aeree probabilmente per la presenza di sostanze riducenti al suo interno e allo stesso tempo il Cr VI inibisce l'attivazione metabolica del benzo(a)pirene e di altri componenti presenti nel fumo di sigaretta a derivati mutageni. Inoltre, i macrofagi alveolari dei fumatori manifestano una maggiore capacità di riduzione del Cr VI. I valori di cromuria significativamente più elevati nei fumatori rispetto ai non fumatori e agli ex fumatori potrebbero essere spiegati sia dall'aumento della ritenzione di particolato nelle vie aeree dei fumatori, sia dalla maggiore formazione di Cr III escreto con le urine [12]. Tuttavia, una volta all'interno delle cellule il Cr VI e il benzo(a)pirene diolo epossido, metabolita attivo del benzo(a)pirene, potrebbero avere effetti sinergici. In colture di cellule polmonari umane è stato osservato che il Cr VI stabilizza il legame tra DNA e benzo(a)pirene diolo epossido a livello degli esoni 7 e 8 della proteina p53 aumentando la probabilità di mutazioni a questo livello [38]. Un altro studio in vitro su cellule ovariche di criceto ha mostrato che il Cr VI favorisce le mutazioni indotte dal benzo(a)pirene diolo epossido inibendo il sistema di escissione nucleotidico (NER) [39].

4.6 I valori limite di esposizione professionale

Il valore limite soglia ponderato alle 8 ore lavorative (TLV-TWA), secondo la Conferenza Americana degli Igienisti Industriali Governativi (ACGIH), è di 50 µg/m³ per i composti solubili del Cr VI e di 10 µg/m³ per i composti insolubili del Cr VI [40]. L'Istituto Nazionale per la Sicurezza e la Salute sul lavoro (NIOSH) raccomanda un valore limite in riferimento ad 8 ore lavorative giornaliere e 40 ore settimanali pari a 0,2 µg/m³ per tutti i composti del Cr VI [41]. Secondo l'Agenzia per la Salute e Sicurezza sul Lavoro (OSHA) per il Cr VI in tutte le sue forme e composti il valore limite PEL

(Permissible Exposure Limit) è $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ mentre il livello di azione (Action Level) è $2,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ [42]. Il Comitato Scientifico Comunitario per i Valori Limite di Esposizione Professionale (SCOEL) sulla base della Direttiva dell'Unione Europea (UE) 2017/2398 ha abbassato il limite di esposizione di $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ proposto nel 2004 [43] a $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ per un periodo di cinque anni dalla data di recepimento della direttiva; tale valore scenderà successivamente a $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$. È stata introdotta una deroga per i procedimenti di saldatura e taglio al plasma o analoghi procedimenti di lavorazione che producono fumi: il valore limite di esposizione è stato fissato a $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ per un periodo di cinque anni dalla data di recepimento trascorsi i quali passerà a $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

4.7 Il monitoraggio biologico

Il MB viene generalmente effettuato mediante il dosaggio del Cr-U. Il Cr-U è un indicatore di esposizione recente e di accumulo. La raccolta del campione di urine e successivo dosaggio viene eseguita il venerdì ad inizio e fine turno di lavoro. La differenza tra inizio e fine turno fornisce informazioni importanti sull'entità dell'esposizione giornaliera; effettuando, inoltre, i dosaggi il venerdì si hanno informazioni anche sull'entità dell'accumulo settimanale. Dopo alcuni giorni dall'ultima esposizione recente il Cr-U basale riflette l'esposizione pregressa. Tuttavia l'impiego di un singolo valore di Cr-U non consente di distinguere tra una rilevante esposizione in atto in soggetti con bassa impregnazione e un'esposizione di lieve entità in soggetti con marcato accumulo nei siti di deposito. Se considerati separatamente né il valore di cromuria basale né la differenza fine-inizio turno consentono una stima precisa dell'esposizione. Adottando invece una strategia combinata, basata su due distinti momenti di prelievo, è possibile ottenere informazioni sia sull'esposizione in atto che sul grado di impregnazione di un singolo lavoratore [23, 36].

Per la popolazione i valori di riferimento del Cr-U, riportati nella terza lista della Società Italiana dei Valori di Riferimento (SIVR), sono pari a $0.05-0.35 \mu\text{g}/\text{L}$ (5° and 95° percentile) [44]. Per i lavoratori esposti possono essere utilizzati gli indici biologici di esposizione (BEI) dell'ACGIH e/o i valori limite biologici (BLV) dello SCOEL. L'ACGIH fornisce un valore BEI di $25 \mu\text{g}/\text{L}$ a fine turno e fine

settimana lavorativa con una differenza tra inizio e fine turno di lavoro non superiore a 10 µg/L [45]. Lo SCOEL riporta un BLV di 15 µg/g di creatinina a fine turno e fine settimana, con una differenza massima consentita tra inizio e fine turno di lavoro di 5 µg/g di creatinina [43]. Il cromo nelle urine (Cr-U) è totalmente ridotto a Cr III, pertanto per avere una stima della sola esposizione a Cr VI bisogna effettuare il dosaggio sui globuli rossi isolati. Per questo indicatore sono disponibili i valori equivalenti di esposizione (EKA) della Fondazione Tedesca per la Ricerca (DFG) [46].

5. LA SALDATURA

5.1 Introduzione

Il processo di saldatura consiste nella giunzione tra metalli attraverso il surriscaldamento a temperature adeguate o l'applicazione di pressione, con o senza l'utilizzo di un metallo di apporto [47].

Sulla base della presenza o meno del metallo d'apporto e della similitudine tra la sua composizione e quella del metallo base si distinguono tre tipologie di saldatura: eterogena, autogena e omogenea. La saldatura eterogena si caratterizza per la presenza del materiale d'apporto che deve avere una composizione diversa e un punto di fusione inferiore rispetto al metallo base, difatti è dalla sola fusione del metallo d'apporto che si ottiene la giunzione dei pezzi da saldare. La saldatura omogenea prevede la fusione sia del metallo base che del metallo d'apporto che pertanto devono avere composizione e punti di fusione simili. Infine nella saldatura autogena il materiale d'apporto è assente e la giunzione si ottiene dalla fusione e successiva solidificazione dei due pezzi da saldare [48].

Dei diversi tipi di saldatura utilizzati i più diffusi sono le saldature ad arco elettrico, che utilizzano energia elettrica come fonte di calore. Il calore di fusione che raggiunge temperature di circa 4000 °C, è prodotto dall'elettricità che passa attraverso due elettrodi collegati ad un generatore di corrente ed immersi in un gas conduttore dell'energia elettrica. Tra queste distinguiamo la saldatura ad arco manuale con elettrodo rivestito (SMAW: *Shielded Metal Arc Welding*), la saldatura ad arco con filo animato (FCAW: *Flux-cored Arc Welding*), la saldatura ad arco sommerso (SAW: *Submerged Arc Welding*), la saldatura ad arco sotto protezione di gas (GMAW: *Gas Metal Arc Welding*) che comprende la saldatura sotto protezione di gas inerte (MIG: *Metal arc Inert Gas*) e la saldatura sotto protezione di gas attivo (MAG *Metal arc Active Gas*) e infine la saldatura ad arco con elettrodo infusibile di tungsteno in atmosfera di gas inerte (GTAW o TIG: *Gas Tungsten Arc Welding*) [49, 50]. In tabella 1 sono elencate le caratteristiche dei diversi tipi di saldatura ad arco elettrico

In particolare la saldatura TIG è un processo di precisione, impiegato per la creazione di giunti di elevata qualità, che può essere eseguito con o senza materiale d'apporto. Il calore di fusione è prodotto dall'arco elettrico che si crea tra un elettrodo di tungsteno non consumabile e il metallo base. Il gas inerte rappresentato da argon o elio ha inoltre la funzione di proteggere la zona di saldatura, l'elettrodo di tungsteno e il metallo base dall'ossidazione e altre reazioni che potrebbero alterare la qualità della saldatura. Il generatore di corrente alimenta l'arco elettrico ed è collegato ad una bombola contenente il gas protettivo ed alla torcia su cui è inserito l'elettrodo di tungsteno attorno al quale fluisce il gas di protezione che, attraverso un bocchello di materiale ceramico, è portato sul bagno di fusione.

La saldatura inizia quando il calore generato dall'arco fonde il metallo base e si crea il bagno di fusione. L'operatore sposta la torcia lungo il pezzo e l'arco progressivamente fonde le superfici del giunto. Quando è presente, il materiale d'apporto viene immerso nel bagno di fusione per riempire il giunto [51] (Figura 1).

5.2 I fumi di saldatura e la distribuzione delle particelle nell'apparato respiratorio.

I fumi di saldatura sono composti da materiale particolato fine ed ultrafine con diametro aerodinamico compreso tra 0.01 e 1 μm e pertanto possono raggiungere e depositarsi nei bronchioli terminali o negli alveoli [52]. Il diametro aerodinamico delle particelle presenti nei fumi di saldatura dipende dal processo che si utilizza: la MMAW genera particelle di circa 150 nm, la MAG di 100 nm, la MIG di 100-150 nm e la TIG < 50 nm [53].

Le particelle inalate possono depositarsi nell'apparato respiratorio, ma anche essere esalate. I meccanismi di deposizione delle particelle nell'apparato respiratorio sono: l'impatto, la sedimentazione e la diffusione. In genere la capacità di raggiungere le più fini diramazioni dell'albero bronchiale è inversamente correlato alle dimensioni delle particelle, per cui le particelle di dimensioni inferiori sono le più pericolose [54, 55].

La commissione Internazionale per la Protezione Radiologica (ICRP) definisce il modello di deposizione delle particelle nell'apparato respiratorio. La deposizione meccanica (impatto, sedimentazione) aumenta all'aumentare del diametro aerodinamico, mentre la deposizione termodinamica (diffusione) aumenta al ridursi del diametro aerodinamico e risulta particolarmente rilevante per le particelle < 100 nm [56]. Inoltre, per le particelle fini ed ultrafini la differenza tra diametro ottico e diametro aerodinamico è determinante. A parità di diametro ottico un maggiore diametro aerodinamico, dovuto ad esempio alla composizione metallica delle particelle con conseguente aumento della densità delle stesse, causa un aumento della deposizione [57]. Secondo studi recenti la deposizione nell'apparato respiratorio delle particelle presenti nei fumi di saldatura è del 25% circa (il 7-10% nelle vie aeree superiori e l'11-14% nella regione alveolare) e la deposizione di particelle composte da Cr VI risulta essere maggiore nella regione alveolare [55]. È stato dimostrato che quasi tutto il Cr e più della metà del Ni presenti nei fumi di saldatura sono contenuti nella frazione di particelle inferiori a 300 nm [58].

Il tempo di permanenza delle particelle nell'apparato respiratorio è maggiore per le particelle di piccole dimensioni che raggiungono le più fini diramazioni dell'albero bronchiale [59]. I principali meccanismi di difesa sono rappresentati dalla clearance mucociliare tracheobronchiale per le particelle con diametro aerodinamico > 2.5 μm e dalla clearance dei macrofagi alveolari per le particelle fini ed ultrafini [60]. Tuttavia, numerosi studi hanno mostrato che l'inalazione cronica di particelle fini ed ultrafini causa una riduzione fino alla perdita della motilità dei macrofagi alveolari sovraccarichi di particelle che si traduce in una mancata progressione delle stesse nelle vie aeree superiori per l'eliminazione attraverso la clearance mucociliare [61-63].

Le particelle fini ed ultrafini hanno un elevato rapporto superficie/volume che si associa ad un aumento della loro reattività chimica e si traduce principalmente in una maggior produzione di ROS responsabili di danno ossidativo tra cui perossidazione lipidica e ossidazione degli acidi nucleici [64].

È stato anche recentemente dimostrato che la produzione di ROS è influenzata dall'esperienza e quindi dall'abilità dei saldatori. Uno studio su apprendisti saldatori TIG ha mostrato una maggiore produzione di ROS nell'aria della zona respiratoria di apprendisti poco esperti rispetto ad apprendisti con maggiore esperienza [65].

Riguardo le proprietà fisiche delle particelle, gli studi finora condotti hanno mostrato una maggiore tossicità delle particelle insolubili che si generano principalmente in corso di TIG, MIG e MAG rispetto alle particelle solubili che derivano principalmente dalla MMAW, probabilmente a causa di una prolungata persistenza delle particelle insolubili nelle vie aeree [66, 67].

5.3 I rischi per la salute

5.3.1 *Il rischio chimico*

Il rischio chimico è dovuto principalmente all'emissione di fumi di saldatura e di gas tossici. La composizione dei fumi di saldatura è estremamente variabile ed è influenzata dall'elettrodo, dal metallo d'apporto, dal metallo base, dal gas di protezione e, dalle vernici e dai contaminanti presenti sulla superficie del pezzo da saldare. Durante la fusione il metallo passa allo stato di vapore e reagisce con l'ossigeno atmosferico formando gli ossidi di metallo che successivamente condensano e formano i fumi. Nei processi che utilizzano il gas di protezione l'ossidazione è ridotta, ne risulta una minore emissione di fumi. I processi ad alta emissione di fumi sono la MMAW e la FCAW mentre quelli a bassa emissione sono la SAW, la GMAW e la TIG. Alluminio (Al), cadmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), rame (Cu), fluoruri, ferro (Fe), piombo (Pb), manganese (Mn), magnesio, molibdeno, nichel (Ni), silice, titanio, zinco (Zn) sono tutti metalli che possono essere presenti nei fumi di saldatura. I fumi generati dalla saldatura dell'acciaio inossidabile sono costituiti prevalentemente da ossidi di Fe, Cr, Mn e Ni, mentre quelli che si generano a seguito di saldatura di acciaio dolce contengono in genere l'80% di ossidi di Fe e piccole quantità di Mn. Durante la saldatura possono generarsi anche gas tossici quali l'ozono (O₃), gli ossidi di azoto (NO_x), il biossido di carbonio e il monossido di carbonio. In particolare nei processi a bassa emissione tra cui la GMAW

e la TIG il gas di protezione intensifica la radiazione ultravioletta che, attraverso una reazione fotochimica, determina una maggior formazione di gas tossici [49].

5.3.2 Il rischio fisico

I rischi fisici derivano dall'esposizione a radiazioni non ionizzanti, rumore, elevate temperature e campi elettromagnetici. Tra le radiazioni non ionizzanti quelle ultraviolette emesse all'arco elettrico sono le più pericolose. A livello oculare gli effetti acuti si manifestano con cheratocongiuntivite ed eritema, l'esposizione cronica può determinare l'insorgenza di cataratta e di melanoma oculare [68].

Il rumore che si genera durante le operazioni di saldatura è in relazione alla specifica tecnica impiegata; in particolare nella saldatura a fiamma ossiacetilenica è dato dalla combustione della miscela gassosa emessa ad alta pressione dal cannello; per quelle ad arco in seguito allo scoccare dell'arco elettrico; per quelle al plasma per la fuoriuscita del plasma dall'ugello che produce un caratteristico sibilo. Va inoltre considerato il rumore emesso durante le operazioni successive quali molatura, smerigliatura ecc. [66].

La produzione di calore con lo sviluppo di elevatissime temperature localizzate in vicinanza della zona di saldatura, è caratteristica comune delle tecniche a gas, ad arco elettrico, al plasma e al laser.

Meritevole di valutazione è inoltre la possibile esposizione professionale ai campi elettromagnetici generati dalla saldatura ad arco, in concomitanza dell'utilizzo di relative elevate correnti elettriche fino a diverse centinaia di Ampere [69].

5.3.3 Il rischio cancerogeno

È ormai nota da tempo la cancerogenicità del Cr VI e del Ni presenti nei fumi che si generano dalla saldatura di acciai inossidabili, essi sono classificati dalla IARC come cancerogeni certi per l'uomo (gruppo 1). Di recente i fumi di saldatura, indipendentemente dal tipo di metalli in essi contenuti, sono passati dal gruppo 2B (possibili cancerogeni per l'uomo) al gruppo 1 in quanto in grado di provocare Ca polmonare. Studi sull'uomo hanno mostrato che l'esposizione cronica sia a fumi

generati dalla saldatura di acciaio inossidabile che di acciaio dolce può causare aberrazioni cromosomiche e rotture del DNA nei linfociti [70]. Gli effetti genotossici sono stati valutati anche utilizzando il test del micronucleo su cellule della mucosa orale che ha mostrato un aumento delle cellule binucleate e delle cellule con cromatina condensata in saldatori MIG rispetto ai controlli [71]. Negli ultimi anni il dosaggio dell'8-idrossi-2-deossiguanosina (8-oxodGuo), la forma ossidata della base azotata guanina legata al DNA, è stata studiata come marker di danno ossidativo da esposizione a sostanze tossiche occupazionali. In saldatori sia di acciaio inossidabile che dolce è stato riscontrato un aumento delle concentrazioni urinarie e plasmatiche di 8-oxodGuo tra inizio e fine turno di lavoro [72, 73].

Nel 2012 la IARC ha classificato le radiazioni UV che si generano durante i processi di saldatura come cancerogeni di gruppo I. I dati si basano su otto studi caso-controllo e su due studi di coorte che hanno permesso di stabilire un'associazione causale tra melanoma oculare ed esposizione a radiazioni UV durante l'attività di saldatura [74].

5.4 Il nichel

5.4.1 Generalità e principali impieghi industriali

Il nichel è un metallo di transizione, duro, duttile e malleabile utilizzato per le sue proprietà di resistenza alla corrosione, al calore, all'ossidazione. In natura è presente principalmente come Ni bivalente (Ni II). È un elemento essenziale per gli organismi viventi come costituente di vari enzimi, tra i quali le ureasi nichel-dipendenti presenti nei batteri saprofiti dell'intestino dell'uomo. È coinvolto anche nel metabolismo degli ormoni e dei lipidi e nell'integrità della membrana cellulare. È attivatore di alcuni enzimi, partecipa al metabolismo del glucosio, è presente in quantità importanti nel DNA e nell'RNA e può agire come stabilizzatore di questi acidi nucleici [75, 76]. I principali utilizzi in ambito professionale sono: la produzione di acciaio inox, il processo di nichelatura e la produzione di metalli non ferrosi. Altri impieghi industriali comprendono lavorazioni metallurgiche

e metalmeccaniche in particolare saldatura, industria chimica e petrolchimica, produzione di plastica e gomma sintetica, batterie elettriche, monete, pigmenti.

5.4.2 Tossicocinetica e tossicodinamica del nichel

L'assorbimento dei composti del Ni si realizza per via inalatoria, cutanea, gastrointestinale e dipende dalla solubilità. L'esposizione professionale riguarda principalmente la via inalatoria e quella cutanea. I composti solubili del Ni, assorbiti rapidamente attraverso i polmoni ed escreti principalmente con le urine, non vengono accumulati nell'organismo e hanno un'emivita che varia da 17 a 39 ore [77]. I composti insolubili invece tendono ad accumularsi nell'organismo, in particolare nei polmoni, con un'emivita variabile da mesi ad anni. In Ni ossido e il Ni iposolfuro sono poco solubili e a differenza di quanto avviene per i composti solubili (Ni cloruro e Ni solfato), si depositano a livello polmonare [78]. In caso di contatto cutaneo l'assorbimento è di modesta entità, ma possono verificarsi sensibilizzazioni causate principalmente da Ni metallico e dai composti solubili.

Gli ioni derivanti da composti di Ni solubile vengono assorbiti lentamente attraverso i canali ionici delle membrane cellulari; mentre i composti poco solubili, come il Ni subsolfuro, penetrano nelle cellule mediante fagocitosi e rilasciano rapidamente ioni Ni II responsabili degli effetti tossici e cancerogeni [79]. La quantità di Ni assorbito e legato alle macromolecole nucleari è maggiore nel caso di esposizione a composti insolubili e poco solubili rispetto ai composti solubili [80]. Il tempo di dimezzamento del nichel plasmatico (sovrapponibile a quello urinario) è tra le 20 e le 34 ore. Secondo alcuni autori per il Ni esisterebbe un'eliminazione bifasica, di 24-48 ore e di uno o più mesi [81].

5.4.3 Tossicità del nichel

A seguito di esposizione acute, dovute in genere ad incidenti/infortuni, si possono manifestare a seconda dell'entità della dose e del composto quadri clinici più lievi quali riniti, faringiti, cefalea e vertigini, a breve risoluzione, o quadri clinici severi come la polmonite chimica e l'edema polmonare [76].

L'esposizione cronica per via inalatoria a polveri ed aerosol di Ni contribuisce allo sviluppo di patologie respiratorie quali rinite, sinusite, bronchite, asma bronchiale, fibrosi polmonare, tumore del polmone, delle cavità nasali e dei seni paranasali. L'esposizione per via cutanea può causare dermatite allergica da contatto, patologia peraltro molto diffusa anche nella popolazione generale [76]. Il Ni infatti è un noto agente sensibilizzante ed è stato dimostrato che a seguito di esposizione orale può verificarsi un peggioramento della dermatite in soggetti sensibilizzati al metallo; nella maggior parte degli studi la dose di esposizione era più alta rispetto a quella contenuta in una normale dieta [82]. Studi epidemiologici e sperimentali su soggetti professionalmente esposti hanno mostrato con sufficiente evidenza che sia i composti del Ni solubili che quelli insolubili possono causare tumore al polmone, alle cavità nasali e ai seni paranasali anche dopo aver eliminato gli effetti dei possibili fattori di confondimento (fumo di sigaretta, altre sostanze tossiche occupazionali) [16, 75, 83]. La IARC classifica sia i composti insolubili che solubili del Ni come cancerogeni certi per l'uomo (gruppo 1) e i composti metallici come possibili cancerogeni per l'uomo (gruppo 2B) [84], l'UE invece definisce come cancerogeni certi solo i composti insolubili (ossido e solfuri) e classifica in categoria 2, cioè come cancerogeni sospetti ma senza prove sufficienti, i composti solubili del Ni (solfato, nitrato, acetato) e il Ni metallico [85].

La cancerogenicità dipende dalla capacità dei diversi composti di entrare nelle cellule bersaglio, ed è maggiore per i composti insolubili che per quelli solubili. I composti insolubili difatti, dopo essere stati fagocitati, rilasciano all'interno delle cellule gli ioni Ni^{2+} che sono i responsabili degli effetti tossici e cancerogeni [86]. Inoltre, alcuni composti come il Ni ossido persistono nei polmoni causando infiammazione cronica e possibile danno genotossico indiretto [87]. Sebbene i meccanismi molecolari alla base della cancerogenicità indotta da Ni non siano stati ancora completamente chiariti, gli studi presenti in letteratura individuano tra i meccanismi d'azione: lo stress ossidativo, gli effetti genotossici, gli effetti epigenetici e le alterazioni della regolazione dell'espressione genica mediante attivazione di determinati fattori di trascrizione quali la proteina tumorale p53, il fattore inducibile

dall'ipossia (HIF), il proto-oncogene c-MYC e il fattore nucleare NFκB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [88].

5.4.4 I valori limite di esposizione professionale

I TLV-TWA raccomandati dall'ACGIH sono 1,5 mg / m³ per il Ni metallico, 0,2 mg / m³ per i composti insolubili e 0,1 mg / m³ per i composti solubili del Ni [40]. Il NIOSH propone invece un valore limite di esposizione professionale di 0,015 mg/m³ come media su un turno di lavoro di 10 ore al giorno e 40 ore settimanali [89]. L'OSHA stabilisce un PEL di 1 mg/m³ per tutti i composti del Ni [90]. Lo SCOEL raccomanda due diversi limiti di esposizione professionale: 0,05 mg/m³ per la frazione respirabile e 0,01 mg / m³ per frazione inalabile [91].

5.4.5 Il monitoraggio biologico

Le matrici utilizzate per valutare l'esposizione al Ni sono il siero e le urine. In soggetti esposti a composti poco solubili, i livelli di Ni nei liquidi biologici riflettono sia l'esposizione recente che quella pregressa. I livelli misurati nel siero e nelle urine dopo assorbimento di composti solubili sono indici di esposizione delle 24-48 ore precedenti [75].

I valori di riferimento SIVR per la popolazione generale al 5° and 95° percentile sono 0.1-5 µg/L nelle urine e 0.1-2 µg/L nel sangue [44]. Per i lavoratori esposti il BLV dello SCOEL è pari a 30 µg/g creatinina a fine turno e fine settimana lavorativa [91].

Il nichel come gli altri metalli di transizione può essere dosato nel CAE. Alcuni studi hanno mostrato come a seguito di esposizione professionale a Ni le concentrazioni di Ni nel CAE (Ni-CAE) erano significativamente maggiori nei lavoratori esposti rispetto ai controlli, pertanto il Ni-CAE potrebbe essere considerato come biomarcatore di esposizione locale [92, 93].

5.5 Fattori che influenzano l'esposizione ai rischi da fumi di saldatura

L'esposizione ai rischi da fumi di saldatura dipende da numerose variabili inerenti sia il processo di saldatura e l'ambiente di lavoro che le caratteristiche individuali del lavoratore e l'utilizzo o meno di

sistemi di protezione. Il materiale che compone l'elettrodo e il suo rivestimento, l'eventuale presenza di gas protettivo, l'utilizzo di materiale d'apporto, la diversa temperatura raggiunta nei differenti processi, eventuali pre-trattamenti di verniciatura o molatura sono tutti parametri che influiscono sull'entità dell'esposizione dei lavoratori qualitativamente e quantitativamente. Riguardo i fattori specifici del lavoratore è importante considerare: la distanza tra saldatore e sorgente di emissione, la presenza di dispositivi di protezione collettiva adeguati (aspiratori), la postura, il numero di ore di lavoro giornaliero, l'anzianità alla mansione, l'utilizzo appropriato di dispositivi di protezione individuale.

Notevole importanza rivestono anche le caratteristiche dell'ambiente di lavoro, che dovrebbe essere ben ventilato con postazioni di saldatura spaziate e separate dagli ambienti in cui vengono svolte altre attività. Qualora ciò non fosse possibile dovrebbero essere utilizzate opportune tende protettive per garantire la protezione dei lavoratori che non sono direttamente impiegati nel processo di saldatura.

5.6 L'apparato respiratorio come principale organo bersaglio: le malattie respiratorie dei saldatori

I saldatori possono manifestare diverse malattie respiratorie che includono patologie benigne e potenzialmente reversibili quali la febbre da fumi metallici [94], la siderosi [95] e le alterazioni della funzionalità respiratoria [96]; patologie acute come la polmonite infettiva [97, 98]; patologie croniche quali l'asma bronchiale [99, 100], la bronchite cronica [101], la broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) [102] e la fibrosi polmonare [129] ed infine la patologia neoplastica che si manifesta con il tumore al polmone [131-148].

5.6.1 Febbre da fumi metallici

La febbre da fumi metallici (FFM) è una patologia respiratoria acuta simil-influenzale che si manifesta dopo circa 4 ore dall'esposizione e si risolve in 24/48 ore. È causata principalmente dall'inalazione di fumi di saldatura contenenti Zn, ma anche rame, magnesio e Cd. L'incidenza negli Stati Uniti è di 500-2000 casi/anno e il 30% dei saldatori riferisce di aver manifestato la patologia

almeno 1 volta durante la propria vita lavorativa [93]. La patogenesi non è ancora ben conosciuta, l'inalazione di fumi determina il reclutamento di leucociti a livello polmonare e la sindrome è mediata da citochine tra cui il TNF- α , l'IL-6 e IL-8[103].

5.6.2 Polmonite infettiva

I saldatori hanno un aumentato rischio di contrarre la polmonite batterica. Già negli anni 60 era emerso un incremento della mortalità per polmonite batterica tra i saldatori. Il rischio di polmonite non è correlato all'anzianità lavorativa ma è costante durante tutta la vita lavorativa e reversibile dopo la cessazione dell'esposizione [104]. Uno studio caso controllo effettuato negli Stati Uniti ha mostrato un eccesso di polmonite lobare in lavoratori esposti a fumi di ferro rispetto ai controlli [105]. In un'analisi di mortalità per attività lavorativa effettuata in Inghilterra e Galles tra il 1991 e il 2000 è emerso un eccesso di mortalità per polmonite pneumococcica nei saldatori [106]. Un recente studio prospettico di coorte che ha coinvolto 320.143 costruttori svedesi ha evidenziato un incremento della mortalità per polmonite infettiva nei lavoratori esposti a fumi metallici, polveri inorganiche e agenti chimici [98]. Lo streptococco pneumonia aderisce alle cellule delle vie aeree distali mediante il legame tra la fosforilcolina batterica e il fattore attivante le piastrine (PAFR) espresso sulle cellule dell'ospite [107]. Dati in vitro e in modelli animali indicano che l'esposizione a fumi di saldatura aumenta l'adesione PAFR-mediata di *S. pneumoniae* alle cellule epiteliali delle basse vie respiratorie e stimola l'espressione dell'mRNA che codifica per il PAFR [97]. Sulla base di questi dati bisognerebbe valutare la possibilità di offrire ai saldatori la vaccinazione antipneumococcica. Nel Regno Unito secondo le linee guida del Comitato Esecutivo per la Salute e Sicurezza sul lavoro (HSE) la vaccinazione non è necessaria se la valutazione del rischio dimostra che l'esposizione a fumi di saldatura è ben controllata [108]. Tuttavia, nonostante il miglioramento delle tecnologie, la sorveglianza sanitaria e l'applicazione delle misure di prevenzione, la mortalità in Inghilterra e in Galles nella decade 2001-2010 per polmonite pneumococcica e polmonite lobare non specifica è

risultata significativamente elevata, sebbene leggermente inferiore a quella della decade precedente [109].

5.6.3 Alterazioni della funzionalità respiratoria

Le alterazioni della funzionalità respiratoria a cui possono andare incontro i saldatori si manifestano principalmente con un maggior declino nel tempo del FEV₁ e della FVC. La letteratura spesso fornisce dati contrastanti dovuti a numerosi fattori di confondimento e variabili. I fattori di confondimento sono: la popolazione dinamica, l'abitudine tabagica e l'effetto spettatore. La popolazione dinamica è intesa come l'abbandono dell'attività da parte dei lavoratori che manifestano disturbi respiratori; l'effetto spettatore si riferisce invece all'elevato numero di saldatori impiegati nelle industrie dei cantieri navali, dove è conosciuto esserci un'alta incidenza di patologie respiratorie croniche probabilmente per la contemporanea esposizione, negli anni passati, all'asbesto [66]. Le variabili che devono essere considerate sono: il tipo di saldatura, gli ambienti di lavoro (spazi confinati, presenza o meno di aspiratori), l'utilizzo o meno dei DPI, la contemporanea esposizione ad altre sostanze tossiche occupazionali. Molti degli studi presenti in letteratura hanno evidenziato un maggior declino annuale del FEV₁ nei saldatori rispetto ai controlli, prevalentemente nei saldatori fumatori [96, 110, 111]. La saldatura MMAW che genera una maggiore quantità di fumi rispetto ad altri processi e il lavoro in ambienti confinati sono associate ad alterazioni degli indici di funzionalità respiratoria [112]. Inoltre, la significativa caduta del FEV₁ e della FVC osservata in alcuni studi sembra essere associata alla durata dell'esposizione, in particolare è significativa per esposizioni superiori ai 20 anni [111, 113, 114]. In una meta-analisi che ha incluso 5 studi caso controllo non sono emerse differenze statisticamente significative di declino del FEV₁ tra saldatori e controlli, anche se la stima della differenza del calo del FEV₁ tra saldatori e controlli era di -9.0 mL/anno. Dopo la stratificazione tra fumatori e non fumatori sono stati stimati cali del FEV₁ di -13.7 mL/anno tra saldatori fumatori e controlli e di -3.8 mL/anno tra saldatori non fumatori e controlli senza differenze statisticamente significative [115]. Dei cinque studi considerati l'unico che mostrava un declino

significativo del FEV₁ riguardava una popolazione di saldatori dei cantieri navali che saldavano esclusivamente ad elettrodo [110].

5.6.4 Asma bronchiale

L'asma occupazionale (AO) può essere definita come una malattia caratterizzata da una limitazione variabile del flusso aereo e/o da iperreattività bronchiale dovuta a cause e condizioni attribuibili ad un particolare ambiente lavorativo [116]. I fumi di saldatura possono essere la causa sia di OA immunologica o con periodo di latenza come conseguenza dell'esposizione ad alcuni metalli presenti negli stessi che di OA senza periodo di latenza o asma da irritanti [117]. La letteratura fornisce risultati contrastanti. Uno studio su larga scala della Comunità Europea (ECRHS) basato su un follow-up di 9 anni non ha mostrato alcuna associazione tra esposizione a fumi di saldatura e sviluppo di asma bronchiale [118]. Al contrario i dati emersi dal programma di sorveglianza SHIELD (*Midland Thoracic Society's Rare Respiratory Disease Registry Surveillance Scheme of Occupational Asthma*) hanno evidenziato che il 9% dei casi di OA segnalati erano associati ad attività di saldatura [99]. Alterazioni della funzionalità respiratoria e sintomi respiratori possono insorgere dopo esposizioni a breve e a lungo termine. In uno studio che ha coinvolto 194 saldatori apprendisti l'incidenza di AO era del 3% (6 su 194) e l'incidenza di iper-reattività bronchiale era dell'11.9% [100]. Un recente studio danese ha mostrato come l'esposizione a lungo termine ai fumi di saldatura sia associata ad un aumento dell'incidenza di AO [119].

Il meccanismo patogenetico alla base dell'AO da fumi di saldatura non è stato ancora del tutto chiarito. Uno studio finlandese ha reclutato 34 saldatori di acciaio inox negli anni 1994-2003 affetti da AO diagnosticata con il test di stimolazione bronchiale specifico. La risposta al test di provocazione bronchiale specifico immediata o doppia (immediata e ritardata) nel 50% circa dei lavoratori ha permesso di supporre che accanto ad un possibile meccanismo IgE mediato altri meccanismi immunologici sono coinvolti nella patogenesi dell'OA nei saldatori di acciaio inox. Dopo la diagnosi di AO la ripresa del lavoro di saldatura è stata possibile solo in 6 dei 34 saldatori.

Gli agenti causali responsabili di fenomeni di sensibilizzazione delle vie aeree sembrerebbero essere il cromo e il nickel presenti nei fumi che si generano dalla saldatura di acciaio inox e gli isocianati presenti sui pezzi da saldare verniciati con vernici poliuretatiche [120]. Tuttavia i fumi di saldatura sono costituiti da una miscela variabile di numerosi agenti e l'AO può essere indotta anche da altri componenti. A tal proposito, nel 2008 è stato pubblicato il primo caso di OA indotto da Mn in un saldatore, la diagnosi è stata effettuata mediante il test di provocazione bronchiale specifico con una soluzione di cloruro di Mn allo 0,1%. La riduzione del FEV₁ dopo il test era del 55% inoltre nell'escreato indotto erano presenti eosinofili e basofili dopo 4 e 24 ore dal test di stimolazione bronchiale [121].

5.6.5 Bronchite Cronica e Broncopneumopatia Cronica Ostruttiva

La bronchite cronica (BC) è definita dalla presenza di tosse con espettorato per almeno 3 mesi all'anno da almeno 2 anni [122]. Numerosi studi hanno mostrato una maggiore frequenza di BC nei lavoratori esposti a fumi di saldatura [101, 114, 118]. In particolare un recente studio su 15.909 soggetti reclutati dalla popolazione generale del Nord Europa ha mostrato un incremento della prevalenza e dell'incidenza di BC in saldatori fumatori [101]. Un'alterazione dell'equilibrio tra agenti ossidanti e antiossidanti potrebbe essere coinvolta nella patogenesi della BC indotta da fumi di saldatura [123]. La BPCO è una malattia comune, prevenibile e trattabile, caratterizzata da persistenti sintomi respiratori e limitazione al flusso aereo, dovuta ad anomalie delle vie aeree e alveolari solitamente causate da una significativa esposizione a particelle nocive o gas [122]. Nella popolazione generale la causa principale di BPCO è il fumo di sigaretta. Tuttavia nell'ultimo decennio un numero crescente di studi su lavoratori non fumatori hanno suggerito una forte associazione tra BPCO e altri fattori di rischio tra cui sostanze tossiche occupazionali e ambientali [124, 125]. In una delle tre indagini nazionali statunitensi sulla salute e nutrizione (NHANES) la prevalenza di BPCO in 12.980 partecipanti era del 5.1% [126], 10 anni dopo l'indagine NHANES III riportava una prevalenza del 6.6%. I dati di quest'ultima indagine sono stati analizzati in uno studio epidemiologico avanzato

condotto dal 1988 al 1994 su 9.823 soggetti di età compresa tra i 30 e 75 anni. La frazione di BPCO attribuibile al lavoro era complessivamente del 19.2% e del 31.1% tra in non fumatori [127]. I fattori di rischio occupazionali sono: polveri organiche e inorganiche, fumi metallici, prodotti chimici e gas [102]. In uno studio caso controllo che comprendeva 131 casi di BPCO e 298 controlli, i saldatori hanno mostrato un odds ratio (OR) aggiustato per età di 6.4 e un aumento del rischio per ogni anno extra di esposizione [102]. In 240 saldatori di due cantieri navali in Corea un eccesso di rischio per BPCO è stato osservato nei gruppi ad intermedia ed alta esposizione rispetto al gruppo a bassa esposizione [128].

5.6.6 Malattie polmonari interstiziali e fibrosi polmonare

La siderosi è una pneumoconiosi benigna causata dall'inalazione di particelle contenenti ossidi di Fe. Dal punto di vista clinico è asintomatica e gli indici di funzionalità polmonare non mostrano alterazioni. Il quadro anatomopatologico è caratterizzato da aree brune di diametro compreso tra 1 e 4 mm che microscopicamente corrispondono ad accumuli di pigmento bruno di ossido di ferro in sede perivascolare, nei macrofagi, negli spazi e nelle pareti alveolari. La radiografia evidenzia opacità nodulari da 0.5 a 2 mm di diametro e opacità lineari. La prognosi è in genere favorevole in quanto il metallo viene progressivamente eliminato, sono stati descritti solo pochi casi di progressione della siderosi in fibrosi polmonare [95]. La fibrosi polmonare descritta nei saldatori sembrerebbe essere invece l'evoluzione ultima di altre malattie polmonari interstiziali. Da una revisione della letteratura basata su 12 case series e 34 case reports i risultati degli esami istologici mostravano una fibrosi peribronchiale, interstiziale e perivascolare con macrofagi a livello delle vie aeree distali e degli alveoli simile quella che si manifesta in corso di bronchiolite respiratoria (RB) e polmonite interstiziale desquamativa (DIP) [129]. La DIP e la RB sono polmoniti interstiziali correlate al fumo di sigaretta, ma un'etiologia occupazionale può anche essere riconosciuta. Seppur raramente, la DIP è stata descritta sia in saldatori di Al che di acciaio [130]. La spirometria spesso non riesce ad

individuare queste condizioni, per cui nei saldatori sintomatici, sarebbe opportuno eseguire ulteriori indagini come la pletismografia polmonare e la tomografia computerizzata ad alta risoluzione.

5.6.7 Cancro al polmone

I fumi di saldatura sono cancerogeni e dagli studi presenti in letteratura è stato stimato un eccesso di rischio per Ca polmonare del 25-40% [131-133]. Una meta-analisi che ha incluso studi statunitensi ed europei dal 1954 al 2004 ha mostrato un eccesso di rischio per Ca polmonare del 26% nei saldatori senza differenze tra saldatori di acciaio inox e dolce [131]. Studi di mortalità hanno evidenziato un incremento dei tassi di mortalità standardizzati (SMR) per Ca polmonare nei saldatori che, sebbene siano maggiori nei saldatori di acciaio inox, sono elevati anche nei saldatori di acciaio dolce con esposizione trascurabile a Cr VI e Ni [132, 134]. Riguardo i saldatori di acciaio inox non è stato ancora chiarito se l'eccesso di rischio per Ca polmonare è attribuibile al Cr VI e al Ni [135]. In uno studio di coorte Danese è stata riscontrata una relazione esposizione-risposta nei saldatori di acciaio inox, ma non nei saldatori di acciaio dolce [136]. Diversamente, in un recente studio caso-controllo condotto in Europa Centrale e dell'Est e nel Regno Unito è stata riscontrata una relazione dose-risposta nei saldatori di acciaio dolce con più di 25 anni di esposizione con aumento del rischio per Ca polmonare anche dopo aggiustamento per fumo di sigaretta e amianto [32].

Nel caso della patologia neoplastica uno dei fattori da considerare è la durata dell'esposizione. Uno studio di mortalità condotto su 2721 saldatori ha mostrato un eccesso di rischio Ca polmonare in saldatori di acciaio inox impiegati da 20 o più anni (5 casi contro 1,54 previsti, SMR = 3,24) [137]. In una coorte di 3247 lavoratori l'aumento del rischio di mortalità per Ca polmonare era del 32% nei saldatori rispetto alla popolazione generale e aumentava fino al 74% dopo 20 o più anni di esposizione [138]. Uno studio successivo su una coorte di lavoratori di cantieri navali ha rilevato un rischio relativo (RR) di 3 solo nei saldatori impiegati da più di 5 anni [139].

La presenza di fattori di confondimento quali il fumo di sigaretta e l'amianto non deve essere sottovalutata, entrambi causa di Ca polmonare. In alcuni studi difatti l'eccesso di rischio riscontrato

è in parte attribuibile ai suddetti fattori di confondimento [133, 140, 141]. Tuttavia, gli studi sui saldatori non esposti all'amianto e dopo l'aggiustamento per il fumo di sigaretta hanno comunque confermato l'esistenza di un'associazione tra esposizione ai fumi di saldatura e Ca polmonare [32, 142]. Uno studio caso-controllo ha mostrato un significativo aumento del rischio in saldatori impiegati sia nella saldatura a gas (OR = 2.9) che ad arco elettrico (OR = 2.3). Il rischio era aumentato nei non fumatori e nei deboli fumatori ma non nei moderati e forti fumatori. Gli autori hanno concluso che l'associazione tra esposizione a fumi di saldatura e Ca polmonare potrebbe essere mascherato nei moderati e forti fumatori dall'effetto predominante del fumo di sigaretta [143].

In alcuni studi che hanno valutato l'istologia del Ca polmonare nei saldatori è stata riscontrata una maggiore frequenza di carcinoma a cellule squamose (SqCC) e di carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC). Un recente studio prospettico ha rivelato una correlazione positiva tra la durata dell'esposizione in anni e il rischio di Ca polmonare tra i fumatori, in particolare era aumentato il rischio per carcinoma a cellule squamose (SqCC) [144]. Lo studio SYNERGY ha mostrato una relazione tra esposizione a fumi di saldatura e SqCC e carcinoma polmonare a piccole cellule (SCLC) [145]. Questi risultati erano conformi a studi precedenti in cui i saldatori avevano un alto rischio di SqCC [143, 146, 147]. e sono stati successivamente riconfermati da un recente studio di coorte su 12845 saldatori seguiti dal 1991 al 2010 che ha mostrato un rapporto di rischio elevato (HR) per SCLC (HR = 1,54) e SqCC (HR = 1,19) [148].

5.7 Altri effetti dei fumi di saldatura

Altri effetti da esposizione a fumi di saldatura possono interessare l'apparato cardiovascolare, l'occhio, la cute, il sistema nervoso, l'apparato riproduttivo e il rene.

L'esposizione professionale a PM e FS è stata associata ad un aumento del rischio di malattie cardiovascolari e le particelle fini (diametro aerodinamico <2.5 µm) sembrano svolgere un ruolo chiave [149]. Uno studio trasversale ha mostrato un incremento significativo della pressione arteriosa nei saldatori rispetto ai controlli, i soggetti reclutati erano tutti non fumatori [150].

I fumi di saldatura determinano un aumento del rischio di cardiopatia ischemica. Riguardo il meccanismo patogenetico sembra essere coinvolto l'ipometilazione del gene del recettore del fattore di coagulazione II (trombina) recettore di tipo 3 (F2RL3) come descritto dopo l'esposizione al fumo di tabacco [149, 151]. In un recente studio condotto su lavoratori dei cantieri navali esposti a FS è stata riportata una riduzione della vitalità cellulare e un aumento dei livelli di 8-oxodGuo, IL-6 e NO nelle cellule epiteliali dell'arteria coronaria umana; in particolare nei saldatori un aumento di 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ della concentrazione media di PM 2.5 determina un aumento delle concentrazioni urinarie dell'8-oxodGuo e del 8-isoprostano (8-IP) rispettivamente del 2.15% e del 8.43% [152].

Le patologie oculari maggiormente riscontrate sono cherato-congiuntiviti croniche, più raramente blefariti, alterazioni corneali e cataratta [153]. Inoltre, le radiazioni UV che si generano in corso di saldatura ad arco elettrico sono causa di melanoma oculare [3].

La cute è particolarmente sensibile alle radiazioni ottiche artificiali con rischio di ustioni da UV non adeguatamente schermate. Inoltre, il Cr VI e il Ni presenti nei fumi prodotti dalla saldatura di acciai speciali può essere causa di dermatite allergica e/o irritativa da contatto [24, 76, 154].

I possibili effetti neurologici sono conseguenti prevalentemente all'azione neurotossica del manganese, responsabile dell'induzione di sintomi di tipo parkinsoniano in soggetti esposti [155].

Di attuale interesse risulta inoltre la possibile interazione tra i campi elettromagnetici (CEM) emessi in alcune fasi dei processi di saldatura e alcuni dispositivi cardiaci quali pacemaker (PM) e defibrillatore cardiaco impiantabile (ICD) [69].

A livello renale l'esposizione determina un lieve incremento della proteinuria sia ad alto (albuminuria) che a basso peso molecolare (beta2-microglobulinuria), si tratta di alterazioni reversibili a distanza di alcuni anni dalla cessazione dell'esposizione [156, 157].

Alcuni studi effettuati sull'uomo e sull'animale hanno evidenziato alterazioni della capacità riproduttiva in soggetti esposti a Cr. In particolare è stata riportata una correlazione inversa tra concentrazione di Cr nel sangue di soggetti professionalmente esposti e numero e motilità degli

spermatozoi [158]. In lavoratori esposti a fumi di saldatura da acciaio inox è stata riscontrata una correlazione positiva fra Cr nel sangue e spermatozoi anormali [159].

5.8 I valori limite di esposizione professionale e il monitoraggio biologico

Il TLV-TWA proposto dall'ACGIH per i fumi di saldatura è pari a 5 mg/m^3 , misurato come particolato totale nella zona di respirazione del saldatore [160]. Tuttavia, essendo i fumi di saldatura una miscela di agenti chimici, bisogna considerare i TLV di tutti i metalli che possono generarsi durante il processo e le cui concentrazioni possono essere misurate in aria ambiente. I TLV-TWA del Cr e del Ni sono elencati nei paragrafi relativi. Il MB dei saldatori di acciaio inox si effettua determinando il Cr-U e il Ni-U. Il Cr-U e il Ni-U vengono valutati a fine turno e fine settimana lavorativa per il Cr-U inoltre è importante valutare la differenza tra inizio e fine turno.

6. L'INDUSTRIA AERONAUTICA E L'ESPOSIZIONE A CROMO ESAVALENTE

Il ciclo produttivo dell'industria aeronautica prevede che i moduli costituenti vengano prima ricoperti con uno strato di *primer*, poi assemblati e successivamente verniciati. Il *primer* è la base dell'intero ciclo di verniciatura, viene applicato come primo strato sulle superfici interne ed esterne dei moduli per proteggerle dalla corrosione e serve da ancoraggio per i successivi rivestimenti in vernice [161]. Nella maggior parte dei casi i *primer* dell'industria aeronautica e di quella aerospaziale contengono sali di cromo tra cui il SrCrO_4 . Durante la verniciatura a spruzzo si generano aerosol che contengono Cr. In uno studio che ha esaminato la distribuzione dimensionale delle particelle di Cr disperse nell'aerosol, il Diametro Aerodinamico Mediano di Massa (MMAD) del Cr T e del Cr VI era rispettivamente di circa $7.5 \mu\text{m}$ e $8.5 \mu\text{m}$ [162]. Altri studi hanno evidenziato come le particelle con diametro $>2 \mu\text{m}$ rappresentavano il 90% della quota di Cr T e Cr VI contenuti negli aerosol di pittura. Pertanto la maggiore parte della quota di particolato contenente Cr VI che viene inalato entra in contatto con il tratto respiratorio superiore dove i meccanismi di difesa ed in particolare l'azione muco-cigliare causano l'intrappolamento e la risalita del materiale inalato. Le particelle con MMAD $<2.0 \mu\text{m}$ contengono meno Cr VI per peso secco di vernice rispetto alle particelle $> 2.0 \mu\text{m}$, sembra, inoltre, che solo il 2% della massa di Cr VI inalato con l'aerosol prodotto dalla verniciatura riesca a raggiungere il tratto respiratorio inferiore depositandosi a livello della regione alveolare [163]. È importante considerare anche la solubilità dei composti del Cr VI in quanto i composti insolubili, tra cui il SrCrO_4 , per le loro proprietà si depositano in maggior quantità nelle vie aeree rispetto a quelli solubili. Le principali organizzazioni che hanno stabilito i TLV distinguono chiaramente i composti solubili ed insolubili del Cr VI con valori di TLV inferiori per i composti insolubili [164]. Nel valutare i potenziali effetti sulla salute, che possono derivare dall'esposizione agli aerosol prodotti durante l'utilizzo di vernici contenenti Cr VI, bisogna tenere in considerazione alcuni importanti meccanismi di tossicocinetica illustrati precedentemente: la deposizione delle particelle nelle vie aeree;

l'assorbimento di Cr VI dall'epitelio dell'apparato respiratorio; il tasso di clearance del Cr VI dal polmone e il tasso di riduzione del Cr VI a Cr III a livello del *lining fluid* [2, 165].

L'esposizione professionale dei verniciatori a Cr VI e i rischi per la salute tra cui quello cancerogeno sono ben documentati [2] In uno studio condotto nel nostro paese su lavoratori dell'industria aerospaziale negli addetti alla verniciatura e negli addetti alla miscelazione delle vernici sono state riscontrate concentrazioni di Cr in aria ambiente (Cr-A) rispettivamente superiori ed inferiori ai TLV dell'ACGIH. I dati del MB in entrambe le categorie di lavoratori hanno evidenziato valori di Cr-U a fine turno e di differenza tra inizio e fine turno inferiori ai BEI previsti dall'ACGIH. In questo studio veniva evidenziata l'importanza dei DPI adottati per ridurre l'esposizione anche nei casi in cui i valori di Cr-A superano i TLV, condizione in cui il datore di lavoro deve necessariamente provvedere (mediante sostituzione del cancerogeno se possibile e/o altri interventi di tipo tecnico) per riportare l'esposizione ad una situazione accettabile. In altri studi sono stati rilevati concentrazioni ambientali di Cr T e Cr VI inferiori ai TLV e concentrazioni di Cr-U sovrapponibili a quelli della popolazione generale, anche in questo caso i verniciatori utilizzavano scrupolosamente i DPI [166]. Un recente studio del 2012 ha indagato la potenziale esposizione a Cr VI in lavoratori dell'industria aeronautica impiegati come montatori che eseguivano operazioni di foratura, assemblaggio dei pezzi e piccoli ritocchi con vernici a base di SrCrO_4 . In questi lavoratori la potenziale esposizione potrebbe derivare dall'inalazione di particelle che si originano in corso di foratura su *primer* e durante i ritocchi con le vernici ma anche da contatto diretto con il *primer*. Le concentrazioni di Cr-U rilevate erano superiori a valori di riferimento SIVR e rispetto ai valori misurati in un gruppo di controllo senza differenze significative tra inizio e fine turno. Dopo 19 giorni di astensione da lavoro la riduzione del Cr-U aveva permesso di escludere un'eventuale esposizione extra-lavorativa. Lo studio sottolineava l'importanza di valutare il rischio cancerogeno e mettere in atto misure di prevenzione per quei lavoratori che possono comunque essere potenzialmente esposti al cancerogeno [161].

Le misure preventive nel caso dell'esposizione a cancerogeni sono volte a ridurre il livello di esposizione al minimo tecnicamente possibile. È necessario pertanto: attuare immediate misure tecniche se le concentrazioni ambientali superano i TLV, sostituire se possibile i *primer* a base di SrCrO_4 con *primer* privi del sale di Cr VI e formare ed informare i lavoratori sul corretto utilizzo dei DPI durante le attività a rischio. I DP respiratori devono essere adatti alla conformazione del viso del lavoratore e, data la loro possibile contaminazione, non devono essere rimossi senza l'utilizzo dei guanti. Se dalla valutazione dei rischi viene riscontrato un rischio per la salute dei lavoratori è necessario attivare la sorveglianza sanitaria.

7. LA CROMATURA GALVANICA

Nel panorama industriale del settore metallurgico e non solo, la cromatura galvanica occupa sicuramente un posto di primo piano. La regione Lombardia nel decreto n.3357 del 2011 la definisce come “processi industriali, generalmente di supporto all’industria di trasformazione dei metalli, tutti accomunati dalla presenza di una procedura di elettrodeposizione galvanica”. In particolare i processi di cromatura galvanica, che garantiscono ai manufatti metallici una resistenza di superficie agli agenti atmosferici duratura o sono utilizzati a scopo decorativo, hanno larga diffusione nell’industria automobilistica, aerea, elettronica e metalmeccanica in genere.”

Esistono tre metodi per poter cromare un metallo o un qualsiasi altro materiale.

La tecnica dell’“Elettrodeposizione” è quella più diffusa e sfrutta il processo di trasferimento degli elettroni dall’anodo, dove viene messo il metallo ricoprente, al catodo, polo al quale sarà posto il materiale da rivestire comportando un’ossidazione dello stesso.

La “Galvanostegia” prevede invece un insieme di fasi per rivestire, sempre tramite il principio dell’elettrolisi, un materiale in modo che questo risulti refrattario alla corrosione o esteticamente più apprezzabile.

Infine la “Galvanoplastica o Elettroformatura” non solo permette di deporre strati di materiale più spessi, ma offre la possibilità di riprodurre, tramite apposite matrici, varie figure sfruttando il metodo della galvanostegia.

Il processo produttivo è articolato e dipende dalle necessità produttive ma sostanzialmente è rappresentato da cinque momenti:

- a) arrivo e stoccaggio delle materie prime
- b) pulizia della superficie dell’oggetto da rivestire
- c) deposizione elettrolitica
- d) finitura
- e) stoccaggio e cessione del prodotto finito

Questa attività presenta in ogni sua fase dei rischi e delle criticità per la salute, per la sicurezza dei lavoratori e per la salvaguardia ambientale.

In cromatura infatti si utilizzano bagni di anidride cromica e acido solforico, in percentuali variabili a seconda dello spessore desiderato e con l'aggiunta di altri composti chimici per dare particolari caratteristiche alla lavorazione a seconda del risultato finale che si vuole ottenere, sia dal punto di vista estetico che sulla base delle capacità fisiche del prodotto.

Onde evitare che il Cr III rimanga in dosi eccessive pregiudicando la brillantezza del prodotto, viene riossidato a Cr VI tramite l'utilizzo di anodi insolubili. Si può aggiungere inoltre che se la cromatura viene eseguita per fini estetici, lo strato depositato sarà più sottile e conseguito con temperature più basse e amperaggi minori rispetto al procedimento che bisogna intraprendere per conferire al prodotto caratteristiche di maggior resistenza all'abrasione, alla corrosione e alla temperatura.

Successivamente, le fasi meccaniche vengono eseguite fuori dalla linea produttiva, mentre i trattamenti chimici sono svolti a ciclo continuo tramite l'immersione degli oggetti in vasche che possono essere disposte in vario modo, determinando impianti in linea, circolari e a ritorno. Le parti metalliche di piccole dimensioni vengono trattate tramite la barilatura, processo dove gli oggetti sono immersi in un tamburo rotante che funge da catodo e che viene immerso nelle vasche e fatto ruotare lentamente.

La valutazione dei rischi prenderà in considerazione i rischi: chimico, cancerogeno, fisico (rumore e microclima), da movimentazione manuale dei carichi, da sovraccarico biomeccanico degli arti superiori e da movimenti ripetitivi degli arti superiori. Riguardo il rischio chimico, durante le varie fasi dei processi legati all'attività galvanica, le fonti di pericolo sono rappresentate dalla possibilità di venire a contatto con le sostanze che si liberano nel corso della lavorazione o durante la manipolazione e la movimentazione delle stesse. I principali pericoli sono rappresentati dall'anidride cromica, dai sali di nichel, dall'acido cloridrico e solfidrico e prodotti intermedi, dalla soda caustica e dai solventi. I metalli principalmente impiegati nell'elettrodeposizione sono il Cr e il Ni,

quest'ultimo in caso di nichelatura. La pericolosità del Cr nella sua forma di anidride cromica è nota da tempo e codificata dai vari organi legislativi: è classificato come H350 (può provocare il cancro) secondo il regolamento della classificazione, etichettatura ed imballaggio (CLP) delle sostanze e delle miscele; è riconosciuto come irritante per cute, congiuntive e mucose e può causare ulcere e perforazioni del setto nasale. Data la sua pericolosità il D.Lgs n.81 del 2008 all'art. 236 impone il MB e il MA [167]. Tra i rischi fisici, l'esposizione a rumore è dovuta alle macchine e agli utensili utilizzati nei processi di preparazione delle superfici e di elettrodeposizione. In genere i livelli di rumore sono compresi tra gli 80 e i 90 db(A). Tuttavia, nelle aziende dove viene effettuata la burattatura della minuteria metallica i livelli possono raggiungere valori superiori ai 90 db(A). Il microclima severo rappresenta un rischio fisico in caso di lavorazioni in ambienti confinati e/o umidi e dipende anche dalle caratteristiche degli impianti di aspirazione presenti sulle vasche di cromatura. L'aria sottratta dagli aspiratori deve infatti essere sostituita con aria atmosferica esterna, che può produrre correnti. I lavoratori esposti al rischio da microclima severo possono andare incontro a situazioni che vanno dall'ipotermia, alla disidratazione, al colpo di calore.

La movimentazione manuale dei carichi è presente soprattutto nelle realtà produttive dove le fasi di elettrodeposizione sono eseguite manualmente e gli spazi a disposizione sono ridotti. I danni si manifestano principalmente a livello del rachide lombare ma possono coinvolgere anche tendini, legamenti o nervi. L'ambiente umido, tipico delle vasche di elettrodeposizione, rappresenta un fattore aggravante per questo tipo di patologie. I movimenti ripetitivi ed il sovraccarico biomeccanico degli arti superiori interessano i lavoratori addetti al carico e scarico di pezzi di piccole dimensioni dai telai, soprattutto in caso di: ciclo lavorativo ripetitivo della durata inferiore ai 30 secondi, carenza di tempi di recupero, movimenti ai gradi estremi degli arti superiori. Le alterazioni che ne conseguono interessano l'apparato muscolo-tendineo di spalla, gomito e mano-polso e determinano l'instaurarsi di patologie tendinee, nervose e vascolari [168-170].

8. MISURE DI PREVENZIONE

8.1 Prevenzione primaria

La prevenzione primaria è finalizzata a limitare l'esposizione dei lavoratori alle sostanze tossiche presenti in ambiente di lavoro. Si realizza attraverso attività di bonifica dell'ambiente di lavoro e con l'uso di dispositivi di protezione individuale (DPI). Il datore di lavoro attenendosi alle disposizioni del D.Lgs. 81/08 deve adoperarsi per la programmazione di interventi di miglioramento quali: la sostituzione, quando possibile, di sostanze o materiali con altri a minore tossicità; la riduzione dell'emissione degli aerosol sostituendo eventualmente i macchinari o le tecniche utilizzate; la predisposizione di ambienti di lavoro con un'adeguata ventilazione e l'impiego di opportuni sistemi di aspirazione. In caso di cromatura galvanica un intervento di prevenzione primaria che riduce fortemente l'esposizione è rappresentato dall'automatizzazione del processo di elettrodeposizione galvanica. Fondamentale è inoltre una corretta informazione e formazione del personale circa i rischi per la salute, il corretto utilizzo degli impianti, la loro periodica manutenzione e pulizia e l'uso dei DPI messi a disposizione dal datore di lavoro. Tra questi dovranno essere forniti schermi per la protezione dalle radiazioni ottiche artificiali in caso di saldatura, DP respiratori, guanti, occhiali e, per i cromatori addetti al processo di elettrodeposizione, mascherine, occhiali con protezioni laterali, guanti e grembiule in PVC [168, 171].

8.2 Prevenzione secondaria

La Prevenzione Secondaria, rappresenta un intervento di secondo livello che, mediante la diagnosi precoce di malattie, in fase asintomatica mira ad ottenere la guarigione o comunque limitarne la progressione (definizione dell'Istituto Superiore di Sanità). Nel campo della Medicina del Lavoro consente l'identificazione di stati di salute e l'accertamento di stati preclinici che possano predisporre i lavoratori all'insorgenza di specifiche malattie professionali dovute agli agenti presenti sul luogo di lavoro. Per la prevenzione secondaria dei rischi lavorativi il Medico del Lavoro si avvale della Sorveglianza Sanitaria. L'articolo 2 D.Lgs 81/2008 definisce la sorveglianza sanitaria come l'insieme

degli atti medici, finalizzati alla tutela dello stato di salute e sicurezza dei lavoratori, in relazione all'ambiente di lavoro, ai fattori di rischio professionali e alle modalità di svolgimento dell'attività lavorativa. La SS è effettuata nei casi previsti dalla normativa e qualora il lavoratore ne faccia richiesta e sia ritenuta dal medico correlata ai rischi lavorativi. I casi previsti dalla normativa vigente si riferiscono ai rischi chimici, fisici e biologici. Tuttavia, mentre nel caso di agenti cancerogeni l'obbligo è definito dalla presenza dell'agente, nei casi ad esempio di agenti chimici non cancerogeni deve essere valutato in base al grado di esposizione opportunamente misurato durante la valutazione dei rischi. La stesura di un adeguato protocollo sanitario può essere considerata come il momento conclusivo di una precisa e attenta valutazione dei rischi [167].

Il protocollo sanitario è specifico per ogni azienda e il medico competente ha un'ampia possibilità di modulare la sorveglianza sanitaria in relazione ai rischi presenti in ogni singola azienda in modo da elaborare protocolli definiti per comparto. Gli aspetti comuni sono la visita medica, in genere annuale, che comprende un'accurata anamnesi e un attento esame obiettivo volto a ricercare l'eventuale insorgenza di segni e sintomi a carico degli apparati respiratorio, cutaneo e muscolo scheletrico. Nel caso dei saldatori vengono utilizzati questionari mirati ad identificare la presenza di soggetti suscettibili all'esposizione a CEM e ROA. L'esame audiometrico, in caso di esposizione a rumore, e spirometrico devono essere effettuati con cadenza almeno biennale. Gli esami ematici comprensivi di emocromo, funzionalità epatica, funzionalità renale e profilo glico-metabolico vengono effettuati per verificare eventuali alterazioni d'organo dovute a esposizioni a metalli, solventi e altre sostanze chimiche. Il ricorso a visite specialistiche ed esami strumentali (visita ORL, visita dermatologica, Rx torace ecc.) vengono richiesti dal Medico del Lavoro in situazioni meritevoli di approfondimento, in base all'entità del rischio o alla suscettibilità individuale [168, 171, 172]. Il MB, esame complementare al MA, fornisce informazioni sul reale assorbimento delle sostanze tossiche tenendo in considerazione le diverse vie di esposizione e l'uso dei DPI. Il MB dei cromatori, dei montatori dell'industria aeronautica e dei saldatori di acciaio inox in relazione alla potenziale esposizione a Cr

e Ni è stato descritto precedentemente. Sempre nell'ambito della sorveglianza sanitaria, il datore di lavoro, ai sensi dell'art. 243 del D. Lgs. 81/2008, e dell'art. 2 del D.M. 12/07/2007 n. 155, istituisce ed aggiorna, un registro di esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni e ne cura la tenuta per il tramite del medico competente. In questo registro vengono iscritti i lavoratori per i quali la valutazione (art. 236 del D.Lgs. 81/2008) dell'esposizione ad agenti cancerogeni o mutageni ha evidenziato un rischio per la salute, e che quindi sono sottoposti a sorveglianza sanitaria (art. 242 del D.Lgs. 81/2008) [167]. L'INAIL, Dipartimento di Medicina del Lavoro, ha istituito ed aggiorna costantemente un sistema di registrazione delle esposizioni professionali (SIREP) ad agenti cancerogeni. È definito cancerogeno qualsiasi agente chimico, fisico o biologico in grado di causare tumori o favorirne l'insorgenza e la propagazione. Riguardo gli elementi metallici in generale la tossicità dipende dalla loro biodisponibilità e quindi dalla capacità di attraversare le membrane e legarsi a macromolecole cellulari. Nel caso del Cr questa è legata allo stato di ossidazione esavalente mentre nel caso del Ni può essere definita dalla solubilità dei diversi composti. Diversi enti e organizzazioni scientifiche tra cui la IARC, l'ACGIH e l'UE individuano, valutano e classificano gli agenti cancerogeni. La IARC dal 1969 produce monografie contenenti un'attenta valutazione degli studi sperimentali ed epidemiologici sulla potenzialità cancerogena degli agenti chimici. L'ACGIH dal 1947 si occupa della determinazione dei TLV-TWA con aggiornamento annuale. Esiste tuttavia il problema irrisolto della gestione delle esposizioni saltuarie e/o a bassissime dosi di agenti cancerogeni. Per alcuni agenti sono stati stabiliti i limiti di concentrazione ambientale, superati i quali si configura la condizione di esposizione professionale, per gli altri è possibile, se presenti, prendere in considerazione i livelli biologici (singoli agenti o loro metaboliti riscontrabili in matrici organiche) per la popolazione generale forniti dalla SIVR. Le linee guida SIMLII riportano l'orientamento del National Board of Labour Protection Finlandese che considera non esposto il lavoratore che utilizza sostanze cancerogene per non più di 20 giornate lavorative all'anno, ad eccezione di eventi accidentali in cui può subire un'esposizione rilevante [173]. L'individuazione di valori limite/valori d'azione,

come indicato anche dalla norma UNI EN 689/97, potrebbe rappresentare una possibile soluzione. A tal proposito bisogna ricordare che le sostanze cancerogene non hanno tutte lo stesso meccanismo d'azione; lo SCOEL si è posto quindi l'obiettivo di stabilire i limiti di esposizione occupazionale (OELs) sulla base dei loro principali meccanismi d'azione. In particolare lo SCOEL suddivide le sostanze cancerogene in 4 gruppi: a) cancerogeni genotossici senza soglia, b) cancerogeni genotossici per i quali non è adeguatamente supportata al presente l'esistenza di una soglia, c) cancerogeni genotossici per i quali è possibile definire un limite pratico, d) cancerogeni non genotossici e cancerogeni non DNA reattivi per i quali un vero limite è associato con un chiaro ed evidente NOAEL. Lo SCOEL definisce gli OEL per i cancerogeni di gruppo c e d [174].

9. VALUTAZIONE NON INVASIVA DELL'APPARATO RESPIRATORIO

9.1 Il condensato dell'aria esalata

Nei lavoratori esposti a Cr il MB tradizionale prevede il dosaggio del Cr-U a fine turno e fine settimana lavorativa, tuttavia il Cr-U è totalmente ridotto a Cr III e non permette di quantificare l'esposizione alla sola quota di Cr VI. Per conoscere l'esposizione a Cr VI bisogna effettuare un prelievo di sangue e dosarlo nei globuli rossi, si tratta tuttavia di una manovra invasiva e richiede costi elevati. La determinazione del Cr nelle due matrici biologiche tradizionali fornisce importanti informazioni sull'esposizione sistemica a Cr ma non sulla dose assorbita e depositata a livello polmonare (organo bersaglio). Studi effettuati nell'ultimo decennio hanno mostrato come il CAE possa essere utilizzato come matrice per la ricerca non solo di biomarcatori di esposizione ma anche di effetto direttamente a livello dell'organo bersaglio. Inoltre nel CAE è possibile determinare anche la frazione di Cr VI permettendo così di valutare il potere riducente del *lining fluid* broncoalveolare. Il CAE si ottiene dal raffreddamento dell'aria esalata durante la respirazione spontanea che precipita e condensa a una temperatura compresa tra 0° e meno 10°C. È costituito principalmente da vapor acqueo (>99%) e solo una piccola quota, derivante dalle goccioline di *lining fluid* broncoalveolare, contiene molecole volatili e non volatili. Il *Lining fluid* bronco-alveolare è il fluido di rivestimento delle vie aeree inferiori ed è costituito dai prodotti degli pneumociti di tipo II e dalla trasudazione di fluido dai capillari alveolari. È formato da uno strato di acqua definita ipofase e dal surfattante. L'ipofase contiene proteine del surfattante, proteine del sistema del complemento e antiossidanti e, garantisce un ambiente idoneo per i macrofagi alveolare che migrano sulla superficie delle cellule epiteliali. Il surfattante è costituito da lipidi (94%) e da proteine. La composizione del fluido di rivestimento varia in condizioni patologiche, ad esempio asma, BPCO, interstiziopatie, Ca polmonare, ma anche a seguito di esposizioni a sostanze pneumotossiche che possano configurare uno stato di infiammazione e/o stress ossidativo a livello delle vie aeree. Proteine, metaboliti, ossidanti, nucleotidi e tutte le sostanze presenti nel *lining fluid* possono essere raccolte e analizzate

nel CAE fornendo importanti informazioni sullo stato di flogosi delle vie aeree e sulla presenza di inquinanti ambientali che dopo essere stati inalati sono riusciti a raggiungere per le loro caratteristiche dimensionali e di solubilità il tratto broncoalveolare [175]. L'interesse per il CAE, come nuova matrice in ambito occupazionale, deriva dalla non invasività della raccolta e dalla possibilità di poter essere ripetuta senza indurre fenomeni di infiammazione secondari come accade ad esempio durante l'esecuzione dell'escreato indotto [176-178]. Inoltre, per le sue caratteristiche e per il basso effetto-matrice, il CAE è il fluido ideale per il dosaggio di elementi in tracce, tra cui i metalli di transizione. Una delle principali limitazioni è la mancata standardizzazione della metodica, il che rende difficile il confronto con i valori di riferimento presenti in letteratura rilevati da soggetti sani e non esposti a pneumotossici. Un'altra limitazione deriva dai problemi analitici associati alla misurazione di piccolissime quantità di mediatori instabili. Tuttavia, studi di validazione di tecniche analitiche quali la cromatografia liquida ad alte prestazioni-spettrometria di massa con ionizzazione a plasma accoppiato induttivamente (HPLC-ICP-MS) hanno dimostrato che numerosi mediatori di stress ossidativo sono presenti e rilevabili nel CAE [179-181]. Il CAE, contenendo molecole derivanti dalle vie aeree, può essere estremamente utile per caratterizzare la dose al bersaglio e per correlare le concentrazioni di biomarcatori di esposizione e biomarcatori di effetto a livello locale. Questi ultimi, infatti, possono fornire informazioni su eventuali alterazioni biochimiche che interessano le vie aeree dopo esposizione acuta e/o cronica ad agenti tossici anche in assenza di sintomi o effetti sui parametri respiratori normalmente monitorati [177, 182].

9.1.1 Biomarcatori di esposizione nel CAE

Pochi sono gli studi che hanno preso in considerazione la misurazione delle concentrazioni dei metalli nel CAE in soggetti professionalmente esposti. Goldoni et al. hanno mostrato come il Co e il tungsteno (W) fossero dosabili nel CAE di lavoratori esposti addetti alla produzione di utensili diamantati ma non nella maggior parte dei controlli. Inoltre nei lavoratori esposti il Co e W CAE correlavano rispettivamente con il Co e W misurati nelle urine [183]. Al contrario nello studio di

Broding et al. il Co e W urinari correlavano con il Cr-A mentre non è stata trovata alcuna correlazione tra Co e W nel CAE e Co e W nelle urine e né tra Co e W nel CAE e Co e W in aria ambiente [184]. Anche il Pb, l'Al, il Berillio, il Mn e il Ni sono stati oggetto di ricerca nel CAE di lavoratori esposti [92, 185, 186]. Uno studio su lavoratori addetti alla saldatura ha mostrato concentrazioni di Ni e di Mn nel CAE significativamente più alte nei casi rispetto ai controlli mentre nelle urine queste differenze erano presenti solo per il Ni, per cui il Mn nel CAE potrebbe rappresentare un nuovo marker di esposizione a fumi di saldatura [92]. Riguardo gli studi sul Cr VI informazioni importanti sono stati ottenuti dal nostro gruppo. In lavoratori addetti alla cromatura galvanica sono state riscontrate differenze significative dei livelli di Cr nel CAE (Cr-CAE) tra i tempi di campionamento con valori maggiori a fine turno lavorativo e concentrazioni significativamente superiori rispetto a quelle determinate in un gruppo di controllo. Sia il Cr-CAE che il Cr-U correlavano con il Cr-A, dimostrando quindi come anche il Cr-CAE possa essere utilizzato come biomarcatore di effetto [187]. Nel CAE è possibile determinare anche la frazione esavalente e ad oggi sono solo due gli studi in cui il Cr VI è stato misurato nel CAE di lavoratori esposti [188, 189]. In particolare il nostro gruppo ha proposto un modello di tossicocinetica del Cr dopo inalazione in cromatura galvanica in base al quale il Cr VI viene ridotto dal *lining fluid* solo del 50% a fine turno con persistenza del Cr VI anche 48 ore dall'ultima esposizione. Il Cr VI non ridotto, dopo essere stato assorbito dalla mucosa, attraversa le membrane delle cellule epiteliali polmonari dove esercita i suoi effetti tossici ed infiammatori come era stato mostrato dall'aumento dei due biomarcatori di stress ossidativo H₂O₂ e MDA nel CAE e dalle correlazioni di questi con il Cr-CAE. Alla luce di questi risultati il Cr-CAE può essere considerato come un marcatore di esposizione locale, che aggiunge quindi informazioni fondamentali a quelle fornite dal tradizionale MB in sangue e urine [13].

9.1.2 Biomarcatori di stress ossidativo nel CAE

Lo stress ossidativo può essere definito come un'alterazione dell'equilibrio tra la produzione di ROS e la disponibilità e l'attività di sostanze antiossidanti [190].

Sono numerose le sostanze che possono determinare un aumento della produzione di ROS, tra queste il fumo di sigaretta, l'esposizione ad inquinanti ambientali, l'infiammazione cronica e l'esposizione professionale a sostanze tossiche. I ROS possono interagire (in modo diretto oppure dopo aver formato altre molecole reattive) con le proteine, i lipidi di membrana e gli acidi nucleici causando un danno. Questo meccanismo è coinvolto nell'eziologia dell'invecchiamento, della cancerogenesi, di patologie cardiovascolari e di molte malattie infiammatorie croniche quali la BPCO. Ridurre lo stress ossidativo è quindi importante per prevenire lo sviluppo di questi quadri clinici [191-193].

L'attivazione di cellule infiammatorie tra cui neutrofili, macrofagi ed eosinofili nonché l'esposizione a sostanze tossiche si associano ad un' aumentata produzione di anione superossido (O_2^-). L'aggiunta di un secondo elettrone e di due protoni determina la formazione di H_2O_2 . Quest'ultimo non è un ROS ma, essendo chimicamente più attivo dell'ossigeno molecolare, acquista facilmente un altro elettrone dando origine al radicale idrossilico ($\bullet OH$) responsabile dell'inizio di reazioni a catena. Nelle vie aeree la capacità di neutralizzare i ROS è inferiore rispetto ai sistemi antiossidanti intracellulari. Numerosi studi hanno mostrato un incremento delle concentrazioni di H_2O_2 nel CAE (H_2O_2 -CAE) di soggetti fumatori, affetti da BPCO e asmatici. Pertanto il H_2O_2 -CAE può essere considerato come un marcatore quantitativo di stress ossidativo a livello delle vie aeree [193, 194].

I prodotti della perossidazione si formano per ossidazione da parte dell'ossigeno molecolare dei lipidi contenenti acidi grassi insaturi e i loro esteri. È un evento dannoso in grado di propagarsi a catena causando compromissione dell'integrità delle membrane biologiche, ma ha anche un potenziale effetto mutageno. Inizialmente un radicale iniziatore interagisce con un acido grasso polinsaturo producendo un radicale lipidico che si combina rapidamente con l'ossigeno per formare il radicale perossi-lipidico. Quest'ultimo è in grado di sottrarre un atomo di idrogeno ad un altro acido grasso polinsaturo generando un idrossido lipidico e un altro radicale lipidico, il quale continua la reazione a catena. Da queste reazioni derivano le aldeidi quali la malondialdeide (MDA), il 4-idrossiesanale, il 4-idrossinonenale (4-HNE), l'esanale, l'eptanale e il nonenale [179].

Tra queste la MDA è uno dei principali prodotti della perossidazione degli acidi grassi polinsaturi. La MDA, la cui formula chimica è $\text{CH}_2(\text{CHO})_2$, è un'aldeide reattiva, causa di citotossicità nelle cellule, e in grado di reagire con la desossiadenosina e desossiguanina nel DNA, formando composti mutageni, precursori di carcinogenesi. Vari studi hanno dimostrato come la MDA misurata nel CAE (MDA-CAE) sia correlata con la flogosi locale e lo stress ossidativo in patologie polmonari infiammatorie croniche quali l'asma e la BPCO [195-197].

Il HNE sembra avere un meccanismo d'azione dipendente dalla concentrazione. Alte concentrazioni inducono apoptosi, differenziazione cellulare e alterazione dei segnali di trasduzione per attivazione di adenilato ciclasti, JNK, caspasi e PKC, mentre basse concentrazioni sembrano essere responsabili della promozione della proliferazione cellulare [198]. Recenti studi effettuati in ambito occupazionale hanno evidenziato un aumento del HNE nel CAE (HNE-CAE) di lavoratori addetti alla pulizia ospedaliera ed esposti ad agenti clorurati [199].

Gli isoprostani sono eicosanoidi che si formano dalla perossidazione lipidica dell'acido arachidonico attraverso un processo non enzimatico innescato dai ROS. Essi, inizialmente, sono esterificati nei fosfolipidi di membrana dai quali sono successivamente separati da una fosfolipasi A_2 passano quindi in circolo per essere infine escreti nelle urine; possono essere rilevati anche nel CAE e nel liquido di lavaggio broncoalveolare. Uno dei più importanti isoprostani sintetizzati in vivo è l'8-IP. Diversi autori hanno riportato un incremento dei livelli di 8-IP nel CAE (8-IP-CAE) di fumatori, di soggetti affetti da BPCO e nel corso di altre patologie respiratorie quali la fibrosi cistica [200] e l'asma bronchiale; in quest'ultima è stata osservata anche una correlazione tra grado di severità ed i livelli di 8-IP [201, 202]

9.2 Frazione di ossido nitrico esalato

Il monossido di azoto (NO) si forma durante la conversione di L-arginina in L-citrullina mediata dall'attività enzimatica dell'ossido nitrico sintetasi (NOS). Le NOS esistono tre isoforme di cui due costituzionali (cNOS) e una inducibile (iNOS). Nelle vie aeree la iNOS, presente nelle cellule

epiteliali, nervose infiammatorie ecc., è sovraespressa in risposta a mediatori proinfiammatori e produce grandi quantità di NO che hanno la funzione di contrastare l'azione dei microrganismi patogeni. Nei soggetti asmatici, le citochine pro-infiammatorie (IL-1 β , IFN- γ , TNF- α) determinano un'aumentata espressione di iNOS e di conseguenza un incremento dei livelli di NO presente nell'aria esalata [203].

I livelli di FeNO possono correlare con gli eosinofili misurati nel siero, nello sputo indotto, nel BAL. Correlano inoltre con l'iperreattività bronchiale e le IgE circolanti. In soggetti asintomatici e in assenza di alterazioni degli indici di funzionalità respiratoria, un aumento dei livelli di FeNO indica infiammazione eosinofila iniziale o non ancora completamente risolta. La sensibilità e la specificità del FeNO nell'identificare gli asmatici con un buon controllo della malattia è maggiore rispetto ai classici test di funzionalità polmonare ed è molto utili per valutare e monitorare nel tempo l'efficacia della risposta alle terapie [204, 205]

Il FeNO si misura in parti per bilione (ppb) e secondo le linee guida dell'*American Thoracic Society/European Respiratory Society* (ATS/ERS) la tecnica online ad espiro singolo con un flusso costante di 50 ml/sec è il *gold standard* per misurare il FeNO, sia in soggetti adulti che in età pediatrica [206].

Nel caso specifico dell'OA il *gold standard* per effettuare la diagnosi è il test di provocazione bronchiale specifico (TBS), che consiste nel far inalare al lavoratore concentrazioni controllate dell'agente professionale sospetto e nel misurare per almeno 8 ore dopo la fine del test i parametri di funzionalità respiratoria. Si tratta tuttavia di un test specialistico di secondo livello, eseguibile solo in centri specializzati e che può causare reazioni asmatiche sia immediate che tardive. Negli ultimi anni sono stati effettuati studi che hanno valutato le variazioni di FeNO dopo esecuzione di TBS con agenti asmogeni professionali. Nello studio di Ferrazzoni et al. in soggetti con TBS da isocianati positivo sono stati riscontrati aumenti significativi del FeNO dopo 24 ore dall'esecuzione del test e queste variazioni correlavano positivamente con l'incremento degli eosinofili nell'espettorato indotto. Le

variazioni di FeNO erano specifiche dei lavoratori che sviluppavano la reazione asmatica, difatti nei controlli con TBS negativo e nei soggetti che manifestavano solo rinite non si osservava alcun incremento del FeNO e/o degli eosinofili [207]. In un altro studio sono state valutate le variazioni di FeNO in 45 pazienti con TBS da agenti asmogeni professionali positivo e in 23 controlli con TBS negativo. Anche in questo caso era stato riscontrato un aumento significativo del FeNO 24 ore dopo il test nei soggetti con TBS positivo che manifestavano la reazione asmatica, ma non nei controlli. Da un'analisi più approfondita degli agenti causali era stato osservato che solo i lavoratori con TBS positivo da inalazione di agenti a basso peso molecolare presentavano un aumento del FeNO dopo il test, tuttavia il valore predittivo del FeNO come strumento diagnostico era basso [208]. Al contrario in uno studio prospettico osservazionale che ha incluso 168 soggetti sottoposti a TBS di cui 98 con test positivo, le variazioni di FeNO sono state riscontrate dopo 24 ore dal test solo nei soggetti con TBS positivo da inalazione di agenti ad alto peso molecolare [209]. Ulteriori studi sono necessari per valutare la possibilità di utilizzare il FeNO come strumento complementare nella diagnosi e nel monitoraggio di asma professionale soprattutto quando gli agenti causali sono a basso peso molecolare e per i quali attualmente non esistono test allergici validati. L'interesse per i soggetti professionalmente esposti deriva dalla non invasività della misurazione, dalla possibilità di ripeterlo nel tempo, dall'assenza di reazioni asmatiche post esecuzione, dalla possibilità di poterlo eseguire direttamente in azienda.

9.3 Prove di funzionalità respiratoria

Gli indici di funzionalità respiratoria vengono valutati mediante l'esame spirometrico. La spirometria fornisce le misure dei volumi polmonari dinamici: Capacità Vitale lenta (CV), Capacità Vitale Forzata (FVC), Volume Espiratorio Massimo al primo Secondo (FEV₁) e il rapporto FEV₁/VC. Inoltre, con la registrazione flusso-volume dell'espiazione forzata vengono misurati i flussi espiratori massimali all'inizio dell'espiazione (Picco Espiratorio di Flusso: PEF) e a diversi volumi polmonari (rispettivamente al 25%, 50% e 75% della CVF: FEF₂₅, FEF₅₀, FEF₇₅). I valori ottenuti vengono

confrontati con standard di riferimento permettendo così di ottenere i parametri FEV₁ % del predetto e FVC % del predetto e i limiti inferiori e superiori di norma (rispettivamente LLN e ULN) per ogni indice misurato. Attualmente gli standard di riferimento utilizzati sono i *Global Lung Function Initiative* (GLI) del 2012 [210].

La spirometria è utilizzata nella sorveglianza dei lavoratori esposti a sostanze pneumotossiche in quanto consente di identificare i deficit ostruttivi e di porre sospetto di deficit restrittivo o misto. Il test può identificare sia variazioni acute degli indici di funzionalità respiratoria sia un aumento nel tempo del calo fisiologico del FEV₁ come risultato dell'esposizione pneumotossici occupazionali [211].

10. DANNO OSSIDATIVO AGLI ACIDI NUCLEICI

La tossicità del Cr VI è dovuta alla generazione di radicali liberi, che a loro volta attivano O₂ e producono ROS [33]. I ROS prodotti all'interno delle cellule inducono un danno ossidativo a livello delle basi azotate del DNA e del RNA [14].

Il danno ossidativo interessa prevalentemente la guanina con generazione 8-idrossi-7,8-diidroguanina (8-oxoGua), 8-idrossi-7,8-diidroguanosina (8-oxoGuo) e di 8-oxodGuo. Tra queste l'8-oxodGuo sembra essere altamente mutagena determinando la perdita del normale appaiamento tra le basi, ed essere coinvolta nella carcinogenesi. Difatti l'8-oxodGuo, se non viene rimossa dai sistemi riparatori, si appaia con l'adenina invece che con la citosina determinando la trasversione (G-T) [212] (Figura 2).

Le basi ossidate del DNA originano per effetto di differenti sistemi di riparazione e/o dal normale turnover degli acidi nucleici. In particolare la 8-oxodGuo riflette sia la riparazione del nucleotide trifosfato 2'-deossiguanosina ossidato a livello del pool cellulare dei 2'-deossiribonucleotidi ad opera dell'enzima MTH1 [213] che la riparazione della 8-oxodGuo nel DNA ad opera di un sistema endonucleasico/nucleotidasico o del sistema di escissione nucleotidico (NER) [214]. La 8-oxoGuo può originare dall'ossidazione della guanina presente nell'RNA, come risultato di turnover molecolare o riparazione, anche se un sistema specifico di riparazione per l'RNA non è stato ancora descritto. La 8-oxoGua riflette il danno alla guanina in posizione 8 ed origina in parte da specifiche attività glicosilasiche del sistema di riparazione per escissione di basi (BER) tra cui la 7,8-diidro-8-oxoguanina DNA glicosidasi umana (hOgg1) o ancora potenzialmente dal turnover o dalla riparazione del DNA e dell'RNA [215, 216] (Figura 3).

Dal momento che tali indicatori di effetto possono essere dosati nel sangue periferico o nelle urine, per il MB dei lavoratori o per studi sulla popolazione generale si preferisce l'utilizzo delle urine per la non invasività del campionamento.

La determinazione non invasiva nel campione urinario utilizzato per determinare i metalli Cr VI, e Ni nel caso dei saldatori, potrebbe essere utile per valutare lo stress ossidativo e l'efficacia dei sistemi di riparazione del danno ossidativo al DNA e all'RNA in soggetti professionalmente. A causa delle proprietà antiossidanti dell'urina, questi indicatori sono stabili per anni, se i campioni sono adeguatamente conservati. Per il dosaggio vengono utilizzate tecniche cromatografiche accoppiate a spettrometria di massa.

L'8-oxodGuo è la base ossidata maggiormente utilizzata per valutare l'eventuale presenza di una correlazione tra danno ossidativo ed esposizione a sostanze tossiche. I suoi livelli possono essere tuttavia influenzati da altri fattori quali abitudini di vita, sesso ed età. È stata osservata una correlazione positiva tra livelli di 8-oxodGuo nelle urine e fumo di sigaretta, quantità di bevande alcoliche consumate e livelli di cortisolo ematico e una correlazione negativa con il consumo di alcuni alimenti (frutta, riso, prodotti a base di soia), il grado di attività fisica e il BMI [217, 218].

Diversi studi si sono occupati della ricerca di una possibile associazione tra esposizione a sostanze presenti in ambiente lavorativo e danno ossidativo a livello degli acidi nucleici.

In recenti studi l'8-oxoGuo, rispetto all'8-oxodGuo e all'8-oxoGua, si è dimostrato biomarcatore più sensibile del danno ossidativo in lavoratori esposti a stirene e benzene. La localizzazione citoplasmatica dell'RNA e le sue proprietà strutturali (a singolo filamento con basi non protette da legami idrogeno né da proteine strutturali) lo rendono probabilmente più suscettibile agli insulti ossidativi rispetto al DNA [219]. In questi studi inoltre non era stata osservata alcuna associazione tra l'esposizione a benzene e/o stirene e l'8-oxoGua, probabilmente in relazione alla elevata variabilità inter e intra-individuale di questo biomarcatore e al polimorfismo dell'*hOGG1*, uno degli enzimi deputati alla riparazione della guanina ossidata [220]. In uno studio su pazienti affetti da NSCLC sono stati riscontrati livelli di 8-oxoGua urinari inferiori nei pazienti rispetto ai controlli. Questi risultati potrebbero indicare una ridotta attività glicosilasica dell'*hOGG1* nei soggetti affetti da NSCLC [221] e sono in accordo con altri studi che hanno dimostrato come la ridotta attività di

riparazione dell'8-oxoGua rappresenti un fattore di rischio per il carcinoma polmonare, della testa e del collo [222, 223].

Gli studi condotti a tal riguardo in soggetti esposti a fumi di saldatura e in addetti alla cromatura galvanica sono pochi. La cancerogenicità dei fumi di saldatura e dei metalli in essi contenuti può derivare dalla loro abilità ad indurre stress ossidativo e di conseguenza recare danno a diverse molecole tra cui gli acidi nucleici. Nel processo di saldatura sia di acciaio dolce che di acciaio inossidabile si generano ROS, tuttavia i fumi derivanti dalla saldatura di acciai inossidabili mostrano una reattività e una capacità di generazione radicalica più elevata. La differente quantità di radicali prodotti per esposizione ai due diversi tipi di fumi sembra esser correlata alla presenza di Cr VI nell'acciaio inossidabile [224]. Graczyk et al. hanno valutato l'effetto dell'esposizione in saldatori apprendisti, dimostrando un significativo aumento delle concentrazioni plasmatiche e urinarie di H₂O₂ e di 8-oxodGuo rispettivamente dopo 60 minuti e 3 ore dall'inizio dell'attività di saldatura [73]. Nello studio WELDOX condotto su 238 saldatori è stata dimostrata un'associazione tra esposizione a Cr presente nei fumi di saldatura ed escrezione urinaria di 8-oxoGuo e 8-oxodGuo, il Ni invece mostrava solo una debole correlazione con l'8-oxoGuo e l'8-oxodGuo U [225], probabilmente in relazione alla minore capacità dello stesso di indurre la produzione diretta di ROS. Il Ni difatti determina un incremento dello stress ossidativo ma in maniera indiretta, riducendo la sintesi e l'attività dei sistemi antiossidanti e inducendo ipossia [87]. In uno studio effettuato in Taiwan che ha incluso 48 cromatori e 19 controlli sono state osservate concentrazioni di 8-oxodGuo nelle urine significativamente maggiori nei cromatori rispetto ai controlli. Le concentrazioni di 8-oxodGuo correlavano sia con le concentrazioni urinarie di Cr che con quelle ambientali ad indicare come l'8-oxodGuo potesse essere utilizzata come biomarcatore di effetto da esposizione a Cr [226].

Partendo dai risultati finora emersi dagli studi presenti in letteratura, le tre diverse forme della guanina ossidata potrebbero in futuro essere utilizzate non solo come indicatori di effetto in lavoratori esposti

a sostanze tossiche, ma anche come indicatori di suscettibilità in quanto riflettono indirettamente l'attività di diversi sistemi di riparazione enzimatica.

11. SCOPI

Lo scopo principale di questo studio è di misurare biomarcatori di esposizione nel CAE di lavoratori potenzialmente esposti a metalli pneumotossici (Cr VI e Ni) e correlare la loro concentrazione con quella di biomarcatori di stress ossidativo, quali H₂O₂, MDA, HNE e 8-IP, e di infiammazione, come il FeNO, integrando in tal modo il MB sulle urine ed ambientale tradizionale.

Ulteriori scopi sono:

- valutare la presenza di alterazioni degli indici di funzionalità respiratoria e correlarli con i biomarcatori di stress ossidativo e di infiammazione misurati a livello dell'organo bersaglio.
- misurare la concentrazione di particolato nel CAE ed utilizzarlo come possibile biomarcatore di esposizione.
- quantificare il danno ossidativo agli acidi nucleici mediante la determinazione delle concentrazioni urinarie delle basi ossidate in relazione al tempo di campionamento e mediante il confronto con un gruppo di controllo non professionalmente esposto.

Sono stati reclutati soggetti appartenenti a tre categorie di lavoratori:

- 1 lavoratori addetti alla saldatura di acciaio inox in atmosfera di gas inerte con elettrodo infusibile di tungsteno
- 2 montatori dell'industria aeronautica
- 3 lavoratori addetti alla cromatura galvanica.

Sono stati, inoltre, reclutati due gruppi di controllo per determinare i valori nella popolazione generale delle basi ossidate urinarie (Controlli 1) e del materiale particolato nel CAE (Controlli 2) e confrontarli con quelli misurati nei lavoratori.

Le misure del particolato nel CAE e l'analisi del FeNO sono state effettuate solo nella popolazione dei saldatori.

12. MATERIALI E METODI

12.1 Disegno dello studio

12.1.1 Saldatori

Nel periodo compreso tra i mesi di febbraio 2015 e giugno 2016 sono stati arruolati 100 saldatori TIG di acciaio inox presso 24 aziende di Parma e provincia. A ciascun lavoratore, previa somministrazione del consenso informato, è stato somministrato un questionario anamnestico per la raccolta di informazioni sull'anamnesi fisiologica, patologica remota e prossima, farmacologica e professionale. È stata, inoltre, indagata la presenza di sintomi respiratori e/o cutanei correlati e/o peggiorati dall'attività lavorativa.

Le caratteristiche della popolazione di saldatori reclutati sono descritte in tabella 2.

Nei tre tempi di campionamento T_0 (il venerdì prima dell'inizio del turno di lavoro), T_1 (lo stesso venerdì alla fine del turno di lavoro) e T_2 (il lunedì successivo prima dell'inizio turno) sono stati eseguiti: un esame spirometrico, l'analisi dell'ossido nitrico esalato (FeNO), la raccolta di un campione di CAE e la raccolta di un campione di urine.

12.1.2 Montatori dell'industria aeronautica

Nei mesi di novembre e dicembre 2016 sono stati arruolati 41 montatori dell'industria aeronautica. A ciascun lavoratore, previa somministrazione del consenso informato, è stato somministrato il questionario anamnestico e sono stati raccolti un campione di CAE e uno di urine nei tre tempi: T_0 : il venerdì alla fine del turno di lavoro, T_1 : il lunedì successivo all'inizio del turno di lavoro e T_2 : il lunedì alla fine del turno di lavoro la raccolta. L'esame spirometrico è stato eseguito nei due tempi T_0 e T_1 . Sul CAE e sulle urine sono stati effettuati gli stessi dosaggi della popolazione di saldatori. Le caratteristiche della popolazione di montatori dell'industria aeronautica sono descritte in tabella 3

12.1.3 Cromatori

In collaborazione con il Dipartimento di Scienze della Salute, Scuola di Specializzazione in Medicina del Lavoro, Laboratorio di Igiene Industriale e Tossicologia Occupazionale dell'Università degli Studi di Genova, tra i mesi di gennaio e marzo 2017 sono stati reclutati 24 cromatori in due aziende della Provincia di Genova. A ciascun lavoratore, previa somministrazione del consenso informato, è stato somministrato il questionario anamnestico. Nei due tempi T₀ il martedì all'inizio del turno di lavoro e T₁ il martedì alla fine del turno di lavoro sono stati raccolti un campione di CAE e uno di urine ed è stato eseguito un esame spirometrico. I dosaggi effettuati sul CAE e sulle urine sono stati analoghi a quelli del gruppo I e II. Le caratteristiche della popolazione di cromatori reclutati sono descritte in tabella 4.

In tutti e tre i gruppi di studio sul CAE sono stati dosati: il cromo totale (Cr T) ed il Cr VI, il H₂O₂, l'8-IP, MDA e il HNE. Solo nei saldatori è stato misurato il particolato nel CAE. Sulle urine sono stati misurati: il Cr T, la base azotata guanina nelle diverse forme (libera, legata al DNA e legata all'RNA) native e modificate (ossidate). Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico per Parma (Protocollo n° 6120 del 16 febbraio 2015).

12.1.4 Controlli 1

Sono stati reclutati 52 soggetti sani non esposti a sostanze tossiche occupazionali. Le caratteristiche della popolazione di controlli 1 sono riportate in tabella 5

A ciascun controllo, previa acquisizione del consenso informato, è stato somministrato un questionario anamnestico con informazioni inerenti l'anamnesi fisiologica (BMI, abitudine tabagica, dieta), l'anamnesi patologica remota e prossima con particolare riguardo alla pregressa diagnosi di patologie croniche e neoplastiche. Un campione di urine è stato quindi raccolto per il dosaggio della base azotata guanina nelle diverse forme ossidate e native.

12.1.5 Controlli 2

Le caratteristiche della popolazione di controlli 2 sono descritte in Tabella 6.

Dopo aver acquisito il consenso informato, è stato raccolto un campione di CAE da parte di ciascun controllo per la determinazione del PM. I soggetti erano tutti sani e non esposti sulla base dell'anamnesi lavorativa ad agenti tossici.

12.2 Il monitoraggio ambientale

12.2.1 Saldatori

Le concentrazioni di Cr, Cr VI e Ni nell'aria dell'ambiente di lavoro sono state ottenute dai documenti di valutazione del rischio fornite dalle aziende partecipanti allo studio. Il MA mediante campionamento personale ha coinvolto in ogni azienda il 25% dei saldatori. I campionatori personali sono stati posizionati sotto la maschera di saldatura, direttamente nella zona di respirazione del saldatore. Il particolato ambientale è stato raccolto su una membrana in esteri misti di cellulosa di 0.8 µm di porosità e 25 mm di diametro, al flusso di 2.5 L/minuto per 180 minuti. I campionamenti e le successive analisi sono state eseguite secondo la norma 15202/2012 dell'Organizzazione Internazionale per la Normazione (ISO) [227]. Il Cr VI è stato raccolto su una membrana di polivinil cloruro (PVC) di 5 µm di porosità e 25 mm di diametro, al flusso di 3 L/minuto per 180 minuti utilizzando il metodo NIOSH 7600/1994 [228]. Le concentrazioni dei metalli in aria ambiente erano espresse in mg/m³ e calcolate secondo la formula: C (concentrazione) = P (quantità del metallo) / T (tempo di campionamento) secondo la norma dell'Ente Nazionale Italiano di Unificazione UNI EN 689/1997 [229]

12.2.2 Montatori dell'industria aeronautica

Il Centro di Ricerche Ambientali dell'Istituto Maugeri dell'Università degli Studi di Pavia si è occupato del MA. I campionamenti personali sono stati effettuati in tutti i montatori nelle giornate di lunedì in cui sono stati raccolti i campioni per il MB.

I campionamenti sono stati eseguiti in accordo con le Norme UNI-EN riportate nell'allegato XLI al decreto ed in particolare le UNI-EN 482/2012 e 689/97 sulle strategie di campionamento ed i requisiti degli strumenti di misura. I metodi di campionamento utilizzati sono stati scelti fra quelli validati da Enti certificati in materia (UNICHIM; NIOSH; OSHA). I campionamenti sono stati eseguiti per un periodo di tempo rappresentativo della durata delle lavorazioni e dell'esposizione degli operatori durante lo svolgimento delle mansioni nonché in relazione al periodo di tempo cui fa riferimento il rispettivo TLV. Il Cr è stato raccolto su una membrana in esteri misti di cellulosa al flusso 1-4 L/min. e le analisi sono state eseguite mediante spettrometria di massa con ionizzazione a plasma accoppiato induttivamente (ICP MS). Il campionamento del Cr VI è stato effettuato utilizzando una membrana in PVC al flusso 1-4 L/min. e analizzato mediante spettrofotometria ultravioletta visibile (UV-VIS) [228].

12.2.3 Cromatori

Nelle due aziende di addetti alla cromatura galvanica il MA è stato svolto dal Dipartimento di Specialità Medico Chirurgiche Scienze Radiologiche e Sanità Pubblica, Sezione di Sanità Pubblica e Scienze Umane Medicina del Lavoro e Igiene Industriale dell'Università di Brescia. I campionamenti personali sono stati effettuati nella stessa giornata in cui sono stati raccolti i campioni per il MB. La determinazione delle specie del Cr è stata effettuata con metodo HPLC-ICP-MS (Catalani et al., 2016) utilizzando una membrana in PVC di 37 mm di diametro al flusso di 2 L/minuto per 180 minuti. La separazione delle specie del Cr è stata ottenuta trattando l'estratto delle membrane con EDTA₂(Na) 5mM pH 7 a 40° in bagno ad ultrasuoni per 15 minuti. Poi le soluzioni sono state inserite in bagno maria a 60°C per 1 ora. Il Cr III forma un complesso con EDTA che viene trattenuto dalla colonna mentre il Cr VI permane in soluzione come dicromato. La soluzione così ottenuta è stata quindi analizzata mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni- spettrometria di massa con ionizzazione a plasma accoppiato induttivamente (HPLC-ICP-MS). La determinazione del Cr totale,

del Cr III e del Cr VI è stata effettuata con ELAN DRC (Perkin Elmer SCIEX, Waltham, MA, USA) in flusso di ammoniaca. L'HPLC dedicato è *metal-free* con inserti in ceramica e titanio per evitare ogni forma di contaminazione e rilascio di cromo e con forno per mantenere colonna e fase mobile alla temperatura di 40°. Il metodo permette di misurare sia il Cr (III) che il Cr (VI) con una sensibilità di 0.1 µg/L. Per il controllo dell'accuratezza del metodo viene utilizzato il materiale certificato NIST 1643. Il limite di rilevabilità della metodica, è di 0,1 µg/L. Il coefficiente di variazione è 5.7% per il Cr III e 5.4% per il Cr VI

12.3 La spirometria e l'analisi dell'ossido nitrico esalato (FeNO)

La spirometria è stata eseguita utilizzando uno spirometro portatile (*Koko Spirometer; Sensor Medics, Yorba Linda, CA*) e come valori di riferimento sono stati utilizzati i (GLI) del 2012 [210]. Come raccomandato dalle linee guida dell'ATS/ERS sono state effettuate 3 curve flusso-volume accettabili e riproducibili ed è stato registrato il valore migliore di FEV1, FVC e *Tiffenau* [211].

L'analisi on line del FeNO è stata eseguita mediante un analizzatore portatile a chemiluminescenza (*Hypair FeNO Medisoft group*) secondo la standardizzazione delle linee guida ATS/ERS. Il lavoratore dopo aver compiuto un'inspirazione in aria ambiente ha effettuato un'espiazione lenta e costante della durata di circa di 10 secondi all'interno di un boccaglio connesso allo strumento portatile [206]. I valori di FeNO sono espressi in parti per bilione (ppb).

12.4 Il monitoraggio biologico

12.4.1 Determinazione dei biomarcatori di esposizione e di effetto nel CAE

Il CAE è stato raccolto utilizzando un condensatore portatile denominato TURBO-DECCS fornito dalla Medivac di Parma. Il condensatore è stato impostato ad una temperatura di condensazione di -5°C secondo le raccomandazioni dell'ATS/ERS [177]. La parte denominata DECCS è rappresentata dal sistema di raccolta monouso dotato di una trappola salivare per evitare contaminazioni. Ciascun lavoratore è stato pertanto invitato a respirare a volume corrente attraverso il boccaglio del sistema di

raccolta per 15 minuti, tempo necessario per ottenere circa 1-1.5 ml di CAE. Il volume totale ottenuto è stato così aliquotato: 4 aliquote da 100 µL per dosare il H₂O₂, la MDA, l'8-IP e l'HNE. La quota rimanente (circa 500-1000 µL) è stato utilizzato per la determinazione dei biomarcatori di esposizione (Cr T, Cr VI e Ni). Le aliquote sono state conservate a -80°C e a +4°C rispettivamente per il dosaggio dei biomarcatori di effetto e di esposizione fino al momento dell'analisi. La concentrazione di H₂O₂ è stata misurata utilizzando un Kit commerciale fluorimetrico (Amplex® Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) ed espressa in µM, l'8-IP mediante test immunoenzimatico (EIA) ed espresso in pg/mL, la MDA e l'HNE sono state determinate con la cromatografia liquida-spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) [179] ed espresse in nM, con limite di rivelazione (LOD) di 0.05 nM per la MDA e 0.01 nM per l'HNE.

Le concentrazioni di Cr T e Ni sono state dosate tramite assorbimento atomico elettrotermico (ETAAS) ed espresse in µg/L, con LOD rispettivamente di 0.05 e 0.2 µg/L.

Per la speciazione del Cr nel CAE è stato fatto un lavoro di modifica del protocollo precedentemente pubblicato [189] in modo da ridurre il LOD da 0.2 a 0.1 µg/L e da ridurre i volumi di CAE da utilizzare che brevemente illustreremo.

- 1) 500-700 µl di CAE venivano mescolati con 700 µl di tetrabutylammonio bromuro (TBAB) 50 mM in 4-metil-2-pentanone e 50 µl di acido nitrico 70%. Riducendo i volumi rispetto a quanto pubblicato (1250-1450 µl massimo rispetto ai 2000 µl) è possibile completare la prima estrazione in provette da 1.5 ml. Successivamente, la soluzione ottenuta veniva mescolata energeticamente per almeno 5 minuti e centrifugata a 3000 g per 5 minuti.
- 2) 600 µL fase organica, contenente il complesso TBAB-Cr VI ma non Cr III, venivano mescolati a 50 µl di 1,5-difenilcarbazide (DFC) in etanolo 60% e acido nitrico 7% e 700 µl di acqua deionizzata, consentendo sempre di lavorare in volumi <1500 µl. Dopo mescolamento (2-3

minuti) e centrifugazione (3000 g per 1-2 minuti) la fase acquosa (600 µl circa) veniva utilizzata per misure in assorbimento atomico.

- 3) Il campione tale quale veniva usato in ETAAS. Il metodo prevede l'utilizzo di 20 µl del campione + 20 del "bianco" (acqua trattata allo stesso modo dei campioni) ma con due iniezioni successive: la prima arrivava solo alla fase della pirolisi, mentre l'atomizzazione vera e propria avveniva solo dopo la seconda iniezione. Il Cr VI veniva quindi misurato in 40 µl di campione. Questa ottimizzazione ha consentito di avere un LOD di 0.1 µg/L.

12.4.2 Determinazione del materiale particolato nel CAE

Il particolato nel CAE è stato determinato mediante la componente laser dello strumento *EyeTech Lung Vision*. Si tratta di un sistema di analisi che permette di valutare le dimensioni e la distribuzione delle particelle disperse in un fluido (Figura 4).

Il sistema è dotato di due distinti canali di misura: un laser e un analizzatore video; la componente laser è in grado di rilevare particelle fini (di diametro compreso tra 0,3 µm e 1 µm), mentre l'analizzatore video ha il limite di riuscire a vedere con difficoltà le particelle di diametro inferiore ai 5 µm.

La componente laser si basa sul principio dell'Oscuramento nel Tempo del Laser, la luce laser viene irradiata attraverso una serie di lenti che permettono di focalizzare il fascio in un punto stretto. Il punto viene ruotato da un prisma a cuneo in modo che il fascio descriva un movimento circolare stretto nella zona campione. Quando il fascio laser interagisce con una particella nel suo percorso, un fotodiode rileva la durata dell'ostruzione temporanea del fascio laser da parte delle particelle. Il tempo di oscuramento è direttamente correlato al diametro della particella che interagisce con il fascio laser, per cui le particelle più grandi causeranno una durata di oscuramento superiore rispetto alle particelle più piccole. In particolare, dalla durata dell'oscuramento (t) e dalla velocità di rotazione nota del raggio laser (v) può essere calcolato il diametro delle particelle (D) con la seguente relazione: $D = v \cdot t$.

In confronto alla elevata velocità del laser rotante, le particelle risultano ferme. Così, il movimento delle particelle non influenza la misurazione delle dimensioni delle particelle stesse. Per quanto riguarda la durata dell'analisi, solitamente, ad alte concentrazioni (> 50000 p/mL) si raggiunge una confidenza del 95% in circa 2 minuti; tuttavia per valori inferiori a 10000 p/mL è preferibile definire un tempo di misura svincolato dall'intervallo di confidenza per motivi pratici, ovvero la misura potrebbe richiedere anche tempi molto lunghi. Per questo motivo abbiamo impostato misure tarate su 200 secondi in triplicato per ogni campione/standard, un tempo sufficiente per tener conto delle fluttuazioni che si osservano nella misura. Tenendo conto di interferenze quali la possibile flocculazione, la produzione di bollicine, l'aggregazione o l'eventuale precipitazione del materiale particolato durante le analisi, su ogni campione di condensato sono state effettuate 3 analisi di 200 secondi l'una; i risultati hanno portato a ritenere le misure fornite dallo strumento come sufficientemente lineari e concordanti.

A causa degli esigui volumi di condensato che possono essere ottenuti da ciascun soggetto, il condensato stesso è stato diluito con acqua distillata. Per ogni campione è stato analizzato il corrispondente "bianco", ovvero un campione caratterizzato da scarsissimo contenuto di particolato (compreso tra 0 e 300 p/mL), da sottrarre poi all'analisi del campione effettivo.

Ogni campione è stato alloggiato in cuvette di plastica. Ciascuna cuvette monouso è stata scelta scevra da imperfezioni ed impurità di superficie che avrebbero potuto alterare il segnale laser e quindi le misure.

Nella fase preliminare dello studio è stata effettuata la messa a punto di tale strumento per la standardizzazione delle misure ed è stato verificato che il *Lung Vision* fosse effettivamente in grado di caratterizzare le particelle sia per la concentrazione che per i diametri. Ciò è stato effettuato mediante la misurazione di particelle standard con diametro noto come il latex. Sempre in fase preliminare è stata esclusa una possibile interferenza dell'aria ambiente. Nei nostri laboratori è stata analizzata l'aria ambientale, flussandola all'interno di una Falcon inserita nel Turbo-Deccs impostato

a -5° per un totale di 250 L, riscontrando concentrazioni molto basse di particelle solo nella frazione 0,3-1 µm (78 p/mL); nelle altre frazioni il segnale era sovrapponibile a quello dell'acqua distillata ("bianchi"). Si osservava una modesta contaminazione solo per particolato superiore a 10 µm. Pertanto si evince che il PM dell'aria ambientale non influisce sui livelli di materiale particolato nel CAE dei soggetti presi in esame.

È stato valutato anche il possibile ruolo della saliva nella determinazione dei valori di particelle riscontrati. In campioni di CAE con concentrazioni di particelle particolarmente elevati (> 10000 p/mL) sono stati messi a confronto lo spettro del CAE del soggetto in esame e quello della saliva, ottenendo in alcuni casi sovrapposizione e deducendo quindi una contaminazione del campione con saliva stessa, in altri casi gli spettri non erano sovrapponibili, quindi abbiamo potuto concludere che per quei soggetti l'esposizione a particolato fosse elevata. Utilizzando test statistici non parametrici si riduce molto l'effetto di tali outliers frutto di contaminazioni. In teoria il sistema potrebbe essere sfruttato per valutare le contaminazioni salivari dei campioni. Effettuare questa prova è stato fondamentale per discriminare ulteriormente la validità della nostra ricerca di materiale particolato all'interno del campione di CAE.

Per ogni campione sono stati riportati dati relativi alle seguenti frazioni: 0.3-1 µm (PM₁), 1-2.5 µm (PM_{2.5}), 2.5-10 µm (PM₁₀) e la somma dei 3 precedenti (PM_{TOT}).

12.4.3 Determinazione dei metalli nelle urine

A ciascun lavoratore è stato consegnato un contenitore sterile per la raccolta delle urine, uno per ogni tempo di campionamento e le urine sono state conservate in cella fredda a temperatura pari a + 4° C fino al momento delle analisi. Le concentrazioni di Cr T e Ni sono state determinate mediante ETAAS con LOD di 0.05 µg/L per il Cr T e 0.5 µg/L per il Ni. I valori di Cr T e Ni sono stati espressi in funzione della creatinina urinaria.

12.4.4 Determinazione degli indicatori di stress ossidativo urinari

Per valutare il danno ossidativo agli acidi nucleici sono state determinate le concentrazioni di Guanina (Gua), 8-oxoGua, Guanosina (Guo), 8-oxoGuo, 2'deossiguanosina (dGuo) e 8-oxodGuo escrete nelle urine. La cotinina urinaria è stata dosata per caratterizzare l'esposizione a fumo di tabacco che rappresenta un fattore di confondimento in quanto può determinare un aumento dell'escrezione delle basi ossidate. Le determinazioni sono state effettuate mediante LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo dotato di interfaccia *TurboIonspray*. La separazione dei sei analiti nella stessa corsa cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna Atlantis[®]dC₁₈ (100 x 3,0 mm i.d., 3 µm, Waters) ed una fase mobile costituita da acido formico 10 mM (pH 3,75) e metanolo in gradiente di eluizione. Prima dell'analisi i campioni di urina sono stati centrifugati a 10.000 rpm per 5 minuti e addizionati con una soluzione di acido formico acquoso contenente la miscela degli SI. La ionizzazione degli analiti è stata ottenuta in ioni positivi e la rivelazione in MS/MS, in modalità denominata SRM (*Selective Reaction Monitoring*, monitorando le transizioni caratteristiche di ciascun analita).

Il metodo sviluppato è stato validato mediante lo studio dell'intervallo di linearità, la determinazione dei limiti di rivelazione e della precisione (*intra-day* e *inter-day*). Le concentrazioni di tutti gli analiti determinati sono state espresse in funzione della creatinina urinaria, determinata secondo il metodo di Jaffè.

Il danno ossidativo agli acidi nucleici è stato valutato come rapporto tra la forma ossidata e la forma nativa della guanina libera, legata all'RNA e legata al DNA, rispettivamente: 8-oxoGua/Gua, 8-oxoGuo/Guo ed 8-oxodGuo/dGuo.

12.5 Analisi statistiche

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando SPSS per Windows[®], Versione 25.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA) e il software PRISM 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA). La normalità della distribuzione è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov.

Le differenze di ciascuna variabile tra i tre tempi di campionamento sono state valutate mediante il test dell'analisi della varianza (ANOVA) seguito dal test di Bonferroni per le variabili normalmente distribuite e il test di Friedman seguito dal test di Dunn per le variabili non normalmente distribuite. I valori sono stati riportati come media \pm deviazione standard (DS) e come mediana e range interquartile (25°-75° percentile) rispettivamente per le variabili parametriche e non. Le correlazioni tra le variabili sono state valutate tramite il coefficiente di correlazione (r) di *Pearson* e di *Spearman* rispettivamente per le variabili normalmente distribuite e non normalmente distribuite. Valori di $p < 0.05$ sono stati considerati statisticamente significativi.

13. RISULTATI

13.1 Saldatori

13.1.1 Caratteristiche della popolazione in studio e degli ambienti di lavoro

In tutte le aziende che hanno partecipato allo studio gli ambienti di lavoro erano ben ventilati e le postazioni di saldatura distanziate l'una dall'altra e separate dai locali dove venivano svolte le altre attività. In 23 delle 24 aziende erano presenti dispositivi di protezione collettiva del tipo aspiratori. I 3 saldatori impiegati nell'azienda priva di aspiratori riferivano di utilizzare dispositivi di protezione respiratoria durante la saldatura.

Solo 2 dei 100 saldatori reclutati erano apprendisti TIG, i restanti 98 erano specializzati e avevano un'anzianità lavorativa mediana di 24 anni. Altre tecniche come la MIG, la MAG e la MMAW venivano utilizzate raramente. Tuttavia, l'attività di saldatura non veniva svolta per 8 h/die ma per circa metà giornata lavorativa, nella restante parte della giornata venivano svolte per lo più attività di molatura e di assemblaggio. La prevalenza di asma bronchiale allergico era del 4%. Dai questionari non sono emersi sintomi respiratori e/o cutanei correlabili all'attività di saldatura. Tutti i lavoratori erano informati sull'importanza del corretto uso dei dispositivi di protezione collettiva e individuale.

13.1.2 Monitoraggio ambientale

In tabella 7 sono riportate le concentrazioni ambientali di Cr T, Cr VI e Ni. I valori sono tutti nettamente inferiori ai rispettivi TLV-TWA dell'ACGIH.

13.1.3 Test di funzionalità respiratoria e FeNO

La spirometria è risultata normale in tutti e tre i tempi di campionamento; i valori di FeNO non venivano modificati dall'esposizione a fumi di saldatura. (Tabella 8)

13.1.4 Biomarcatori di esposizione

I valori di Ni dosati nel CAE erano nella maggior parte dei campionamenti <LOD, senza differenze significative tra i tre tempi di campionamento. Il Cr T nel CAE ha mostrato concentrazioni

significativamente inferiori al tempo T₂ rispetto ai tempi T₁ ($p < 0.0001$) e T₀ ($p < 0.023$), con valori medi e di range interquartile al 25°-75° percentile di 0.06 µg/L (<LOD-0.14) al T₀, 0.08 µg/L (<LOD-0.22) al T₁, <LOD (<LOD-0.10 µg/L) al T₂ (figura 5).

Su 9 campioni di CAE di saldatori con concentrazioni di Cr T superiore a 0.40 µg/L si è proceduto con la speciazione del Cr VI e in 2 sono emersi valori sopra il LOD [0.15 (intervallo <0.1–0.25)].

Le concentrazioni di Cr-U sono risultate significativamente inferiori al T₂ rispetto al T₁ ($p = 0.010$) e al T₀ ($p < 0.0001$). Le concentrazioni mediane (25°-75° percentile) del Cr-U nei tre tempi di campionamento erano di 0.71 (0.36-1.27), 0.74 (0.41-1.21) and 0.59 (0.26-1.00) µg/g creatinina (figura 6).

Le concentrazioni di Ni-U hanno mostrato differenze significative tra T₀ e T₁ ($p = 0.001$) e tra T₁ e T₂ ($p < 0.0001$) con valori di mediana (25°-75° percentile) maggiori al T₁ [1.11 (0.59-0.79) µg/g creatinina] rispetto al T₀ [0.76 (0.37-1.40) µg/g creatinina] e al T₂ [0.83 (0.31-1.38) µg/g creatinina]. (Figura 7)

13.1.5 Particolato nel CAE

I valori delle 4 classi di particolato nei campioni di CAE dei saldatori non sono risultati significativamente differenti tra i tre tempi di campionamento, sebbene siano stati riscontrati valori più bassi al T₂ rispetto agli altri due tempi di campionamento (tabella 9). Inoltre i valori di particolato nel CAE dei saldatori sono risultati significativamente superiori rispetto a quelli dei controlli 2 (Figura 8).

13.1.6 Biomarcatori di effetto

Le concentrazioni dell'H₂O₂-CAE si sono rivelate significativamente più alte al T₁ rispetto al T₀ ($p < 0.0001$) e al T₂ ($p < 0.0001$) con valori di media ± DS pari a 0.18 ± 0.10, 0.25 ± 0.14, and 0.16 ± 0.09 µM rispettivamente ai tempi T₀, T₁ e T₂ (Figura 9 A). I valori di MDA-CAE espressi in mediana (25°-75° percentile) sono risultati pari a 2.79 (2.20-3.59) nM al T₀, 2.98 (2.19-4.18) nM al T₁ e 2.43

(1.82-3.09) nM al T₂ con differenze significative tra i tempi T₀ e T₂ ($p=0.02$) e T₁ e T₂ ($p<0.0001$), mentre non sono state riscontrate differenze statisticamente significative il venerdì tra inizio e fine turno (Figura 9 B). Le concentrazioni di HNE-CAE sono risultate significativamente maggiori al T₀ rispetto al T₂ ($p=0.015$) con valori espressi in mediana (25°-75° percentile) di 0.53 (0.40-0.72) nM al T₀, 0.48 (0.36-0.67) nM al T₁ and 0.51 (0.39-0.65) nM al T₂. L'8-IP non ha mostrato differenze significative tra i tre tempi di campionamento.

13.1.7 Biomarcatori di danno ossidativo agli acidi nucleici

Il rapporto 8-oxoGua/Gua non ha rivelato differenze significative tra i tre tempi di campionamento con valori di mediana (25°-75° percentile) pari a 0.04 (0.02-0.07) al T₀, 0.05 (0.03-0.08) al T₁ e 0.04 (0.03-0.08) al T₂. Il rapporto 8-oxoGuo/Guo ha invece mostrato differenze significative tra i tempi T₀ e T₁ ($p>0.0001$) e tra i tempi T₁ e T₂ ($p=0.011$) con valori espressi in mediana (25°-75° percentile) maggiori al T₁ 0.11 (0.07-0.18) rispetto al T₀ 0.10 (0.06-0.14) e al T₂ 0.10 (0.06-0.15) (Figura 10-A). Analogamente il rapporto 8-oxodGuo/dGuo ha evidenziato differenze significative il T₀ e il T₁ ($p=0.001$) e tra il T₁ e il T₂ ($p=0.001$) con valori di mediana (25°-75° percentile) pari a 5.80 (3.62-9.92) al T₀, 8.13 (4.10-13.26) al T₁ e 5.10 (2.77-10.24) (Figura 10-B) Il rapporto 8-oxodGuo/dGuo nella popolazione dei controlli è risultato pari a 3.09 (1.84-6.52) e significativamente inferiore rispetto a valori misurati nei saldatori al T₀, al T₁ ($p<0.0001$) e al T₂ ($p=0.003$). (Figura 10-A) I rapporti 8-oxoGua/Gua e 8-oxoGuo/Guo nella popolazione dei controlli hanno mostrato rispettivamente valori di 0.04 (0.02-0.09) e di 0.13 (0.06-0.19) senza differenze significative rispetto a quelli determinati nei saldatori.

13.1.8 Correlazioni

Correlazioni positive statisticamente significative sono state riscontrate tra i biomarcatori di effetto H₂O₂-CAE e MDA-CAE con indice di correlazione di *Spearman* (r) pari a 0.134 e $p=0.005$ e tra MDA-CAE e HNE-CAE ($r=0.485$ and $p<0.0001$) (Figura 11). Riguardo i biomarcatori di esposizione

correlazioni positive significative sono state rivelate tra il Cr-U ed il Ni-U ($r=0.508$, $p < 0.0001$) e tra il Cr-CAE e il Ni-CAE ($r=0.239$, $p < 0.0001$). Il Cr-A correlava sia con il Cr-CAE ($r=0.480$ e $p < 0.0001$) (Figura 12-A) che con il Cr-U ($r=0.360$ e $p=0.003$) (Figura 12-B). Correlazioni positive seppur deboli ma statisticamente significative sono emerse tra il Ni-CAE e i biomarcatori di effetto MDA-CAE ($r=0.122$, $p < 0.05$) e HNE-CAE ($r=0.255$, $p < 0.001$), con il limite che molti dei valori di Ni-CAE erano inferiori al LOD. Sono state individuate correlazioni positive tra 8-oxodGuo e Cr-U al T₁ ($r=0.205$ e $p=0.041$) (Figura 13-A) e tra 8-oxoGuo e Cr-U al T₀ ($r=0.327$ e $p < 0.0001$) al T₁ ($r=0.329$ e $p < 0.0001$) (Figura 13-B) e al T₂ ($r=0.293$ e $p < 0.0001$). Non sono state riscontrate correlazioni tra le concentrazioni dei metalli nel CAE e nelle urine e né tra le concentrazioni di Cr-CAE e i biomarcatori di effetto dosati nel CAE. È emersa una debole correlazione positiva tra Cr-CAE e PM 2.5-CAE al T₀ ($r=0.212$, $p < 0.044$) (Figura 14).

13.2 Montatori dell'industria aeronautica

13.2.1 Caratteristiche della popolazione in studio e degli ambienti di lavoro

I lavoratori reclutati nell'industria aeronautica effettuavano operazioni di foratura e sverniciatura su pezzi metallici precedentemente verniciati con *primer* a base di SrCrO₄ e ritocchi con vernici a base di SrCrO₄. L'operazione di ritocco con le vernici contenenti Cr VI venivano effettuate per pochi minuti nella giornata lavorativa. La ventilazione dei locali era adeguata e i locali erano dotati di aspiratori. I montatori riferivano di utilizzare al bisogno ed in particolare durante le operazioni di foratura e di verniciatura i dispositivi di protezione respiratoria. Tutti i lavoratori erano informati sull'importanza del corretto uso dei dispositivi di protezione collettiva e individuale. La prevalenza di asma bronchiale allergico era del 12%, ma nessuno dei lavoratori riferiva peggioramento dei sintomi durante l'attività lavorativa.

13.2.2 Monitoraggio ambientale

In tabella 10 sono riportate le concentrazioni ambientali di Cr T e Cr VI, anche in questo caso si tratta di valori molto inferiori ai TLV-TWA dell'ACGIH.

13.2.3 Test di funzionalità respiratoria

Differenze statisticamente significative di FEV₁, FVC, percentuale del predetto del FEV₁ e dell'indice di Tiffenau sono emerse tra i due tempi di campionamento, seppur con valori entro i limiti di norma.

I valori dei parametri di funzionalità respiratoria sono riportati in tabella 11.

13.2.4 Biomarcatori di esposizione

Le concentrazioni Cr T nel CAE non hanno mostrato differenze significativamente tra i tre tempi di campionamento. In 8 campioni di CAE che presentavano concentrazioni di Cr T comprese tra 0,25 e 0,78 µg/L si è proceduto con speciazione del Cr e 6 campioni hanno rivelato valori di Cr VI sopra il LOD [0,15 (intervallo <0,1 – 0,25)]

Analogamente al CAE, nelle urine non sono emerse differenze significative di Cr tra i tre tempi di campionamento. I valori mediani e di range interquartile al 25°-75° percentile del Cr T-CAE e del Cr-U nei tre tempi di campionamento sono riportati in tabella 12

13.2.5 Biomarcatori di effetto

L'analisi delle concentrazioni di H₂O₂-CAE non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra i tre tempi di campionamento, ma sono stati riscontrati valori di mediana (25°-75° percentile) tendenzialmente più alti al T₂ 0.20 (0.15-0.25) µM rispetto al T₀ 0.17 (0.09-0.29) µM e al T₁ 0.16 (0.11-0.26) µM.

La MDA-CAE ha rivelato differenze statisticamente significative tra T₀ e T₁ ($p < 0.005$) e tra T₀ e T₂ ($p < 0.010$). I valori mediani (25°-75° percentile) sono risultati di 2.16 (1.68-3.18) nM al T₀, 2.08 (1.36-2.87) nM al T₁ e 2.09 (1.29-3.04) al T₂. (Figura 15-A)

Le concentrazioni della HNE-CAE hanno mostrato differenze statisticamente significative tra T₀ e T₂ ($p < 0.001$), con valori di mediana (25°-75° percentile) pari a 0.53 (0.42-0.84) nM al T₀, 0.58 (0.38-0.71) nM al T₁ e 0.49 (0.38-0.65) nM al T₂. (Figura 15-B)

Non sono state riscontrate differenze significative nei valori di 8-IP-CAE tra i tre tempi di campionamento.

13.2.6 Biomarcatori di danno ossidativo agli acidi nucleici

Il rapporto 8-oxoGua/Gua ha mostrato differenze significative tra T₁ e T₀ ($p = 0.002$) e tra T₁ e T₂ ($p = 0.007$) con valori di mediana (25°-75° percentile) superiori al T₁ [0.05 (0.03-0.07)] rispetto al T₀ [0.03 (0.02-0.05)] e T₂ [0.03 (0.02-0.05)]. Considerando invece la guanina libera ossidata espressa su creatinina è stata riscontrata una differenza significativa tra T₁ e T₂ ($p = 0.023$) ma con andamento opposto e valori maggiori al T₀ [10.18 (6.02-17.08)] e al T₂ [10.57 (4.7-17.25)] rispetto al T₁ [6.84 (3.39-14,04)]. Il rapporto 8-oxoGuo/Guo si è rivelato significativamente inferiore al T₁ con valori di mediana (25°-75° percentile) pari a 0.12 (0.07-0.19) rispetto al T₀ [0.15 (0.09-0.23), $p = 0.031$] e al T₂ [0.14 (0.08-0.21), $p > 0.007$] (Figura 16). Non sono emerse differenze significative del rapporto 8-oxodGuo/dGuo tra i tre tempi di campionamento. I valori di mediana (25°-75° percentile) erano di 2.99 (1.85-6.01) al T₀, 3.28 (1.97-7.11) al T₁ e 3.45 (1.72-6.90) al T₂. Nessuno dei rapporti ha mostrato differenze significative rispetto ai valori degli stessi misurati nella popolazione dei controlli.

13.2.7 Correlazioni

Sono state individuate correlazioni positive statisticamente significative tra i biomarcatori di effetto MDA-CAE e HNE-CAE con indice di correlazione di Spearman (r) di 0.799 e $p < 0.0001$ (Figura 17) e tra MDA-CAE e 8-IP-CAE ($r = 0.253$ e $p = 0.001$).

Il Cr T in aria ambiente (Cr-A) determinato mediante i campionamenti personali correlava positivamente con il Cr-U al T₂ ($r = 0.512$ e $p = 0.003$) (Figura 18) ma non con il Cr-CAE. È emersa inoltre una correlazione positiva significativa tra Cr-A e MDA-CAE al T₂ ($r = 0.477$ e $p = 0.007$).

Riguardo i biomarcatori di danno ossidativo agli acidi nucleici l'8-oxoGuo correlava positivamente con il Cr-U ($r=0.377$ e $p=0.001$) (Figura 19). Nessuna correlazione è stata riscontrata tra i biomarcatori di effetto e di esposizione nel CAE né tra il Cr-CAE e il Cr-U.

13.3 Cromatori

13.3.1 Caratteristiche della popolazione in studio e degli ambienti di lavoro

Nella provincia di Genova sono state reclutate due aziende la prima composta da 4 lavoratori e la seconda da 20. I 3 dei 4 lavoratori della prima azienda erano addetti alla cromatura elettrolitica, mentre 1 era addetto alla manutenzione degli impianti di cromatura. Il lavoro veniva svolto per 5 giorni a settimana e per circa 8 ore al giorno. Dei 20 lavoratori della seconda azienda invece 6 erano addetti alla manutenzione degli impianti di cromatura e 14 alla linea di cromatura elettrolitica per la produzione di banda cromata. Le attività venivano svolte per circa 10 giorni al mese e per 4 ore al giorno, nei rimanenti giorni del mese i lavoratori operavano sulle linee per la produzione di bande stagnate. In entrambe le aziende il processo di cromatura era automatizzato e i lavoratori svolgevano l'attività da una cabina di controllo, inoltre erano presenti efficienti sistemi di aspirazione e gli stessi lavoratori riferivano di utilizzare, al bisogno, i dispositivi di protezione respiratori. La prevalenza di asma bronchiale allergica era del 4%. Dai questionari non sono emersi sintomi respiratori e/o cutanei correlati all'attività lavorativa. Tutti i lavoratori erano informati sull'importanza del corretto uso dei dispositivi di protezione collettiva e individuale.

13.3.2 Monitoraggio ambientale

Le concentrazioni ambientali di Cr T e Cr VI sono risultate molto più basse dei corrispettivi TLV-TWA dell'ACGIH (tabella 13).

13.3.3 Test di funzionalità respiratoria

Differenze statisticamente significative di FEV₁, FVC, percentuale del predetto del FEV₁ e dell'indice di Tiffenau sono emerse tra i due tempi di campionamento (tabella 14), seppur con valori entro i limiti di norma.

13.3.4 Biomarcatori di esposizione

Le concentrazioni di Cr-U non hanno evidenziato differenze significativa tra i due tempi di campionamento. I valori mediani (25°-75° percentile) sono riportati in tabella 15. Il Cr nel CAE è stato dosato solo nei 4 cromatori della prima azienda che avevano valori di Cr-U compresi tra 1.36 e 5.43 µg/g creatinina al T₀ e tra 1.63 e 9.17 µg/g creatinina al T₁. Negli altri 20 cromatori non si è proceduto al dosaggio del Cr-CAE in quanto le concentrazioni di Cr-U erano molto bassi con valori di mediana (25°-75° percentile) pari a 0.12 (0.05-0.20) µg/g creatinina al T₀ e 0.12 (0.05-0.23) µg/g creatinina al T₁. Nei lavoratori della prima azienda sono stati riscontrati valori di Cr-CAE compresi tra 0.16 e 0.57 al T₀ e 0.09 e 0.49 al T₁. Le analisi statistiche del Cr-CAE non sono state effettuate per l'esiguo numero di campioni.

13.3.5 Biomarcatori di effetto

Nessuno dei biomarcatori di effetto, H₂O₂, MDA, HNE e del 8-IP, dosati nel CAE ha mostrato differenze di concentrazione significative tra i due tempi di campionamento come mostrato in tabella 16.

13.3.6 Biomarcatori di danno ossidativo agli acidi nucleici

I rapporti 8-oxoGua/Gua, 8-oxoGuo/Guo e 8-oxodGuo/dGuo non hanno evidenziato differenze significative né tra inizio e fine turno, né rispetto alle misurazioni rilevate nella popolazione di controllo. I valori espressi come media ± DS erano pari a 0.08 ± 0.05 al T₀ e 0.07 ± 0.03 al T₁ per il rapporto 8-oxoGua/Gua, 0.13 ± 0.07 al T₀ e 0.15 ± 0.07 al T₁ per il rapporto 8-oxoGuo/Guo e 3.64 ± 1.91 al T₀ e 4.03 ± 1.8 al T₁ per il rapporto 8-oxodGuo/dGuo. Sebbene non significativa per i rapporti

8-oxoGuo/Guo e 8-oxodGuo/dGuo è stata riscontrata una tendenza all'aumento tra inizio e fine turno. Il rapporto 8-oxoGua/Gua invece ha presentato un andamento opposto; tuttavia, anche in questo caso come nei montatori, se consideriamo la base ossidata guanina senza rapportarla alla forma non ossidata, i valori di 8-oxoGua tendono ad essere maggiori a fine turno (10.28 ± 7.08 $\mu\text{g/g}$ creatinina) rispetto ad inizio turno (9.78 ± 6.19 $\mu\text{g/g}$ creatinina) senza differenze significative.

13.3.7 Correlazioni

Il Cr-A e il Cr-U correlavano significativamente ($r=0.518$ e $p=0.009$). È stata individuata una correlazione positiva statisticamente significativa tra i biomarcatori di effetto MDA-CAE e HNE-CAE ($r=0.534$ e $p<0.0001$) (Figura 20). I biomarcatori di danno ossidativo agli acidi nucleici 8-oxodGuo e 8-oxoGuo correlavano positivamente con il Cr-U rispettivamente $r=0.458$, $p=0.001$ e $r=0.289$, $p=0.049$ (Figura 21)

14. DISCUSSIONE

In questo studio abbiamo reclutato tre categorie di lavoratori potenzialmente esposti a Cr VI, e nel caso dei saldatori anche a Ni, al fine di valutare eventuali variazioni di biomarcatori nel CAE e nelle urine in relazione all'esposizione. Le concentrazioni dei metalli misurate in aria ambiente mediante campionatori personali hanno mostrato valori inferiori ai TLV-TWA dell'ACGIH. Queste misurazioni sono rassicuranti ed indicano una bassa esposizione che nel caso dei saldatori di acciaio inox è coerente con il processo di saldatura TIG utilizzato e nel caso dei montatori dell'industria aeronautica con l'esiguo utilizzo delle vernici a base di SrCrO_4 . I cromatori invece generalmente sono esposti a maggiori livelli di Cr-A, nella nostra casistica tuttavia l'attività di cromatura era completamente automatizzata e i lavoratori svolgevano l'attività all'interno di una cabina di controllo. Tutte le aziende erano inoltre dotate di aspiratori correttamente funzionanti.

Riguardo la saldatura TIG si tratta di un processo a basso tasso di emissione di fumi, tuttavia, rispetto alle altre tecniche, durante la TIG si generano fumi composti principalmente da nanoparticelle con diametro < 100 nm e la maggior parte dei metalli tra cui il Cr VI ed il Ni si trovano all'interno delle particelle con diametro < 300 nm [58]. Le nanoparticelle raggiungono le più fini diramazioni dell'albero bronchiale, il tasso di deposizione e il tempo di permanenza delle stesse nelle vie aeree è superiore rispetto alle particelle di più grandi dimensioni [56]. Inoltre, la deposizione aumenta all'aumentare della densità ed è maggiore nel caso di particelle a composizione metallica [57]. L'elevato rapporto superficie/volume che le caratterizza è responsabile di un aumento della reattività chimica che si traduce in una maggiore produzione di ROS e conseguente danno ossidativo [64].

Dai questionari non sono emersi sintomi respiratori correlati all'attività lavorativa, tutti i lavoratori erano informati sull'importanza dell'utilizzo dei DPC e DPI e hanno riferito di essere stati formati sul corretto utilizzo degli stessi. Gli indici di funzionalità respiratoria, determinati mediante esame spirometrico, sono risultati più bassi ad inizio turno in tutte e tre le categorie di lavoratori, in particolare la differenza degli indici FEV1 e FEV1 (% del predetto) ha raggiunto la significatività

statistica sia nei montatori che nei cromatori, mentre gli indici FVC e Tiffenau sono risultati significativamente maggiori ad inizio turno solo nei cromatori. I valori da noi riscontrati sono in accordo con la bassa esposizione e confermano i dati presenti in letteratura sul ritmo circadiano dei valori spirometrici nella popolazione adulta non affetta da patologie cardiorespiratorie. Un recente studio su 20 soggetti adulti sani ha mostrato valori di FEV₁ significativamente più bassi alle ore 9 del mattino rispetto alle 17 pomeriggio e un analogo andamento non significativo della FVC [230]. In uno studio retrospettivo che ha analizzato 4.435 spirometrie i valori più bassi di FEV₁, FVC e Tiffenau sono stati osservati alle ore 12 e i valori più alti alle ore 15 e 16 [231]. Per comprendere i meccanismi fisiologici e molecolari responsabili delle variazioni diurne della funzione polmonare sono necessari ulteriori studi. La respirazione è strettamente regolata dal tasso metabolico, che a sua volta è influenzato da fattori tra cui l'attività fisica, lo stato di eccitazione e gli stimoli provenienti dal sistema nervoso autonomo [232, 233].

I saldatori hanno mostrato differenze significative del Cr-CAE e del Cr-U tra T₀ e T₁ e tra T₁ e T₂ con valori maggiori il venerdì a fine turno rispetto agli altri due tempi di campionamento. Riguardo il Cr-U le concentrazioni misurate erano leggermente superiori ai valori di riferimento per la popolazione generale [0.05-0.35 ug/L (5° and 95° percentile)] dalla SIVR [44]. Nel caso dei montatori dell'industria aeronautica non sono state riscontrate differenze significative dei valori di Cr-CAE e di Cr-U tra i tre tempi di campionamento e i valori di Cr-U sono risultati sovrapponibili ai valori di riferimento della SIVR per la popolazione generale. Nella popolazione di cromatori le concentrazioni di Cr-U non hanno mostrato differenze significative tra inizio e fine turno e i valori di fine turno sono risultati lievemente superiori ai valori di riferimento per la popolazione, ma inferiori a quelli misurati nella popolazione di saldatori. In tutte e tre le popolazioni di lavoratori i valori di Cr-U erano inferiori ai BEI (<10 µg/L differenza tra inizio e fine turno, 25 µg/L fine turno e fine settimana lavorativa) dell'ACGIH [40] e ai BLV (<5 µg/g creatinina differenza tra inizio e fine turno, 15 µg/g creatinina fine turno e fine settimana lavorativa) dello SCOEL [43].

Coerentemente con il basso livello di esposizione sia le concentrazioni di Cr-CAE che di Cr-U sono risultate più basse di quelle rilevate in altri studi. In un gruppo di cromatori reclutati precedentemente dal nostro gruppo ed esposti a concentrazioni di Cr-A pari a 0.078 (0.023) $\mu\text{g}/\text{m}^3$ [(media geometrica (deviazione geometrica standard))] i valori di Cr EBC e di Cr-U a fine turno e fine settimana lavorativa espressi in mediana (25°-75° percentile) erano rispettivamente di 7.8 (2.1-15.2) $\mu\text{g}/\text{L}$ e 9.0 (5.6-13.4) $\mu\text{g}/\text{g}$ di creatinina [187]. In un recente studio che ha incluso diverse categorie di lavoratori esposti a Cr VI, tra cui cromatori e addetti al taglio dei metalli al plasma, sono stati riscontrati valori di Cr-CAE e di Cr-U rispettivamente di 0.5 (2.98) $\mu\text{g}/\text{L}$ e 4.7 (20.4) $\mu\text{g}/\text{g}$ di creatinina [media (90° percentile)] [234].

Nella popolazione di saldatori le differenze delle concentrazioni di Cr-CAE nei tre tempi di campionamento indicano che anche bassi livelli di Cr-A possono causare modificazioni nei livelli di Cr-CAE. Questi risultati confermano quelli osservati in un gruppo di pazienti affetti da Ca polmonare non a piccole cellule ed esposti a bassissime concentrazioni di Cr rilasciate dalle clips chirurgiche durante l'intervento di asportazione della neoplasia. I valori di Cr-CAE misurati nei pazienti 2-4 giorni post-intervento erano significativamente maggiori rispetto ai valori determinati negli stessi pazienti prima dell'intervento e anche rispetto a quelli rilevati in un gruppo di controllo [235].

In 9 campioni di CAE di saldatori e in 8 campioni di CAE di montatori che mostravano concentrazioni di Cr T CAE rispettivamente comprese tra 0.43–0.91 e 0.25–0.78 $\mu\text{g}/\text{L}$, si è proceduto con la speciazione del Cr VI e solo in 2/9 dei saldatori e in 6/8 dei montatori sono state riscontrate concentrazioni $> \text{LOD}$ [0.15 (intervallo $< 0.1-0.25$)]. Questi risultati mostravano che erano presenti frazioni di Cr VI non ridotte (mediamente il 40% circa de totale) solo nei montatori mentre nei saldatori la maggior parte dei valori erano $< \text{LOD}$ indicando una minor esposizione a Cr VI. L'ottimizzazione del metodo ETAAS per la rilevazione del Cr VI quindi ha consentito di ridurre il LOD di un fattore 2 rispetto allo studio precedente [189]. Possiamo concludere pertanto che si tratta

di una metodica sufficientemente sensibile non solo per stimare l'esposizione a Cr VI ma anche per escluderla in caso di valori $< 0.1 \mu\text{g/L}$.

Inoltre, nei saldatori il Cr-A correlava sia con il Cr-CAE che con il Cr-U, coerentemente con il dato precedentemente pubblicato dal nostro gruppo sui cromatori. Questi risultati indicano che il Cr-CAE, come il Cr-U, può essere utilizzato come biomarcatore di esposizione. Una limitazione dello studio è stata l'impossibilità di effettuare il MA contestualmente al MB, tuttavia nel periodo intercorso le condizioni di lavoro erano rimaste stabili. Nei montatori dell'industria aeronautica invece il Cr-A correlava con il Cr-U ma non con il Cr-CAE; queste differenze potrebbero derivare da vie di esposizione diverse (cutanea) e dal corretto utilizzo dei DPI. La correlazione tra Cr-A e Cr-CAE è stata riscontrata nei saldatori ma non nei montatori dell'industria aeronautica. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che nelle attività di foratura e verniciatura il MMAD delle particelle generatesi è di circa $8 \mu\text{m}$ mentre la saldatura TIG produce prevalentemente nanoparticelle e i DP respiratori, presenti attualmente in commercio, non garantiscono un'adeguata protezione nei confronti delle particelle ultrafini. Inoltre i saldatori, sebbene utilizzassero gli schermi protettivi per le radiazioni e i DPC, indossavano i DP respiratori solo nelle aziende prive di aspiratori.

L'assenza di correlazione tra Cr-CAE e Cr-U in tutte e tre le categorie di lavoratori, in accordo con lo studio di Caglieri et al., potrebbe essere spiegata dalla complessa cinetica del cromo, soprattutto in seguito a lunghe esposizioni e dalla presenza di altre vie di assorbimento come quella cutanea.

Il Ni dosato nelle matrici biologiche dei saldatori è risultato nella maggior parte dei campioni di CAE $< \text{LOD}$ senza differenze tra i tre tempi, mentre nelle urine, sebbene siano state riscontrate concentrazioni significativamente maggiori al T_1 rispetto agli altri due tempi di campionamento, i valori erano sovrapponibili ai valori di riferimento SIVR per la popolazione generale [(0.1-5 $\mu\text{g/L}$ (5° e 95° percentile)]. Questi dati ancora una volta riflettono la bassa esposizione. Inoltre, i fumi che si generano dalla saldatura di acciaio inox contengono approssimativamente il 57 % di Fe, il 20% di Cr,

il 14% di Mn e solo il 10 % di Ni [236]. Queste percentuali spiegherebbero i diversi livelli di Cr-U e Ni U e di Cr-CAE e Ni-CAE riscontrate nella popolazione dei saldatori.

Riguardo i biomarcatori di effetto, nei saldatori il H₂O₂ CAE sembrerebbe essere influenzato dal singolo turno lavorativo, mentre la MDA risentirebbe dell'intera settimana lavorativa. Tuttavia, seppur debolmente, i due biomarcatori di effetto sono correlati tra loro ($r=0.134$ e $p=0.021$) ad indicare una possibile produzione concomitante degli stessi. Anche la HNE come la MDA sembrerebbe essere influenzata dalla settimana di lavoro e data la correlazione riscontrata tra i due biomarcatori è possibile supportare l'ipotesi di un via comune di stress ossidativo. I dati presenti in letteratura a tal riguardo mostrano risultati parzialmente contrastanti. In un precedente studio su due gruppi di saldatori esposti rispettivamente a fumi di Al/Fe e a fumi di Cd/Cr/Fe/Pb/Mn/Ni erano state osservate concentrazioni di H₂O₂ CAE significativamente maggiori in entrambi i gruppi di saldatori rispetto ad un gruppo di controllo [237]. In altri due studi invece non erano emerse differenze nelle concentrazioni di H₂O₂ CAE e MDA CAE tra saldatori e controlli e neppure nei saldatori tra diversi tempi di campionamento [73, 238]. Erano, tuttavia, diverse le condizioni di esposizioni: Nello studio di Graczyk et al. erano stati reclutati solo saldatori apprendisti esposti a fumi generati dalla saldatura TIG [73], mentre nello studio di Brand et al. giovani volontari erano stati esposti a fumi generati dalla saldatura MAG di acciaio legato [238]. In entrambi i casi si trattava di studi controllati, lo studio attuale invece è stato svolto durante una reale giornata di lavoro e 98/100 dei saldatori reclutati erano esperti, impiegati da tempo in questa mansione.

Nei montatori dell'industria aeronautica il H₂O₂ ha evidenziato una tendenza ad aumentare all'interno del singolo turno di lavoro sebbene le differenze riscontrate non abbiano raggiunto la significatività statistica. La MDA ha mostrato differenze significative tra tutti e tre i tempi di campionamento, mentre la HNE ha mostrato differenze tra i tempi T₀ e T₁. I valori di MDA e HNE sono risultati più alti il venerdì a fine turno rispetto agli altri due tempi, sembrerebbero quindi essere influenzate maggiormente dall'intera settimana lavorativa piuttosto che dal singolo turno. La correlazione tra

MDA e HNE riscontrata anche in questo gruppo conferma la produzione contemporanea degli stessi. Nei cromatori è stato preso in considerazione solo il singolo turno e i biomarcatori di effetto dosati nel CAE non hanno mostrato variazioni. Nel precedente studio del nostro gruppo invece sia il H₂O₂ CAE che la MDA erano influenzati dall'intera settimana di lavoro. Queste differenze sono da attribuire al diverso grado di esposizione, dovuto anche alla diversa tipologia di cromatura, manuale nello studio precedente ed automatizzata nello studio attuale, nel quale, tra l'altro, i biomarcatori non sono stati valutati in relazione alla settimana di lavoro, ma all'interno del singolo turno.

In nessuna delle tre popolazioni di lavoratori sono state evidenziate correlazioni tra i biomarcatori di effetto e di esposizione dosati nel CAE. Questi risultati lascerebbero ipotizzare che l'andamento della MDA e del H₂O₂ sia determinato da altri irritanti come ad esempio nel caso dei saldatori dal particolato ultrafine o dall'ozono. La saldatura TIG difatti genera maggiori quantità di ozono e particolato fine ed ultrafine rispetto ad altri tipi di saldatura [49, 53].

Mediante lo strumento *Lung Vision* nel CAE dei saldatori sono state dosate 4 classi dimensionali di PM da 10 a 0.3 µm e, sebbene non siano emerse differenze tra i tre tempi di campionamento, i valori sono risultati maggiori rispetto a quelli determinati nel gruppo di controllo. Le differenze di PM CAE emerse tra i saldatori ed i controlli potrebbero quindi far ipotizzare: una produzione endogena da infiammazione cronica; una produzione esogena da esposizione alle particelle derivanti dall'aggregazione di particelle di dimensioni inferiori presenti nei fumi; una produzione esogena da esposizione al particolato che si genera in corso di altre attività quali la molatura. La debole correlazione emersa tra PM_{2.5} e Cr-CAE, riconferma la scarsa esposizione a fumi di saldatura. Nessuna correlazione è emersa tra PM e biomarcatori di effetto nel CAE. Un limite dello strumento è però quello di non riuscire a vedere particelle di diametro inferiore a 0.3 µm, e nel caso di esposizione a fumi di saldatura TIG sarebbe invece interessante dosare classi dimensionali inferiori di PM, dell'ordine delle nanoparticelle, per correlarle con i biomarcatori di stress ossidativo misurati nel CAE:

Gli indicatori di danno ossidativo agli acidi nucleici, dosati nelle urine ed espresse come rapporto tra forma ossidata e forma non ossidata, hanno mostrato variazioni sia in relazione al tempo di campionamento che rispetto alla popolazione di controlli. In particolare il rapporto 8-oxoGuo/Guo sia nei saldatori che nei montatori è influenzato dal singolo turno lavorativo e nei cromatori, anche se non sono emerse differenze significative, ha presentato un comportamento analogo. Nei saldatori anche l'8-oxodGuo ha risentito dell'influenza del singolo turno di lavoro e sono stati riscontrati livelli superiori in tutti e tre i tempi di campionamento rispetto a quelli determinati nella popolazione di controllo. Nelle altre 2 categorie di lavoratori il rapporto 8-oxodGuo/dGuo non ha evidenziato differenze significative né tra i tempi di campionamento né rispetto alla popolazione di controllo, tuttavia nei cromatori è stata osservata una tendenza all'aumento tra inizio e fine turno. La significatività dei livelli di 8-oxodGuo/dGuo riscontrata tra i tre tempi nei saldatori, ma non nelle altre due categorie di lavoratori, potrebbe essere attribuita al diverso livello di esposizione a Cr, superiore nei saldatori rispetto alle altre due categorie. Abbiamo inoltre escluso l'influenza del fumo di sigaretta sull'escrezione delle diverse forme ossidate della guanina (dati non mostrati). Nonostante la bassa esposizione, come riportato nello studio di Andreoli et al. su volontari sani, l'escrezione urinaria delle diverse forme della guanina non segue un ritmo circadiano [220], per cui le variazioni riscontrate sono da attribuire alla presenza del Cr ma anche ad altre sostanze ossidanti nell'ambiente di lavoro.

L'assenza di differenze significative dei rapporti oxoGua/Gua e 8-oxoGuo/Guo tra i lavoratori ed i controlli può essere spiegata con la maggior escrezione delle basi immodificate nei controlli rispetto alla popolazione esposta (dati non mostrati) verosimilmente a causa di un maggior turnover degli acidi nucleici. Ad avvalorare l'ipotesi è il fatto che, sebbene l'andamento del rapporto 8-oxoGua/Gua sia risultato maggiore ad inizio turno rispetto a fine turno in tutte e tre le categorie di lavoratori, se consideriamo la 8-oxoGua non espressa in rapporto alla forma non ossidata, i risultati mostrano un andamento opposto. In particolare i valori risultano maggiori ad inizio turno rispetto alla fine turno

di lavoro e raggiungono la significatività statistica nei montatori e nei saldatori ad indicare come nella popolazione esposta sia presente una maggiore escrezione della forma ossidata della guanina libera rispetto alla forma nativa.

Nei saldatori le differenze del rapporto 8-oxodGuo/dGuo tra i tempi di campionamento e i livelli significativamente maggiori rispetto ai controlli sosterebbero l'ipotesi di un'aumentata escrezione della forma ossidata in relazione all'esposizione a fumi di saldatura. Questi risultati sono in accordo con quanto descritto in letteratura. Nello studio di Graczyk et al. era stato valutato l'effetto dell'esposizione in saldatori apprendisti, dimostrando un significativo aumento delle concentrazioni plasmatiche e urinarie di H₂O₂ e di 8-oxodGuo rispettivamente dopo 60 minuti e 3 ore dall'inizio dell'attività di saldatura [73]. Nello studio WELDOX condotto su 238 saldatori è stata dimostrata un'associazione tra esposizione a Cr presente nei fumi di saldatura ed escrezione urinaria di 8-oxoGuo e 8-oxodGuo [225].

Per quanto riguarda le correlazioni, la 8-oxodGuo e il Cr-U correlavano positivamente nei saldatori al T₁ e nei cromatori in entrambi i tempi di campionamento. La possibilità di utilizzare l'8-oxodGuo come biomarcatore di effetto da esposizione a Cr era già stata evidenziata in un precedente studio su un gruppo di cromatori che mostravano concentrazioni di 8-oxodGuo maggiori rispetto a quelle misurate in un gruppo di controllo e queste correlavano con le concentrazioni urinarie ed ambientali di Cr [226].

La correlazione tra 8-oxodGuo e cromo al T₁ nei saldatori indicherebbe una possibile associazione tra un danno ossidativo di tipo acuto agli acidi nucleici a fronte di un'esposizione seppur bassa a Cr. Invece, la correlazione tra 8-oxoGuo e Cr in tutti i tempi di campionamento e in tutte le categorie di lavoratori indicherebbe un danno ossidativo costante indotto dall'esposizione continuativa seppur a basse dosi di Cr. L'ipotesi scaturisce dal fatto che l'8-oxoGuo deriva prevalentemente dal danno e/o dalla riparazione dell'RNA che, data la sua localizzazione citoplasmatica e le sue proprietà strutturali

(monofilo, basi non protette da legami ad idrogeno né a proteine strutturali), è più suscettibile agli insulti ossidativi rispetto al DNA [215, 239].

15. CONCLUSIONI

Le tre categorie di lavoratori analizzate in questo studio erano esposte a bassi dosi di Cr, come rilevato dai dati del MA. Tuttavia, nonostante la bassa esposizione, nei saldatori il Cr-CAE e il Cr-U hanno mostrato variazioni significative tra gli stessi tempi di campionamento, mentre nei montatori dell'industria aeronautica e nei cromatori, esposti a concentrazioni inferiori di Cr-A rispetto ai saldatori, non sono emerse differenze significative. Questi risultati e le correlazioni del Cr-A sia con il Cr-CAE che con il Cr-U nei saldatori confermano la possibilità di poter utilizzare il Cr-CAE come biomarcatore di esposizione nella valutazione della dose al bersaglio. Oltre che per la determinazione del Cr ed eventualmente di altri metalli, il CAE può essere utile per quantificare lo stress ossidativo ed identificare i soggetti ipersuscettibili per i quali sono necessarie misure di prevenzione aggiuntive. In questo studio sono state riscontrate variazioni giornaliere e/o settimanali dei biomarcatori H₂O₂, MDA e HNE, ma nessuna correlazione tra questi e il Cr-CAE, per cui altre sostanze tossiche, come l'ozono (nel caso dei saldatori) e il particolato, presenti negli ambienti di lavoro possono essere causa di queste alterazioni. I risultati confermano quindi la possibilità di poter utilizzare il CAE per indagare contemporaneamente indicatori di esposizione (i metalli) e di effetto (*markers* di stress ossidativo) direttamente a livello dell'organo bersaglio, consentendoci quindi di ottenere valori più rappresentativi del reale danno polmonare. Le variazioni dei rapporti delle diverse forme ossidate e native della guanina tra i tempi di campionamento e le differenze emerse tra i saldatori e la popolazione di controllo, ci ha permesso di dimostrare che, nonostante la bassa esposizione, è presente un aumento del danno ossidativo a livello degli acidi nucleici, che si traduce in aumentata attività dei meccanismi di riparo e/o del turnover cellulare e di conseguenza in un incremento dell'escrezione nelle urine delle forme ossidate della guanina. Queste alterazioni sembrerebbero essere in parte dovute al Cr come mostrato dalle correlazioni riscontrate tra Cr-U e le forme ossidate della guanosina (8-oxoGuo e 8-oxodGuo). In questo studio, nonostante i bassi livelli di Cr-A, i dati sui saldatori hanno mostrato differenze delle concentrazioni di Cr-EBC tra i diversi tempi di

campionamento, indicando così che il Cr-EBC è un biomarcatore sensibile di esposizione. Il Cr VI è stato determinato solo in 2/9 e in 6/8 rispettivamente dei campioni di CAE dei saldatori e dei montatori e grazie all'ottimizzazione della metodica è stato possibile non solo stimare l'esposizione a Cr VI ma anche escluderla per valori $< 0.1 \mu\text{g/L}$. Le differenze riscontrate dei biomarcatori di effetto nel CAE e dei biomarcatori di danno ossidativo agli acidi nucleici nelle urine tra i tempi di campionamento indicano un'alterazione dell'equilibrio del sistema ossidante/antiossidante che non può tuttavia essere attribuito al Cr VI, il che suggerisce l'esistenza di ulteriori fattori di rischio professionali in grado di determinare effetti indesiderati.

BIBLIOGRAFIA

1. Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale (SIMLII). 2013. Linee guida per il monitoraggio biologico. Nuova Editrice Berti.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2012. A review of human carcinogens. Chromium (VI) compounds. Volume 100c. Lyon, France. World Health Organization.
3. Guha N, Loomis D, Guyton KZ, *et al.* Carcinogenicity of welding, molybdenum trioxide, and indium tin oxide *Lancet Oncol* 2017;18:581-582.
4. Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. Human biomonitoring: state of the art *Int J Hyg Environ Health* 2007;210:201-228.
5. Manini P, De Palma G, Mutti A. Exposure assessment at the workplace: implications of biological variability *Toxicol Lett* 2007;168:210-218.
6. Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council *Environ Health Perspect* 1987;74:3-9.
7. Aitio A. Guidance values for the biomonitoring of occupational exposure. State of the art *Med Lav* 2006;97:324-331.
8. Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium *Toxicology* 2002;180:5-22.
9. De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Znacchi P. Genotoxicity of chromium compounds. A review *Mutat Res* 1990;238:99-172.
10. Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). 2012. Toxicological Profile for Chromium. Atlanta, USA.
11. De Flora S, Camoirano A, Bagnasco M, Bennicelli C, Corbett GE, Kerger BD. Estimates of the chromium(VI) reducing capacity in human body compartments as a mechanism for attenuating its potential toxicity and carcinogenicity *Carcinogenesis* 1997;18:531-537.

12. De Flora S. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis *Carcinogenesis* 2000;21:533-541.
13. Goldoni M, Caglieri A, De Palma G, *et al.* Chromium in exhaled breath condensate (EBC), erythrocytes, plasma and urine in the biomonitoring of chrome-plating workers exposed to soluble Cr(VI) *J Environ Monit* 2010;12:442-447.
14. O'Brien TJ, Ceryak S, Patierno SR. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms *Mutat Res* 2003;533:3-36.
15. Zhitkovich A. Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI) *Chem Res Toxicol* 2005;18:3-11.
16. International Agency for Research of Cancer (IARC). 1990. Chromium, Nickel and Welding. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 49. Lyon, France. World Health Organization.
17. Welinder H, Littorin M, Gullberg B, Skerfving S. Elimination of chromium in urine after stainless steel welding *Scand J Work Environ Health* 1983;9:397-403.
18. Schaller KH, Csanady G, Filser J, Jüngert B, Drexler H. Elimination kinetics of metals after an accidental exposure to welding fumes *Int Arch Occup Environ Health* 2007;80:635-641.
19. Baruthio F. Toxic effects of chromium and its compounds *Biol Trace Elem Res* 1992;32:145-153.
20. Chiu A, Shi XL, Lee WK, *et al.* Review of chromium (VI) apoptosis, cell-cycle-arrest, and carcinogenesis *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2010;28:188-230.
21. Sun H, Brocato J, Costa M. Oral Chromium Exposure and Toxicity *Curr Environ Health Rep* 2015;2:295-303.
22. Franchini I, Mutti A. Selected toxicological aspects of chromium(VI) compounds *Sci Total Environ* 1988;71:379-387.

23. Foa V, Riboldi L, Patroni M, Zocchetti C, Sbrana C, Mutti A. Effects derived from long-term low-level chromium exposure in ferro-alloy metallurgy. Study of absorption and renal function in workers *Sci Total Environ* 1988;71:389-400.
24. Shelnutt SR, Goad P, Belsito DV. Dermatological toxicity of hexavalent chromium *Crit Rev Toxicol* 2007;37:375-387.
25. Birk T, Mundt KA, Dell LD, *et al.* Lung cancer mortality in the German chromate industry, 1958 to 1998 *J Occup Environ Med* 2006;48:426-433.
26. Rosenman KD, Stanbury M. Risk of lung cancer among former chromium smelter workers *Am J Ind Med* 1996;29:491-500.
27. Davies JM. Lung cancer mortality among workers making lead chromate and zinc chromate pigments at three English factories *Br J Ind Med* 1984;41:158-169.
28. Deschamps F, Moulin JJ, Wild P, Labriffe H, Haguenoer JM. Mortality study among workers producing chromate pigments in France *Int Arch Occup Environ Health* 1995;67:147-152.
29. Franchini I, Magnani F, Mutti A. Mortality experience among chromeplating workers. Initial findings *Scand J Work Environ Health* 1983;9:247-252.
30. Sorahan T, Burges DC, Hamilton L, Harrington JM. Lung cancer mortality in nickel/chromium platers, 1946-95 *Occup Environ Med* 1998;55:236-242.
31. Milatou-Smith R, Gustavsson A, Sjögren B. Mortality among Welders Exposed to High and to Low Levels of Hexavalent Chromium and Followed for More Than 20 Years *Int J Occup Environ Health* 1997;3:128-131.
32. 't Mannetje A, Brennan P, Zaridze D, *et al.* Welding and lung cancer in Central and Eastern Europe and the United Kingdom *Am J Epidemiol* 2012;175:706-714.
33. Aiyar J, Berkovits HJ, Floyd RA, Wetterhahn KE. Reaction of chromium(VI) with glutathione or with hydrogen peroxide: identification of reactive intermediates and their role in chromium(VI)-induced DNA damage *Environ Health Perspect* 1991;92:53-62.

34. Proctor DM, Suh M, Campleman SL, Thompson CM. Assessment of the mode of action for hexavalent chromium-induced lung cancer following inhalation exposures *Toxicology* 2014;325:160-179.
35. Wedeen RP, Qian LF. Chromium-induced kidney disease *Environ Health Perspect* 1991;92:71-74.
36. Mutti A, Corradi M. 2014. *Lezioni di Medicina del Lavoro*. Nuova Editrice Berti. Piacenza.
37. Smith CJ, Livingston SD, Doolittle DJ. An international literature survey of "IARC Group I carcinogens" reported in mainstream cigarette smoke *Food Chem Toxicol* 1997;35:1107-1130.
38. Feng Z, Hu W, Rom WN, Costa M, Tang MS. Chromium(VI) exposure enhances polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA binding at the p53 gene in human lung cells *Carcinogenesis* 2003;24:771-778.
39. Hu W, Feng Z, Tang MS. Chromium(VI) enhances (+/-)-anti-7beta,8alpha-dihydroxy-9alpha,10alpha-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene-induced cytotoxicity and mutagenicity in mammalian cells through its inhibitory effect on nucleotide excision repair *Biochemistry* 2004;43:14282-14289.
40. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). 2012. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposures indices. Cincinnati, OH.
41. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). 2013. Criteria for a Recommended Standard: Occupational Exposure to Hexavalent Chromium.
42. Occupational Safety & Health Administration (OSHA). 2006. Chromium (VI). Standard n° 1910.1026. Washington, USA.

43. Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL). 2004. Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits: Risk assessment for Heavalent Chromium. SCOEL/SUM/86.
44. Società Italiana Valori di Riferimento (SIVR). 2011. Terza lista dei valori di riferimento per elementi, composti organici e loro metaboliti.
45. American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)- 2001. Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposures indices. Cincinnati, OH.
46. Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG). 2014. List of MAK and BAT Values. Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area. Report No. 50
47. American Welding Society (AWS). 1979. Effects of Welding on Health. Miami, IL.
48. Lippold JC. 2015. Welding Metallurgy and Weldability. Welding Metallurgy Principles. Chapter 2. Ed. Wiley.
49. Antonini JM, Lewis AB, Roberts JR, Whaley DA. Pulmonary effects of welding fumes: review of worker and experimental animal studies *Am J Ind Med* 2003;43:350-360.
50. American Welding Society (AWS). Welding Handbook. Ninth Ed., Volume 1. Jenney CL, O'Brien A. Editors. Miami.
51. American Welding Society (AWS). Welding Handbook. Ninth Ed., Volume 2. Welding processes, part 1. Gas tungsten arc welding. O'Brien A Editor.
52. Zimmer AT, Biswas P. Characterization of the aerosols resulting from arc welding processes. *J Aerosol Sci* 2001;3:993-1008.
53. Brand P, Lenz K, Reisgen U, Kraus T. Number size distribution of fine and ultrafine fume particles from various welding processes *Ann Occup Hyg* 2013;57:305-313.

54. Berlinger B, Benker N, Weinbruch S, *et al.* Physicochemical characterisation of different welding aerosols *Anal Bioanal Chem* 2011;399:1773-1780.
55. Cena LG, Chisholm WP, Keane MJ, Cumpston A, Chen BT. Size Distribution and Estimated Respiratory Deposition of Total Chromium, Hexavalent Chromium, Manganese, and Nickel in Gas Metal Arc Welding Fume Aerosols *Aerosol Sci Technol* 2014;48:1254-1263.
56. Valentin J. International Commission on Radiological Protection (ICRP): guide for the practical application of the ICRP Human Respiratory Tract Model. A report of ICRP supporting guidance 3: approved by ICRP committee 2 in October 2000. *Ann ICRP*. 2002;32(1-2):13-306.
57. Goldoni M, Acampa O, Longo S, *et al.* Inter- and intra-subject variability of kinetics of airway exhalation and deposition of particulate matter in indoor polluted environments *Int J Hyg Environ Health* 2012;215:312-319.
58. Cena LG, Chisholm WP, Keane MJ, Chen BT. A Field Study on the Respiratory Deposition of the Nano-Sized Fraction of Mild and Stainless Steel Welding Fume Metals *J Occup Environ Hyg* 2015;12:721-728.
59. Möller W, Felten K, Sommerer K, *et al.* Deposition, retention, and translocation of ultrafine particles from the central airways and lung periphery *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177:426-432.
60. Kreyling WG, Semmler-Behnke M, Takenaka S, Möller W. Differences in the biokinetics of inhaled nano- versus micrometer-sized particles *Acc Chem Res* 2013;46:714-722.
61. Hinds WC. 1999. Aerosol technology-properties, behavior, and measurement of airborne particles. Wile Interscience publication. Second Ed. USA.
62. Yu CP, Chen YK, Morrow PE. An analysis of alveolar macrophage mobility kinetics at dust overloading of the lungs *Fundam Appl Toxicol* 1989;13:452-459.

63. Morrow PE. Possible mechanisms to explain dust overloading of the lungs *Fundam Appl Toxicol* 1988;10:369-384.
64. Chang C, Demokritou P, Shafer M, Christiani D. Physicochemical and toxicological characteristics of welding fume derived particles generated from real time welding processes *Environ Sci Process Impacts* 2013;15:214-224.
65. Graczyk H, Lewinski N, Zhao J, Concha-Lozano N, Riediker M. Characterization of Tungsten Inert Gas (TIG) Welding Fume Generated by Apprentice Welders *Ann Occup Hyg* 2016;60:205-219.
66. Antonini JM. Health effects of welding *Crit Rev Toxicol* 2003;33:61-103.
67. Kalliomäki PL, Hyvärinen HK, Aitio A, Lakoma EL, Kalliomäki K. Kinetics of the metal components of intratracheally instilled stainless steel welding fume suspensions in rats *Br J Ind Med* 1986;43:112-119.
68. Nakashima H, Utsunomiya A, Takahashi J, Fujii N, Okuno T. Hazard of ultraviolet radiation emitted in gas metal arc welding of mild steel *J Occup Health* 2016;58:452-459.
69. Yamaguchi-Sekino S, Ojima J, Sekino M, Hojo M, Saito H, Okuno T. Measuring exposed magnetic fields of welders in working time *Ind Health* 2011;49:274-279.
70. Iarmarcovai G, Sari-Minodier I, Chaspoul F, *et al.* Risk assessment of welders using analysis of eight metals by ICP-MS in blood and urine and DNA damage evaluation by the comet and micronucleus assays; influence of XRCC1 and XRCC3 polymorphisms *Mutagenesis* 2005;20:425-432.
71. Jara-Ettinger AC, López-Tavera JC, Zavala-Cerna MG, Torres-Bugarín O. Genotoxic Evaluation of Mexican Welders Occupationally Exposed to Welding-Fumes Using the Micronucleus Test on Exfoliated Oral Mucosa Cells: A Cross-Sectional, Case-Control Study *PLoS One* 2015;10:e0131548.

72. Nuernberg AM, Boyce PD, Cavallari JM, Fang SC, Eisen EA, Christiani DC. Urinary 8-isoprostane and 8-OHdG concentrations in boilermakers with welding exposure *J Occup Environ Med* 2008;50:182-189.
73. Graczyk H, Lewinski N, Zhao J, *et al.* Increase in oxidative stress levels following welding fume inhalation: a controlled human exposure study *Part Fibre Toxicol* 2016;13:31.
74. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2012. Radiation. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Volume 100D. Lyon, France. World Health Organization.
75. Agency for toxic substances and disease registry (ATSDR). 2005. Toxicology Profile for Nickel. Atlanta, USA.
76. Schaumlöffel D. Nickel species: analysis and toxic effects *J Trace Elem Med Biol* 2012;26:1-6.
77. Tossavainen A, Nurminen M, Mutanen P, Tola S. Application of mathematical modelling for assessing the biological half-times of chromium and nickel in field studies *Br J Ind Med* 1980;37:285-291.
78. Sunderman FW, Aitio A, Morgan LG, Norseth T. Biological monitoring of nickel *Toxicol Ind Health* 1986;2:17-78.
79. Lu H, Shi X, Costa M, Huang C. Carcinogenic effect of nickel compounds *Mol Cell Biochem* 2005;279:45-67.
80. Harnett PB, Robison SH, Swartzendruber DE, Costa M. Comparison of protein, RNA, and DNA binding and cell-cycle-specific growth inhibitory effects of nickel compounds in cultured cells *Toxicol Appl Pharmacol* 1982;64:20-30.
81. Robert R, Lauwerys P, Hoet I. 2001. Industrial chemical exposure guide lines for biological monitoring. Third Ed. 158-164. Lewis Pub. London.
82. Jensen CS, Menné T, Lisby S, Kristiansen J, Veien NK. Experimental systemic contact dermatitis from nickel: a dose-response study *Contact Dermatitis* 2003;49:124-132.

83. Grimsrud TK, Peto J. Persisting risk of nickel related lung cancer and nasal cancer among Clydach refiners *Occup Environ Med* 2006;63:365-366.
84. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2012. A review of human carcinogens. Nickel and nickel compounds. Volume 100c. Lyon, France. World Health Organization.
85. Comunità Europea (CE). 2006. Lista delle sostanze classificate cancerogene e/o mutagene dalla CE nel 28° adeguamento alla direttiva 67/548/CEE.
86. Kasprzak KS, Sunderman FW, Salnikow K. Nickel carcinogenesis *Mutat Res* 2003;533:67-97.
87. Cameron KS, Buchner V, Tchounwou PB. Exploring the molecular mechanisms of nickel-induced genotoxicity and carcinogenicity: a literature review *Rev Environ Health* 2011;26:81-92.
88. Yao Y, Costa M. Toxicogenomic effect of nickel and beyond *Arch Toxicol* 2014;88:1645-1650.
89. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). 1978. Occupational Health Guideline for Nickel Metal and Soluble Nickel compounds.
90. Occupational Safety & Health Administration (OSHA). 2017. Nickel. Standard n° 1910.1000. Washington, USA.
91. Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL). 2011. Recommendation Recommendation from the Scientific Committee on Occupational Exposure Limits for nickel and inorganic nickel compounds. SCOEL/SUM/85.
92. Hulo S, Chérot-Kornobis N, Howsam M, *et al.* Manganese in exhaled breath condensate: a new marker of exposure to welding fumes *Toxicol Lett* 2014;226:63-69.
93. Romano A, Aiani MR, Brambilla M, *et al.* [Metabolomic profiles of exhaled breath condensate of 39 nickel exposed workers] *G Ital Med Lav Ergon* 2012;34:682-686.
94. Ahsan SA, Lackovic M, Katner A, Palermo C. Metal fume fever: a review of the literature and cases reported to the Louisiana Poison Control Center *J La State Med Soc* 2009;161:348-351.

95. Billings CG, Howard P. Occupational siderosis and welders' lung: a review *Monaldi Arch Chest Dis* 1993;48:304-314.
96. Christensen SW, Bonde JP, Omland O. A prospective study of decline in lung function in relation to welding emissions *J Occup Med Toxicol* 2008;3:6.
97. Suri R, Periselneris J, Lanone S, *et al.* Exposure to welding fumes and lower airway infection with *Streptococcus pneumoniae* *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:527-534.e527.
98. Torén K, Qvarfordt I, Bergdahl IA, Järholm B. Increased mortality from infectious pneumonia after occupational exposure to inorganic dust, metal fumes and chemicals *Thorax* 2011;66:992-996.
99. Bakerly ND, Moore VC, Vellore AD, Jaakkola MS, Robertson AS, Burge PS. Fifteen-year trends in occupational asthma: data from the Shield surveillance scheme *Occup Med (Lond)* 2008;58:169-174.
100. El-Zein M, Malo JL, Infante-Rivard C, Gautrin D. Incidence of probable occupational asthma and changes in airway calibre and responsiveness in apprentice welders *Eur Respir J* 2003;22:513-518.
101. Holm M, Kim JL, Lillienberg L, *et al.* Incidence and prevalence of chronic bronchitis: impact of smoking and welding. The RHINE study *Int J Tuberc Lung Dis* 2012;16:553-557.
102. Blanc PD, Menezes AM, Plana E, *et al.* Occupational exposures and COPD: an ecological analysis of international data *Eur Respir J* 2009;33:298-304.
103. Blanc PD, Boushey HA, Wong H, Wintermeyer SF, Bernstein MS. Cytokines in metal fume fever *Am Rev Respir Dis* 1993;147:134-138.
104. Doig At, Challen PJ. Respiratory hazards in welding. *Ann Occup Hyg* 1964;7:223-231.
105. Palmer KT, Poole J, Ayres JG, Mann J, Burge PS, Coggon D. Exposure to metal fume and infectious pneumonia *Am J Epidemiol* 2003;157:227-233.

106. Palmer KT, Cullinan P, Rice S, Brown T, Coggon D. Mortality from infectious pneumonia in metal workers: a comparison with deaths from asthma in occupations exposed to respiratory sensitisers *Thorax* 2009;64:983-986.
107. van der Poll T, Opal SM. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia *Lancet* 2009;374:1543-1556.
108. Health and Safety Executive (HSE). 2014. Pneumonia vaccination for employees exposed to welding and metal fume. London, UK.
109. Coggon D, Harris EC, Cox V, Palmer KT. Pneumococcal vaccination for welders *Thorax* 2015;70:198-199.
110. Chinn DJ, Stevenson IC, Cotes JE. Longitudinal respiratory survey of shipyard workers: effects of trade and atopic status *Br J Ind Med* 1990;47:83-90.
111. Haluza D, Moshammer H, Hochgatterer K. Dust is in the air. Part II: Effects of occupational exposure to welding fumes on lung function in a 9-year study. *Lung* 2014;192.
112. Meo SA. Spirometric evaluation of lung function (maximal voluntary ventilation) in welding workers *Saudi Med J* 2003;24:656-659.
113. Skoczyńska A, Gruszczyński L, Wojakowska A, Ścieszka M, Turczyn B, Schmidt E. Association between the Type of Workplace and Lung Function in Copper Miners *Biomed Res Int* 2016;2016:5928572.
114. Sobaszek A, Edme JL, Boulenguez C, *et al.* Respiratory symptoms and pulmonary function among stainless steel welders *J Occup Environ Med* 1998;40:223-229.
115. Szram J, Schofield SJ, Cosgrove MP, Cullinan P. Welding, longitudinal lung function decline and chronic respiratory symptoms: a systematic review of cohort studies *Eur Respir J* 2013;42:1186-1193.
116. Baur X, Sigsgaard T, Aasen TB, *et al.* Guidelines for the management of work-related asthma *Eur Respir J* 2012;39:529-545.

117. Beach JR, Dennis JH, Avery AJ, *et al.* An epidemiologic investigation of asthma in welders *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1394-1400.
118. Lillienberg L, Zock JP, Kromhout H, *et al.* A population-based study on welding exposures at work and respiratory symptoms *Ann Occup Hyg* 2008;52:107-115.
119. Kristiansen P, Jørgensen KT, Hansen J, Bonde JP. Redemption of asthma pharmaceuticals among stainless steel and mild steel welders: a nationwide follow-up study *Int Arch Occup Environ Health* 2015;88:743-750.
120. Hannu T, Piipari R, Tuppurainen M, Nordman H, Tuomi T. Occupational asthma caused by stainless steel welding fumes: a clinical study *Eur Respir J* 2007;29:85-90.
121. Wittczak T, Dudek W, Walusiak-Skorupa J, *et al.* Metal-induced asthma and chest X-ray changes in welders *Int J Occup Med Environ Health* 2012;25:242-250.
122. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, *et al.* Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:557-582.
123. Fidan F, Unlü M, Köken T, *et al.* Oxidant-antioxidant status and pulmonary function in welding workers *J Occup Health* 2005;47:286-292.
124. Meldrum M, Rawbone R, Curran AD, Fishwick D. The role of occupation in the development of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) *Occup Environ Med* 2005;62:212-214.
125. Salvi SS, Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease in non-smokers *Lancet* 2009;374:733-743.
126. Whittemore AS, Perlin SA, DiCiccio Y. Chronic obstructive pulmonary disease in lifelong nonsmokers: results from NHANES *Am J Public Health* 1995;85:702-706.
127. Hnizdo E, Sullivan PA, Bang KM, Wagner G. Association between chronic obstructive pulmonary disease and employment by industry and occupation in the US population: a study

- of data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey *Am J Epidemiol* 2002;156:738-746.
128. Koh DH, Kim JI, Kim KH, Yoo SW, Group KWC. Welding fume exposure and chronic obstructive pulmonary disease in welders *Occup Med (Lond)* 2015;65:72-77.
 129. Cosgrove MP. Pulmonary fibrosis and exposure to steel welding fume *Occup Med (Lond)* 2015;65:706-712.
 130. Godbert B, Wissler MP, Vignaud JM. Desquamative interstitial pneumonia: an analytic review with an emphasis on aetiology *Eur Respir Rev* 2013;22:117-123.
 131. Ambroise D, Wild P, Moulin JJ. Update of a meta-analysis on lung cancer and welding *Scand J Work Environ Health* 2006;32:22-31.
 132. Simonato L, Fletcher AC, Andersen A, *et al.* A historical prospective study of European stainless steel, mild steel, and shipyard welders *Br J Ind Med* 1991;48:145-154.
 133. Moulin JJ. A meta-analysis of epidemiologic studies of lung cancer in welders *Scand J Work Environ Health* 1997;23:104-113.
 134. Hansen KS, Lauritsen JM, Skytthe A. Cancer incidence among mild steel and stainless steel welders and other metal workers *Am J Ind Med* 1996;30:373-382.
 135. Langård S. Nickel-related cancer in welders *Sci Total Environ* 1994;148:303-309.
 136. Sørensen AR, Thulstrup AM, Hansen J, *et al.* Risk of lung cancer according to mild steel and stainless steel welding *Scand J Work Environ Health* 2007;33:379-386.
 137. Moulin JJ, Wild P, Haguenoer JM, *et al.* A mortality study among mild steel and stainless steel welders *Br J Ind Med* 1993;50:234-243.
 138. Beaumont JJ, Weiss NS. Lung cancer among welders. *J Occup Med.* 1981; 23(12):839-844.
 139. Danielsen TE, Langård S, Andersen A. Incidence of cancer among welders and other shipyard workers with information on previous work history *J Occup Environ Med* 2000;42:101-109.

140. Becker N. Cancer mortality among arc welders exposed to fumes containing chromium and nickel. Results of a third follow-up: 1989-1995 *J Occup Environ Med* 1999;41:294-303.
141. Danielsen TE, Langård S, Andersen A. Incidence of cancer among Norwegian boiler welders *Occup Environ Med* 1996;53:231-234.
142. Richiardi L, Boffetta P, Simonato L, *et al.* Occupational risk factors for lung cancer in men and women: a population-based case-control study in Italy *Cancer Causes Control* 2004;15:285-294.
143. Vallières E, Pintos J, Lavoué J, Parent M, Rachet B, Siemiatycki J. Exposure to welding fumes increases lung cancer risk among light smokers but not among heavy smokers: evidence from two case-control studies in Montreal *Cancer Med* 2012;1:47-58.
144. Wong JYY, Bassig BA, Seow WJ, *et al.* Lung cancer risk in welders and foundry workers with a history of heavy smoking in the USA: The National Lung Screening Trial *Occup Environ Med* 2017;74:440-448.
145. Kendzia B, Behrens T, Jöckel KH, *et al.* Welding and lung cancer in a pooled analysis of case-control studies *Am J Epidemiol* 2013;178:1513-1525.
146. Sankila RJ, Karjalainen ES, Oksanen HM, Hakulinen TR, Teppo LH. Relationship between occupation and lung cancer as analyzed by age and histologic type *Cancer* 1990;65:1651-1656.
147. Siew SS, Kauppinen T, Kyyrönen P, Heikkilä P, Pukkala E. Exposure to iron and welding fumes and the risk of lung cancer *Scand J Work Environ Health* 2008;34:444-450.
148. MacLeod JS, Harris MA, Tjepkema M, Peters PA, Demers PA. Cancer Risks among Welders and Occasional Welders in a National Population-Based Cohort Study: Canadian Census Health and Environmental Cohort *Saf Health Work* 2017;8:258-266.

149. Mocevic E, Kristiansen P, Bonde JP. Risk of ischemic heart disease following occupational exposure to welding fumes: a systematic review with meta-analysis *Int Arch Occup Environ Health* 2015;88:259-272.
150. Li H, Hedmer M, Kåredal M, *et al.* A Cross-Sectional Study of the Cardiovascular Effects of Welding Fumes *PLoS One* 2015;10:e0131648.
151. Hossain MB, Li H, Hedmer M, Tinnerberg H, Albin M, Broberg K. Exposure to welding fumes is associated with hypomethylation of the F2RL3 gene: a cardiovascular disease marker *Occup Environ Med* 2015;72:845-851.
152. Lai CY, Lai CH, Chuang HC, *et al.* Physicochemistry and cardiovascular toxicity of metal fume PM2.5: a study of human coronary artery endothelial cells and welding workers *Sci Rep* 2016;6:33515.
153. Davies KG, Asanga U, Nku CO, Osim EE. Effect of chronic exposure to welding light on Calabar welders *Niger J Physiol Sci* 2007;22:55-58.
154. Zamanian Z, Mortazavi SM, Asmand E, Nikeghbal K. Assessment of Health Consequences of Steel Industry Welders' Occupational Exposure to Ultraviolet Radiation *Int J Prev Med* 2015;6:123.
155. Racette BA, Criswell SR, Lundin JI, *et al.* Increased risk of parkinsonism associated with welding exposure *Neurotoxicology* 2012;33:1356-1361.
156. Franchini I, Cavatorta A, Mutti A, Borghetti A. [Acute renal failure from occupational agents] *Med Lav* 1980;71:283-295.
157. Verschoor MA, Bragt PC, Herber RF, Zielhuis RL, Zwennis WC. Renal function of chrome-plating workers and welders *Int Arch Occup Environ Health* 1988;60:67-70.
158. Kumar S, Sathwara NG, Gautam AK, *et al.* Semen quality of industrial workers occupationally exposed to chromium *J Occup Health* 2005;47:424-430.

159. Danadevi K, Rozati R, Reddy PP, Grover P. Semen quality of Indian welders occupationally exposed to nickel and chromium *Reprod Toxicol* 2003;17:451-456.
160. *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)*. 2001. Welding fumes, not otherwise specified. In: Documentation of the threshold limit values for chemical substances. 7th edition:1726-1727. Cincinnati, OH.
161. Genovese G, Castiglia L, Pieri M, *et al.* Occupational Exposure to Chromium of Assembly Workers in Aviation Industries *J Occup Environ Hyg* 2015;12:518-524.
162. Sabty-Daily RA, Harris PA, Hinds WC, Froines JR. Size distribution and speciation of chromium in paint spray aerosol at an aerospace facility *Ann Occup Hyg* 2005;49:47-59.
163. LaPuma PT, Fox JM, Kimmel EC. Chromate concentration bias in primer paint particles *Regul Toxicol Pharmacol* 2001;33:343-349.
164. Gherardi M, Gatto MP, Gordiani A, Paci E, Proietto A. [Occupational exposure to hexavalent chromium during aircraft painting] *G Ital Med Lav Ergon* 2007;29:553-555.
165. Sabty-Daily RA, Hinds WC, Froines JR. Size distribution of chromate paint aerosol generated in a bench-scale spray booth *Ann Occup Hyg* 2005;49:33-45.
166. Nolli F, Cirila PE, Firmi AM, Valcarengi M, Pavesi D, Franzosi C, Cirila AM. 2009. Esposizione a cromo: i risultati dello studio PPTP - Verniciatura. Atti del convegno “Attività di verniciatura: salute e sicurezza”. Ed. Cimal: 87-96. Milano.
167. Decreto Legislativo 9 aprile 2008 n.81 e successive modifiche ed integrazioni. La salute e la sicurezza nei luoghi di lavoro.
168. Regione Lombardia. Decreto n° 3357 del 13/04/2011. Vademecum per il miglioramento della salute e sicurezza nelle galvaniche.
169. Cirila PE, Filipponi A. 2005. Attività di Galvanica. Opuscolo Salute e Sicurezza. INAIL. Roma.
170. Profilo di rischio nel comparto: galvaniche, accessibile in rete all'indirizzo https://appsricercascientifica.inail.it/profili_di_rischio/Galvaniche/index.htm

171. Cella MT. 2011. Sorveglianza sanitaria nelle attività di saldatura. Azienda Unità Sanitaria Locale di Piacenza. Dipartimento di Sanità Pubblica.
172. Raffaele G, Campagna G, Casini A, Ferlisi S, Gismondi M. Sorveglianza sanitaria e saldatori. *G Ital Med Lav Erg.* 2011;33:3
173. Heikkilä P, Kauppinen T. Occupational exposure to carcinogens in Finland *Am J Ind Med* 1992;21:467-480.
174. Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale (SIMLII). 2013. Linee guida per la sorveglianza sanitaria degli esposti ad agenti cancerogeni e mutageni in ambienti di lavoro. Nuova Editrice Berti.
175. Mutti A, Corradi M, Goldoni M, Vettori MV, Bernard A, Apostoli P. Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with COPD or asthma *Chest* 2006;129:1288-1297.
176. Corradi M, Mutti A. Exhaled breath analysis: from occupational to respiratory medicine *Acta Biomed* 2005;76 Suppl 2:20-29.
177. Horváth I, Hunt J, Barnes PJ, *et al.* Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions *Eur Respir J* 2005;26:523-548.
178. Mutti A, De Palma G, Goldoni M. Nuove prospettive nel monitoraggio biologico degli elementi metallici: l'esempio del cromo esavalente. *G Ital Med Lav Erg* 2012;34:251-254.
179. Andreoli R, Manini P, Corradi M, Mutti A, Niessen WM. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:637-645.
180. Svensson S, Olin AC, Lärstad M, Ljungkvist G, Torén K. Determination of hydrogen peroxide in exhaled breath condensate by flow injection analysis with fluorescence detection *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;809:199-203.

181. Montuschi P, Ragazzoni E, Valente S, *et al.* Validation of 8-isoprostane and prostaglandin E(2) measurements in exhaled breath condensate *Inflamm Res* 2003;52:502-507.
182. Mutti A, Corradi M. Recent developments in human biomonitoring: non-invasive assessment of target tissue dose and effects of pneumotoxic metals *Med Lav* 2006;97:199-206.
183. Goldoni M, Catalani S, De Palma G, *et al.* 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.
184. Broding HC, Michalke B, Göen T, Drexler H. Comparison between exhaled breath condensate analysis as a marker for cobalt and tungsten exposure and biomonitoring in workers of a hard metal alloy processing plant *Int Arch Occup Environ Health* 2009;82:565-573.
185. Hulo S, Radauceanu A, Chérot-Kornobis N, *et al.* Beryllium in exhaled breath condensate as a biomarker of occupational exposure in a primary aluminum production plant *Int J Hyg Environ Health* 2016;219:40-47.
186. Félix PM, Almeida SM, Franco C, *et al.* The suitability of EBC-Pb as a new biomarker to assess occupational exposure to lead *Int J Environ Health Res* 2015;25:67-80.
187. Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, *et al.* The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers *Environ Health Perspect* 2006;114:542-546.
188. Hoffmeyer F, van Kampen V, Deckert A, *et al.* Evaluation of Airway Inflammation in Compost Workers Exposed to Bioaerosols Using Exhaled Breath Condensate and Fractional Exhaled Nitric Oxide *Adv Exp Med Biol* 2015;858:57-67.
189. Goldoni M, Caglieri A, Poli D, *et al.* Determination of hexavalent chromium in exhaled breath condensate and environmental air among chrome plating workers *Anal Chim Acta* 2006;562:229-235.

190. Czerska M, Mikołajewska K, Zieliński M, Gromadzińska J, Wąsowicz W. Today's oxidative stress markers *Med Pr* 2015;66:393-405.
191. Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, *et al.* Oxidative stress and its significant roles in neurodegenerative diseases and cancer *Int J Mol Sci* 2014;16:193-217.
192. Sinha N, Dabla PK. Oxidative stress and antioxidants in hypertension-a current review *Curr Hypertens Rev* 2015;11:132-142.
193. Inonu H, Doruk S, Sahin S, *et al.* Oxidative stress levels in exhaled breath condensate associated with COPD and smoking *Respir Care* 2012;57:413-419.
194. Murata K, Fujimoto K, Kitaguchi Y, Horiuchi T, Kubo K, Honda T. Hydrogen peroxide content and pH of expired breath condensate from patients with asthma and COPD *COPD* 2014;11:81-87.
195. Goldoni M, Corradi M, Mozzoni P, *et al.* Concentration of exhaled breath condensate biomarkers after fractionated collection based on exhaled CO₂ signal *J Breath Res* 2013;7:017101.
196. Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, *et al.* Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:1380-1386.
197. Bartoli ML, Novelli F, Costa F, *et al.* Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases *Mediators Inflamm* 2011;2011:891752.
198. Yang Y, Sharma R, Sharma A, Awasthi S, Awasthi YC. Lipid peroxidation and cell cycle signaling: 4-hydroxynonenal, a key molecule in stress mediated signaling *Acta Biochim Pol* 2003;50:319-336.
199. Casimirri E, Stendardo M, Bonci M, *et al.* Biomarkers of oxidative-stress and inflammation in exhaled breath condensate from hospital cleaners *Biomarkers* 2016;21:115-122.
200. Montuschi P, Kharitonov SA, Ciabattini G, *et al.* Exhaled 8-isoprostane as a new non-invasive biomarker of oxidative stress in cystic fibrosis *Thorax* 2000;55:205-209.

201. Montuschi P, Corradi M, Ciabattoni G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patients *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:216-220.
202. Aldakheel FM, Thomas PS, Bourke JE, Matheson MC, Dharmage SC, Lowe AJ. Relationships between adult asthma and oxidative stress markers and pH in exhaled breath condensate: a systematic review *Allergy* 2016;71:741-757.
203. Silkoff PE, Robbins RA, Gaston B, Lundberg JO, Townley RG. Endogenous nitric oxide in allergic airway disease *J Allergy Clin Immunol* 2000;105:438-448.
204. Malinovschi A, Janson C, Holmkvist T, Norbäck D, Meriläinen P, Högman M. IgE sensitisation in relation to flow-independent nitric oxide exchange parameters *Respir Res* 2006;7:92.
205. Taylor DR, Pijnenburg MW, Smith AD, De Jongste JC. Exhaled nitric oxide measurements: clinical application and interpretation *Thorax* 2006;61:817-827.
206. Society AT, Society ER. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005 *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:912-930.
207. Ferrazzoni S, Scarpa MC, Guarnieri G, Corradi M, Mutti A, Maestrelli P. Exhaled nitric oxide and breath condensate pH in asthmatic reactions induced by isocyanates *Chest* 2009;136:155-162.
208. Sastre J, Costa C, del Garcia Potro M, Aguado E, Mahillo I, Fernández-Nieto M. Changes in exhaled nitric oxide after inhalation challenge with occupational agents *J Investig Allergol Clin Immunol* 2013;23:421-427.
209. Lemiere C, NGuyen S, Sava F, D'Alpaos V, Huaux F, Vandenplas O. Occupational asthma phenotypes identified by increased fractional exhaled nitric oxide after exposure to causal agents *J Allergy Clin Immunol* 2014;134:1063-1067.

210. Quanjer PH, Stanojevic S, Cole TJ, *et al.* Multi-ethnic reference values for spirometry for the 3-95-yr age range: the global lung function 2012 equations *Eur Respir J* 2012;40:1324-1343.
211. Miller MR, Hankinson J, Brusasco V, *et al.* Standardisation of spirometry *Eur Respir J* 2005;26:319-338.
212. Loft S, Høgh Danielsen P, Mikkelsen L, Risom L, Forchhammer L, Møller P. Biomarkers of oxidative damage to DNA and repair *Biochem Soc Trans* 2008;36:1071-1076.
213. Tsuzuki T, Egashira A, Igarashi H, *et al.* Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:11456-11461.
214. Patel PR, Bevan RJ, Mistry N, Lunec J. Evidence of oligonucleotides containing 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine *Free Radic Biol Med* 2007;42:552-558.
215. Manini P, De Palma G, Andreoli R, *et al.* Biomarkers of nucleic acid oxidation, polymorphism in, and expression of, hOGG1 gene in styrene-exposed workers *Toxicol Lett* 2009;190:41-47.
216. Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radic Biol Med* 2002;33:875-885.
217. Tamae K, Kawai K, Yamasaki S, *et al.* Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine *Cancer Sci* 2009;100:715-721.
218. Irie M, Tamae K, Iwamoto-Tanaka N, Kasai H. Occupational and lifestyle factors and urinary 8-hydroxydeoxyguanosine *Cancer Sci* 2005;96:600-606.
219. Nunomura A, Moreira PI, Castellani RJ, *et al.* Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders *Neurotox Res* 2012;22:231-248.
220. Andreoli R, Manini P, De Palma G, *et al.* Quantitative determination of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, 8-oxo-7,8-dihydroguanine, 8-oxo-7,8-dihydroguanosine, and their non-oxidized forms: daily concentration profile in healthy volunteers *Biomarkers* 2010;15:221-231.

221. Andreoli R, Mutti A, Goldoni M, Manini P, Apostoli P, De Palma G. Reference ranges of urinary biomarkers of oxidized guanine in (2'-deoxy)ribonucleotides and nucleic acids *Free Radic Biol Med* 2011;50:254-261.
222. Paz-Elizur T, Krupsky M, Blumenstein S, Elinger D, Schechtman E, Livneh Z. DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1312-1319.
223. Paz-Elizur T, Ben-Yosef R, Elinger D, *et al.* Reduced repair of the oxidative 8-oxoguanine DNA damage and risk of head and neck cancer *Cancer Res* 2006;66:11683-11689.
224. Leonard SS, Chen BT, Stone SG, *et al.* Comparison of stainless and mild steel welding fumes in generation of reactive oxygen species *Part Fibre Toxicol* 2010;7:32.
225. Pesch B, Lotz A, Koch HM, *et al.* Oxidatively damaged guanosine in white blood cells and in urine of welders: associations with exposure to welding fumes and body iron stores *Arch Toxicol* 2015;89:1257-1269.
226. Kuo HW, Chang SF, Wu KY, Wu FY. Chromium (VI) induced oxidative damage to DNA: increase of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine concentrations (8-OHdG) among electroplating workers *Occup Environ Med* 2003;60:590-594.
227. International Organization for Standardization (ISO). 2012. Workplace air - Determination of metals and metalloids in airborne particulate matter by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. ISO 15202.
228. The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). 1994. NIOSH Manual of Analytical Methods. No 7600.
229. Italian National Unification European (UNI EN). 1997. Workplace Atmospheres - Guidance for the assessment of exposure by inhalation to chemical agents for comparison with limit values and measurement strategy. UNI EN 689.
230. Rhee MH, Kim LJ. The changes of pulmonary function and pulmonary strength according to time of day: a preliminary study *J Phys Ther Sci* 2015;27:19-21.

231. Medarov BI, Pavlov VA, Rossoff L. Diurnal variations in human pulmonary function *Int J Clin Exp Med* 2008;1:267-273.
232. Bianchim MS, Sperandio EF, Martinhão GS, *et al.* Correlation between heart rate variability and pulmonary function adjusted by confounding factors in healthy adults *Braz J Med Biol Res* 2016;49.
233. Phillipson EA, Bowes G. American Physiological Society. 1986. Control of breathing during sleep. Handbook of physiology, the respiratory system, control of breathing. Bethesda, Cherniack NS, Widdicombe JG, editors. 3(2):649–689.
234. Leese E, Morton J, Gardiner PHE, Carolan VA. The simultaneous detection of trivalent & hexavalent chromium in exhaled breath condensate: A feasibility study comparing workers and controls *Int J Hyg Environ Health* 2017;220:415-423.
235. Goldoni M, Caglieri A, Corradi M, *et al.* Chromium in exhaled breath condensate and pulmonary tissue of non-small cell lung cancer patients *Int Arch Occup Environ Health* 2008;81:487-493.
236. Antonini JM, Roberts JR, Stone S, *et al.* Persistence of deposited metals in the lungs after stainless steel and mild steel welding fume inhalation in rats *Arch Toxicol* 2011;85:487-498.
237. Fireman E, Lerman Y, Stark M, *et al.* Detection of occult lung impairment in welders by induced sputum particles and breath oxidation *Am J Ind Med* 2008;51:503-511.
238. Brand P, Bischof K, Siry L, *et al.* Exposure of healthy subjects with emissions from a gas metal arc welding process: part 3--biological effect markers and lung function *Int Arch Occup Environ Health* 2013;86:39-45.
239. Manini P, De Palma G, Andreoli R, *et al.* Occupational exposure to low levels of benzene: Biomarkers of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes *Toxicol Lett* 2010;193:229-235.

TABELLE

Tabella 1: Processi di saldatura ad arco elettrico

Tipo di saldatura ad arco elettrico	Tipo di elettrodo	Protezione dall'ossidazione	Materiale base	Metalli e gas tossici presenti nei fumi
Saldatura manuale ad arco con elettrodo rivestito (SMAW)	Elettrodo rivestito consumabile	Rivestimento dell'elettrodo	Tutti i metalli ferrosi	Al, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Fluoruri, Mg, Mn, Mo, Ni, Pb, Si, Ti, Zn. Gas tossici: CO, CO ₂ , NO _x , O ₃
Saldatura ad arco con filo animato (FCAW)	Filo metallico vuoto continuo consumabile con un'anima di polveri (flusso).	Flusso dell'elettrodo	Acciai dolci; Acciai speciali	Cr, Fe, fluoruri Mn, Ni, Si. Gas tossici: CO, CO ₂ , NO _x , O ₃ ,
Saldatura ad arco sommerso (SAW)	Elettrodo consumabile non rivestito	flusso granulare (calce, Si, ossido di Mn, fluoruro di calcio e altri composti)	Acciai dolci	Al, Fe, Fluoruri, Mg, Mn, Si, Ti. Gas tossici: CO, CO ₂ , NO _x , O ₃ ,
Saldatura ad arco sotto protezione di gas (GMAW): <ul style="list-style-type: none"> • Protezione di gas inerte (MIG) • Protezione di gas attivo (MAG) 	Filo metallico continuo pieno consumabile	MIG: gas inerte (argon o elio) MAG: gas attivo (CO ₂)	Fe, acciai dolci, acciai speciali, leghe di Cu, leghe di Ni, Al, Mg	Al, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni. Elevate quantità di gas tossici: CO, CO ₂ , NO _x , O ₃
Saldatura ad arco con elettrodo infusibile di tungsteno (GTAW)	Elettrodo non consumabile di tungsteno	Gas inerte (argon o elio)	Fe, acciai speciali, Al, Mg	Al, Cr, Fe, Mg, Mn, Ni. Elevate quantità di gas tossici: CO, CO ₂ , NO _x , O ₃

Legenda: Al: alluminio; Cd: cadmio; Co: cobalto; Cr: cromo; Cu: rame; Fe: ferro; Mg: magnesio; Mn: manganese; Mo: molibdeno; Ni: nichel; Pb: piombo; Si: silicio; Ti: titanio; Zn: zinco; CO: monossido di carbonio; CO₂: diossido di carbonio NO_x: ossidi di ozono, O₃: ozono

Tabella 2. Caratteristiche della popolazione di saldatori

Numero di soggetti	100
Età (anni)	43 ± 9*
Sesso (M/F)	100/0
Abitudine tabagica (fumatori/non fumatori/ex fumatori)	33/36/31
Indice di massa corporea (BMI, Kg/m³)	26 (24-28)**
Attività di saldatura (ore/giorno)	4 (2-6)**
Anzianità alla mansione (anni)	24 (14-31)**
FEV₁ (% del predetto)	96 ± 11
FVC (% del predetto)	99 ± 10

*media ± deviazione standard; **mediana (25°-75° percentile).

Tabella 3. Caratteristiche della popolazione di montatori dell'industria aeronautica

Numero di soggetti	41
Età (anni)	34 (32-49)**
Sesso (M/F)	41/0
Abitudine tabagica (fumatori/non fumatori/ex fumatori)	14/17/10
Indice di massa corporea (BMI, Kg/m³)	25 ± 3*
Attività di ritocchi con vernici a base di SrCrO₄ (minuti/giorno)	2 (2-5)**
Attività di foratura e sverniciatura su <i>primer</i>, attività di sigillatura	5 (3-8)**
Anzianità alla mansione (anni)	10 (8-15)**
FEV₁ (% del predetto)	91 ± 10*
FVC (% del predetto)	93 ± 10*

*media ± deviazione standard; **mediana (25°-75° percentile).

Tabella 4. Caratteristiche della popolazione di cromatori

Numero di soggetti	24
Età (anni)	43 ± 7*
Sesso (M/F)	24/0
Abitudine tabagica (fumatori/non fumatori/ex fumatori)	5/11/8
Indice di massa corporea (BMI, Kg/m³)	25 (22-26)**
Attività di cromatura	8 h/g per 10 gg/mese
Anzianità alla mansione (anni)	16 (14-21)**
FEV₁ (% del predetto)	100 ± 12*
FVC (% del predetto)	101 ± 12*

*media ± deviazione standard; **mediana (25°-75° percentile).

Tabella 5. Caratteristiche della popolazione Controlli 1

Numero di soggetti	52
Età (anni)	46 (34-58)**
Sesso (M/F)	52/0
Abitudine tabagica (Fumatori/non fumatori/ex fumatori)	16/30/6
Indice di massa corporea (BMI, Kg/m³)	25 (23-27)**

**mediana (25°-75° percentile).

Tabella 6. Caratteristiche della popolazione Controlli 2

Numero di soggetti	70
Età (anni)	31 (29-40)**
Sesso (M/F)	48/22
Abitudine tabagica (fumatori/non fumatori/ex fumatori)	25/40/5
Indice di massa corporea (BMI, Kg/m³)	23 (21-24)**

**mediana (25°-75° percentile).

Tabella 7. Saldatori. Risultati dei monitoraggi ambientali

Metalli	Campionamenti personali	Concentrazioni (mg/m ³)	TLV-TWA ACGIH (mg/m ³)
Cr T	25/100	0.002 (0.0006-0.009)	0.5
Cr-VI	25/100	<0.002	0.05
Ni T	25/100	0.001 (0.0003-0.006)	0.1- 0.2- 0.5 ⁽¹⁾

Cr T: cromo totale; Cr-VI: cromo esavalente; Ni T: nichel totale; TLV-TWA: valori limite di soglia medi ponderati nel tempo; ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists.

(1) 0.1: applicabile a composti inorganici del Ni solubili e al Ni₃S₂

(2) 0.2: applicabile a composti inorganici del Ni insolubile

1.5: applicabile a Ni elemento

Valori mediani (25°-75° percentile).

Le concentrazioni dei metalli sono espresse in mg/m³ e calcolate con la seguente formula: C (concentrazione) = P (quantità di metallo) / T (tempo di campionamento) * F (flusso di campionamento)

Tabella 8. Saldatori. Risultati degli esami spirometrici

Parametri respiratori	T ₀	T ₁	T ₂	<i>p</i>
FEV ₁ (L)	3.90 ± 0.62	3.87 ± 0.62	3.83 ± 0.61	ns*
FEV ₁ (% del predetto)	97.43 ± 11.17	96.75 ± 11.39	95.72 ± 11.04	ns*
FVC (L)	4.99 ± 0.77	4.96 ± 0.75	4.94 ± 0.76	ns*
FVC (% del predetto)	100.29 ± 10.56	99.54 ± 10.26	99.26 ± 10.20	ns*
FEV ₁ /FVC	79 (76-82)	78 (76-82)	78 (74-81)	ns**
FeNO (ppb)	21 (12-33)	18 (12-32)	20 (13-32)	ns**

FEV₁: volume nel primo secondo di un'espiazione forzata; FVC: capacità vitale forzata; FeNO: ossido nitrico esalato; n.s.: non significativo; T₀: venerdì inizio turno; T₁: venerdì fine turno; T₂: lunedì inizio turno.

I valori di FEV₁, FVC, del predetto del FEV₁, del predetto della FVC, sono riportati come media ± deviazione standard.

I valori dell'indice di Tiffenau (FEV₁/FVC) e del FeNO come mediana (25°-75° percentile)

*Anova per misure ripetute seguita dal test *post hoc* di Bonferroni.

**Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn.

Tabella 9. Saldatori. Valori delle 4 frazioni di PM-CAE.

Frazioni di particolato	T ₀	T ₁	T ₂	<i>p</i>
PM ₁ (n°/mL)	321.6 (118.7-667.0)	230.0 (112.8-512.4)	255.0 (100.5-545.2)	n.s.
PM _{2.5} (n°/mL)	311.0 (207.7-659.2)	310.5 (208.7-562.7)	305.9 (175.9-625.5)	n.s.
PM ₁₀ (n°/mL)	423.8 (266.7-683.5)	375.1 (238.1-76.0)	362.0 (196.5-758.0)	n.s.
PM _{TOT} (n°/mL)	1109.0 (671.9-2160.0)	951.4 (659.4-1968.0)	968.6 (563.2-2053.5)	n.s.

Legenda. PM₁: materiale particolato, classe dimensionale 0.3-1 µm; PM_{2.5}: materiale particolato, classe dimensionale 1-2.5 µm; PM₁₀: materiale particolato, classe dimensionale 2.5-10 µm; PM_{TOT}: materiale particolato totale calcolato come la somma di PM₁, PM_{2.5} e PM₁₀; T₀: venerdì inizio turno; T₁: venerdì fine turno; T₂: lunedì inizio turno; n.s.: non significativo.

I valori sono espressi in mediana (25°-75° percentile)

Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn.

Tabella 10. Montatori dell'industria aeronautica. Risultati del monitoraggio ambientale

Metalli	Campionamenti personali	Concentrazioni (mg/m³)	TLV-TWA secondo l'ACGIH (mg/m³)
Cr T	41/41	0.00006 (0.00003-0.0001)	0.5
Cr VI	41/41	0.000005 (0.000005-0.00006)	0.05

Cr: cromo; Cr T: cromo totale; Cr-VI: cromo esavalente; TLV-TWA: valori limite di soglia medi ponderati nel tempo; ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Valori mediani (25°-75° percentile).

Le concentrazioni dei metalli sono espresse in mg/m³ e calcolate con la seguente formula: C (concentrazione) = P (quantità di metallo) / T (tempo di campionamento) * F (flusso di campionamento)

Tabella 11. Montatori dell'industria aeronautica. Risultati degli esami spirometrici

Parametri respiratori	T₀	T₁	<i>p</i>
FEV ₁ (L)	3.76 ± 0.62	3.63 ± 0.70	T ₀ vs T ₁ <i>p</i> <0.05*
FEV ₁ (% del predetto)	94.02 ± 8.09	91.24 ± 10.10	T ₀ vs T ₁ <i>p</i> <0.05*
FVC (L)	4.64 ± 0.82	4.56 ± 0.89	T ₀ vs T ₁ <i>p</i> <0.05*
FVC (% del predetto)	93.82 ± 9.31	92.64 ± 10.06	n.s.*
FEV ₁ /FVC	82 (77-85)	81 (76-84)	T ₀ vs T ₁ <i>p</i> <0.05**

FEV₁: volume nel primo secondo di un'espiazione forzata; FVC: capacità vitale forzata; T₀: venerdì fine turno; T₁: lunedì inizio turno; n.s.: non significativo.

I valori di FEV₁, FVC, del predetto del FEV₁, del predetto della FVC, sono riportati come media ± deviazione standard.

I valori dell'indice di Tiffenau (FEV₁/FVC) come mediana (25°-75° percentile);

*Test t per campioni accoppiati.

**Test non parametrico di Friedman seguito dal test dei ranghi di Wilcoxon.

Tabella 12. Montatori dell'industria aeronautica. Concentrazioni di Cr nel CAE e nelle urine

Metalli	T₀	T₁	T₂	<i>p</i>
Cr-CAE (µg/L)	0.06 (0.04-0.09)	0.05 (0.04-0.09)	0.06 (0.04-0.10)	n.s.*
Cr-U (µg/g creatinina)	0.07 (0.04-0.17)	0.11 (0.06-0.29)	0.11 (0.05-0.21)	n.s.*

Legenda. Cr-CAE: concentrazione di cromo nel condensato dell'aria esalata; Cr-U: concentrazione di cromo nelle urine; T₀: venerdì fine turno; T₁: lunedì inizio turno; T₂: lunedì fine turno; n.s.: non significativo

I valori di Cr-CAE e Cr-U sono espressi come mediana (25°-75° percentile)

*Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn

Tabella 13. Cromatori. Risultati del monitoraggio ambientale

Metalli	Campionamenti personali	Concentrazioni (mg/m³)*	TLV-TWA ACGIH (mg/m³)
Cr T	6/24	0.00054 (0.00014-0.00099)	0.5
Cr-VI	6/24	0.00003 (0.000014-0.0002)	0.05

Cr: cromo; Cr T: cromo totale; Cr-VI: cromo esavalente; TLV-TWA: valori limite di soglia medi ponderati nel tempo; ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists.

Valori mediani (25°-75° percentile).

Le concentrazioni dei metalli sono espresse in mg/m³ e calcolate con la seguente formula: C (concentrazione) = P (quantità di metallo) / T (tempo di campionamento) * F (flusso di campionamento)

Tabella 14. Cromatori. Risultati degli esami spirometrici

Parametri respiratori	T₀	T₁	<i>p</i>
FEV ₁ (L)	4.06 ± 0.61	4.10 ± 0.60	T ₀ vs T ₁ <i>p</i> <0.05
FEV ₁ (% del predetto)	100.36 ± 12.01	101.62 ± 11.70	T ₀ vs T ₁ <i>p</i> <0.05
FVC (L)	5.12 ± 0.75	5.12 ± 0.76	n.s.
FVC (% del predetto)	101.41 ± 12.24	101.66 ± 11.79	n.s.
FEV ₁ /FVC	80 ± 4	80 ± 3	n.s.

FEV₁: volume nel primo secondo di un'espiazione forzata; FVC: capacità vitale forzata; T₀: martedì inizio turno; T₁: martedì fine turno; n.s.: non significativo.

I valori di FEV₁, FVC, del predetto del FEV₁, del predetto della FVC e dell'indice di Tiffenau (FEV₁/FVC) sono riportati come media ± deviazione standard.

Test t per campioni accoppiati.

Tabella 15. Cromatori. Concentrazioni di Cr nelle urine

Metalli	T ₀ (martedì inizio turno)	T ₁ (martedì fine turno)	<i>p</i>
Cr-U (µg/g creatinina)	0.14 (0.06-0.26)	0.13 (0.06-0.53)	n.s.

Legenda. Cr-U: concentrazione di cromo nelle urine; T₀: martedì inizio turno; T₁: martedì fine turno; n.s.: non significativo

I valori di Cr-U sono espressi come mediana (25°-75° percentile)

Test t per campioni accoppiati.

Tabella 16. Cromatori. Concentrazioni dei biomarcatori di effetto nel CAE

Biomarcatori di effetto nel CAE	T₀	T₁	<i>p</i>
H ₂ O ₂ (μM)	0.32 ± 0.12	0.32 ± 0.10	n.s.*
MDA (nM)	2.71 (2.34-3.20)	2.63 (2.33-3.17)	n.s.**
HNE (nM)	0.39 ± 0.11	0.39 ± 0.10	n.s.*
8-IP (pg/ml)	2.99 (1.35-4.19)	2.97 (1.35-3.80)	n.s.**

Legenda. H₂O₂: perossido di idrogeno; MDA: malondialdeide; HNE: 4-idrossinonenale; 8-IP: 8-isoprostano; T₀: martedì inizio turno; T₁: martedì fine turno; turno.

I valori di H₂O₂ e HNE sono espressi come media ± deviazione standard.

I valori di MDA e 8-IP sono espressi come mediana (25°-75° percentile).

*Test t per campioni accoppiati.

**Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn

FIGURE

Figura 1: Schema rappresentativo del processo di saldatura TIG. Adattata da AWS, 2004 [51].

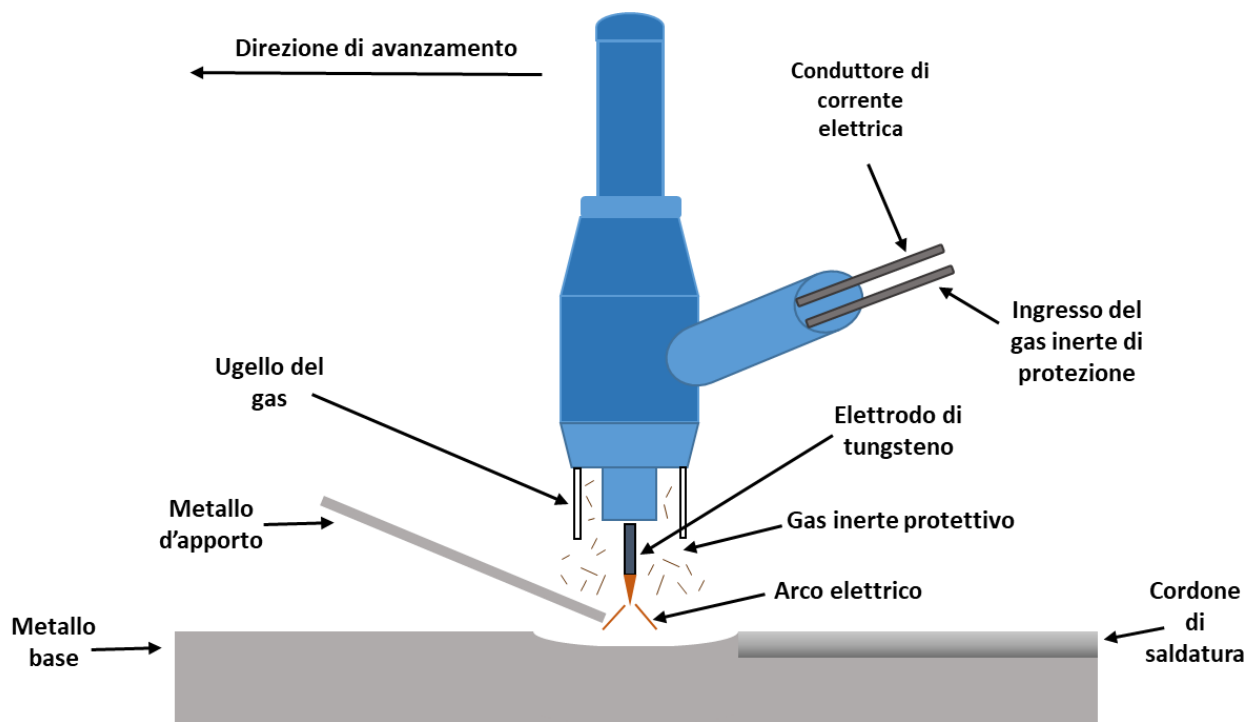
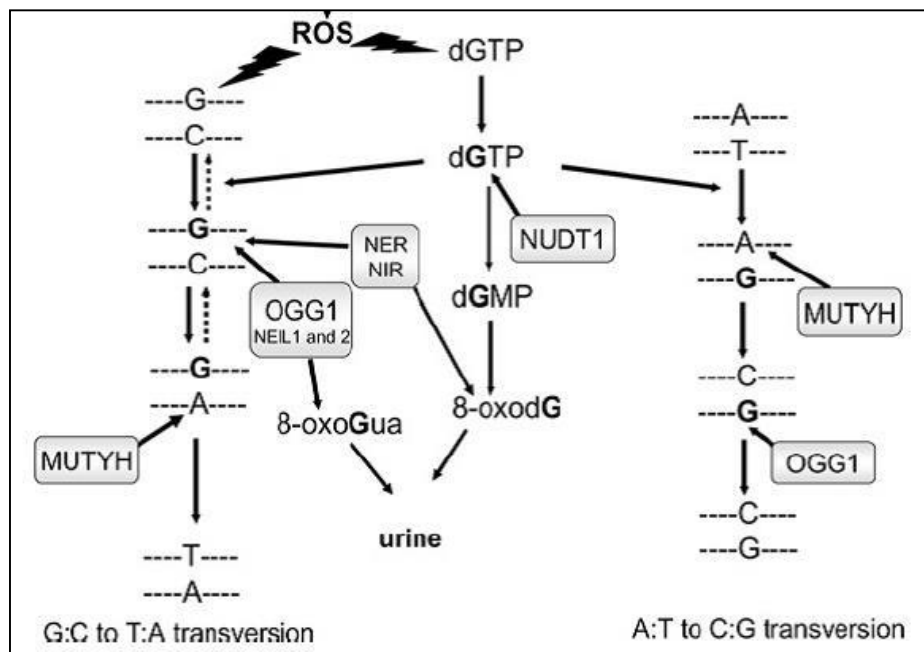


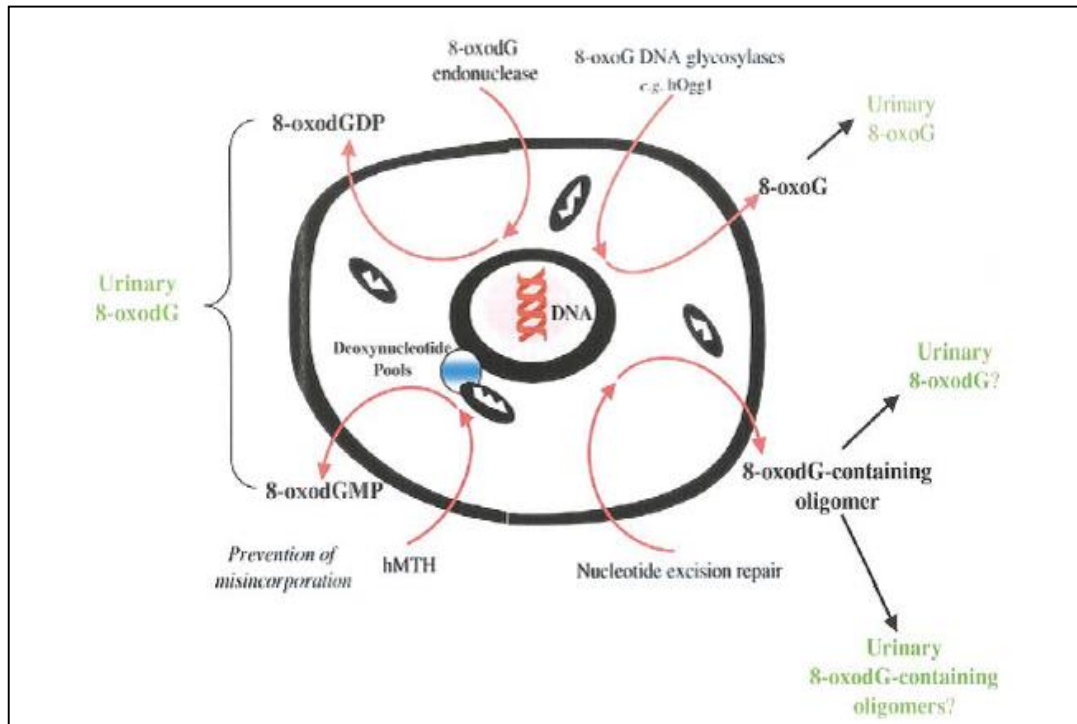
Figura 2. Generazione della guanina ossidata nel DNA, effetto mutageno e vie di riparazione.

Adattata da Loft et al., 2008 [212].



Legenda: ROS: radicali liberi dell'ossigeno; OGG1: 7,8-diidro-8-oxoguanina DNA glicosidasi umana; NER: sistema di escissione nucleotidico; NUDT1: 8-idrossi-7,8-diidroguanina trifosfatasi; MUTYH: adenina DNA glicosidasi; 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; 8-oxodG: 8-idrossi-2'-deossiguanosina; dGMP: 8-idrossi-2'-deossiguanosinammonofosfato; dGDP: 8-idrossi-2'-deossiguanosinatrifosfato.

Figura 3. Possibili fonti di guanina idrossilata (pool dei nucleotidi, RNA, DNA), enzimi coinvolti nella riparazione del danno ossidativo alla guanina (hOgg1, hMTH, 8-oxo-dG-endonucleasi, nucleotidasi) e prodotti di eliminazione (8-oxoG, 8-oxoGuo e 8-oxodG). Tratta da Lunec et al., 2002 [216].



Legenda: hOgg1: 7,8-diidro-8-oxoguanina DNA glicosidasi umana; 8-oxoG: 8-idrossiguanina; 8-oxodG: 8-idrossi-2'-deossiguanosina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-guanosina; hMTH: 8-idrossi-2'-deossiguanosina 5'-trifosfato pirofosfoidrolasi; 8-oxoGMP: 8-idrossi-2'-deossiguanosinamonomosfato; 8-oxoGDP: 8-idrossi-2'-deossiguanosinadifosfato.

Figura 4. EyeTech Lung vision

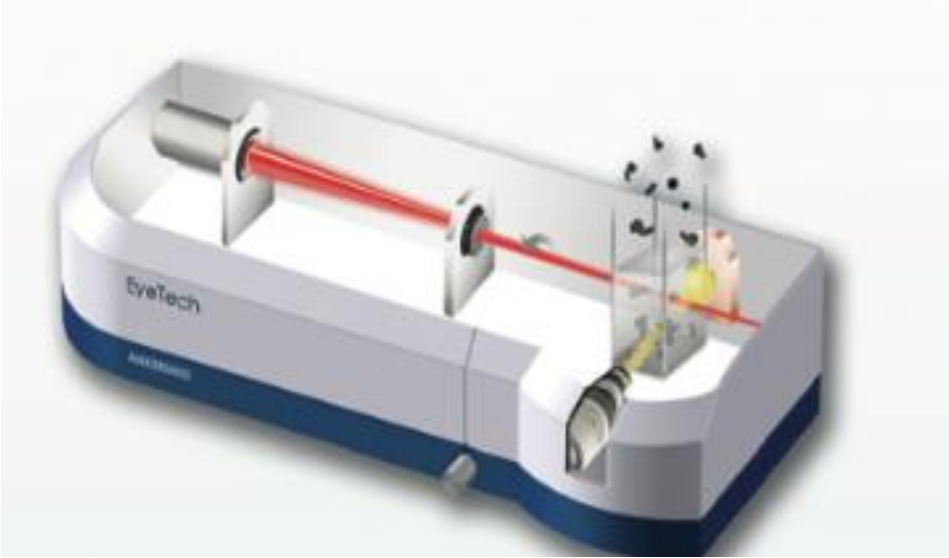
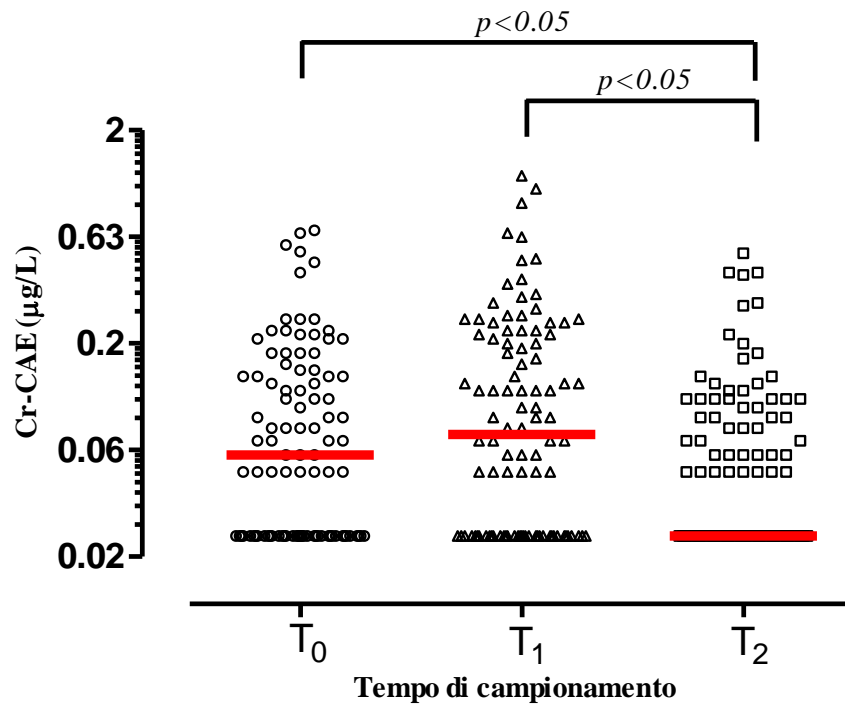


Figura 5. Saldatori. Andamento temporale del Cr-CAE.

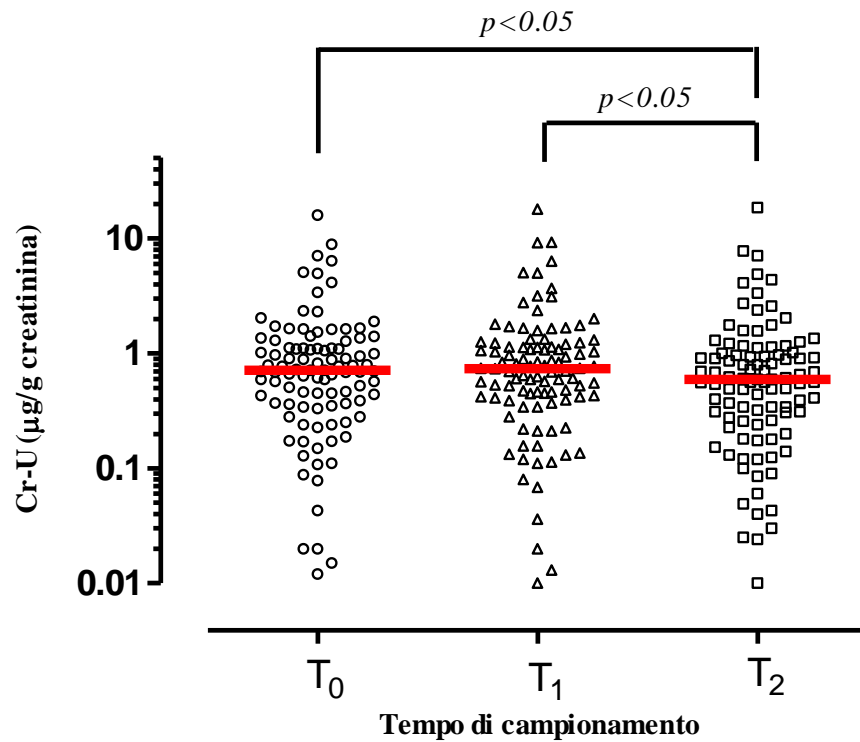


Legenda: Cr-CAE: concentrazione di cromo nel condensato dell'aria esalata; T₀: venerdì inizio turno; T₁: venerdì fine turno; T₂: lunedì inizio turno.

Le linee rosse rappresentano i valori medi di Cr-CAE nei tre tempi di campionamento.

Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn

Figura 6. Saldatori. Andamento temporale del Cr-U.

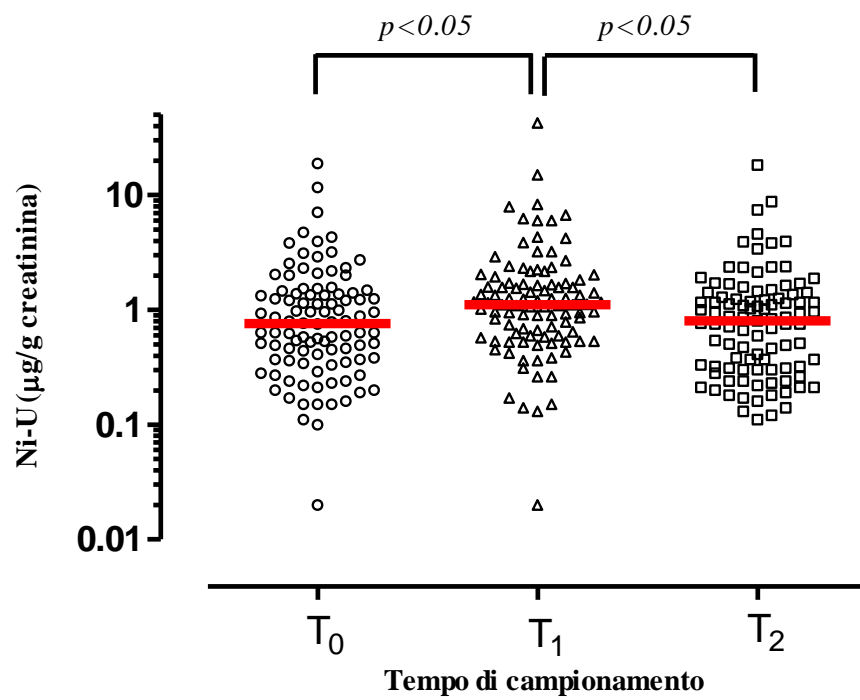


Legenda: Cr-U: concentrazione di cromo nelle urine; T₀: venerdì inizio turno; T₁: venerdì fine turno; T₂: lunedì inizio turno.

Le linee rosse rappresentano i valori mediani di Cr-U nei tre tempi di campionamento.

Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn

Figura 7. Saldatori. Andamento temporale del Ni-U.

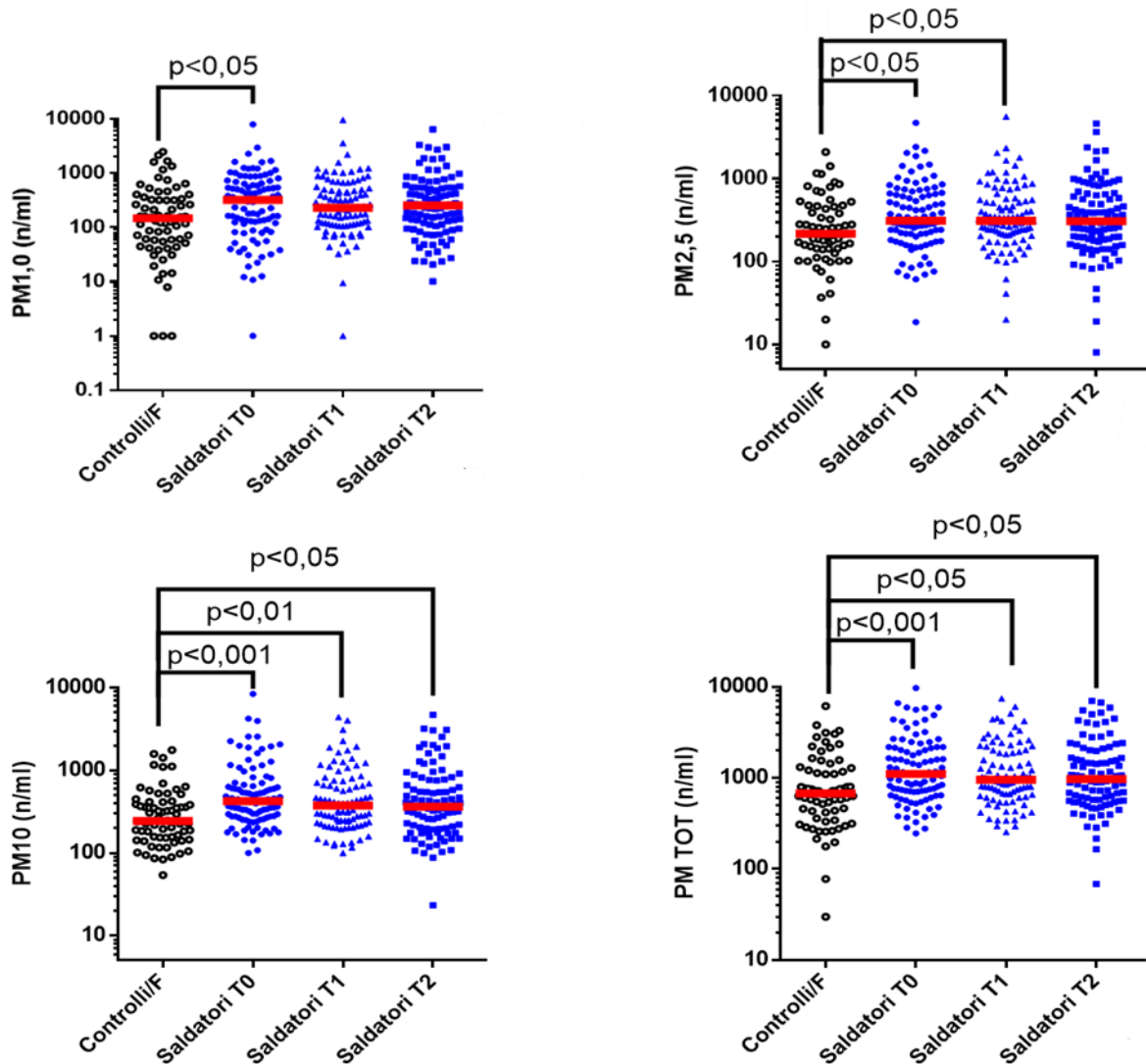


Legenda: Ni-U: concentrazione di nichel nelle urine; T₀: venerdì inizio turno; T₁: venerdì fine turno; T₂: lunedì inizio turno.

Le linee rosse rappresentano i valori mediani di Ni-U nei tre tempi di campionamento.

Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn

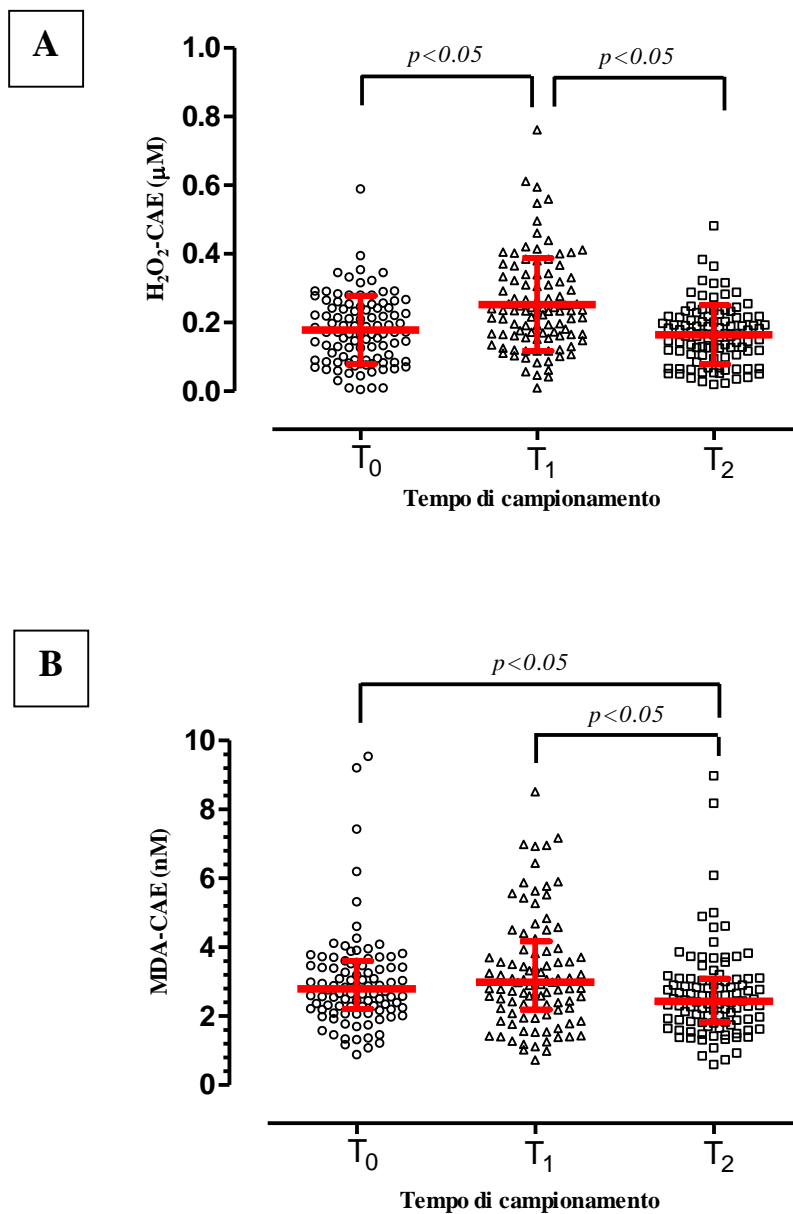
Figura 8. Saldatori. Andamento temporale del PM-CAE nei saldatori e confronto con il gruppo dei Controlli 2.



Legenda. PM 1: materiale particolato, classe dimensionale 0.3-1 μm ; PM 2.5: materiale particolato, classe dimensionale 1-2.5 μm ; PM 10: materiale particolato, classe dimensionale 2.5-10 μm ; PM TOT: materiale particolato totale calcolato come la somma di PM 1, PM 2.5 e PM 10; T₀: venerdì inizio turno; T₁: venerdì fine turno; T₂: lunedì inizio turno. Le linee rosse rappresentano i valori mediani delle 4 classi dimensionali di materiale particolato nei saldatori e nei controlli. Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn per valutare le differenze di PM CAE tra i tempi di campionamento nei saldatori.

Test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Mann-Whitney corretto per il test di Bonferroni per valutare le differenze di PM CAE tra saldatori e controlli.

Figura 9. Saldatori. Andamento temporale del H₂O₂-CAE (A) e della MDA-CAE (B)



Legenda. **A.** H₂O₂-CAE: concentrazione del perossido di idrogeno nel condensato dell'aria esalata; T₀: venerdì inizio turno; T₁: venerdì fine turno; T₂: lunedì inizio turno.

In rosso sono rappresentati i valori medi \pm deviazione standard di H₂O₂-CAE nei tre tempi di campionamento.

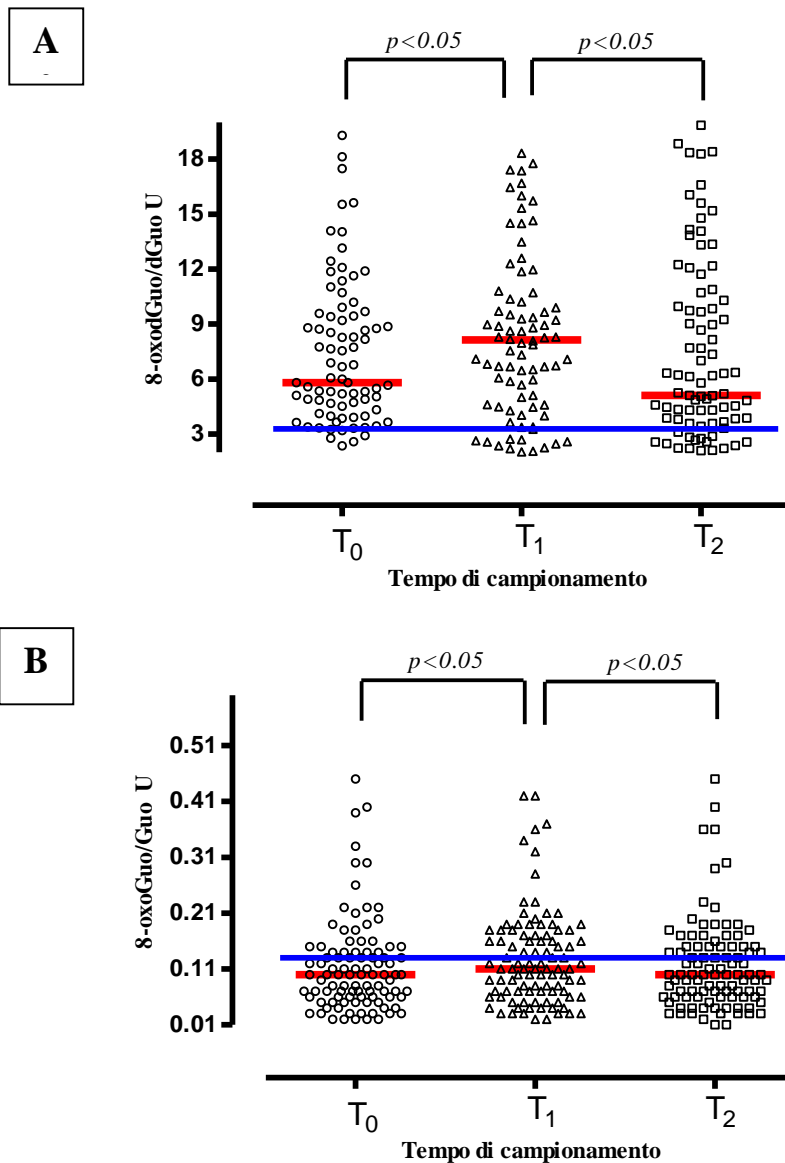
Test anova per misure ripetute seguito dal test *post hoc* di Bonferroni

B. MDA-CAE: concentrazione della malondialdeide nel condensato dell'aria esalata; T₀: venerdì inizio turno; T₁: venerdì fine turno; T₂: lunedì inizio turno.

In rosso sono rappresentati i valori mediani (25°-75° percentile) di MDA-CAE nei tre tempi di campionamento.

Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn.

Figura 10. Saldatori. Andamento temporale dei rapporti 8-oxodGuo/dGuo U (A) e 8-oxoGuo/dGuo U (B) e confronto con i valori misurati nella popolazione Controlli 1.

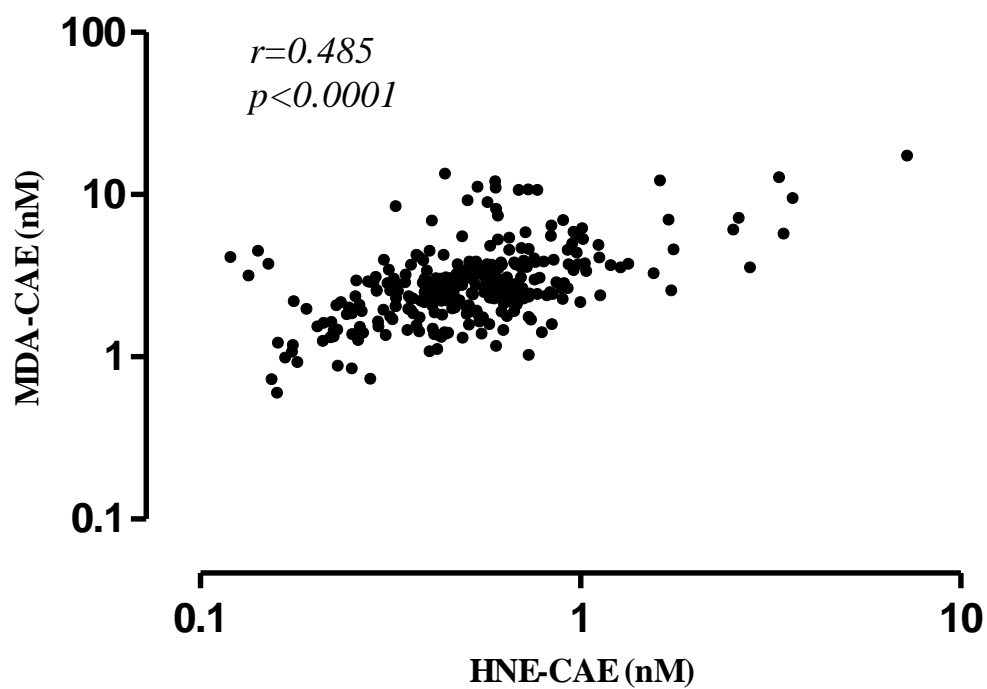


Legenda: 8-oxodGuo/dGuo U: 8-idrossi-2-deossiguanosina/2-deossiguanosina nelle urine (A); 8-oxoGuo/Guo U: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina/guanosina nelle urine (B); T₀: venerdì inizio turno; T₁: venerdì fine turno; T₂: lunedì inizio turno.

Le linee rosse rappresentano i valori mediani dei rapporti 8-oxodGuo/dGuo (A) e 8-oxoGuo/Guo (B) nei tre tempi di campionamento. La linea blu rappresenta il valore mediano dei rapporti 8-oxodGuo/dGuo (A) e 8-oxoGuo/Guo (B) nella popolazione di Controlli 1.

Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn per valutare le differenze di 8-oxoGuo/Guo tra i tempi di campionamento nei saldatori. Test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Mann-Whitney corretto per il test di Bonferroni per valutare le differenze di 8-oxoGuo/Guo tra saldatori e controlli.

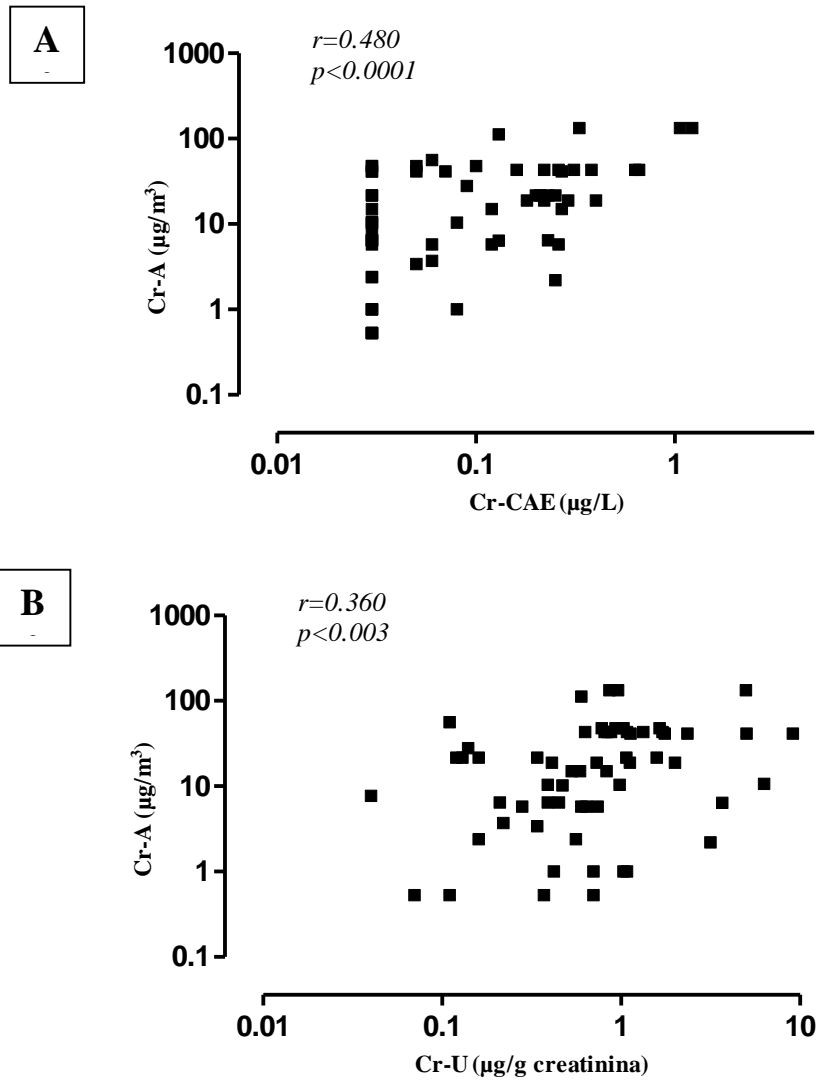
Figura 11. Saldatori. Correlazione tra MDA-CAE e HNE-CAE



Legenda: MDA-CAE: concentrazione di malondialdeide nel condensato dell'aria esalata; HNE-CAE: concentrazione di 4-idrossinonenale nel condensato dell'aria esalata.

Correlazione di Serman; r : indice di correlazione; p significativa per valori < 0.05 .

Figura 12. Saldatori. Correlazione tra Cr-A e Cr-CAE (A) e tra Cr-A e Cr-U (B)

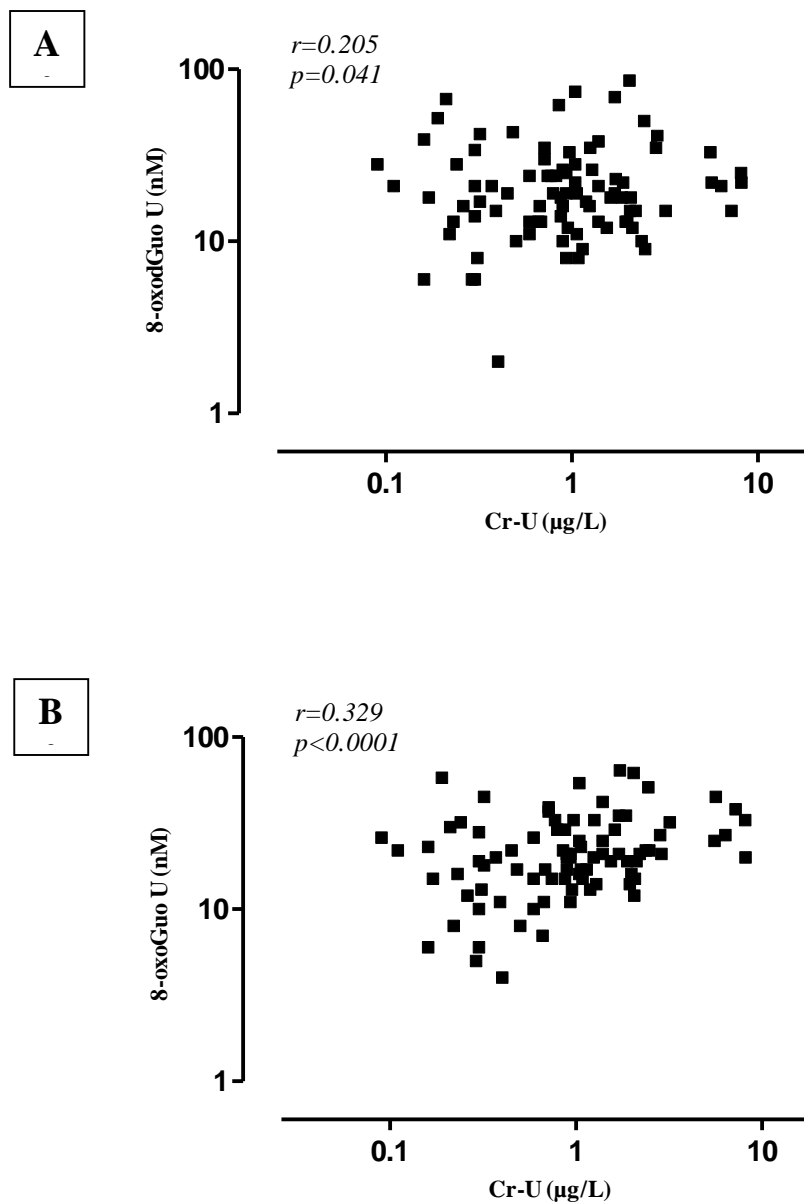


Legenda: Cr-A: concentrazione di cromo in aria ambiente; Cr-CAE: concentrazione di cromo nel condensato dell'aria esalata (A); Cr-U: concentrazione di cromo nelle urine (B)

Correlazione di Sperman; r : indice di correlazione; p significativa per valori < 0.05 .

Figura 13. Saldatori.

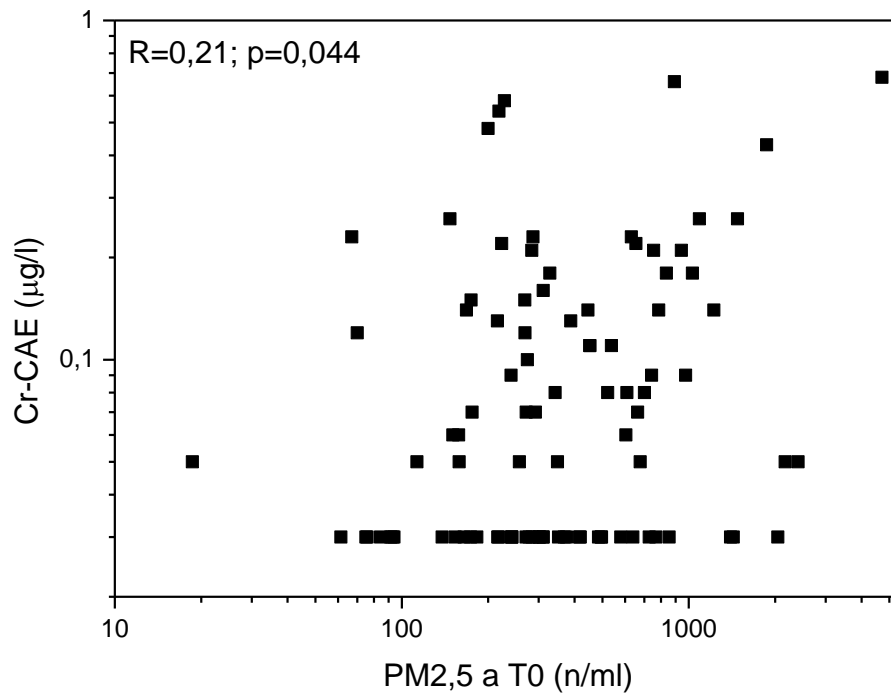
Correlazione tra 8-oxodGuo U e Cr-U (A) e tra 8-oxoGuo e Cr-U (B) al T₁



Legenda. 8-oxodGuo U: 8-idrossi-2-deossiguanosina nelle urine (**A**); 8-oxoGuo U: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina nelle urine (**B**); Cr-U: concentrazione del cromo urinario;

Correlazione di Spearman; r : indice di correlazione; p significativa per valori < 0.05 .

Figura 14. Saldatori. Correlazione tra Cr-CAE e PM 2.5-CAE

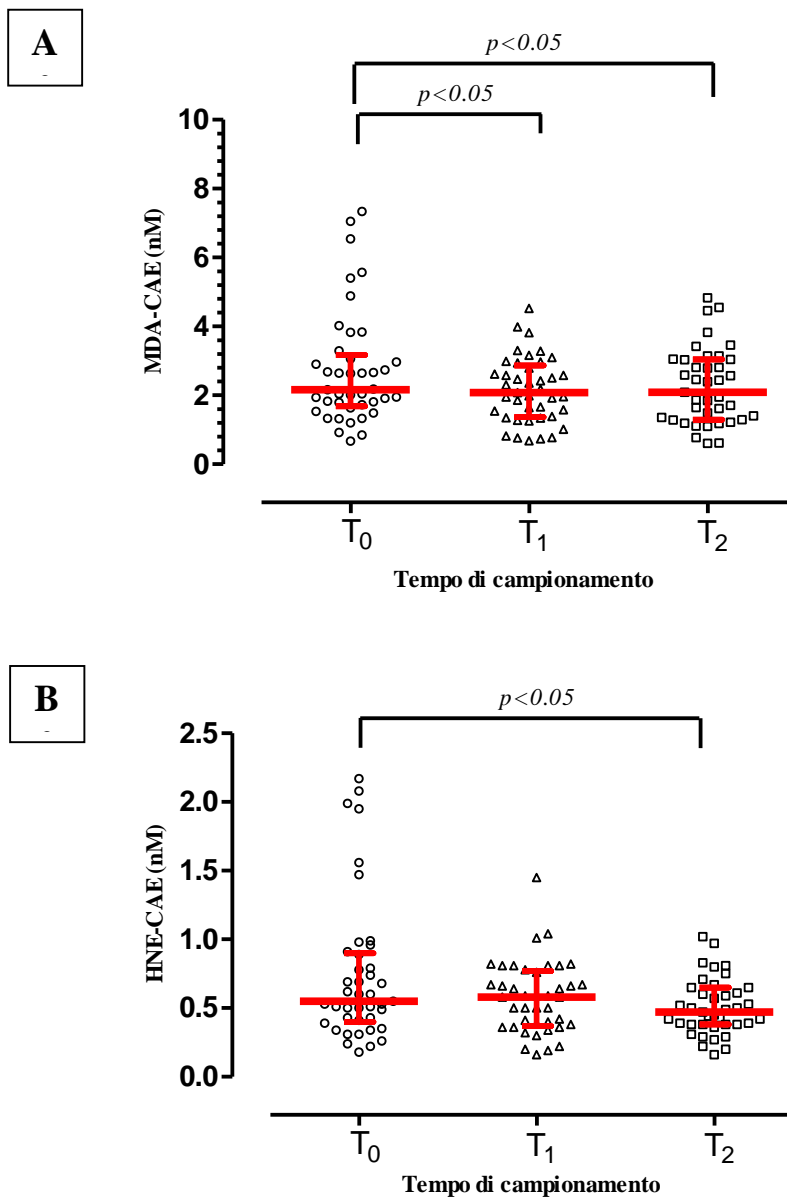


Legenda: Cr-CAE: concentrazione di cromo nel condensato dell'aria esalata; PM 2.5: PM 2.5: materiale particolato, classe dimensionale 1-2.5 µm. T₀: venerdì fine turno

Correlazione di Spearman; r : indice di correlazione; p significativa per valori < 0.05.

Figura 15. Montatori dell'industria aeronautica.

Andamento temporale della MDA-CAE (A) e del HNE-CAE (B)

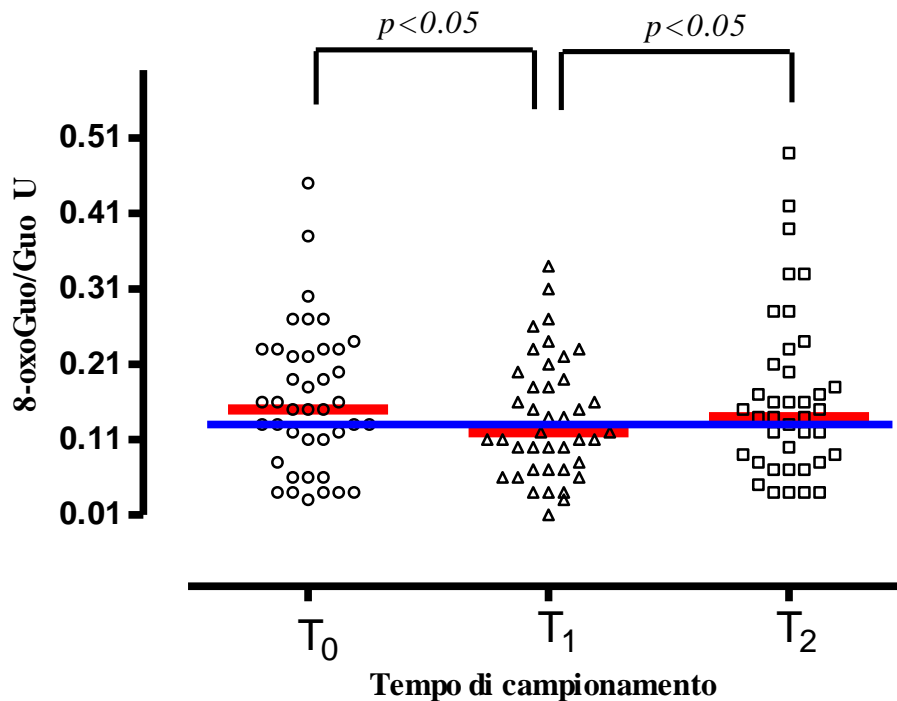


Legenda. MDA-CAE: concentrazione della malondialdeide nel condensato dell'aria esalata (A); HNE-CAE: concentrazione della 4-idrossinonenale nel condensato dell'aria esalata (B); T₀: venerdì inizio turno; T₁: venerdì fine turno; T₂: lunedì inizio turno.

In rosso sono rappresentati i valori mediani (25°-75° percentile) di MDA-CAE (A) e di HNE-CAE (B) nei tre tempi di campionamento.

Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn

Figura 16. Montatori dell'industria aeronautica. Andamento temporale del rapporto 8-oxoGuo/dGuo U (B) e confronto con i valori misurati nella popolazione Controlli 1.



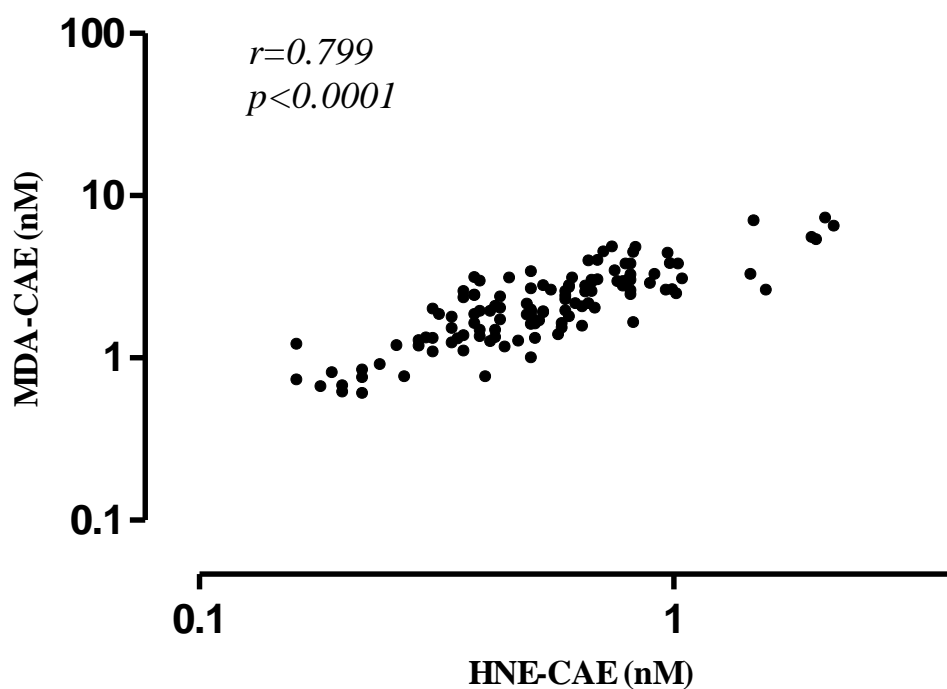
Legenda: 8-oxoGuo/Guo U: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina/guanosina nelle urine; T₀: venerdì fine turno; T₁: lunedì inizio turno; T₂: lunedì fine turno.

Le linee rosse rappresentano i valori mediani del rapporto 8-oxoGuo/Guo nei tre tempi di campionamento. La linea blu rappresenta il valore mediano del rapporto 8-oxoGuo/Guo nella popolazione di Controlli 1.

Test non parametrico di Friedman seguito dal test di Dunn per valutare le differenze di 8-oxoGuo/Guo tra i tempi di campionamento nei montatori dell'industria aeronautica.

Test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Mann-Whitney corretto per il test di Bonferroni per valutare le differenze di 8-oxoGuo/Guo tra montatori e controlli.

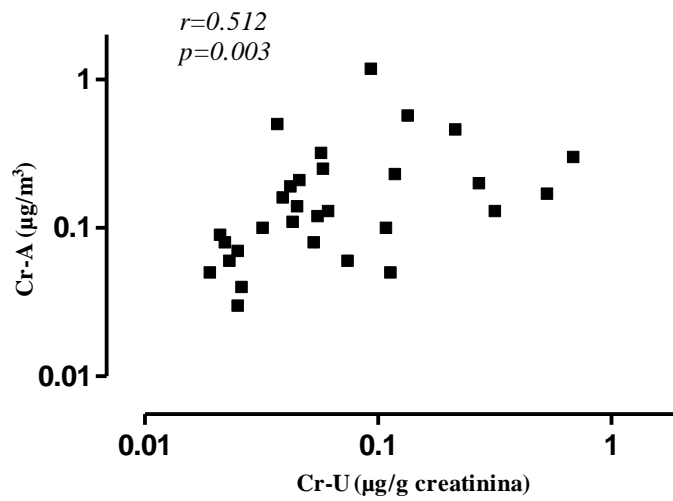
Figura 17. Montatori dell'industria aeronautica. Correlazione tra MDA-CAE e HNE-CAE



Legenda. HNE-CAE: concentrazione della 4-idrossinonemale nel condensato dell'aria esalata; MDA-CAE: concentrazione della MDA nel condensato dell'aria esalata;

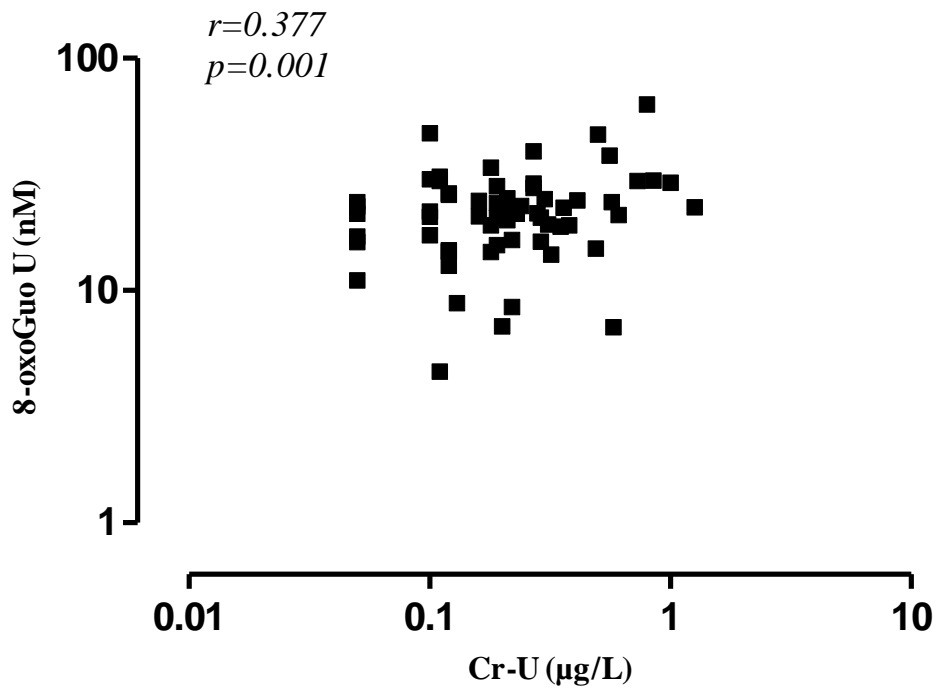
Correlazione di Sperman; r : indice di correlazione; p significativa per valori < 0.05 .

Figura 18. Montatori dell'industria aeronautica. Correlazione tra Cr-A e Cr-U



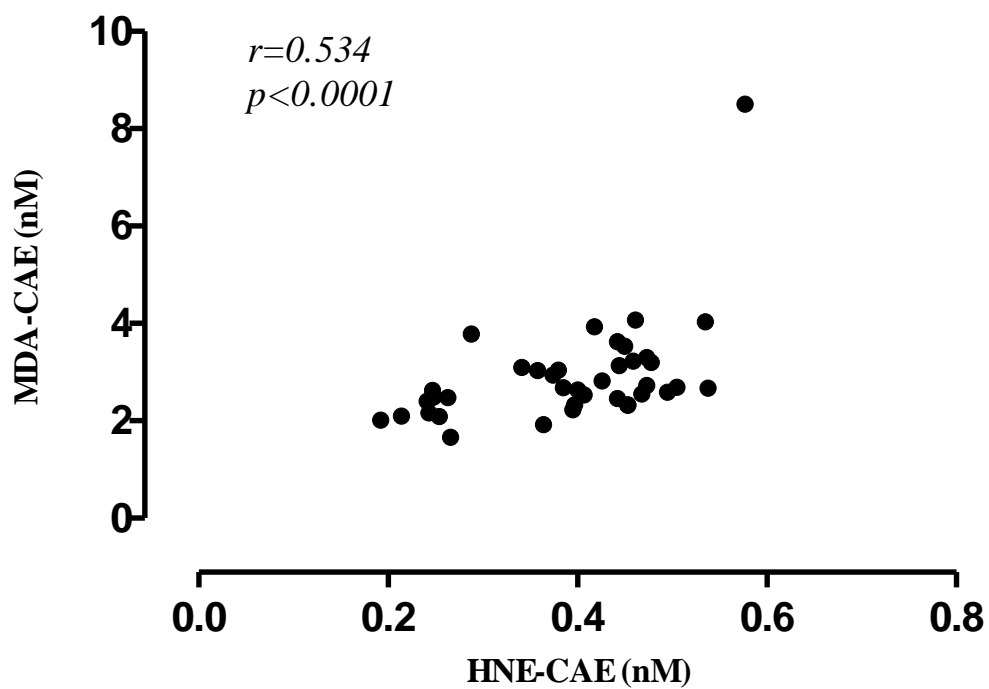
Legenda. Cr-A: concentrazione del cromo totale in aria ambiente; Cr-U: concentrazione del cromo urinario;
Correlazione di Sperman; r : indice di correlazione; p significativa per valori < 0.05 .

Figura 19. Montatori dell'industria aeronautica. Correlazione tra 8-oxoGuo U e Cr-U



Legenda. 8-oxoGuo U: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina nelle urine; Cr-U: concentrazione del cromo urinario; Correlazione di Spearman; r : indice di correlazione; p significativa per valori < 0.05 .

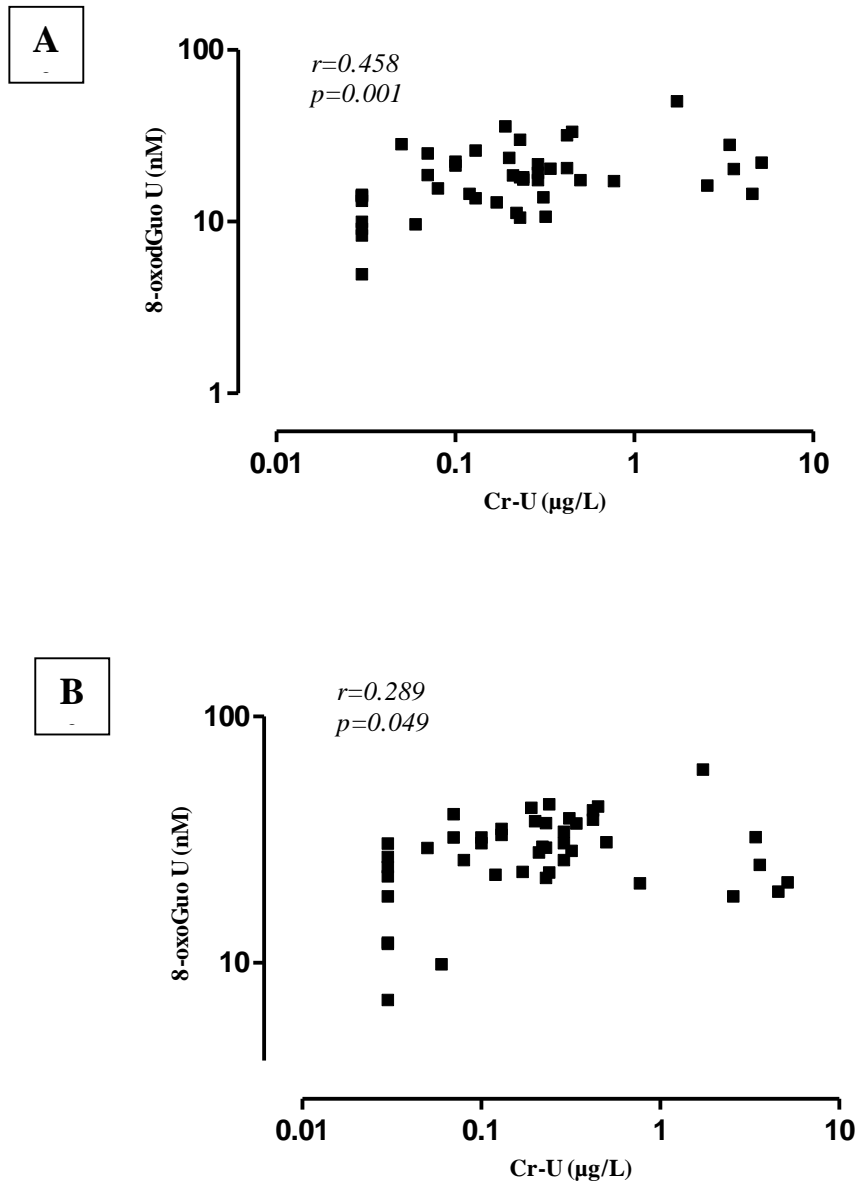
Figura 20. Cromatori. Correlazione tra MDA-CAE e HNE-CAE



Legenda. HNE-CAE: concentrazione della 4-idrossinonemale nel condensato dell'aria esalata; MDA-CAE: concentrazione della MDA nel condensato dell'aria esalata;

Correlazione di Serman; r : indice di correlazione; p significativa per valori < 0.05 .

Figura 21. Cromatori. Correlazione tra 8-oxodGuo U e Cr-U (A) e tra 8-oxoGuo U e Cr-U (B)



Legenda. 8-oxodGuo U: 8-idrossi-2-deossiguanosina nelle urine (A); 8-oxoGuo U: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina nelle urine (B); Cr-U: concentrazione del cromo urinario;

Correlazione di Serman; r : indice di correlazione; p significativa per valori < 0.05 .

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio sentitamente il Prof. Antonio Mutti e il Prof. Massimo Corradi che con il loro sapere mi hanno guidata lungo questo percorso formativo.

Ringrazio il Prof. Matteo Goldoni e la Prof.ssa Roberta Andreoli per il loro fondamentale contributo allo studio.

Ringrazio Rossella e Silvana per la loro immediata disponibilità.

Un sincero grazie alla Dr.ssa Chiara Tanzi e al Dr. Francesco Magnani, senza il loro aiuto non sarei riuscita ad intraprendere questo progetto.

Ringrazio la Prof.ssa Luisella Selis e tutti i medici competenti che hanno partecipato al progetto, in particolare ringrazio il Dr. Francesco Saverio Renzulli, il Dr. Alessandro Rasi e il Dr. Marco Spaggiari.

Ringrazio ancora i colleghi delle Università di Pavia, Genova e Brescia per la collaborazione.

Ringrazio Alessandra, tutti i miei amici/colleghi che hanno partecipato allo studio in questi tre anni, in particolare grazie a Susanna, Silvia M, Maria Emilia e Silvia B.

Un enorme grazie a Francesco Magnelli per l'aiuto e il supporto datomi in quest'ultimo anno.

Ringrazio ancora tutti i miei amici.

Ringrazio i miei genitori che mi hanno sempre sostenuta, in particolare la mia mamma senza di lei non ce l'avrei mai fatta.

Ringrazio mia sorella Ambra per avermi sempre ascoltata e per i momenti di svago passati insieme.

Infine ringrazio la mia stupenda famiglia: Alessandro per l'immensa gioia che mi dà giorno dopo giorno e Marcello con cui condivido tutte le esperienze di vita e il cui supporto è indispensabile.