

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA PREVENZIONE
CICLO XX

Elementi metallici
e composti organici aromatici nel tessuto polmonare
sano e neoplastico

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Tutor:
Chiar.mo Prof. Pietro Apostoli

Dottoranda:
Simona Catalani

1 INTRODUZIONE	2
1.2 Elementi metallici	3
1.2.1 Arsenico (As)	6
1.2.2 Berillio (Be)	9
1.2.3 Cadmio (Cd)	11
1.2.4 Cromo (Cr)	14
1.2.5 Nichel (Ni)	17
1.2.6 Altri elementi metallici	19
1.3 Idrocarburi policiclici aromatici	20
1.4 Determinazione degli elementi su tessuti freschi e fissati,	24
possibili influenze e variazioni	24
1.5 Elementi metallici e idrocarburi policiclici aromatici nell'ambiente	26
2 OBIETTIVO DELLO STUDIO	29
3 MESSA A PUNTO E APPLICAZIONE DEL DOSAGGIO DI ELEMENTI METALLICI E IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICO NEL TESSUTO POLMONARE	30
3.1 Casistica	30
3.2 Metodo di analisi dei metalli	32
3.3 Metodo di analisi IPA	34
3.4 Risultati	36
3.4.1 Risultati elementi metallici	36
3.4.2 Risultati IPA	55
4 VALUTAZIONE META ANALITICA	61
4.1 Metodo	61
4.1.1 Elaborazione di una meta-analisi	62
4.2 Ricerca dei lavori: dosaggio elementi metallici su tessuti polmonari	63
4.2.1 Valutazione	63
4.2.2 Criteri di eliminazione e grading dei lavori	66
4.3 Risultato meta-analisi dosaggio elementi metallici in tessuti polmonari	68
4.4 Discussione	84
4.4.1 Fattori condizionanti l'accumulo di elementi metallici a livello polmonare	84
4.4.2. Informazioni di carattere metodologico	92
4.4.3. Considerazioni conclusive meta-analisi elementi metallici	95
4.5 Ricerca dei lavori: dosaggio IPA sui tessuti polmonari	97
4.6 Risultato meta-analisi dosaggio IPA nel tessuto polmonare	100
5 CONFRONTO DATI E META-ANALISI	101
5.1 Elementi Metallici	101
5.2 IPA	109
6 SVILUPPI FUTURI	112
7 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI	113
8 BIBLIOGRAFIA	117

1 INTRODUZIONE

L'apparato respiratorio ed il polmone in particolare sono fra gli organi più sensibili agli inquinanti ambientali e lavorativi ed un elevato numero di patologie polmonari, tra cui il tumore del polmone, sono stati correlati all'esposizione ambientale e occupazionale a sostanze chimiche cancerogene e non cancerogene. Poiché dati obiettivi di esposizione non sono disponibili nella maggior parte dei casi la ricostruzione del nesso causale fra esposizione soprattutto lavorativa e patologie polmonari è difficile.

L'aumento di mortalità per tumore polmonare in seguito all'esposizione a particolato atmosferico è stato stimato essere intorno all'8% in aree ad elevato inquinamento (Pope et al., 2002), in relazione al fatto che l'inquinamento atmosferico contiene una varietà di composti genotossici e con potenziale cancerogeno provenienti da motori di scarico, oli lubrificanti, fumo di tabacco.

È stato stimato che una percentuale di carcinomi broncogeni variabile, a seconda delle casistiche, dall'1 al 40%, possa essere attribuita all'esposizione occupazionale i cui agenti eziologici possono essere sia chimici (organici ed inorganici) che fisici (Ezzati, 2002).

Secondo la IARC (IARC, 2002), sono almeno 22 le sostanze riconosciute cancerogene per il polmone presenti nei luoghi di lavoro, tra questi ad esempio l'amianto, i composti dell'arsenico, il bis-clorometil-etere (BCME), il cadmio (Cd), il cromo (Cr), il nichel (Ni), il berillio (Be), il radon, le radiazioni ionizzanti, gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA). Tra queste sostanze chimiche, molte rimangono a lungo nei polmoni, perché sono stabili e quindi la loro eliminazione è difficile. Il loro contributo (frazione eziologica) potrebbe essere meno rilevante, sotto il profilo epidemiologico, di quello del fumo di tabacco, con cui però possono manifestare effetti additivi o sinergici. La gran parte di queste sostanze chimiche potenzialmente nocive è presente nell'ambiente di lavoro, ma anche nell'ambiente generale, benché i livelli di esposizione siano in questi casi generalmente minori.

Diversi studi, a partire dagli anni '70, hanno verificato l'accumulo di elementi metallici nel tessuto polmonare di soggetti professionalmente esposti al fine di stabilire se tale accumulo avesse potuto svolgere un ruolo nella patogenesi tumorale, in considerazione della maggior proporzione di neoplasie polmonari in soggetti con

esposizione professionale documentata, le aumentate concentrazioni tissutali di elementi metallici cancerogeni potrebbero essere interpretate in senso causale rispetto allo sviluppo della neoplasia, anche se i dati al momento non sono del tutto concordanti.

1.2 Elementi metallici

Agenzie come IARC, ACGIH e DFG hanno classificato come cancerogeni i seguenti elementi metallici o loro specie: arsenico, berillio, cadmio, cromo e nichel.

La principale via di esposizione è quella inalatoria (eccetto che per l'arsenico) e i principali organi target sono le prime vie respiratorie ed i polmoni. Sono riportati inoltre aumentati rischi di tumore per cute, prostata, reni, vescica e fegato e sangue (Beyersmann et al., 2002).

Per i vari elementi metallici è stata descritta una sensibile differenza nel potenziale cancerogeno dovuta a differenze nello stato di ossidazione, potenziale redox, natura organica o inorganica delle specie e stato di metilazione dei composti.

Rilevante è la capacità degli elementi metallici di generare specie reattive dell'ossigeno (ROS) e altri intermedi in grado di provocare danni diretti al DNA, nella loro abilità di interferire attivando o inibendo enzimi addetti alla riparazione del DNA e regolatori della proliferazione cellulare.

La formazione di complessi metallo-proteine e altre molecole può interferire sull'omeostasi cellulare e fornire le condizioni per una selezione di cellule con fenotipi trasformati.

I meccanismi alla base dell'induzione della cancerogenesi, sia nell'uomo che negli animali, non sono ancora stati del tutto chiariti. Probabilmente ogni metallo possiede un meccanismo molecolare che contribuisce allo sviluppo del tumore.

Generalmente si considera che la cancerogenesi si sviluppi in almeno quattro stadi principali: iniziazione, promozione, progressione e metastasi. Mutazioni del DNA capaci di attivare oncogeni o inattivare oncosoppressori vengono tradizionalmente considerate fattori cruciali per l'iniziazione, tuttavia contribuiscono a tale processo anche altri eventi, come l'attivazione della trascrizione, la ricombinazione e l'amplificazione di oncogeni (Solomon, 1991; Schwab, 1990). Alterazioni

dell'espressione genica e dei segnali intercellulari vengono considerate fattori promuoventi e di progressione tumorale (Mikalsen, 1990).

Gli ioni metallici sono in grado di legare direttamente, attraverso legami ionici e covalenti, alcuni componenti cellulari come il DNA e le proteine nucleari, causando un danno al DNA e cambi di conformazione. Oltre al legame diretto alle macromolecole cellulari, altri meccanismi sono coinvolti nella risposta cellulare indotta dai metalli. Numerosi studi hanno evidenziato che le specie reattive dell'ossigeno (ROS) giocano un ruolo fondamentale nel mediare la risposta cellulare e la cancerogenesi (Vallyathan, 1998).

L'esposizione umana agli elementi metallici è dovuta alla loro elevata diffusione e persistenza ambientale, derivanti anche dal largo uso industriale. Storicamente, le più pesanti esposizioni a metalli sono avvenute nei luoghi di lavoro o negli ambienti vicini a fonti industriali; nella popolazione generale, invece, l'esposizione è largamente diffusa, ma generalmente a bassi livelli di esposizione.

Gli elementi metallici possono avere multipli effetti sulle funzioni cellulari incluse proliferazioni, apoptosi, differenziazione e trasformazione cellulare

Non esiste un meccanismo unico nella cancerogenesi degli elementi metallici, ogni elemento esercita diversi effetti cellulari in accordo con le proprie proprietà chimico-fisiche e le corrispondenti interazioni con le biomolecole.

Con l'eccezione del cromo(VI) i metalli cancerogeni sono solo debolmente mutageni (Oller, 2002); arsenico, cadmio e nichel inibiscono efficacemente i meccanismi di riparazione del DNA e quindi si può affermare che questi elementi possono in qualche modo aumentare l'iniziazione tumorale indotta da altri agenti. Inoltre gli ioni degli stessi sono attivi induttori di geni che giocano un importante ruolo nella proliferazione cellulare favorendo quindi la crescita neoplastica. D'altra parte alcuni elementi metallici possono indurre geni codificanti per proteine citoprotettive come metallothioneine, GST, p53 e Stress proteins (Harris et al., 2003).

Le differenze nell'assorbimento, nella distribuzione, nel bilancio fra effetti detossificanti e di deregolazione possono spiegare la grande variazione di sensibilità degli organi verso gli elementi metallici cancerogeni.

L'interazione sui recettori dei fattori di crescita attraverso mutazioni o aumentate espressioni è una dei meccanismi responsabili dell'invasività e delle caratteristiche metastatiche dei tumori.

Gli elementi metallici considerati sono responsabili di effetti sovrapponibili indotti però da meccanismi e interazioni molecolari differenti, ad esempio provocano l'aumento della concentrazione di calcio intracellulare, implicato nei meccanismi di proliferazione cellulare, in particolare il cadmio provoca l'aumento del calcio attraverso l'interazione con una proteina G (Lyu et al., 1993), nichel, attraverso l'interazione con recettori del ferro sulla superficie cellulare (McNulty et al., 1999) e berillio attraverso un meccanismo 1,4,5-inositolo trifosfato dipendente (Misra et al., 2002).

1.2.1 Arsenico (As)

I meccanismi attraverso cui l'arsenico risulta cancerogeno sono stress ossidativo, danni al DNA, inibizione dei processi di riparazione, alterazione della metilazione del DNA, aberrazioni cromosomiche, attivazione dei segnali di trasduzione dell'espressione genica, modificazioni del controllo del ciclo e della differenziazione cellulari. Esso agisce essenzialmente a livello della promozione tumorale attraverso la modulazione dei segnali responsabili della crescita cellulare (Simenova et al., 2000). L'arsenico è assunto dall'organismo nelle sue specie inorganiche arsenico(III) o arsenico(V) e in condizioni anaerobiche predomina l'arsenico trivalente più tossico del pentavalente a causa di un veloce assorbimento cellulare, una maggiore abilità a legarsi ai siti sulfidrilici delle proteine e una maggiore tendenza a formare radicali liberi (Kitchin et al., 2005).

L'esposizione alle forme trivalenti dell'arsenico e ai composti mono e dimetilati sono associati a tumori a pelle, polmone, vescica, reni e fegato così come a molte altre patologie non neoplastiche come il diabete, l'ipertensione e disturbi cardiovascolari e cerebrovascolari (Tapio et al., 2006).

La più diffusa via di esposizione oltre a quella inalatoria in ambito occupazionale e ambientale è l'ingestione con acqua contaminata e alimenti.

È stato chiaramente dimostrato che l'esposizione a basse concentrazioni di As aumenta la proliferazione cellulare nell'uomo. L'aumento di tale proliferazione è mediato da diversi meccanismi fra cui l'attivazione del fattore di trascrizione AP-1 attraverso la chinasi MAP (mitogen-activated protein) e PKC (proteina chinasi C).

Oltre alla capacità di contribuire all'invasività tumorale è anche nota la capacità di indurre apoptosi, proprietà che viene sfruttata in alcuni farmaci usati nel trattamento dei tumori.

Dong (2002) ha dimostrato che l'esposizione di cellule JB6 a basse dosi di arsenico (0,5-24 μM) induce trasformazione cellulare mentre l'esposizione ad alte concentrazioni (50-100 μM) induce apoptosi, probabilmente a causa della tossicità dell'arsenico.

L'apoptosi indotta dall'arsenico non è dipendente da p53, questo è stato dimostrato studiando l'effetto dell'arsenico su due linee cellulari di fibroblasti una p53^{+/+} e una p53^{-/-}, il trattamento con arsenico ha indotto apoptosi in entrambe le linee cellulari.

(Huang et al., 1999). Proprietà questa che può essere sfruttata utilizzando l'arsenico nell'indurre apoptosi in tumori con mutazioni p53.

Le forme inorganiche di arsenico (III e V) mostrano un basso o nullo potenziale mutageno in modelli animali e batterici e solo in combinazione con altri agenti come luce UV, radiazione ionizzanti e agenti alchilanti provocano danni al DNA.

L'arsenico così come nichel, cadmio e cobalto inibiscono i processi di riparazione del DNA aumentando quindi l'azione mutagena e cancerogena di agenti direttamente genotossici; Lau et al., (2006) hanno dimostrato che una co-esposizione a arsenico e Benzo(a)Pirene (BaP) aumenta la trasformazione cellulare di 100 volte rispetto alla singola esposizione.

Studi in vivo mostrano che l'arsenico potenzia la formazione di addotti al DNA a basse dosi. Il livello di addotti BaP-DNA in polmoni e cute è superiore in seguito a co-esposizione con arsenico e nel caso del polmone la differenza è statisticamente significativa ($p=0,038$). (Evans et al. 2004)

Maier et al., (2004), riportano che l'arsenico potenzia il legame del BaP con il DNA in vitro aumentando il livello di addotti BaP-DNA di 17 volte. Lo studio in vivo riporta il medesimo andamento anche se con un aumento inferiore.

Evidenze epidemiologiche indicano che l'arsenico e il fumo di sigarette agiscono sinergicamente per l'aumento dell'incidenza di tumori polmonari promuovendo lo stress ossidativo e quindi l'ossidazione al DNA (Hays et al., 2006).

La conversione enzimatica dell'arsenico inorganico nelle specie mono e dimetilate è stata a lungo considerata il principale meccanismo di detossificazione delle specie inorganiche e si riteneva che solo le specie inorganiche fossero dotate di potere cancerogeno. Realmente i composti pentavalenti metilati sono meno tossici ed escreti più rapidamente dell'As inorganico, inoltre le forme metilate dell'As trivalente sono citotossiche e genotossiche.

Nesnow et al. (2002) hanno dimostrato che le forme trivalenti acido monometilarsinico (MMA(III)) e acido dimetilarsinico (DMA(III)) sono maggiormente clastogeniche delle forme pentavalenti e in grado di formare ROS.

MMA(III) e DMA(III) inducono effetti citotossici e genotossici come formazione di micronuclei, aberrazioni cromosomiche e scambio di cromatidi fratelli (Dopp et al., 2004)

Nessun enzima dei sistemi di riparazione del DNA è inibiti dall'arsenico con eccezione di PARP (polyADP-ribose polymerase). Quindi è improbabile che l'effetto dell'arsenico sui meccanismi di riparazione del DNA avvenga attraverso una interazione diretta con gli enzimi addetti ma indirettamente attraverso una modulazione genica.

1.2.2 Berillio (Be)

Il berillio e i suoi sali sono cancerogeni e inducono trasformazioni cellulari su culture cellulari mammifere, si legano a nucleoproteine e inibiscono enzimi coinvolti nella sintesi del DNA, inoltre inducono mutazioni geniche su colture cellulari (Misra et al., 2002).

Il berillio è estremamente tossico e porta a malattie respiratorie sia acute che croniche (Kriebel et al., 1988). Uno studio sulla mortalità di 9225 lavoratori impegnati nell'industria del berillio ha mostrato un eccesso di rischio per tumore del polmone (Ward, 1992), oltre ad un eccesso di enfisema e pneumoconiosi. Il rischio di tumore aumenta con l'aumentare del periodo di latenza dalla prima esposizione, ma non è correlato con la durata dell'esposizione. Una breve esposizione in alcune attività industriali potrebbe essere correlata con un'alta esposizione. Per esempio, l'85% dei lavoratori di aziende nelle quali era stato evidenziato un aumentato rischio di tumore del polmone è stato impiegato per meno di un anno. Inoltre, questi lavoratori avevano un rischio aumentato di morte per pneumoconiosi (Hayes et al., 1997). Negli Stati Uniti, fin dal 1952 si registrano i casi di malattie berillio correlate: è stato trovato un eccesso di rischio per tumore del polmone in 689 lavoratori registrati (Steenland et al., 1991).

Solo un limitato numero di studi però è stato dedicato ai meccanismi di azione cancerogeni e mutageni del berillio. Saggi di mutazioni e aberrazioni cromosomiche sul berillio e i suoi composti hanno fornito risultati contraddittori. I test batterici sono negativi mentre quelli su cellule di mammiferi mostrano un'evidenza di induzione di mutazioni, aberrazioni cromosomiche e trasformazioni cellulari (Gordon et al., 2003). Evidenze epidemiologiche indicano nelle vie respiratorie il principale target di questo elemento metallico.

Per i tumori polmonari, una esposizione di 17 µg di berillio/gr di polmone induce tumori maligni e o benigni nel 50% degli animali trattati di entrambi i sessi, con una sopravvivenza ≥ 1 ; si nota una sostanziale molteplicità tumorale ma non sono presenti mutazioni geniche di K-ras e p-53 (Finch et al., 1996).

Non tutti i sali del berillio inducono gli stessi effetti e il fluoruro di berillio rappresenta una situazione unica con effetti sui segnali di trasduzione e sul metabolismo energetico, inibiscono ad esempio le ATPasi (Sankaran et al., 1997).

Studio in vivo su topi esposti a dosi crescenti di Berillio mostrano un aumento del numero totale di cellule, un aumento della percentuale di neutrofili, elevati livelli di proteine totali e attività della β -glucuronidasi e lattato deidrogenasi nel BAL dei topi esposti a alte dosi di berillio.

1.2.3 Cadmio (Cd)

Il cadmio è associato a tumori a polmoni ed in minor misura a prostata, pancreas, reni. L'inalazione di cadmio nei ratti provoca adenocarcinoma polmonare, può inoltre indurre tumori o lesioni preneoplastiche nella prostata di ratti dopo ingestione o iniezione mentre a dosi relativamente alte può indurre tumori testicolari benigni anche se questo appare essere legato a diminuita funzionalità più che a una specifica azione cancerogena (Waalkes et al., 2000).

Molti studi indicano che il cadmio è debolmente mutageno e probabilmente agisce attraverso meccanismi indiretti o epigenetici, compresa l'attivazione di processi oncogeni o soppressione di apoptosi.

Il cadmio è un cancerogeno non-genotossico e risulta non mutageno in test su batteri e solo debolmente mutageno in test su cellule di mammiferi, tuttavia è provato che il cadmio è co-mutageno in test su cellule di mammiferi quando combinato con agenti genotossici proprietà questa che può essere spiegata attraverso l'inibizione dei processi di riparazione al DNA (Hartwig et Schwerdtle , 2002).

I meccanismi coinvolti sono essenzialmente indiretti come la generazione di ROS, l'inibizione dei sistemi di riparazione del DNA, il danneggiamento dei sistemi di difesa cellulare come gli antiossidanti, l'interferenza con i segnali di trasduzione e la distruzione dell'adesione cellulare (Waisberg et al., 2003).

L'esposizione a cadmio induce l'espressione di molti geni che codificano per la sintesi delle metallotioneine (MT), delle proteine HSPs (heat shock proteins) (geni coinvolti nella risposta a Stress Ossidativo) e geni coinvolti nella sintesi del glutathione (GSH).

Da studi su roditori si può dedurre che l'effetto protettivo delle MT dipende dalla distribuzione del cadmio, dall'inducibilità dei geni MT e dal livello delle MT nei vari tessuti e specie (Misra et al., 1997); ad esempio Ren et al., 2003, hanno mostrato che il trattamento con cadmio nei ratti provoca un aumento delle MT nel fegato ma non nei testicoli e questo può essere la causa dell'alta suscettibilità di questo organo al cadmio.

I macrofagi alveolari in soggetti fumatori accumulano significative quantità di cadmio senza un conseguente aumento delle MT indicando quindi una saturazione delle

stesse. L'aumento di cadmio nelle cellule alveolari può contribuire allo sviluppo di tumori nei soggetti fumatori (Grasseschi et al., 2003).

L'espressione di geni antiossidanti come quelli che codificano per la sintesi di superossido dismutasi e catalasi sono depressi dal cadmio (Liu et al., 2002) e questa può essere la via attraverso il quale il cadmio induce perossidazione lipidica, stress ossidativo e tossicità correlata.

In contrasto ci sono studi che suggeriscono che una esposizione prolungata a cadmio porta i tessuti ad una sorta di adattamento per cui si osserva un aumento dell'attività della SOD e catalasi (Zikic et al., 1998).

L'attivazione di proto-oncogeni ad opera del cadmio è un meccanismo epigenetico che coinvolge l'inibizione della metilazione del DNA che rappresenta uno strumento cellulare di repressione genica a larga scala, l'ipometilazione è associata ad una overexpression di proto-oncogeni (Takiguchi et al., 2003).

Il cadmio altera la concentrazione di molti secondi messaggeri cellulari (come la concentrazione di calcio intracellulare) e modifica l'attività di proteine chinasi e fattori di trascrizione.

Il cadmio inoltre si può sostituire al calcio della E-caderina, glicoproteina transmembrana che gioca un ruolo chiave nell'adesione cellulare implicata anche nella proliferazione, apoptosi, differenziazione e invasione tumorale (Prozialeck et al., 2003).

Le cellule esposte a cadmio mostrano "adattamenti" cellulari: ad esempio il livello di antiossidanti cresce in risposta alla presenza di ROS cadmio-indotti; così come l'induzione di geni MT ad opera del cadmio porta ad un aumento di metallotioneine che legandosi al metallo riducono la concentrazione di cadmio libero nella cellula.

Dal punto di vista epidemiologico, i risultati sono contrastanti, un piccolo studio svedese su lavoratori che producevano batterie, esposti a cadmio e a nichel idrossido, non ha trovato eccessi di rischio (Elinder et al., 1985). Nemmeno un ulteriore studio inglese condotto tra lavoratori che producevano leghe di rame e cadmio ha trovato eccessi di rischio per patologia neoplastica respiratoria o prostatica, nonostante un aumento dei casi di enfisema e di proteinuria (Sorahan et al., 1995). Un eccesso di tumori polmonari è stato invece trovato fra gli operai con mansioni adiacenti alle precedenti lavorazioni (Sorahan et al., 1995), con il dubbio che ciò fosse dovuto ad una co-esposizione ad arsenico. Le possibili co-esposizioni non sono state valutate neanche

in studi su 17 stabilimenti inglesi che producevano o usavano cadmio e nei quali è stato evidenziato un aumento di rischio per carcinoma polmonare (Kazantasis et al., 1992; Kazantasis et al., 1993). Invece, un eccesso di tale carcinoma ed una relazione dose-risposta sono stati trovati in lavoratori di un'azienda statunitense di recupero di cadmio (Stayner, 1992). In conclusione, gli studi fra gli esposti a cadmio sono in genere limitati dal piccolo numero di soggetti con esposizioni significative, dalle limitate informazioni sul tipo di cadmio in esame (polvere, fumi o sali di cadmio) e dalla potenziale co-esposizione ad altri cancerogeni, quali nichel ed arsenico. Tuttavia, è stato evidenziato un aumento di rischio di tumore del polmone nell'uomo e anche gli studi sperimentali supportano questo dato (IARC, 1993).

1.2.4 Cromo (Cr)

Il cromo esavalente (Cr VI), classificato in gruppo 1 dalla IARC (International Agency for Research on Cancer), è in grado di determinare sia alterazioni dirette a carico del DNA (mutazioni puntiformi, aberrazioni cromosomiche, formazione di addotti) e delle proteine, sia lesioni attraverso la produzione di ROS (O'Brien et al., 2003). Altre lesioni invece sono potenzialmente pre-mutagene, come i fenomeni di perossidazione lipidica con conseguente danno strutturale e funzionale alle membrane. Queste alterazioni, che rappresentano gli effetti di differenti cinetiche degli enzimi di riparazione del DNA, sono descritte in un recente studio relativo alla citotossicità, alla cancerogenicità ed ai meccanismi di danno ossidativo di diverse forme di cromo (Dayan e Paine, 2001), ma sono già state da tempo studiate (De Flora et al., 1985; De Flora, 1990).

I dati sperimentali indicano l'importanza della riduzione del cromo(VI) a cromo(III) all'interno dell'organismo; in condizioni fisiologiche il cromo(VI) attraversa le membrane cellulari e subisce una riduzione metabolica ad opera di acido ascorbico, composti tiolici a basso peso molecolari come glutatione e cisteina; il cromo(VI) è l'unico elemento metallo cancerogeno che genera specie reattive dell'ossigeno direttamente attraverso l'interazione con riduttori cellulari (Beyersmann, 2002).

Nel corso del processo di riduzione del cromo(VI) si formano intermedi reattivi come cromo(IV) e cromo(V) e specie radicaliche reattive.

La reazione di riduzione alla quale possono andare incontro i composti esavalenti, così come l'interazione con altri bersagli molecolari, soprattutto rappresentati dagli acidi nucleici, costituirebbe la base per gli effetti genotossici.

Il cromo(III) è in grado di formare complessi con molteplici ligandi come aminoacidi come cisteina, istidina, serina, treonina e tirosina, proteine quali l'actina, RNA e DNA (Sudgen et al., 2000).

Il legame del cromo è base specifico anche se non in modo assoluto e nel caso del DNA è verso la guanina, mentre per l'RNA l'acido poliriboguanilico (poli(G)) (Arakawa et al., 2000).

Studi hanno dimostrato che il cromo(V) oltre a reagire con H_2O_2 portando alla produzione di radicali idrossilici è in grado di ossidare direttamente basi (guanina o 8-

oxo-dG) attraverso sottrazione di elettroni e conseguente addizione all'ossigeno, quindi senza coinvolgere la produzione di ROS. (Sudgen et al., 2001; Bose et al., 1999). E' stato anche ipotizzato un possibile meccanismo epigenetico per la genotossicità del cromo, studiando un sistema in vitro in grado di causare la metilazione del DNA delle regioni promotrici in cellule transgeniche (G12) di mammifero, V79 derivate, il fenomeno deriverebbe dal gran numero di geni oncosoppressori ed altri geni di riparazione del DNA che sarebbero inattivati in seguito alla metilazione del DNA (Klein, et al., 2002; Beyersmann, 2002).

I principali Target cellulari del cromo (VI) sono le cellule epiteliali polmonari e i fibroblasti, studi su linee cellulari di carcinoma polmonare hanno dimostrato una correlazione fra l'uptake di bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) e la risposta cellulare (Liu et al., 2001).

Pritchard et al. (2001) suggeriscono che gli effetti indotti dal cromo(VI) sono dose-dipendenti, correlati con l'estensione dei danni al DNA. Basse dosi di cromo(VI) ($<2\mu M$, 24h) possono causare moderati danni DNA, come un transitorio arresto del controllo cellulare che permette la riparazione del DNA in un secondo momento: l'esposizione ad alte dosi ($>5\mu M$, 24h) può causare danni irreversibili che portano al blocco del ciclo cellulare.

Studi in vitro hanno dimostrato che i livelli di p53 in linee cellulari tumorali umane aumentano in seguito ad esposizione di cromo(VI), questo dimostra che i meccanismi coinvolti nella riparazione di insulti cromo-correlati sono mediati dal p53, dall'arresto del ciclo cellulare e dall'apoptosi (Wang et al., 2001).

Tuttavia recenti studi hanno dimostrato che oltre al p53 viene attivato il gene per ATM (ataxia telangiectasia-mutated) (Ha et al., 2003) che risulta essere il principale segnale coinvolto nell'apoptosi cellulare indotta dal cromo e che paradossalmente contribuisce anche alla sopravvivenza cellulare

L'analisi degli studi relativi ai composti di cromo(VI) va inoltre diversificata in funzione della solubilità dei composti. È noto da molto tempo e largamente accettato che i composti scarsamente solubili del cromo(VI) sono agenti cancerogeni per l'uomo, ma anche composti relativamente idrosolubili o mediamente solubili in acqua del cromo(VI) si sono rilevati cancerogeni. Le minori evidenze di cancerogenicità per l'uomo dei composti più solubili del cromo(VI) potrebbero dipendere dalla minor

esposizione nei comparti produttivi a rischio, dalla più breve emivita biologica e dalla minor interazione con agenti co-cancerogeni nelle miscele di inquinanti ambientali a cui i lavoratori sono esposti.

Studi epidemiologici statunitensi, inglesi, tedeschi e giapponesi hanno mostrato un rischio elevato di tumore al polmone nelle industrie di produzione di cromati (Pastides, 1994; Davies, 1991; Korallus, 1993). Il rischio era elevato in particolare tra i lavoratori maggiormente esposti a cromo esavalente (Pastides, 1994). Rosenman e Stanbury nel 1996 hanno studiato hanno dimostrato un eccesso di rischio per cancro polmonare e per tumori delle cavità nasali in una coorte di lavoratori, assunti fra il 1937 e il 1971, di quattro industrie che producevano cromati (Rosenman et al. 1996). Uno studio recente (Gibb et al, 2000), condotto su 2357 lavoratori assunti fra il 1950 ed il 1974 in un'industria di produzione di cromati, ha dimostrato una stretta relazione dose-risposta tra esposizione cumulativa a cromo (VI) e tumore del polmone e alle fosse nasali, controllando l'effetto confondente del fumo di sigaretta.

1.2.5 Nichel (Ni)

La cancerogenesi del nichel si basa essenzialmente sulla biodisponibilità degli ioni sul sito nucleare delle cellule respiratorie target. Pertanto non è solo la presenza del nichel nell'aria a determinare il suo potenziale cancerogeno ma anche se, una volta inalato, è biodisponibile in sufficiente quantità nei siti nucleari delle cellule epiteliali.

I fattori che influenzano questa biodisponibilità e che determinano quindi il rischio intrinseco sono la dimensione delle particelle, le caratteristiche di superficie, la solubilità, il meccanismo di escrezione dal tratto respiratorio e il meccanismo di penetrazione nelle cellule target .

Studi in vitro e in vivo hanno confermato l'effetto cancerogeno del nichel e dei suoi composti tentando di spiegare i meccanismi di azione come la capacità di causare trasformazioni cellulari. È dimostrato che il nichel causa piccoli o nessun danno al DNA e non è mutageno in test su batteri e poco in culture cellulari di mammiferi (Hu et al., 2004).

Studi in vitro su cellule animali hanno evidenziato che trattamenti con cloruro di nichel possono causare un aumento nella frequenza delle mutazioni indotte dalla luce UV sul gene ipoxantina (guanina) fosforibosil-transferasi (hprt) e lo scambio di cromatidi fratelli. e aumentare la trasformazione morfologica indotta dal benzo(a)pirene, il maggiore agente cancerogeno presente nel fumo di sigarette, in cellule embrionali di criceto (Kasprzak et al., 2003).

Hu et al., (2004) dimostrano che l'esposizione a nichel aumenta significativamente la frequenza delle mutazioni indotte da addotti-benzo(a)pirene diol-eossido (BPDE metabolita attivo del benzo(a) pirene) aumentando la genotossicità e mutagenicità degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) attraverso l'inibizione di geni implicati nella riparazione al DNA.

L'esposizione a nichel porta alla formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) , all'attivazione di fattori di trascrizione e alla conseguente interazione con l'espressione di geni correlati allo sviluppo del tumore (Savolainen et al., 1996; Lu et al., 2005).

Nella caratterizzazione della cancerogenicità del nichel è essenziale l'identificazione della specie. L'esposizione a composti solubili aumenta il rischio di tumori respiratori a concentrazioni inferiori ($> 1 \text{ mg /m}^3 \text{ Ni}$) rispetto ai composti insolubili ($> 10 \text{ mg /m}^3 \text{ Ni}$) (Oller et al., 2002), tuttavia l'abilità degli studi epidemiologici di determinare l'apporto

delle specie solubili rispetto alle insolubili sulla cancerogenesi è limitata a causa dei pochi dati disponibili sulle esposizioni e a causa dell'esposizione a miscele delle specie e altri agenti potenzialmente cancerogeni.

Il nichel ossido non è solubile nei fluidi biologici per cui non libera quantità sufficiente di ioni nichel (II) a livello del DNA; tuttavia proprio a causa della bassa solubilità il suo accumulo a livello polmonare può causare reazioni infiammatorie capaci di produrre effetti genotossici indiretti.

Nichel solfato è rapidamente solubile e non è in grado di penetrare nelle cellule poiché viene rapidamente escreto con le urine.

La solubilità dei composti del nichel inalati è quindi direttamente correlata alla tossicità. La penetrazione di particelle di nichel insolubili attraverso la fagocitosi è un meccanismo efficace per far arrivare il nichel alle cellule target, mentre non si evidenzia nessun uptake degli ioni di nichel che derivano dai composti solubili.

L'esempio più noto è rappresentato dal nichel subsolfuro. Questo composto è parzialmente solubile nei fluidi biologici e riesce a entrare nelle cellule, una volta dentro i fagosomi a causa del pH acido gli ioni sono liberati e distribuiti al sito nucleare: Le particelle di nichel subsolfuro non si accumulano nei polmoni e sembrano fagocitate e solubilizzate nelle cellule target, permettendo il rilascio di una dose sufficiente di ioni nichel(II) da esercitare un effetto genotossico nel nucleo.

Al contrario le specie solubili si dissociano immediatamente in ioni nichel e la penetrazione degli ioni nelle cellule è poco efficiente e contrastata da una rapida escrezione degli ioni dal polmone e da un'alta affinità degli ioni con le proteine.

Questo modello conferma che le specie solubili del nichel hanno un potere cancerogeno inferiore alle specie insolubili, tuttavia in teoria se la concentrazione delle specie solubili del nichel è molto alta la dose di nichel (II) potrebbe raggiungere i nuclei delle cellule target, in pratica questo non è possibile poiché la tossicità degli ioni nichel (II) causa la morte a concentrazioni inferiori a quelle necessarie alla cancerogenicità (Haber et al., 2000).

L'inalazione del nichel solubile non porta sufficiente nichel biodisponibile per indurre tumori, tuttavia come nel caso di nichel subsolfuro i composti solubili del nichel possono causare una tossicità respiratoria e possono aumentare la cancerogenicità di altri composti (Salnikow et al., 2000)

In conclusione, il nichel, soprattutto nella forma solubile di nichel solfato e nichel ossido è un noto cancerogeno che aumenta il rischio di tumori delle cavità nasali, dei seni paranasali (tumori molto rari nella popolazione generale) e del polmone (Shen et al., 1994; IARC, 1990).

1.2.6 Altri elementi metallici

Negli ultimi anni, studi sperimentali suggeriscono che altri metalli quali il piombo (Pb) e il cobalto (Co) possano essere cancerogeni, ma il rischio non è stato ancora adeguatamente valutato nell'uomo. Il loro meccanismo d'azione non è ben noto, ma sembrerebbe essere associato agli effetti indiretti legati alla produzione di radicali liberi e specie reattive dell'ossigeno. Il piombo, ad esempio, è classificato dalla IARC come possibile cancerogeno per l'uomo (gruppo 2B), ma, nonostante la plausibilità biologica di una possibile associazione del piombo con l'eccesso di tumori in tutte le sedi, legata alla sua capacità di inibire i processi di riparazione del DNA, non sembra che gli esposti professionalmente a piombo abbiano una maggior frequenza di tumori. La IARC colloca il cobalto ed i composti di cobalto all'interno del gruppo 2B (agenti che possono essere cancerogeni per gli esseri umani). L'ACGIH ha collocato il cobalto ed i suoi composti inorganici nella categoria A3 (cancerogeno per gli animali da laboratorio: l'agente è cancerogeno per gli animali da laboratorio in concentrazioni relativamente elevate, attraverso vie, in forme istologiche, o con meccanismi che non sono considerate importanti per l'esposizione degli operai).

1.3 Idrocarburi policiclici aromatici

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono una famiglia di composti a due o più anelli aromatici condensati che si formano durante i processi di combustione incompleta e per pirolisi di materiale organico. La loro presenza nell'ambiente è legata sia a sorgenti naturali (incendi, attività vulcanica, biosintesi) sia ad attività antropiche (utilizzo energetico di combustibili fossili, incenerimento di rifiuti, dispersione di oli minerali). Sono composti ubiquitari che si ritrovano nell'ambiente sia sotto forma di polveri sia di vapore libero o adsorbito su particolato atmosferico. A prescindere da specifiche esposizioni professionali, l'assorbimento di IPA ha assunto nel corso degli anni rilevanza anche nella popolazione generale in relazione all'inquinamento ubiquitario dei gas di scarico degli autoveicoli, al consumo di cibi affumicati, arrostiti, tostati, fritti e all'abitudine al fumo di tabacco.

Boffetta et al, 1997 basandosi sui dati epidemiologici disponibili hanno evidenziato un aumentato rischio di cancro per polmone, cute e vescica per alti livelli di concentrazione di IPA. Del resto anche le moderate esposizioni ad IPA della popolazione generale sembrano poter determinare un rischio significativo per la comparsa di neoplasie polmonari, come segnalato dalla Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale. Secondo le direttive europee, inoltre, a sei di questi idrocarburi [benzo(a)pirene, benzo(a)antracene, dibenzo(a,h)antracene, benzo(b)fluorantene, benzo(j)fluorantene, benzo(k)fluorantene] è associata la frase di rischio R45 (può provocare il cancro) o R49 (può provocare il cancro per inalazione).

Uno studio di Boffetta e coll (1999) sui dati epidemiologici disponibili evidenzia che l'esposizione ad alti livelli di concentrazioni di IPA (produzione di alluminio, gasificazione del carbone, produzione di coke, fonderie di ferro e acciaio, distillazione del catrame, produzione di carbone black) implica un rischio di cancro per polmone, cute e vescica. Secondo questo studio il polmone sembra essere l'organo più a rischio con un incremento di rischio per le industrie dove maggiore è l'esposizione ad IPA.

La cancerogenesi è correlata alla presenza di quattro o più anelli aromatici biotrasformati in metaboliti, come i diidrodiole-epossidi, nei quali il gruppo tossicologicamente attivo è collocato nella cosiddetta bay region, cioè l'ansa a forma angolare che deriva dalla fusione di tre anelli aromatici.

Gli IPA vengono assorbiti per via inalatoria (Van Vaeck et al., 1983), gastrointestinale (Rees, 1971) o cutanea (Sartorelli, 1993).

Gli enzimi che intervengono nella biotrasformazione degli IPA sono distribuiti in tutto l'organismo: il fegato possiede la più elevata capacità metabolica, seguito da polmone, intestino, cute e rene.

La biotrasformazione degli IPA dipende da enzimi di fase I e II. Nella fase I, un ruolo importante spetta alle monoossigenasi a funzione mista, cui appartengono alcuni isoenzimi della famiglia dei citocromi P-450. Le monoossigenasi agiscono principalmente sulle regioni ad elevata densità elettronica (regioni K) o sulle regioni angolari dei nuclei contigui degli IPA (bay region) con doppi legami, come presenta il benzo(a)pirene (BaP). L'eossido così formato è un buon substrato per l'eossido idrolasi (EI) e reagisce solo marginalmente con il DNA. Se l'eossido viene idratato a diidrodiole dalla EI, il doppio legame adiacente può essere ossidato da un'altra monoossigenasi P-450 dipendente. I dioloepossidi che si ottengono sono agenti alchilanti in grado di legare covalentemente i siti nucleofili del DNA e di proteine come l'albumina e l'emoglobina. I dioloepossidi sono chimicamente instabili ed oltre a reagire con le macromolecole possono essere idrolizzati a tetrol. I diidrodiole possono inoltre essere coniugati con acido glucuronico o deidrogenati a catecoli. Ad esempio, i fenoli derivati dal BaP possono essere coniugati con acido glucuronico o solfoconiugati; i catecoli possono essere metilati da una catecolo -metiltransferasi microsomiale epatica. I coniugati con il glutathione, dopo la perdita dei residui glutammico e glicinico, vengono successivamente acetilati sull'amminogruppo libero del residuo cisteinico portando alla formazione dell'acido mercapturico specifico (Batt, 1994).

Le principali isoforme del P450 coinvolte nella metabolizzazione degli IPA e caratterizzate da polimorfismi genetici sono il CYP1A1 ed il CYP3A4 (Ayrton et al., 1990).

Il gene CYP1A1 codifica per una aril-idrocarbomonoossigenasi (AII), che catalizza l'ossidazione degli IPA a prodotti fenolici ed eossidi. Tale enzima è responsabile dell'attivazione metabolica del BaP, appare inducibile dagli IPA contenenti la bay region ed è presente soprattutto nel polmone. Il gene CYP3A4 codifica per un enzima responsabile della conversione dei diidrodiole in dioloepossidi, la cui peculiarità è la

presenza di più siti di legame, capaci di attivare diversi substrati, quali il fenantrene (FEN) ed il 7,8-benzoflavone (Ayrton, 1990).

La variabilità della detossificazione risulta in larga misura dall'attività di enzimi, come l'EI e la glutatione-S-transferasi (GSH-t), entrambi polimorfici (Heckbert, 1992).

L'EI microsomiale converte gli intermedi epossidici derivati dal metabolismo ossidativo in diidrodiooli. Questa attività enzimatica è elevata nel fegato e cute, bassa nel rene, molto bassa nel polmone e nell'intestino. Di particolare interesse, in relazione alla cancerogenesi da IPA, è la diversa distribuzione della attività dell'EI nel fegato e nel polmone e il loro rapporto con l'attività BaP monoossigenasica. Il meccanismo della EI è duplice: detossifica da un lato e dall'altro forma il diidrodioolo che viene successivamente bioattivato nel cancerogeno finale.

Numerose sono le attività che espongono ad IPA e nelle quali si è evidenziato un aumentato rischio di sviluppare un tumore del polmone, tra queste la produzione di alluminio, la gasificazione del carbone, la produzione di coke, la distillazione del catrame, l'attività di spazzacamino (IARC, 2007).

Il D.L.vo 626/94 considera come attività lavorative a rischio di cancro tutte le lavorazioni che espongono agli IPA presenti nella fuliggine, nel catrame, nella pece, nel fumo o nelle polveri di carbone.

Gli IPA per esplicare il loro effetto cancerogeno devono previa trasformazione enzimatica in metaboliti elettrofili legarsi con il DNA delle cellule bersaglio formando i cosiddetti addotti. Quando l'alterazione del genoma non viene riparata prima della duplicazione del DNA possono prodursi mutazioni stabili o altri danno del DNA che qualora interessino geni implicati nella regolazione del ciclo e della moltiplicazione cellulare possono determinare la cosiddetta iniziazione che la prima di una serie di eventi che può condurre una cellula allo sviluppo di una neoplasia clinicamente evidente. È stato pertanto ipotizzato che gli addotti IPA-DNA e IPA-proteine ematiche siano indicatori biologici di grande interesse perché i loro livelli possono consentire di stimare quelli dei metaboliti elettrofili degli IPA effettivamente in grado di reagire con il DNA a livello degli organi bersaglio.

Ricerche svolte negli ultimi due decenni hanno permesso di sviluppare e di affinare metodi analitici e misurare gli addotti non solo in soggetti esposti a concentrazioni elevate di IPA ma anche in popolazioni non professionalmente esposte.

I metodi analitici per il dosaggio degli addotti degli IPA possono essere suddivisi in tre gruppi di post marcatura ^{32}P , immunoenzimatici e fisico-chimici anche se a tutt'oggi non esistono procedure standardizzate e, anche per uno stesso tipo di analisi, le procedure variano da laboratorio a laboratorio, inoltre la qualità delle analisi non è stata adeguatamente validata anche se i vari controlli inter-laboratoriali hanno dimostrato una considerevole variabilità dei risultati.

È interessante sottolineare che alcuni studi in vivo hanno dimostrato che il dibenzo(a,l)pirene possiede un potenziale cancerogeno 100 volte maggiore del benzo(a)pirene, tuttavia ci sono solo limitati studi sulla sua formazione e presenza nell'ambiente (Okona-Mensah et al., 2005). Il dibenzo(a,l)pirene è considerato un mutageno in vivo sulla base di test di mutagenicità e formazioni di addotti del DNA in vivo.

La sua cancerogenicità è stata dimostrata in molti studi su roditori, l'applicazione dermica induce tumori in siti come polmoni, cute e linfomi con coinvolgimento organico multiplo (Higginbotham et al 1993), somministrazione intraperitoneale provoca tumori polmonari (Prahalad et al., 1997), e risulta positivo nei saggi di iniziazione-promozione tumorale (Luch et al., 1999).

1.4 Determinazione degli elementi su tessuti freschi e fissati, possibili influenze e variazioni

Negli studi di determinazioni di elementi in traccia su tessuti biologici è indispensabile che il campione non subisca variazioni in merito alla concentrazione degli elementi. In molti casi tessuti freschi e immediatamente analizzabili non sono disponibili e in molti casi si ricorre all'analisi su tessuti fissati.

Il processo di fissazione in formalina potrebbe provocare la lisciviazione degli elementi dal tessuto ma pochi studi hanno riportato dati in merito.

Gellein et al. 2007, ha determinato la concentrazione di 19 elementi metallici nella formalina in cui sono stati conservati campioni di cervello di ratto per periodi di tempo variabili da poche settimane a qualche anno. Le concentrazioni di arsenico, cadmio, rubidio e antimonio nella formalina nella quale sono stati conservati i tessuti per alcuni anni sono maggiori di 100 volte rispetto alla formalina fresca. Per cromo e nichel la lisciviazione è invece trascurabile. Per gli elementi essenziali come ferro, zinco e rame i risultati sono intermedi, le concentrazioni nella formalina "conservata" sono maggiori di circa 20 volte. È evidente che il processo di lisciviazione non funziona semplicemente della concentrazione degli elementi nei tessuti; elementi presenti in alte concentrazioni nei tessuti (es elementi essenziali) mostrano una perdita trascurabile rispetto ad altri presenti in concentrazioni molto inferiori.

È ragionevole assumere che queste differenze dipendono maggiormente dalla forza e dalla tipologia di legame dei diversi elementi nei tessuti; per esempio argento, mercurio, nichel e piombo che si legano ai tessuti con un forte legame ai gruppi sulfidrilici di proteine sono debolmente rilasciati dai tessuti nel mezzo di fissaggio.

Seemann et al. 1990 determina cromo e nichel in tessuti polmonari fissati e riporta una trascurabile concentrazione di tali elementi nella formalina conservata.

Bush et al 1995 affronta il problema da una diversa angolazione, ossia valutano le concentrazioni di rame, ferro, calcio, magnesio, zinco, cadmio, mercurio, alluminio e manganese in tessuti freschi e conservati in formalina per 1 settimana, 6 mesi e 1 anno.

Le concentrazioni di magnesio calano dal 18-41% dopo una settimana di conservazione, in seguito a lunghi termini di conservazione si verifica un graduale aumento di alluminio (da 0,9 µg/g a 2,3 µg/g dopo 12 mesi) e una perdita di manganese (da 6,0 µg/g a 3,8 µg/g) per gli altri elementi non sono riportati cambiamenti di rilievo. Quan et al. (2006) trovano che dopo 4 mesi e mezzo di conservazione in formalina di un campione di tessuto epatico la concentrazione di cromo si riduce significativamente.

1.5 Elementi metallici e idrocarburi policiclici aromatici nell'ambiente

In questo paragrafo si riportano i risultati di indagini di monitoraggio ambientale svolte nell'ambiente generale e in un ambiente di lavoro come una acciaieria con lo scopo di illustrare la composizione quali-quantitativa degli elementi oggetto del presente studio nei principali ambienti di vita.

Metodi:

Si è proceduto all'effettuazione di prelievi ambientali di misura del particolato inalabile con microgravimetria, alla misura di 8 frazioni granulometriche di particelle (0.5- a >15 μm) con analizzatore di polveri e al dosaggio di elementi metallici e idrocarburi policiclici aromatici. Il materiale aerodisperso è stato raccolto per filtrazione su membrane di esteri di cellulosa, porosità 0.8 μm e diametro di 25mm per l'analisi delle polveri e su membrane di fibra di vetro per quella degli IPA. I prelievi delle polveri e dei fumi sono stati effettuati per 4h utilizzando campionatori fissi a flusso costante di 2-3.5 l/min (rispettivamente per la frazione respirabile e per gli IPA).

L'analisi ponderale è stata condotta sulle membrane, opportunamente condizionate in cappa climatizzata (20°C e 50% umidità) e pesate, prima e dopo il prelievo. La differenza in peso, rapportata al volume di aria espirata, ha permesso di calcolare la polverosità in mg/m^3 .

La misura delle frazioni granulometriche delle polveri è stata effettuata mediante un analizzatore di polveri che usa la tecnologia dello scattering della luce per il conteggio delle singole particelle, la sorgente della luce è un laser.

Le otto frazioni considerate sono 0,5-1 μm ; 1,1-2 μm ; 2,1-3,5 μm ; 3,6-5 μm ; 5,1-7,5 μm ; 7,6-10 μm ; 10,1-15 μm ; >15 μm .

Gli IPA analizzati sono benzo(a)antracene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, benzo(a)pirene, dibenzo(a,h)antracene, benzo(g,h,i)perilene è stata inoltre determinata la concentrazione di pirene, non per le proprie caratteristiche tossicologiche ma poiché viene dosato un suo metabolita urinario.

I composti dopo trattamento con diclorometano ed acetonitrile sono stati esaminati in liquido cromatografia ad elevate prestazioni HPLC con rivelatore fluorimetrico.

L'analisi dei metalli depositati sulle membrane prevede la dissoluzione delle stesse con acido nitrico ultrapuro e le soluzioni ottenute sono successivamente diluite con acqua distillata.

Le soluzioni ottenute sono iniettate in uno spettrometro di massa accoppiato al plasma con cella di reazione (ICP-MS DRC).

Risultati:

Dalle tabelle sotto riportate si evidenzia che le polveri raccolte in una acciaieria sono composte da una quantità notevolmente maggiori di IPA ed elementi metallici rispetto all'ambiente generale e fra i due settori qui rappresentati esiste una ulteriore differenza; il settore di colata continua è caratterizzata da una concentrazione di IPA tot 7 volte superiore rispetto al settore LF e 68 volte superiore rispetto all'ambiente generale.

Per quanto riguarda gli elementi metallici, sono tutti presenti in concentrazioni maggiori rispetto all'ambiente generale.

Tabella 1: Determinazione degli elementi metallici ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) in diversi settori di una acciaieria e nell'ambiente generale (valori medi).

	Acciaieria		Ambiente generale
	Colata continua	Cabina LF	
Be	0,0002	0,001	nd
Al	77	3,0	0,2
Mn	12	0,6	0,05
Co	0.02	0.003	0,0001
Ni	0.07	0.07	0.008
Cu	3.06	0,3	0,02
Zn	32	7,3	0,2
As	0.06	0,01	nd
Sr	0.04	0,06	0,01
Mo	0,2	0,01	0,01
Cd	0.03	0.006	0.002
Sn	0.05	0.03	0.01
Sb	0.01	0.01	0.002
Ba	0,5	0,5	0,01
Hg	nd	nd	nd
Pb	3,8	0,9	0,04
Fe	54	6,0	0,4
Cr	2	0,04	0,02

Tabella 2 Determinazione degli idrocarburi policiclici aromatici (ng/m^3) in diversi settori di una acciaieria e nell'ambiente generale (valori medi).

	Acciaieria		Ambiente generale
	Colata continua	Cabina LF	
benzo-a-antracene	36,10	4,9	0,4
benzo-b-fluorantene	94,00	7,0	nd
benzo-k-fluorantene	22,00	3,2	0,4
benzo-a-pirene	12,00	4,9	0,8
dibenzo-a,h-anthracene	5,20	1,1	0,1
benzo-g,h,i-perilene	35,00	8,0	1,7
IPA TOT	204,3	29,1	3,4

2 OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'apparato respiratorio ed il polmone in particolare sono fra gli organi bersaglio di inquinanti ambientali e lavorativi come idrocarburi policiclici aromatici ed elementi metallici e alcune patologie polmonari, tra cui il tumore del polmone, sono ad essi correlati.

La disponibilità di indicatori di dose efficace o metabolicamente attiva al bersaglio è quindi di rilevante importanza. Con la ricerca proposta si vuole mettere a punto una metodica per la determinazione di tali xenobiotici nel tessuto polmonare al fine di meglio comprendere il ruolo di questi contaminanti ambientali nell'eziologia del tumore polmonare.

L'obiettivo principale del presente studio è quello di capire la distribuzione di tali composti, nel soggetto sano, malato e professionalmente esposto al fine di chiarire il contributo degli stessi all'insorgenza di tumori polmonari.

Lo studio approfondito della letteratura sull'argomento permetterà di tracciare un profilo delle principali problematiche di carattere metodologico e applicativo sui dosaggi di elementi metallici e idrocarburi policiclici aromatici nelle matrici tissutali fornendo gli strumenti per affrontare una lettura critica.

Inoltre l'applicazione di software di elaborazioni dati permetterà di concretizzare dimensionalmente la meta-analisi svolta.

La raccolta dei campioni di tessuto polmonare, oggetto dell'analisi del presente studio, è iniziata nel 2003 e le difficoltà riscontrate a causa della provenienza da più strutture e a causa delle differenti metodiche di raccolta e conservazione sono state convogliate in interessanti informazioni metodologiche.

La determinazione degli elementi metallici cancerogeni e non e degli idrocarburi policiclici aromatici permetterà di verificare se l'analisi dei campioni bioptici prelevati da pazienti affetti da tumore polmonare può permettere una valida stima della misura dell'esposizione per via inalatoria sia voluttuaria che professionale.

3 MESSA A PUNTO E APPLICAZIONE DEL DOSAGGIO DI ELEMENTI METALLICI E IDROCARBURI POLICICLICI AROMATICO NEL TESSUTO POLMONARE

3.1 Casistica

Per questo studio sono stati reclutati pazienti con tumore del polmone non a piccole cellule in stadio IA o IB di età compresa tra 46 e 84 anni in collaborazione con il Dipartimento di Chirurgia Toracica dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Parma e dell'Istituto di Anatomia Patologica degli Spedali Civili di Brescia nel periodo di tempo compreso fra gennaio 2003 e giugno 2005 e fra gennaio 2007 e settembre 2007. Questi pazienti erano in attesa di essere sottoposti ad intervento chirurgico di resezione e non avevano subito precedenti trattamenti chemioterapici o radioterapici. Per ciascun soggetto sono stati raccolti due campioni di tessuto polmonare di almeno 3 cm, 1 prelevato in corrispondenza della neoplasia (tessuto neoplastico), 1 in sede periferica, alla lesione (tessuto indenne).

I 47 campioni provenienti dall'Azienda ospedaliera di Parma sono stati immediatamente crio-conservati mentre gli 84 campioni provenienti dagli Spedali civili di Brescia hanno subito il processo di fissaggio in formalina al 10%.

Le informazioni relative ai dati socio-demografici, anamnesi familiare, fisiologica, patologica e farmacologica, storia professionale e residenziale, abitudini voluttuarie sono state desunte da questionari sottoposti ai pazienti e dalla cartella clinica, mentre ulteriori informazioni sulla neoplasia (sede, istotipo, altre patologie polmonari) sono state desunte dal referto istologico.

In tabella 3 sono riportate le descrizioni della casistica in esame.

I controlli (fumatori e non), sono stati scelti tra i pazienti, senza tumore polmonare, con diagnosi di: pneumotorace, distrofia bollosa, fibrosi cicatriziale, polmonite granulomatosa, bronchiectasie e cisti.

Tabella 3 Descrizione della popolazione studiata

Caratteristiche della popolazione	Casi (n = 131)	Controlli (n = 16)
Conservazione		
<i>fissati</i>	84	9
<i>congelati</i>	47	7
Sesso		
<i>Maschi</i>	106	11
<i>Femmine</i>	25	5
Età, M±DS (range)	68 ± 7,3 (46-84)	55 ± 15 (23-77)
Abitudine tabagica		
<i>Fumatori correnti</i>	54	7
<i>Ex fumatori</i>	32	5
<i>Non fumatori</i>	8	4
Attività lavorativa		
<i>Esposti</i>	29	
<i>Non esposti</i>	52	
Altre patologie polmonari (si/no)	95/36	
Diagnosi istologica		
<i>Carcinoma squamoso</i>	59	
<i>Adenocarcinoma</i>	54	
<i>Altri istotipi°</i>	18	
Sede della neoplasia		
<i>Inferiore</i>	33	
<i>Superiore</i>	70	
<i>Destro</i>	13	
<i>sinistro</i>	44	

° 5 pleomorfi, 3 adenosquamoso, 4 neuroendocrino, 1 mucinoso, 5 indifferenziato

3.2 Metodo di analisi dei metalli

Per ciascuno dei campioni polmonari raccolti si è provveduto a sezionare un piccolo pezzo utilizzando un vetrino al fine di evitarne la contaminazione con strumenti metallici.

Il pezzo sezionato è stato quindi essiccato in stufa a 70°C per tre ore.

In considerazione del fatto che alcuni studi in letteratura avevano essiccato il campione per tempi più lunghi sono state eseguite prove di essiccazione per 12 ore su 2 differenti campioni di tessuto sano e su altrettanti di tessuto neoplastico ottenendo perdite di peso sostanzialmente sovrapponibili. Pertanto si è scelto di procedere con l'essiccazione per 3 ore.

Successivamente il pezzo polmonare è stato pesato con bilancia analitica a 4 cifre decimali. I campioni sono stati sottoposti a digestione acida con aggiunta di acido nitrico iperpuro al 70% e acqua bidistillata in rapporto 1:1 per 30 minuti a 70°C e infine si è proceduto ad analisi multielemento .

L'analisi multielementale del tessuto polmonare è stata eseguita in spettrometria di massa accoppiata induttivamente al plasma ICP-MS (Perkin Elmer, ELAN DRC II) con determinazione Total Quant e per quanto riguarda ferro, cromo e vanadio in DRC con ammoniaca.

La calibrazione è stata effettuata con il calibration standard 3, stock multielement (10 µg/ml; Perkin Elmer) .

L'accuratezza è stata determinata attraverso la media di valori ottenuti dall'analisi di materiale di riferimento certificato NIST 1640 (trace element in water).

La precisione espressa come coefficiente di variazione variava dal 4-8% intraserie e del 6-12 % inter-serie.

Il limite di rilevabilità calcolato dall'analisi di 10 bianchi sulla base di 3 deviazioni standard del segnale di background, i valori ottenuti sono indicati nella tabella sottostante (4).

Tabella 4 Limite di rilevabilità strumentale della metodica utilizzata

Limite di rilevabilità (µg/l)			
Ag	0,003	Cs	0,004
Al	0,005	Cu	0,004
As	0,001	Hg	0,005
Au	0,005	Mn	0,002
Ba	0,005	Mo	0,005
Cd	0,006	Ni	0,004
Co	0,003	Pb	0,004
Rb	0,002	Se	0,05
Sr	0,004	Sn	0,005
Zn	0,002		

Le condizioni analitiche strumentali sono riportate nella tabella sottostante (5).

Tabella 5 Condizioni Strumentali ICP-MS

Sorgente del Plasma	99.998% Argon
Gas ausiliario	1.2 l/min
Plasma	15 l/m
Nebulizer gas	flow 0.94 min
Rf power	1.2 kW
Lens: Voltaggio	6.00 V. Adjusted by Be, Co, In, Pb (DAC value 5,6; 6,3; 7,8; 8,8)
Vuoto	10 ⁻⁷ mbar
Range di massa (m/z)	6-15;19-39;42-210; 230-240
Sweeps reading	1
Numero di replicati	2
Risoluzione	Normal
Scanning mode peak	Hop
Baseline time (ms)	0
Sample uptake	0.9 ml/min
Analytical technique	Total quant method
Analytical method	External calibration

3.3 Metodo di analisi IPA

La determinazione degli IPA nel tessuto è stata condotta su alcuni campioni della casistica precedentemente descritta. È stato possibile applicare tale dosaggio solo su un esiguo numero di soggetti in quanto la metodica applicata necessita di un cospicuo frammento di tessuto (3-4gr).

In particolare lo studio è stato condotto su 36 campioni tutti conservati in formalina al 10%, tutti i soggetti erano uomini fumatori, 23 tessuti indenni di soggetti affetti da tumore polmonare, 6 tessuti neoplastici e 7 controlli.

Il metodo analitico è stato determinato sulla base dei dati forniti in letteratura in merito ai procedimenti applicati su diverse matrici biologiche sia di natura umana (Gladen et al., 2000; Toriba et al., 2003), animale (Geffard et al., 2003; Mooiboek et al., 2002) e vegetale (Lodovici et al. 1998); si è quindi posta una particolare attenzione alle metodiche standardizzate relative al dosaggio degli IPA nel tessuto polmonare (Lodovici et al., 1998, Takagi et al., 2004; Tokiwa et al., 1993; Beach et al., Goldman et al., 2000).

Tutti i lavori sono concordi nell'estrazione degli IPA dalle diverse matrici tramite estrazione liquido-liquido con differenti solventi organici.

Per ciascun campione sono stati determinati 7 IPA: benzo (a) antracene, benzo (b) fluorantene, benzo (a) pirene, benzo (k) fluorantene, dibenzo (a,h) antracene, benzo (g,h,i) perilene e dibenzo(a,l) pirene.

L'estrazione degli IPA dal tessuto polmonare è condotta in 50 ml di soluzione di etanolo con 3 grammi di KOH in bagno ad ultrasuoni per 2 ore e 50µl di metilcolantrene (100ng/ml) usato come standard interno.

La soluzione viene poi trasferita in un imbuto separatore insieme a 15 ml di n-esano e 50 ml di acqua.

Dopo aver miscelato la soluzione si separa la fase organica, contenete gli IPA, dalla fase acquosa; l'operazione è ripetuta per due volte e alla fine gli estratti organici vengono uniti.

Alla soluzione finale di n-esano si aggiungono 5g di sodio solfato anidro e si porta a secco in provette di vetro su evaporatore a centrifuga. L'estratto finale viene infine ripreso in 1 ml di acetonitrile.

Gli estratti ottenuti sono stati analizzati in HPLC (Perkin Elmer serie 200), con rivelatore fluorimetrico (ex 290, em 430), con colonna C18 (Vydac 5 μ m, 0,46 x 25) e loop da 50 μ l. Si è utilizzata una soluzione di eluizione composta da acetonitrile:acqua (45:55), con un flusso di 1,6 ml/minuto. La separazione è stata ottenuta con un gradiente che porta un aumento di acetonitrile da 45% a 99% in 40 minuti.

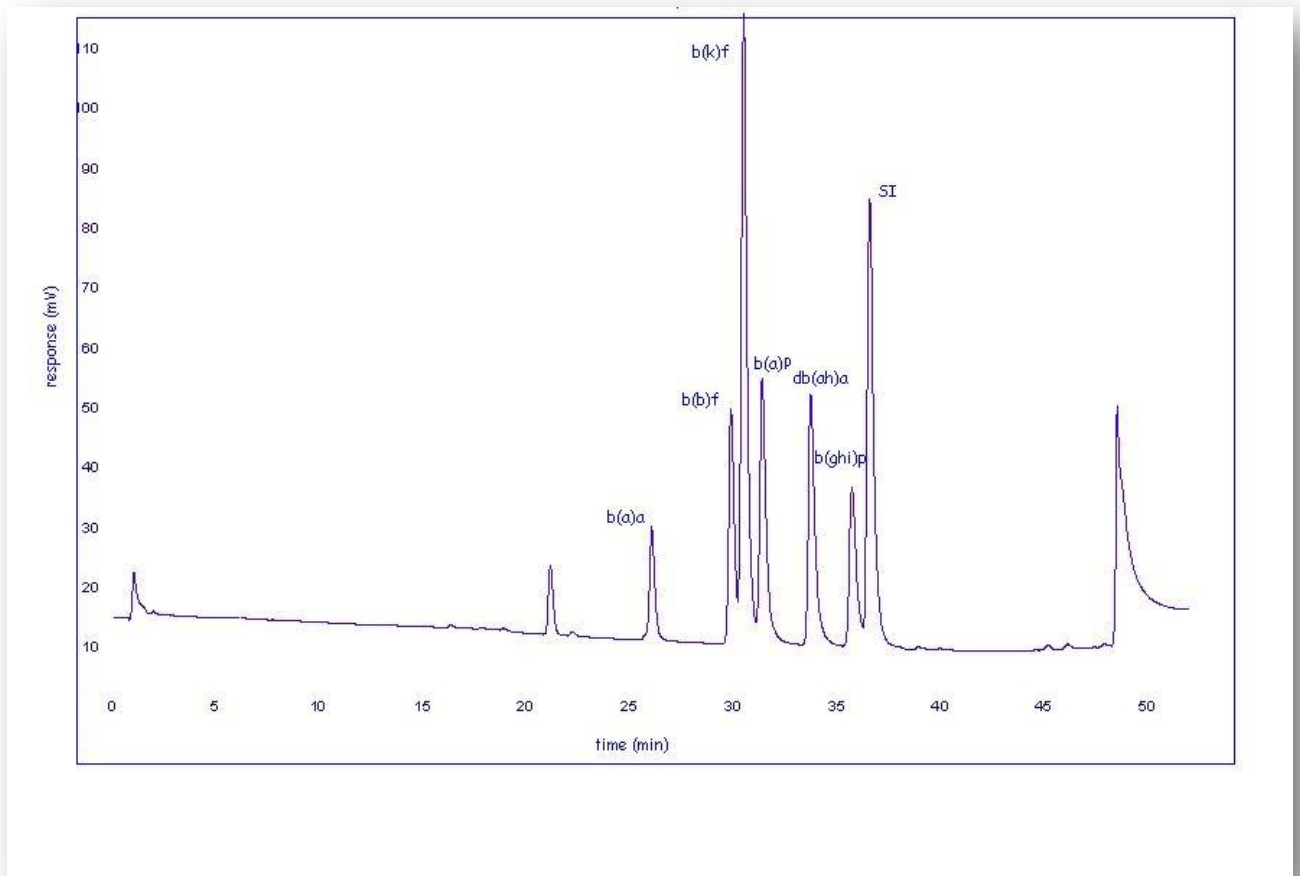


Figura 1 Tracciato cromatografico per indagine IPA su estratto polmonare

3.4 Risultati

3.4.1 Risultati elementi metallici

Prova Preliminare

Al fine di verificare l'effetto che le diverse modalità di conservazione hanno sui campioni è stato fatto uno studio preliminare su frammenti autoptici (11) di tessuto polmonare suddivisi in due parti al momento del prelievo e conservati sia in formalina che congelati.

Il risultato, riportato in figura 2 mostra che per alcuni elementi non c'è differenza in merito alle modalità di conservazione, mentre per cromo, molibdeno, lantanio, uranio e vanadio le concentrazioni sono significativamente superiori nei campioni fissati, per il cesio la concentrazione è significativamente superiore nei campioni congelati mentre per rame, zinco, bario e piombo le differenze sono presenti senza raggiungere la significatività.

Per escludere che la formalina potesse favorire l'estrazione degli elementi metallici e degli idrocarburi policiclici aromatici o che potesse in qualche modo contaminare i campioni, è stata condotta un'analisi su formalina fresca e su formalina di conservazione ottenendo per tutti gli elementi metallici e IPA ricercati concentrazioni al di sotto del limite di rilevabilità.

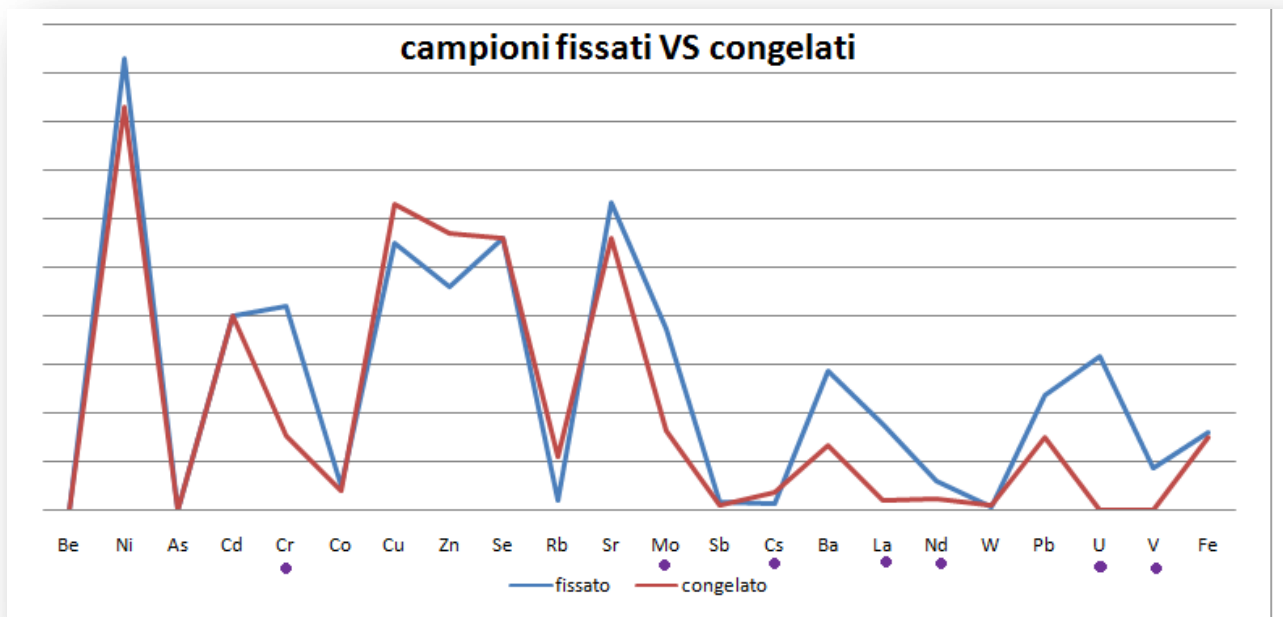


Figura 2 Confronto delle mediane delle concentrazioni degli elementi metallici determinati in 11 campioni autoptici conservati sia in formalina che congelati (gli elementi con il pallino sono quelli con una significatività $p < 0,05$, test di Mann-Witney).

Confronto fra tessuto indenne (S) tessuto neoplastico (M) di soggetti affetti da tumore polmonare e controlli (C).

In seguito alla valutazione dei risultati della prova preliminare la casistica è stata elaborata in base alle modalità di conservazione dei campioni ossia campioni congelati (C) e fissati (F).

In tabella 6 sono riportati i risultati dell'intera casistica sulle determinazioni degli elementi metallici nel tessuto indenne e neoplastico di soggetti affetti da tumore polmonare e nei controlli suddivisi in base alle modalità di conservazione.

Tabella 6 Concentrazione mediana degli elementi metallici determinate su tessuti indenni, neoplastici e controllo fissati e congelati.

µg/g	S (tessuto indenne)			M (tessuto neoplastico)			C (controlli)		
	congelato (n=47) mediana	fissato (n=84) mediana	p	congelato (n=47) mediana	fissato (n=84) mediana	p	congelato (n=9) mediana	fissato (n=7) mediana	P
Be	0,0005	0,001	ns	0,0005	0,0005	ns	0,0005	0,0005	ns
Ni	4,52	7,53	<0,001	3,84	5,80	0,02	2,61	8,53	ns
As	0,001	0,0005	ns	0,004	0,0005	ns	0,007	0,0005	ns
Cd	0,51	1,20	0,004	0,45	0,40	ns	0,42	1,10	ns
Cr	0,28	0,70	<0,001	0,33	0,50	0,02	0,40	0,42	ns
Co	0,07	0,11	<0,001	0,06	0,09	0,02	0,04	0,06	ns
Cu	3,48	7,56	<0,001	4,21	10,12	<0,001	3,47	13,46	0,01
Zn	69,4	452,5	<0,001	58,9	478,5	<0,001	50,6	104,4	ns
Se	0,76	1,15	0,009	0,96	1,75	<0,001	0,53	0,91	0,03
Rb	15,17	0,47	<0,001	16,58	0,34	<0,001	10,63	1,24	0,001
Sr	1,00	30,34	<0,001	0,97	32,42	<0,001	0,82	1,23	ns
Mo	0,06	0,07	ns	0,08	0,06	ns	0,05	0,30	0,009
Sb	0,005	0,005	ns	0,005	0,005	ns	0,007	0,02	ns
Cs	0,05	0,006	<0,001	0,06	0,005	<0,001	0,03	0,02	ns
Ba	0,29	6,6	<0,001	0,18	5,95	<0,001	0,27	0,33	0,05
La	0,06	0,06	ns	0,05	0,02	0,002	0,06	0,08	ns
Ce	0,30	0,14	0,001	0,30	0,04	<0,001	0,26	0,005	0,001
Nd	0,05	0,02	0,033	0,033	0,009	0,006	0,03	0,11	ns
Gd	0,008	0,001	0,03	0,005	0,001	0,02	0,005	0,005	ns
W	0,004	0,009	ns	0,003	0,001	ns	0,01	0,02	ns
Pb	0,21	2,15	<0,001	0,16	2,32	<0,001	0,12	11,2	0,001
U	0,004	0,0005	ns	0,001	0,09	<0,001	0,003	0,30	0,009
V	0,11	0,05	0,002	0,08	0,03	0,002	0,06	0,30	ns
Fe	420,2	516,6	ns	371,6	217,5	<0,001	314,8	1395,2	ns

Si considera significativo il valore con p<0,05, test di Mann-Whitney.

I tessuti conservati in formalina hanno concentrazioni notevolmente superiori rispetto alla stessa tipologia di tessuti congelati, alcuni elementi differiscono di più ordini di grandezza.

Come evidenziato dall'alto numero di valori statisticamente significativi (tabella 6), le due casistiche presentano molte differenze.

Considerando separatamente le due casistiche (tabella 7 e 8) si osserva che nei tessuti congelati il frammento indenne (S) dei soggetti affetti da tumore polmonare presenta concentrazioni significativamente superiori di nichel, bario e ferro mentre selenio e rame sono maggiormente presenti nel tessuto neoplastico; rispetto ai controlli i soggetti affetti da tumore polmonare presentano concentrazioni maggiori di zinco, rubidio, cesio e piombo.

Nei campioni conservati in formalina il tessuto indenne (S) rispetto al neoplastico ha concentrazioni statisticamente superiori di cadmio, cromo, cobalto, lantanio e cerio, mentre il rame e selenio, come nella casistica dei congelati, e tungsteno e ferro sono in concentrazione superiore nel tessuto neoplastico.

Rispetto ai controlli cobalto, zinco, rubidio, stronzio, molibdeno, antimonio, cesio e bario sono superiori nei soggetti affetti da neoplasia (tessuto S) mentre uranio e ferro hanno andamento opposto.

Tabella 7 Mediana, 25° e 75° percentile della distribuzione degli elementi metallici ($\mu\text{g/g}$ tessuto secco) nelle biopsie tissutali congelate

$\mu\text{g/g}$	S (Tessuto indenne) (n=47)			M (Tessuto neoplastico) (n=47)			p	Controlli (n=9)			p
	Mediana	25°	75°	Mediana	25°	75°		Mediana	25°	75°	
Be	0,0005	0,0005	0,019	0,0005	0,0005	0,017	ns	0,0005	0,0005	0,0005	ns
Ni	4,52	2,64	6,46	3,84	1,995	5,07	0,03	2,61	0,93	7,92	ns
As	0,001	0,001	0,05	0,004	0,001	0,053	ns	0,007	0,0005	0,04	ns
Cd	0,51	0,22	1,21	0,45	0,11	0,79	ns	0,42	0,08	0,7	ns
Cr	0,28	0,11	0,74	0,33	0,07	0,73	ns	0,40	0,13	1,35	ns
Co	0,07	0,05	0,12	0,06	0,02	0,1	ns	0,04	0,03	0,1	ns
Cu	3,48	2,35	4,39	4,21	3,32	5,88	0,03	3,47	0,7	5,5	ns
Zn	69,4	60,6	80,2	58,9	45,9	83,04	ns	50,6	19,4	58,3	0,002
Se	0,76	0,18	1,10	0,96	0,648	1,351	0,03	0,53	0,14	0,66	ns
Rb	15,2	9,6	20,1	16,58	9,10	24,18	ns	10,6	2,6	13,5	0,02
Sr	1,00	0,55	2,94	0,97	0,42	2,87	ns	0,82	0,54	1,47	ns
Mo	0,06	0,007	0,11	0,08	0,02	0,11	ns	0,05	0,002	0,18	ns
Sb	0,005	0,005	0,006	0,005	0,005	0,005	ns	0,007	0,005	0	ns
Cs	0,05	0,03	0,09	0,06	0,03	0,08	ns	0,03	0,01	0,06	0,05
Ba	0,29	0,133	0,6	0,186	0,06	0,42	0,03	0,27	0,09	0,43	ns
La	0,06	0,03	0,14	0,05	0,02	0,14	ns	0,06	0,009	0,14	ns
Ce	0,30	0,18	0,91	0,30	0,14	0,60	ns	0,26	0,022	0,44	ns
Nd	0,05	0,02	0,12	0,033	0,006	0,09	ns	0,03	0,003	0,07	ns
Gd	0,008	0,001	0,02	0,005	0,001	0,02	ns	0,005	0,0008	0,02	ns
W	0,004	0,001	0,022	0,003	0,001	0,03	ns	0,01	0,008	0,02	ns
Pb	0,21	0,13	0,39	0,16	0,05	0,37	ns	0,12	0,03	0,1	0,01
U	0,004	0,001	0,01	0,001	0,001	0,007	ns	0,003	0,001	0,007	ns
V	0,11	0,05	0,3	0,08	0,03	0,2	ns	0,06	0,01	0,2	ns
Fe	420,2	245,5	900,3	371,6	234,3	595,8	ns	314,8	123,2	1.378,6	ns

Fra le concentrazioni del tessuto indenne e malato è stato applicato il Test di Wilcoxon per dati appaiati, considerando significativi i valori con $p < 0,05$.

Fra le concentrazioni del tessuto indenne di soggetti affetti da neoplasia e controlli è stato applicato il Test di Mann-Witney considerando significativi i valori con $p < 0,05$.

Tabella 8 Mediana e 25° e 75° percentile della distribuzione degli elementi metallici ($\mu\text{g/g}$ tessuto secco) nelle biopsie tissutali fissate.

	S (Tessuto indenne) (n=84)			M (Tessuto neoplastico) (n=84)			p	Controlli (n=7)			p
	Mediana	25°	75°	Mediana	25°	75°		Mediana	25°	75°	
Be	0,001	0,0005	0,03	0,0005	0,0005	0,02	ns	0,0005	0,0005	0,005	ns
Ni	7,53	4,91	17,23	5,80	2,30	12,71	ns	8,53	6,11	10,10	ns
As	0,0005	0,0005	0,045	0,0005	0,0005	0,02	ns	0,0005	0,0005	0,0005	ns
Cd	1,20	0,37	1,92	0,40	0,21	0,91	<0,001	1,10	0,31	4,67	ns
Cr	0,70	0,43	1,37	0,50	0,31	0,86	0,002	0,42	0,16	0,84	0,05
Co	0,11	0,08	0,25	0,09	0,05	0,12	<0,001	0,06	0,04	0,06	<0,001
Cu	7,56	4,12	11,98	10,12	6,33	17,33	<0,001	13,46	5,46	95,34	ns
Zn	452,5	142,3	1156,1	478,5	194,7	1357,3	ns	104,4	46,1	688,5	0,02
Se	1,15	0,65	1,34	1,75	1,32	2,17	<0,001	0,91	0,56	2,54	ns
Rb	0,47	0,27	0,64	0,34	0,22	0,71	ns	1,24	0,96	2,23	<0,001
Sr	30,3	23,3	35,7	32,4	23,1	39,7	ns	1,2	0,7	3,2	<0,001
Mo	0,07	0,02	0,16	0,06	0,02	0,09	ns	0,30	0,35	0,63	0,006
Sb	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	ns	0,02	0,01	0,02	0,002
Cs	0,006	0,004	0,01	0,005	0,003	0,008	ns	0,02	0,01	0,02	0,04
Ba	6,62	4,55	8,91	5,95	3,66	7,94	ns	0,33	0,37	1,68	<0,001
La	0,06	0,03	0,13	0,02	0,01	0,06	0,001	0,08	0,03	0,24	ns
Ce	0,14	0,07	0,3	0,04	0,02	0,12	0,02	0,005	0,005	0,005	ns
Nd	0,02	0,01	0,05	0,009	0,001	0,02	ns	0,11	0,03	0,17	ns
Gd	0,001	0,001	0,008	0,001	0,001	0,003	ns	0,001	0,001	0,001	ns
W	0,009	0,001	0,06	0,001	0,001	0,01	<0,001	0,02	0,01	0,03	ns
Pb	2,15	0,83	12,81	2,32	0,97	12,43	ns	11,24	0,26	104,67	ns
U	0,0005	0,0005	0,08	0,09	0,03	0,2	ns	0,30	0,3	0,3	0,009
V	0,05	0,027	0,1	0,03	0,02	0,09	ns	0,30	0,04	0,9	ns
Fe	516,6	308,3	905,2	217,5	125,7	383,2	<0,001	1395,2	652,8	1979,4	0,01

Fra le concentrazioni del tessuto indenne e malato è stato applicato il Test di Wilcoxon per dati appaiati, considerando significativi i valori con $p < 0,05$.

Fra le concentrazioni del tessuto indenne di soggetti affetti da neoplasia e controlli è stato applicato il Test di Mann-Witney considerando significativi i valori con $p < 0,05$.

Si riscontrano concentrazioni superiori di alcuni elementi metallici, classificati come cancerogeni, nel tessuto polmonare indenne rispetto al relativo frammento neoplastico (figura 3, 4, 5 e 6).

Mentre elementi “essenziali” come rame e selenio sono in concentrazioni significativamente superiori nel tessuto neoplastico (figura 7 e 8).

Il confronto fra soggetti malati e controlli, probabilmente anche per il basso numero di controlli disponibili, porta a scarsi risultati; in definitiva i soggetti affetti da tumore polmonare (S) hanno una concentrazione maggiore di elementi metallici considerati

cancerogeni come piombo (rilevata nella casistica dei campioni congelati) , cobalto e debolmente cromo (casistica campioni fissati) rispetto ai controlli (C) (figura 9 e 10).

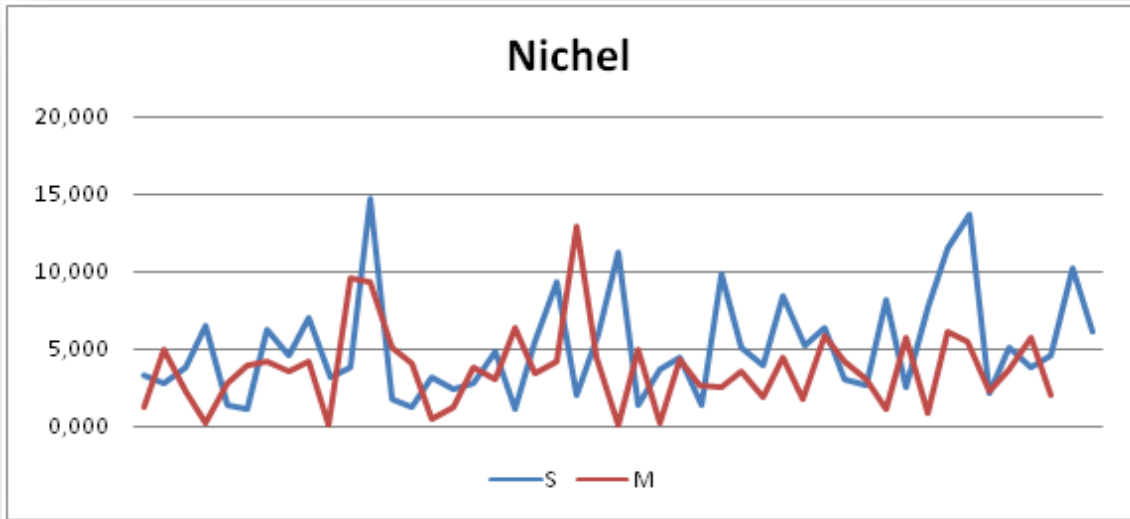


Figura 3 Concentrazioni di nichel determinate nel tessuto sano(S) e neoplastico(M) di soggetti affetti da tumore (Test di Wilcoxon per dati appaiati $p=0,03$). Casistica campioni congelati

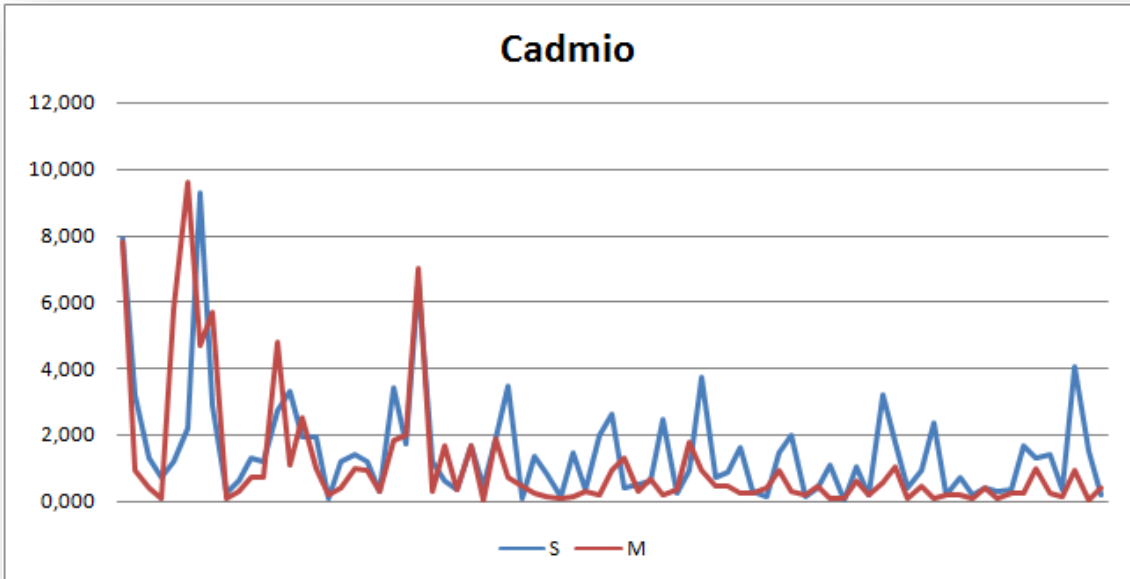


Figura 4 Concentrazioni di cadmio determinate nel tessuto sano(S) e neoplastico(M) di soggetti affetti da tumore (Test di Wilcoxon per dati appaiati $p<0,001$). Casistica campioni fissati

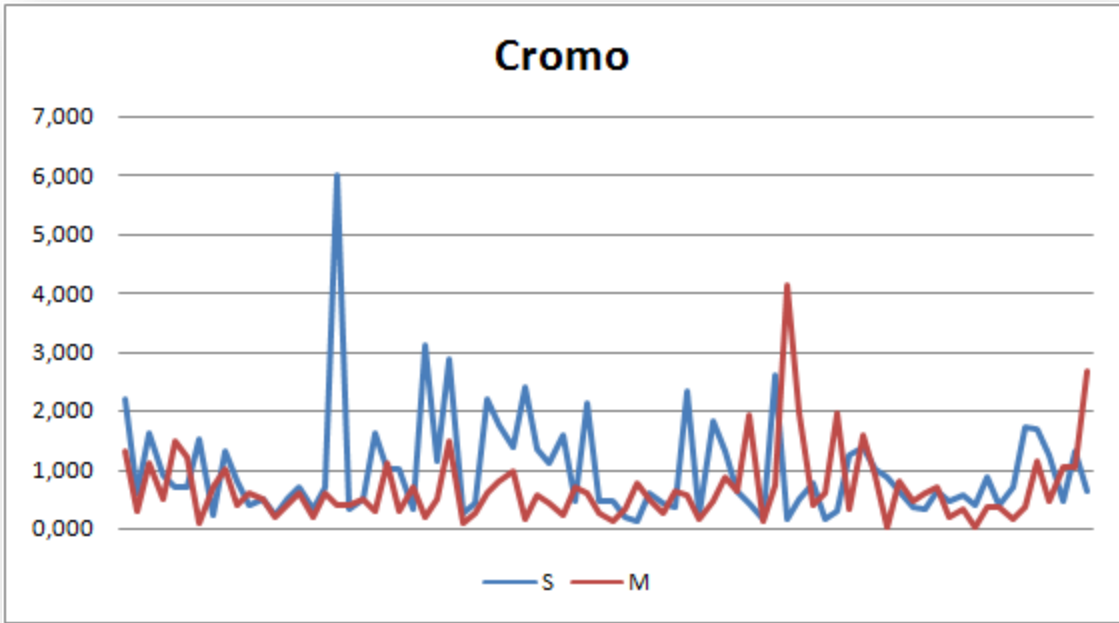


Figura 5 Concentrazioni di cromo determinate nel tessuto sano(S) e neoplastico(M) di soggetti affetti da tumore (Test di Wilcoxon per dati appaiati $p=0,002$). Casistica campioni fissati

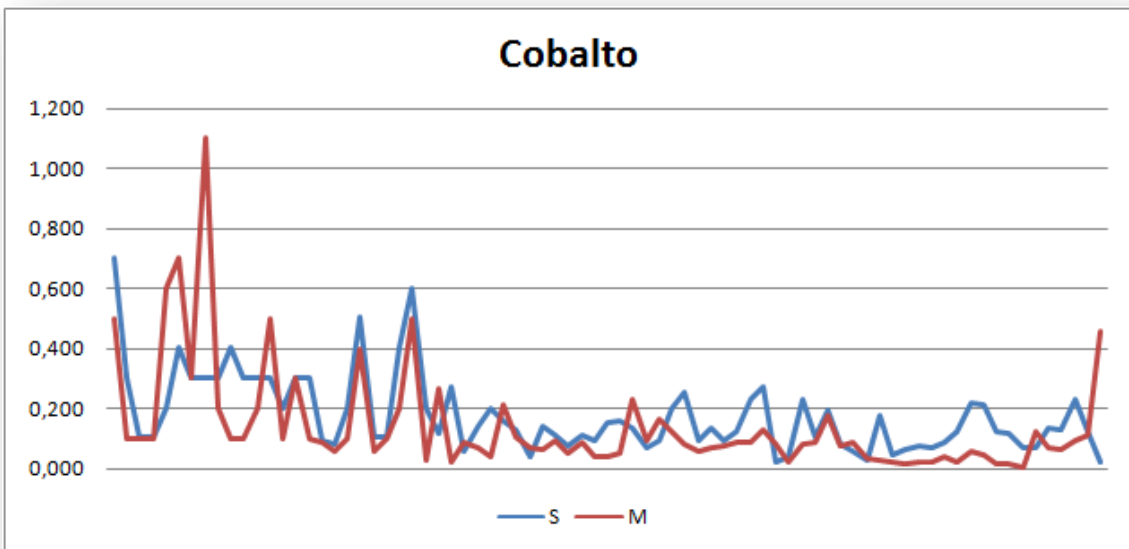


Figura 6 Concentrazioni di cobalto determinate nel tessuto sano(S) e neoplastico(M) di soggetti affetti da tumore (Test di Wilcoxon per dati appaiati $p<0,001$). Casistica campioni fissati

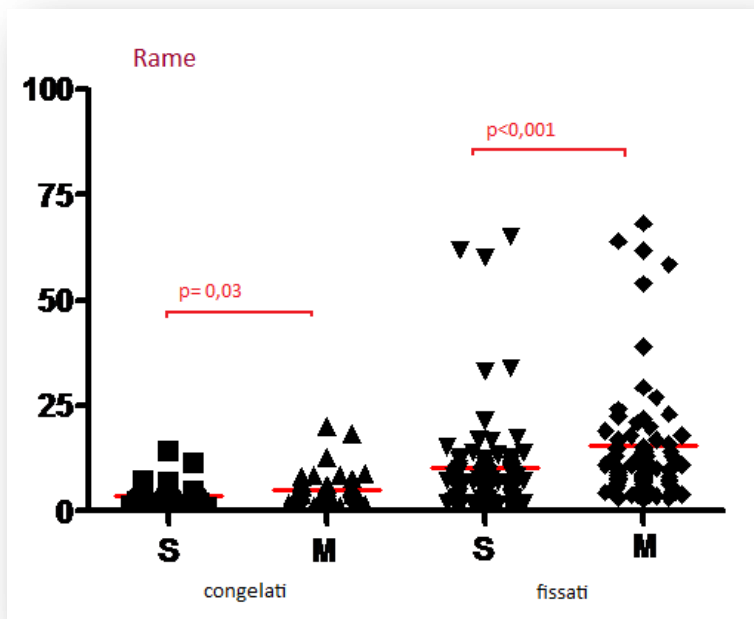


Figura 7 Concentrazioni di rame determinate nel tessuto sano(S) e neoplastico(M) di soggetti affetti da tumore (Test di Wilcoxon per dati appaiati, la linea rappresenta la mediana).

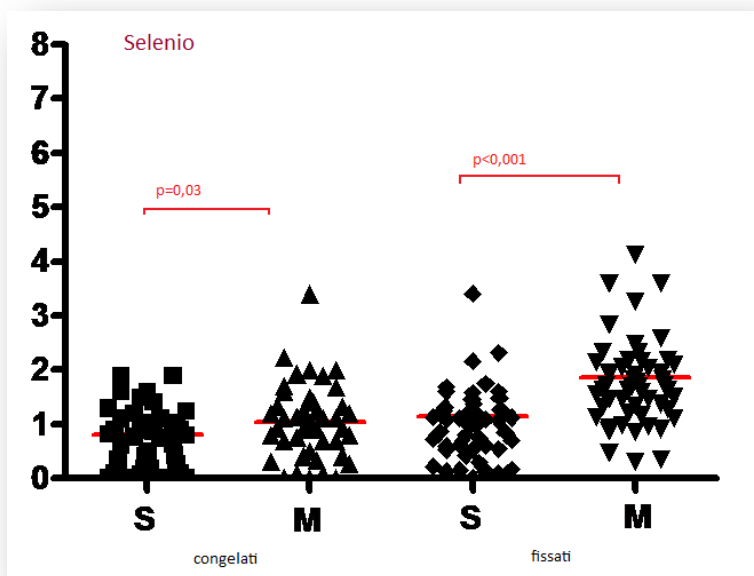


Figura 8 Concentrazioni di selenio determinate nel tessuto sano(S) e neoplastico(M) di soggetti affetti da tumore (Test di Wilcoxon per dati appaiati, la linea rappresenta la mediana).

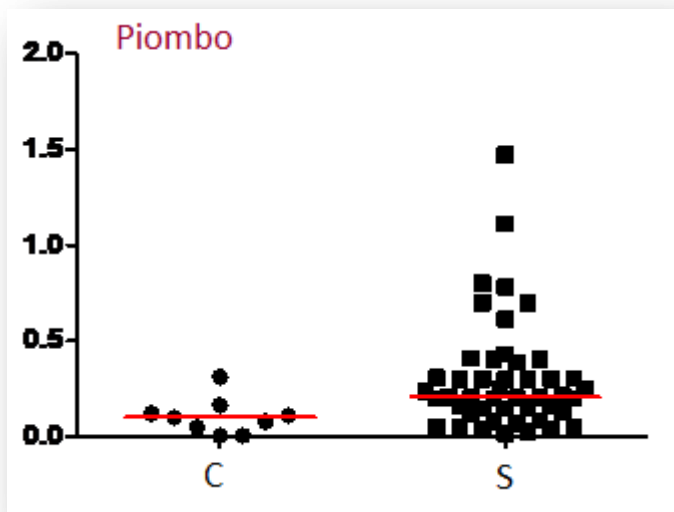


Figura 9 Valori di piombo dosati nei soggetti affetti da tumore polmonare (S, 47) e nei soggetti sani (C, 9), casistica campioni congelati.

(Test di Mann-Witney $p=0,01$, la linea rappresenta la mediana).

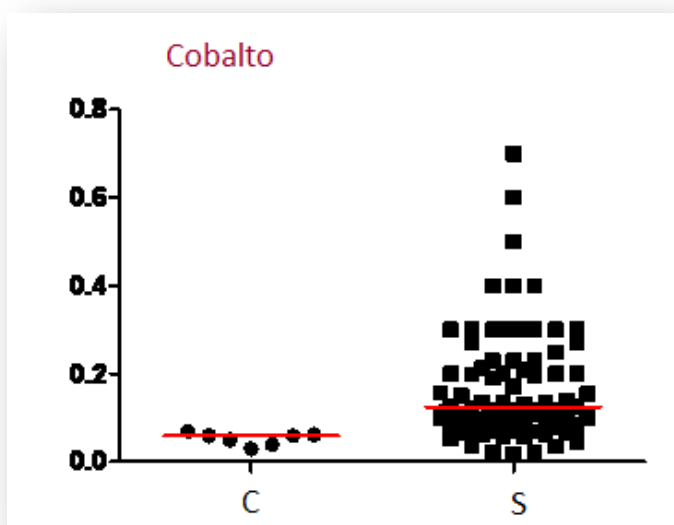


Figura 10 Valori di cobalto dosati nei soggetti affetti da tumore polmonare (S, 84) e nei soggetti sani (C, 7), casistica campioni fissati.

(Test di Mann-Witney $p<0,00$), la linea rappresenta la mediana).

Esposizione

La casistica dei soggetti affetti da neoplasia è stata suddivisa in merito alla professione stabilendo quelle attività che comportano esposizione ad elementi metallici.

I soggetti considerati esposti sono 11 e precisamente minatori, operai di fonderia, acciaieria, carpentieri edili, sabbiatori e verniciatori.

Nella tabella 9 sono riportate le concentrazioni determinate ed in figura 11, 12, 13 sono rappresentati gli elementi metallici che mostrano differenze.

Oltre a arsenico, tungsteno e uranio le cui concentrazioni sono significativamente superiori nei soggetti esposti si segnala il cromo la cui concentrazione è maggiore senza raggiungere la significatività.

Tabella 9 Mediana, 25° e 75° percentile della distribuzione delle concentrazioni degli elementi metallici nel tessuto indenne dei soggetti esposti e non esposti professionalmente ai metalli e affetti da tumore (S, campioni fissati in formalina)

	Esposti (n=10)			Non Esposti (n= 26)			p
	Mediana	25°	75°	Mediana	25°	75°	
Be	0,0005	0,0005	0,0030	0,0030	0,0005	0,0315	ns
Ni	4,6782	2,6971	8,6937	6,2000	5,0000	9,4500	ns
As	0,1053	0,0333	0,2195	0,0005	0,0005	0,0005	0,002
Cd	0,8272	0,3289	3,1714	1,0500	0,4441	1,6376	ns
Cr	1,2439	0,4609	1,3333	0,9821	0,4610	1,6758	ns
Co	0,0913	0,0526	0,1714	0,1200	0,0700	0,1400	ns
Cu	2,8412	2,3873	4,9630	7,2588	4,7809	11,7352	ns
Pb	1,1476	0,8785	1,2716	1,1300	0,6465	2,8998	ns
W	0,0366	0,0132	0,1170	0,0038	0,0010	0,0091	0,008
Se	1,0679	0,6250	1,5783	1,1500	0,8629	1,2335	ns
U	0,1628	0,1025	0,3628	0,0005	0,0005	0,0470	0,001

Fra le concentrazioni del tessuto indenne di soggetti esposti e non esposti professionalmente a elementi metallici è stato applicato il Test di Mann-Witney considerando significativi i valori con $p < 0,05$.

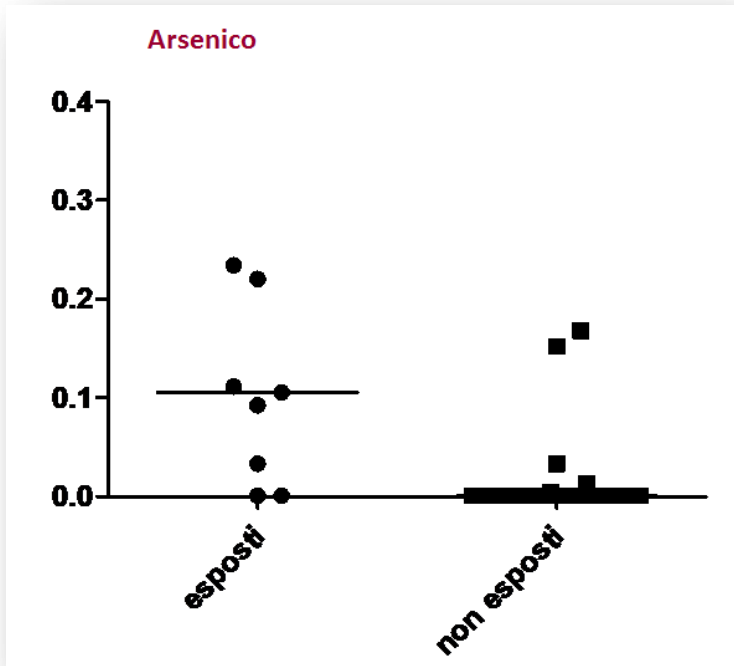


Figura 11 Valori di arsenico dosati nei soggetti esposti (10) e non esposti (26) a elementi metallici (Test di Mann-Witney $p=0,002$, la linea rappresenta la mediana). Casistica campioni fissati.

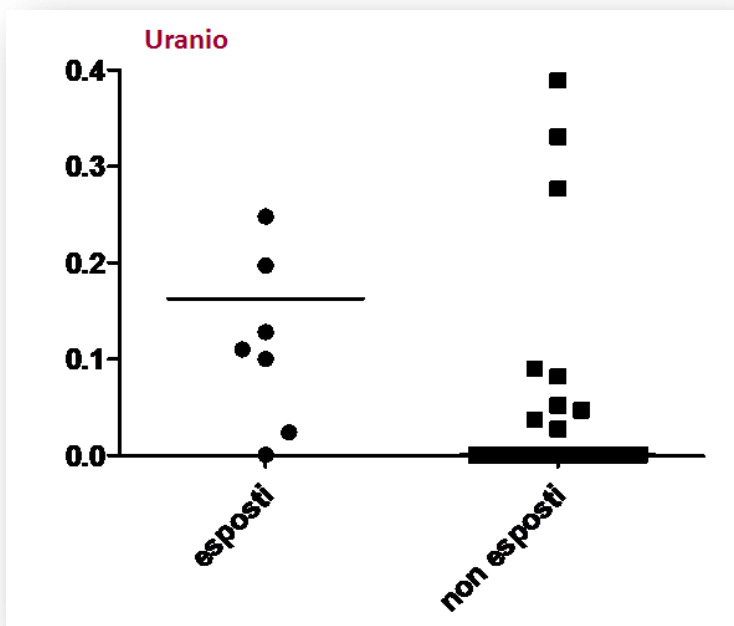


Figura 12 Valori di uranio dosati nei soggetti esposti (10) e non esposti (26) a elementi metallici (Test di Mann-Witney $p=0,001$, la linea rappresenta la mediana). Casistica campioni fissati.

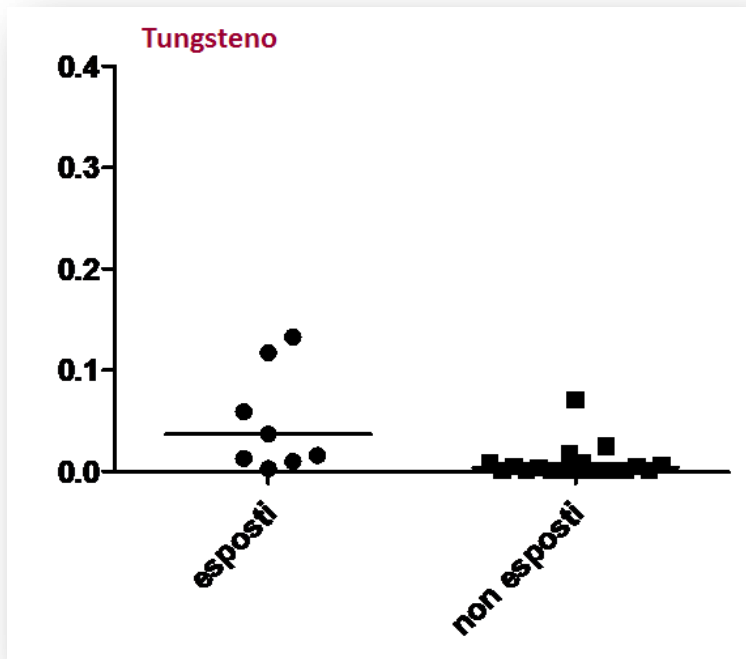


Figura 13 Valori di Tungsteno dosati nei soggetti esposti (10) e non esposti (26) a elementi metallici (Test di Mann-Witney $p=0,008$, la linea rappresenta la mediana). Casistica campioni fissati.

Nella casistica dei campioni congelati non vi è alcuna differenza nelle concentrazioni di elementi metallici di soggetti esposti e non esposti professionalmente.

Fumo

Un grosso limite della casistica raccolta è senza dubbio lo scarso numero di soggetti non fumatori, nella casistica dei campioni fissati è presente un solo soggetto non fumatore per cui il confronto non è attuabile.

Nella casistica dei campioni congelati i dati sono riportati in tabella 10.

Differenze statisticamente significative si sono evidenziate per le concentrazioni tissutali di cadmio, nichel, rubidio e piombo e precisamente maggiori in soggetti fumatori (attuali ed ex) rispetto a chi non ha mai fumato.

Inoltre la distribuzione della casistica classificata per istotipo e abitudine tabagica evidenzia che tutti i soggetti con carcinoma squamoso risultano fumatori (26/26) mentre l'adenocarcinoma è meno evidente ($p=0,10$).

Tabella 10 mediana, 25° e 75° percentile di elementi metallici determinati nel tessuto congelato di soggetti fumatori e non fumatori ($\mu\text{g/g}$ peso secco)

	Fumatori ed ex			Non fumatori			p
	mediana	25°	75°	mediana	25°	75°	
Be	0,0005	0,0005	0,0193	0,0005	0,0005	0,0005	ns
Ni	3,9	2,44	6,6	1,79	1,02	3,63	0,03
As	0,0005	0,0005	0,041	0,022	0,0005	0,0005	ns
Cd	0,52	0,24	1,22	0,05	0,04	0,19	<0,001
Cr	0,29	0,1	0,87	0,49	0,15	1,24	ns
Co	0,07	0,05	0,11	0,055	0,016	0,18	ns
Cu	3,41	2,27	4,37	2,14	0,77	6,4	ns
Zn	69,02	53,4	79,6	61,28	30,56	68,7	ns
Se	0,76	0,19	1,05	0,38	0,1	0,1	ns
Rb	15,1	9,5	19,8	9,84	5,2	13,4	0,05
Sr	0,94	0,55	2,5	1,8	1,0	2,2	ns
Mo	0,006	0,007	0,1	0,008	0,003	0,02	ns
Sb	0,005	0,005	0,007	0,005	0,004	0,06	ns
Cs	0,05	0,03	0,09	0,03	0,02	0,05	ns
Ba	0,25	0,15	0,58	0,29	0,1	0,54	ns
La	0,06	0,02	0,14	0,05	0,03	0,08	ns
Ce	0,3	0,16	0,85	0,25	0,15	0,41	ns
Nd	0,05	0,01	0,1	0,04	0,03	0,07	ns
Gd	0,008	0,001	0,02	0,007	0,004	0,009	ns
W	0,005	0,001	0,02	0,002	0,001	0,007	ns
Pb	0,21	0,12	0,4	0,05	0,01	0,15	0,02
U	0,002	0,0005	0,01	0,25	0,1	0,6	ns
V	0,11	0,06	0,3	0,25	0,1	0,6	ns
Fe	420,2	241,5	833,7	241,7	127,4	377,9	ns

Fra le concentrazione del tessuto indenne di soggetti fumatori e non fumatori è stato applicato il Test di Mann-Witney considerando significativi i valori con $p<0,05$.

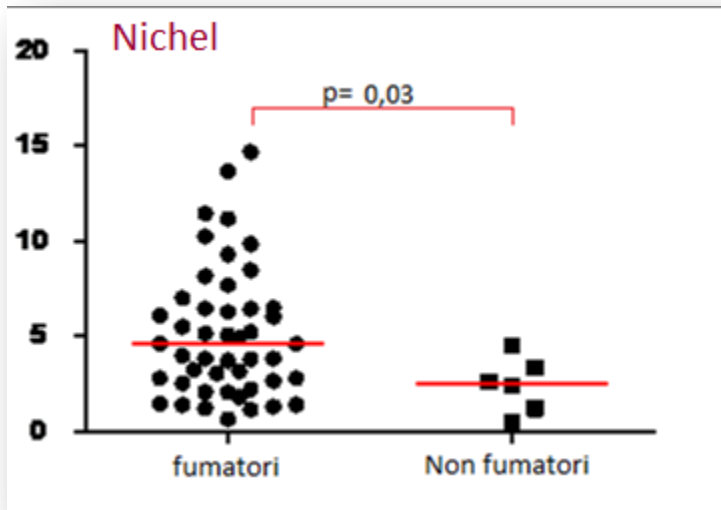


Figura 14 Valori di nichel dosati nei soggetti fumatori e non fumatori, (Test di Mann-Witney, la linea rappresenta la mediana). Casistica campioni fissati.

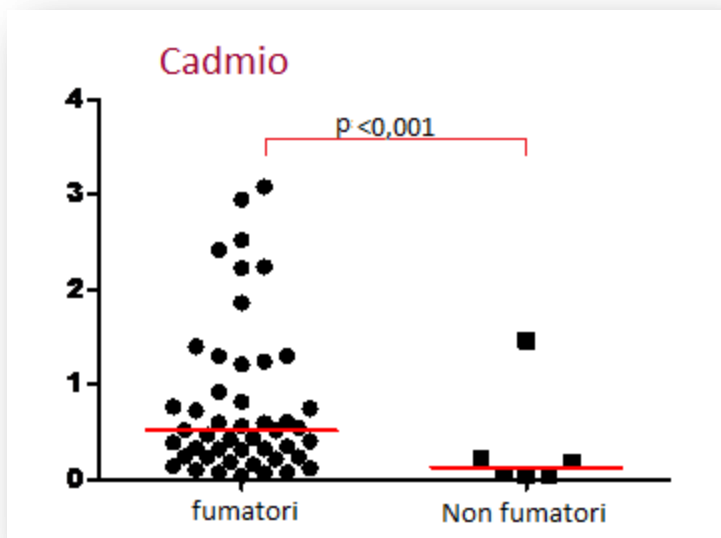


Figura 15 Valori di cadmio dosati nei soggetti fumatori e non fumatori, (Test di Mann-Witney, la linea rappresenta la mediana). Casistica campioni fissati.

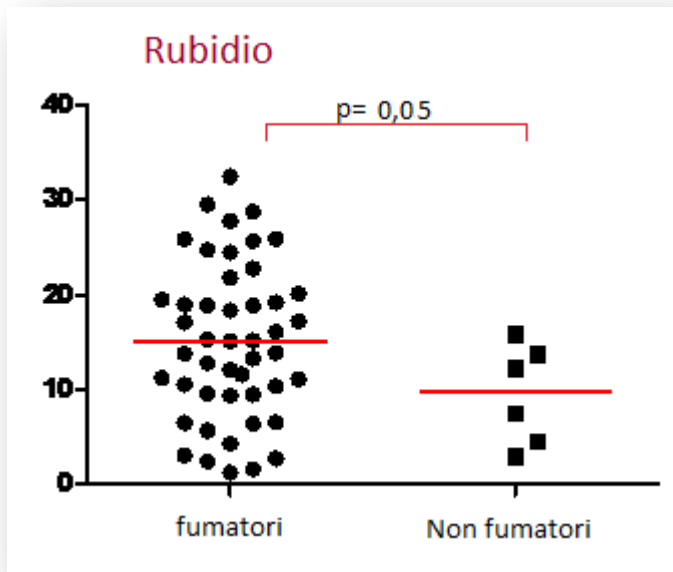


Figura 16 Valori di rubidio dosati nei soggetti fumatori e non fumatori, (Test di Mann-Witney, la linea rappresenta la mediana). Casistica campioni fissati.

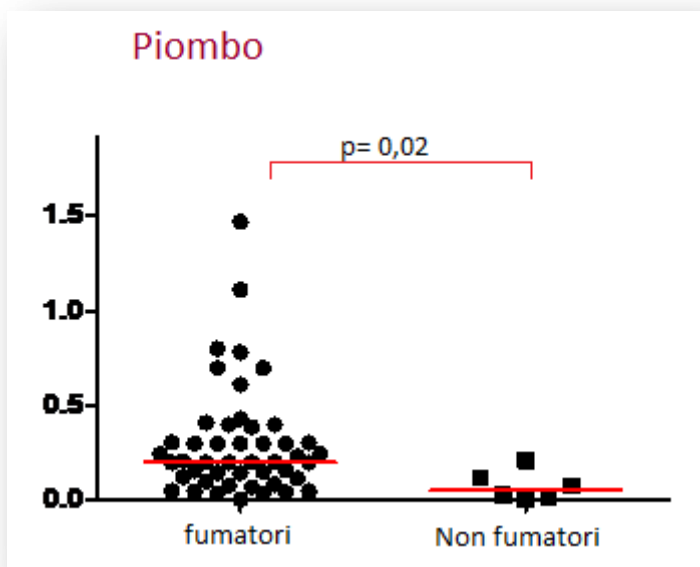


Figura 17 Valori di piombo dosati nei soggetti fumatori e non fumatori, (Test di Mann-Witney, la linea rappresenta la mediana). Casistica campioni fissati.

Sesso ed età

Lo studio dei dati in base a caratteristiche come sesso ed età non ha dato risultati degni di nota.

Lobi ed istotipo

In tabella 11 e 12 sono riportate le concentrazioni degli elementi metallici caratteristiche dei lobi superiori ed inferiori dei frammenti analizzati.

Nel gruppo dei campioni congelati risulta che il nichel è presente in concentrazioni maggiori nella parte superiore mentre il piombo nella parte inferiore nella casistica dei tessuti indenni di soggetti affetti da tumore.

Nei frammenti neoplastici, invece, risulta che zinco, rubidio e cesio sono maggiormente rappresentati nella parte inferiore mentre lantanio e neodimio nella parte superiore.

Nel gruppo dei campioni fissati in formalina, solo il vanadio possiede un andamento significativo essendo in concentrazioni maggiori nella parte superiore dei tessuti indenni della casistica.

Tabella 11 mediana, 25° e 75° percentile di elementi metallici determinati nel tessuto fresco di frammenti polmonari del lobo superiore e inferiore ($\mu\text{g/g}$ peso secco)

	Tessuto indenne S							Tessuto neoplastico M								
	Inferiore N(8)			Superiore N(25)				p	Inferiore N(8)			Superiore N(25)				p
	mediana	25°	75°	media a	25°	75°	media a		25°	75°	media a	25°	75°			
Be	0,001	0,001	0,02	0,001	0,001	0,001	ns	0,001	0,001	0,025	0,001	0,001	0,015	ns		
Ni	2,58	1,99	3,23	5,49	3,80	9,30	0,01	3,48	2,57	4,24	4,20	2,38	5,60	ns		
As	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,05	ns	0,001	0,001	0,001	0,01	0,001	0,06	ns		
Cd	0,66	0,48	1,17	0,59	0,23	1,30	ns	0,61	0,43	1,04	0,50	0,17	1,29	ns		
Cr	0,20	0,11	0,56	0,28	0,09	0,76	ns	0,42	0,10	0,49	0,33	0,08	0,71	ns		
Co	0,05	0,03	0,074	0,08	0,06	0,11	ns	0,03	0,02	0,04	0,09	0,05	0,10	ns		
Cu	3,24	1,82	3,68	3,40	2,35	4,55	ns	4,65	3,45	5,25	4,20	3,18	4,63	ns		
Zn	66,50	46,81	69,8	72,2	61,87	84,2	ns	86,3	75,1	91,0	54,8	46,3	63,3	0,01		
Se	0,69	0,37	1,03	0,8	0,40	1,10	ns	1,32	1,12	1,77	0,97	0,70	1,23	ns		
Rb	22,2	9,51	26,4	13,8	10,5	18,8	ns	27,4	21,3	42,5	12,9	9,10	22,8	<0,001		
Sr	0,79	0,54	1,35	1,04	0,62	4,50	ns	0,52	0,41	0,60	1,33	0,59	3,03	ns		
Mo	0,09	0,06	0,10	0,07	0,006	0,12	ns	0,09	0,08	0,10	0,07	0,03	0,09	ns		
Sb	0,005	0,005	0,01	0,005	0,005	0,006	ns	0,007	0,005	0,01	0,005	0,005	0,005	ns		
Cs	0,06	0,02	0,09	0,05	0,03	0,08	ns	0,07	0,06	0,09	0,04	0,03	0,08	0,02		
Ba	0,27	0,24	0,56	0,23	0,13	1,00	ns	0,35	0,25	0,43	0,15	0,08	0,30	ns		
La	0,02	0,02	0,06	0,08	0,03	0,16	ns	0,02	0,01	0,03	0,10	0,04	0,28	0,03		
Ce	0,18	0,10	0,26	0,60	0,16	0,90	ns	0,27	0,21	0,38	0,35	0,20	1,35	ns		
Nd	0,02	0,009	0,04	0,05	0,02	0,10	ns	0,01	0,004	0,01	0,07	0,02	0,25	0,03		
Gd	0,001	0,001	0,001	0,02	0,009	0,03	ns	0,003	0,002	0,004	0,01	0,005	0,04	ns		
W	0,004	0,001	0,02	0,003	0,001	0,01	ns	0,002	0,001	0,04	0,005	0,001	0,03	ns		
Pb	0,42	0,14	0,65	0,20	0,14	0,30	0,03	0,25	0,14	0,46	0,20	0,05	0,35	ns		
U	0,001	0,001	0,001	0,004	0,001	0,02	ns	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,007	ns		
V	0,08	0,04	0,17	0,10	0,06	0,30	ns	0,06	0,053	0,08	0,11	0,04	0,37	ns		
Fe	301,6	220,4	380,6	564,0	252,8	1052,0	ns	401,4	324,4	554,9	381,5	270,2	748,2	ns		

Fra le concentrazione del tessuto del lobo sup e inf è stato applicato il Test di Mann-Witney considerando significativi i valori con $p < 0,05$.

Tabella 12 mediana, 25° e 75° percentile di elementi metallici determinati nel tessuto fissato di frammenti polmonari del lobo superiore e inferiore (µg/g peso secco)

	Tessuto indenne S							Tessuto neoplastico M							
	Inferiore N(25)			Superiore N(45)				p	Inferiore N(25)			Superiore N(45)			
	mediana	25°	75°	mediana	25°	75°	mediana		25°	75°	mediana	25°	75°	p	
Be	0,001	0,001	0,01	0,001	0,001	0,02	ns	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	0,02	ns	
Ni	7,09	4,04	17,00	8,72	5,41	15,97	ns	6,36	2,07	16,05	5,85	2,86	12,0	ns	
As	0,001	0,001	0,020	0,001	0,001	0,010	ns	0,001	0,001	0,01	0,001	0,001	0,007	ns	
Cd	1,20	0,41	1,91	1,20	0,42	2,23	ns	0,53	0,23	1,19	0,39	0,19	0,91	ns	
Cr	0,69	0,39	1,62	0,70	0,44	1,29	ns	0,48	0,27	0,62	0,56	0,35	0,94	ns	
Co	0,14	0,10	0,20	0,12	0,08	0,21	ns	0,08	0,04	0,15	0,09	0,05	0,12	ns	
Cu	8,50	3,57	11,860	8,31	4,96	12,23	ns	11,77	7,35	15,08	9,94	6,16	17,84	ns	
Zn	454,7	176,0	1432,0	478,1	135,2	1132,0	ns	525,8	208,9	2563,3	384,0	193,2	1144,0	ns	
Se	0,94	0,58	1,24	1,19	0,84	1,46	ns	1,53	1,29	1,79	1,82	1,46	2,19	ns	
Rb	0,48	0,25	0,70	0,36	0,20	0,59	ns	0,43	0,13	0,69	0,23	0,18	0,70	ns	
Sr	30,50	26,00	37,00	31,0	22,3	35,11	ns	28,3	22,6	37,6	34,7	22,3	41,0	ns	
Mo	0,08	0,03	0,13	0,08	0,02	0,12	ns	0,05	0,01	0,10	0,05	0,01	0,09	ns	
Sb	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,007	ns	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005	ns	
Cs	0,005	0,002	0,007	0,009	0,006	0,01	ns	0,003	0,002	0,006	0,005	0,003	0,008	ns	
Ba	7,30	4,14	9,70	5,49	4,55	8,15	ns	5,21	1,63	7,84	6,31	3,19	8,20	ns	
La	0,05	0,03	0,09	0,07	0,04	0,11	ns	0,01	0,003	0,04	0,03	0,01	0,07	ns	
Ce	0,13	0,05	0,27	0,17	0,11	0,29	ns	0,018	0,009	0,06	0,06	0,02	0,13	ns	
Nd	0,02	0,01	0,05	0,02	0,01	0,05	ns	0,002	0,002	0,01	0,008	0,002	0,02	ns	
Gd	0,001	0,001	0,005	0,002	0,001	0,01	ns	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,007	ns	
W	0,009	0,001	0,02	0,008	0,001	0,07	ns	0,001	0,001	0,01	0,001	0,001	0,007	ns	
Pb	2,10	0,86	35,00	2,67	0,69	11,56	ns	3,25	0,66	34,07	2,06	0,9	6,88	ns	
U	0,01	0,001	0,09	0,001	0,001	0,046	ns	0,03	0,02	0,07	0,08	0,04	0,26	ns	
V	0,03	0,02	0,05	0,08	0,05	0,15	0,02	0,02	0,01	0,03	0,06	0,02	0,10	ns	
Fe	539,7	292,8	878,7	510,0	348,8	904,8	ns	215,3	154,7	269,1	269,9	164,5	430,1	ns	

Fra le concentrazione del tessuto del lobo sup e inf è stato applicato il Test di Mann-Witney considerando significativi i valori con p<0,05.

3.4.2 Risultati IPA

la stessa analisi preliminare condotta sugli elementi metallici è stata condotta anche sugli IPA, ossia si è voluto verificare se il medesimo campione congelato e fissato presentasse o meno differenze.

Nonostante gli idrocarburi policiclici aromatici siano composti chimicamente più instabili degli elementi metallici non si nota alcuna differenza fra le due modalità di conservazione dei campioni.

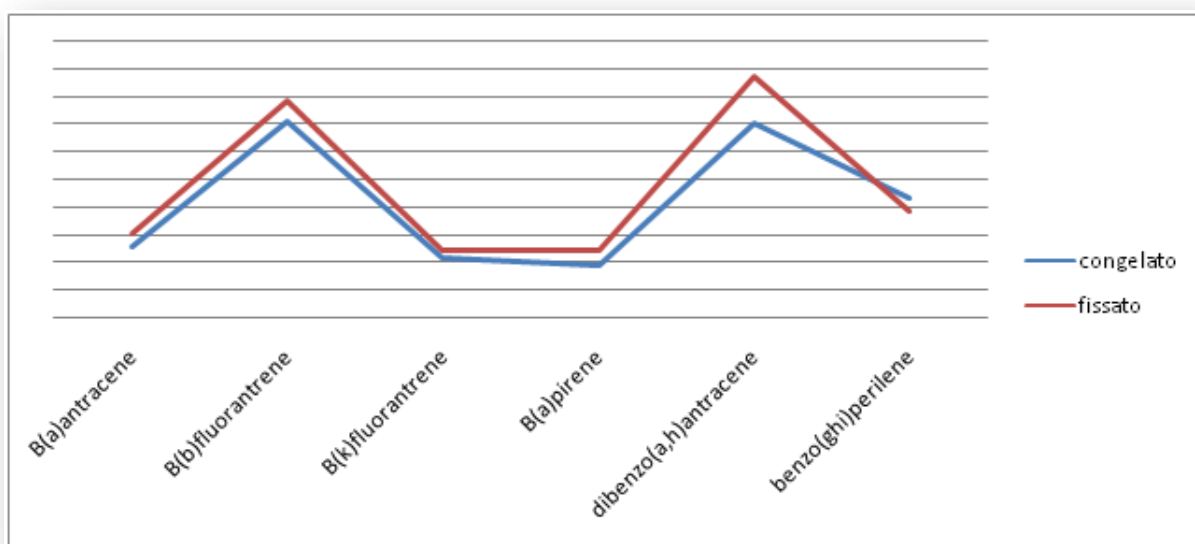


Figura 18 Confronto delle concentrazioni degli idrocarburi policiclici aromatici determinati in campioni autoptici conservati sia in formalina che congelati.

Nonostante queste premesse è stato possibile dosare gli IPA solamente nei campioni fissati.

Della miscela di 7 IPA esaminati il dibenzo(al)pirene è risultato non dosabile in nessuno dei campioni selezionati.

Nella tabella 13 sono riportate le concentrazioni dei singoli IPA suddivise nelle casistiche dei soggetti affetti da tumore polmonare (23 tessuti indenni e 6 tessuti neoplastici) e 6 campioni di controllo.

Il benzo(a)antracene e il benzo(a)pirene determinato nel tessuto indenne e neoplastico di soggetti affetti da tumore polmonare è significativamente superiore rispetto al gruppo di controllo.

In tabella 14 e figura 21 sono riportati i dosaggi effettuati sui tessuti indenni di soggetti affetti da tumore polmonare suddivisi per professione considerando quelle caratterizzate da esposizione a IPA.

Gli 11 soggetti esposti a IPA sono impiegati in acciaieria (8) e asfaltatori (3) mentre i soggetti non esposti sono 10 (commercianti, insegnanti e impiegati).

Il confronto delle concentrazioni di IPA in base alle abitudini al fumo non è stato possibile in quanto tutti i soggetti analizzati sono fumatori e le informazioni relative al numero di sigarette non permette una ulteriore classificazione.

L'elaborazione in base al sesso non ha dato risultati significativi, probabilmente a causa dell'esiguo numero di soggetti di sesso femminile (6) rispetto ai soggetti di sesso maschile (19). La concentrazione di IPA totali è maggiore nei soggetti maschi rispetto alle femmine con $p=0,05$ (figura 22).

Lo studio dei diversi IPA in base all'età ha evidenziato che il benzo(a)antracene è significativamente inferiore nei soggetti con età inferiore ai 60 anni, figura 23 e 24.

Tabella 13 Concentrazioni idrocarburi policiclici aromatici (espressi in ng/g tessuto secco) dosati su soggetti affetti da tumore polmonare (tessuto indenne S e tessuto neoplastico M) e nei soggetti di controllo.

	Tessuto indenne S (23)		Tessuto neoplastico M (6)		Controllo C (7)	
	mediana	25°- 75°	mediana	25°- 75°	mediana	25°- 75°
b(a)a	1,75*	0,13-4,37	0,64†	0,02-3,6	0,010	0,010-0,33
b(b)f	0,72	0,14-1,8	0,45	0,11-5,88	1,10	0,010-2,18
b(k)f	0,17	0,05-0,47	0,20	0,13-0,64	0,37	0,07-1,07
b(a)p	0,27*	0,10-1,5	0,11	0,025-0,52	0,05	0,01-0,56
db (a,h)a	0,98*	0,16-4,44	2,88†	0,45-6,8	0,26	0,017-0,50
b(ghi)p	0,87	0,24-1,64	0,83	0,37-1,88	0,80	0,017-1,83

Test di Mann-Whitney

† $p<0,05$, Tessuto neoplastico VS Controlli

* $p<0,05$ Tessuto indenne VS Controlli

Tabella 14 Concentrazione IPA (ng/g) determinato su tessuti indenni (S) di soggetti affetti da tumore polmonare esposti e non esposti professionalmente a IPA

	Soggetti Esposti (11)		Soggetti non Esposti (10)		p
	mediana	25°- 75°	mediana	25°- 75°	
b(a)a	1,75	0,6-3,2	0,47	0,3-0,8	ns
b(b)f	0,88	0,2-1,9	0,77	0,3-0,9	ns
b(k)f	0,21	0,2-0,5	0,33	0,2-0,4	ns
b(a)p	0,59	0,1-1,5	0,44	0,1-0,5	0,05
db (a,h)a	0,96	0,1-3,5	0,62	0,2-0,9	0,05
b(ghi)p	0,87	0,2-2,2	0,53	0,3-0,8	0,05
Somma	7,24	2,3-16,4	3,42	1,8-3,6	0,02

Fra le concentrazione dei soggetti esposti e non esposti è stato applicato il Test di Mann-Witney considerando significativi i valori con $p < 0,05$.

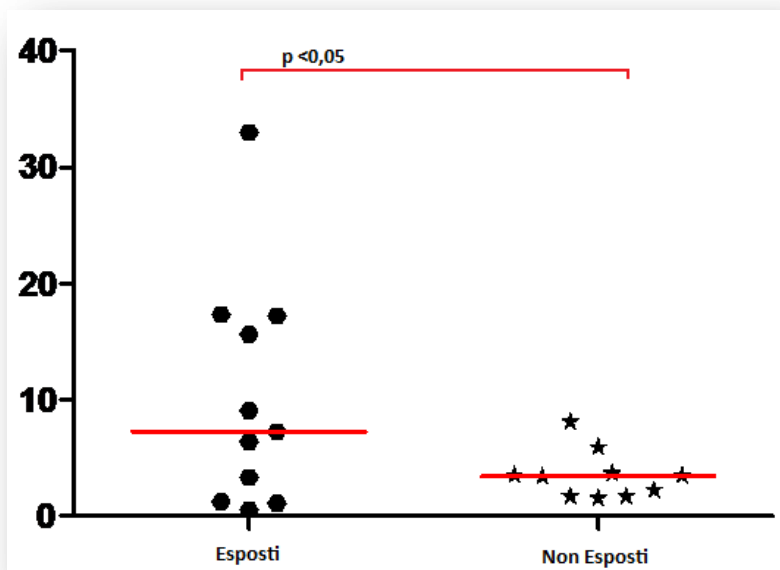


Figura 21 6 IPA totali (ng/g) determinato su tessuto indenne (S) di soggetti affetti da tumore polmonari esposti e non esposti professionalmente. Test di Mann-Whitney

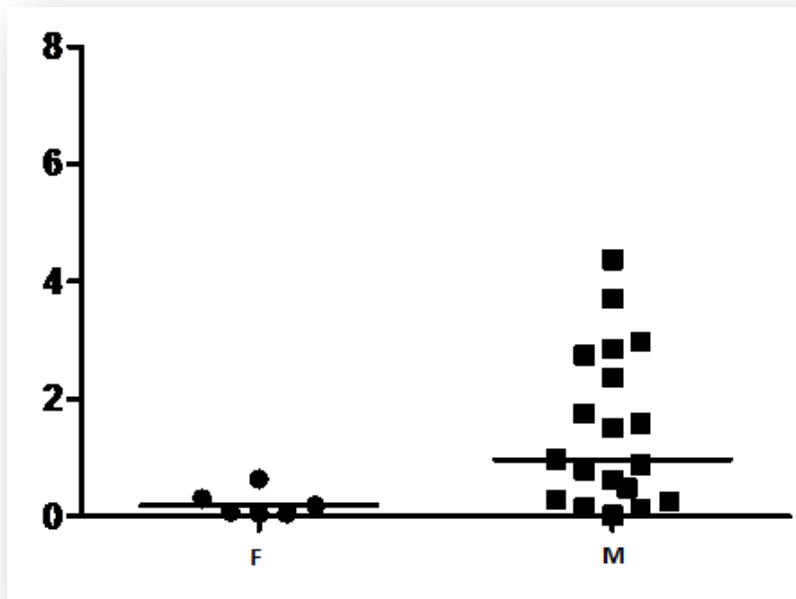


Figura 22 Distribuzione dei 6 IPA tot in base al sesso ($p=0,05$) Test di Mann-Whitney

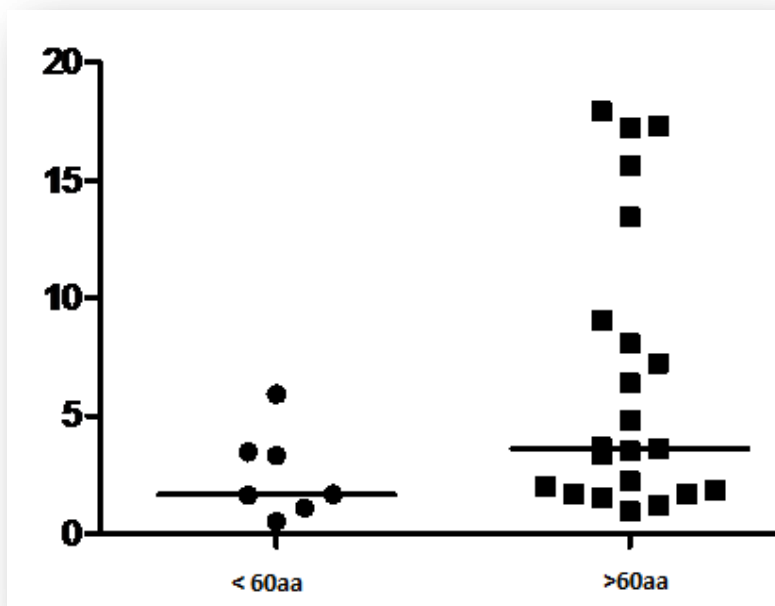


Figura 23 distribuzione IPA tot in base all'età ($p=0,05$) Test di Mann-Whitney

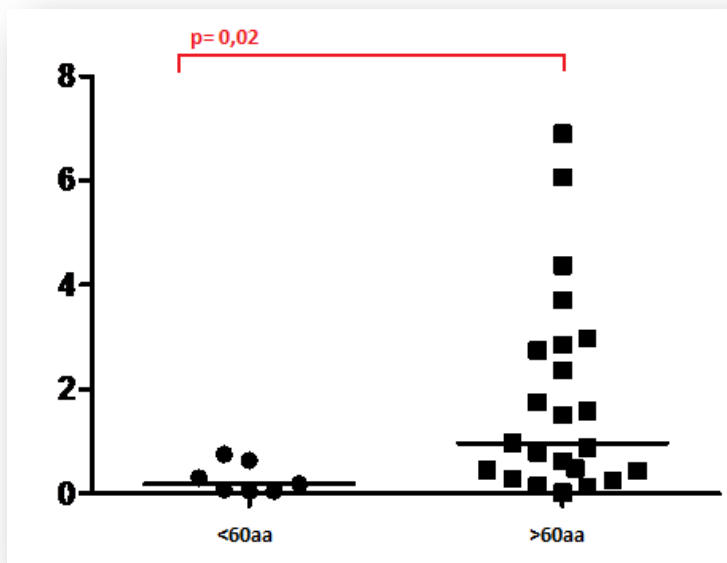


Figura 24 distribuzione concentrazione benzo(a)antracene in base all'età. Test di Mann-Whitney

4 VALUTAZIONE META ANALITICA

4.1 Metodo

La meta-analisi è una tecnica clinico-statistica quantitativa che permette di combinare i dati di più studi condotti su di uno stesso argomento, generando un unico dato conclusivo per rispondere a uno specifico quesito clinico.

La meta-analisi risulta utile quando i risultati dei singoli studi sono discordanti e quando gli studi sono effettuati su pochi pazienti e/o ritenuti scarsamente affidabili (potenza ridotta).

Di conseguenza la meta-analisi forniscono un quadro riassuntivo di un argomento e su un campione di maggiore potenza e dimensione dando inoltre la possibilità di effettuare analisi di sottogruppi.

Una meta-analisi è costituita da due principali fasi una "clinica" e una "statistica".

La fase "clinica" consiste nel definire un protocollo con criteri d'inclusione/esclusione ed end-points e una recensione e selezione di articoli, la fase "statistica" consiste nell'analisi dei singoli studi e complessiva in eventuali sottogruppi.

La meta-analisi oltre a rivedere il disegno, la qualità e la consistenza degli studi identificati somma i loro dati mettendo insieme i diversi risultati numerici.

Esempio di struttura di una metanalisi :

1. Ricerca sistematica ed esaustiva delle evidenze disponibili
2. Esplicitazione dei criteri di inclusione degli studi considerati
3. Analisi dei risultati degli studi

4.1.1 Elaborazione di una meta-analisi

Oggigiorno il numero di studi medico scientifici pubblicati e disponibili è notevolmente aumentato rispetto al passato e insieme ad essi la necessità di una valutazione d'insieme.

Le meta-analisi rappresentano la risposta a questa necessità e l'aumento esponenziale del numero di pubblicazioni di questo tipo registrate dal 1990 ad oggi lo dimostra (figura 25).

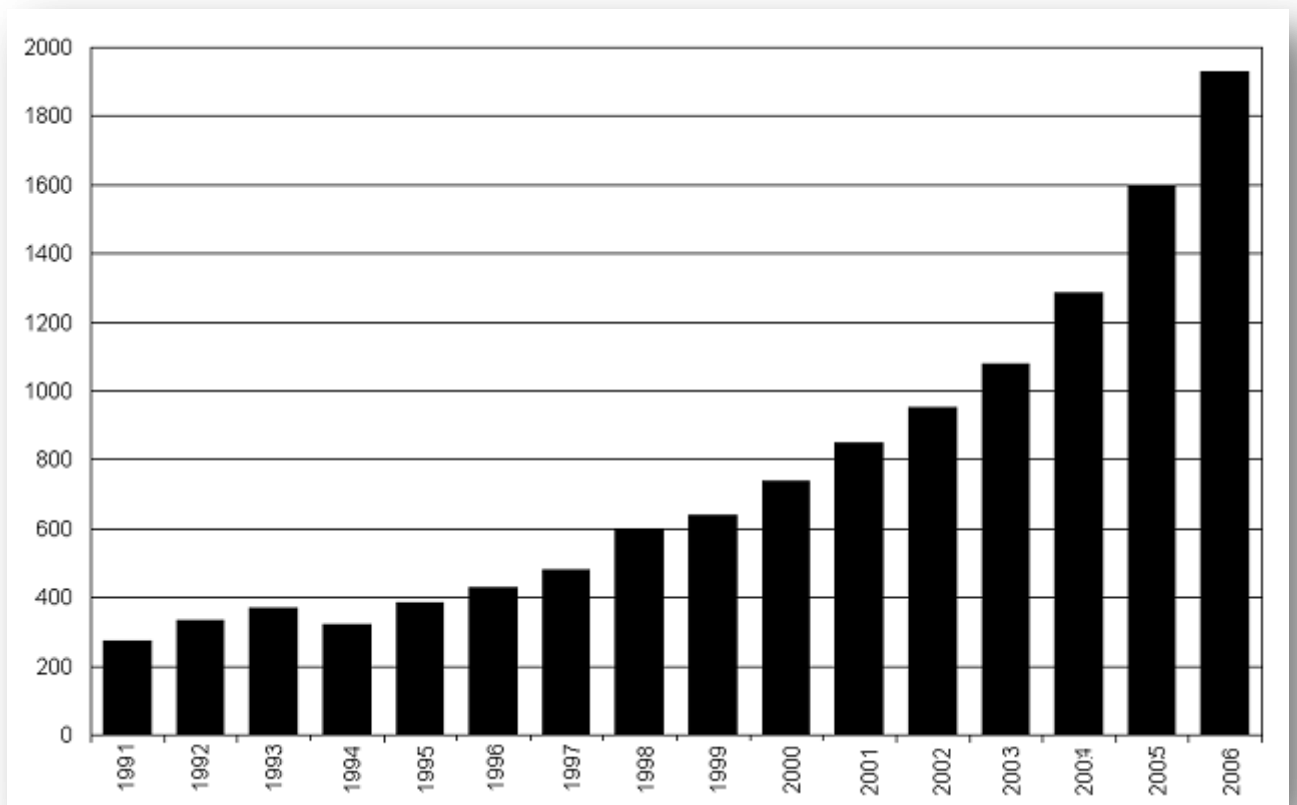


Figura 25 Numero di meta-analisi registrate da Pub-med dal 1991 al 2006.

Di pari passo sono comparsi molti software statistici che includono nel loro pacchetto l'opzione di elaborazioni di meta-analisi (Bax et al., 2007).

Ad oggi Comprehensive Meta-Analysis (CMA-Biostat) risulta essere il programma più completo e maneggevole e permette di combinare i risultati dei singoli studi tenendo

conto delle diverse variabili inserite; il risultato complessivo è espresso con le stesse misure di associazione utilizzate per i singoli studi.

In aggiunta al puro risultato numerico uno studio meta-analitico permette di ricavare importanti informazioni metodologiche e in merito a peso e influenza di variabili confondenti.

4.2 Ricerca dei lavori: dosaggio elementi metallici su tessuti polmonari

Sono state selezionate le pubblicazioni, disponibili nel database Pubmed, dal 1980 a giugno 2007, sulle concentrazioni di metalli e idrocarburi policiclici aromatici determinate nel tessuto polmonare.

Si è potuto osservare che tali determinazioni sono state effettuate su casistiche diverse che possono essere schematizzate in questo modo:

1. in soggetti esposti a metalli o composti organici (professione, ambiente, fumo)
2. soggetti appartenenti alla popolazione generale
3. soggetti con diagnosi di neoplasia polmonare

gli studi appartenenti al gruppo 2 possono essere definiti come tentativi di definire valori di riferimento mentre i lavori dei gruppi 1 e 3 sono studi caso-controllo.

4.2.1 Valutazione

Per ciascun lavoro è stata condotta un'attenta analisi, secondo criteri standardizzati, delle variabili di interesse riguardanti selezione della casistica (età, sesso, fumo, causa del decesso, stato di salute, residenza in zone inquinate, eventuale esposizione professionale), raccolta dei campioni (tipo di prelievo biopsia/autopsia; sede del prelievo lobi/segmenti), trattamento e conservazione dei campioni biologici (congelamento, liofilizzazione, conservazione in formalina e/o in paraffina), metodo di analisi, elaborazione statistica ed espressione dei risultati (rapportata al peso secco/umido), conclusioni.

Lo schema di registrazione delle variabili è presentato in tabella 15.

Tabella 15. Variabili esaminate nello studio meta-analitico

Autore, Anno
Anno determinazione
Nazione
SELEZIONE CASI
N°soggetti
Gruppi particolari
Sesso
Età
Fumo
Stato Salute/patologie
Causa prelievo
Residenza vicino aree contaminate
Esposizioni accidentali
Lavoro
Indicatori bio
CAMPIONAMENTO
Autopsia/biopsia
Sede
Quantità prelevata
Strumento di taglio
CONSERVAZIONE (formalina, congelamento, liofilizzazione)
ANALISI
Digestione
Tecnica
Limite rilevabilità
Quanti e quali metalli
Controllo interno ed esterno
controllo del bianco
TRATTAMENTO DATI
Unità misura (secco-umido)
Distribuzione
Analisi inferenziale
INDICI DI POSIZIONE
Media Arit./DS
Media geom./DS
Mediana
Range
Percentili
CONCLUSIONI

Per i lavori su soggetti professionalmente esposti la caratterizzazione dell'esposizione è stata studiata con lo schema di registrazione presentato in tabella 16.

Tabella 16 Caratterizzazione dell'esposizione

Definizione dell'esposizione	semplice definizione di esposto
	categorie per processo produttivo
	categorie per compiti e mansioni
Durata dell'esposizione	
Durata della cessazione dell'esposizione	
Valutazione dell'entità dell'esposizione	con indicatori ambientali
	con indicatori biologici
	con indicatori cumulativi
Valutazione di esposizioni multiple	

Per i lavori su tessuto neoplastico è stata posta particolare attenzione all'istotipo e alla sede della neoplasia

4.2.2 Criteri di eliminazione e grading dei lavori

Sono stati eliminati i lavori che:

- non esprimevano concentrazioni nel tessuto polmonare;
- esprimevano la concentrazione come numero di particelle osservate al microscopio e non come peso (solo per gli elementi metallici);
- esprimevano la concentrazione su superficie e non su peso;
- non specificavano la sede di campionamento o non fornivano le concentrazioni rilevate in funzione della sede di campionamento.
- I restanti lavori sono stati sottoposti ad una procedura di grading secondo i criteri riportati in tabella 17.

Tabella 17. Criteri per il grading dei lavori

Variabile	Criterio	Punteggio
Anno della determinazione	Non specificato	0
	Specificato	1
Informazioni sullo stato di salute (neoplasie e/o patologie polmonari)	Non raccolte	0
	Raccolte senza esprimere differenti concentrazioni per sani e malati	1
	Raccolte esprimendo differenti concentrazioni sani e malati	2
Informazioni sul fumo di sigaretta	Non raccolte	0
	Raccolte senza esprimere differenti concentrazioni per fumatori e non	1
	Raccolte esprimendo differenti concentrazioni per fumatori e non	2
Conservazione del campione	Non specificato	0
	Specificato	1
Trattamento preanalitico del campione	Non descritto	0
	Descritto in modo sintetico	1
	Descritto in modo dettagliato	2
Limite di rilevabilità	Non specificato	0
	Specificato	1
Partecipazione a programmi di Quality assurance	Non dichiarato	0
	Dichiarato	1
Trattamento dati	1 solo indicatore	0
	2 o più indicatori	1
Analisi distribuzione dei dati	assente	0
	presente	1
Analisi inferenziale	assente	0
	presente	1

Sì è deciso di eliminare i lavori che non avessero raggiunto almeno un punteggio pari a 5 e di suddividere i restanti in due gruppi definiti:

- di buona qualità se il punteggio raggiunto era compreso tra 5 e 10;
- di ottima qualità se il punteggio raggiunto era superiore a 10.

4.3 Risultato meta-analisi dosaggio elementi metallici in tessuti polmonari

Sono stati recuperati e analizzati **58** lavori successivamente suddivisi nei seguenti 3 gruppi:

1. **Gruppo 1**: comprendente **7** lavori che avevano determinato la concentrazione di metalli esclusivamente nel tessuto polmonare di soggetti professionalmente esposti (**Andersen, 2003; Barregard, 1999; Dufresne, 1996; Ishikawa, 1994a; Schwartz, 1998; Seeman, 1990; Shen, 1994**) e **21** lavori che avevano determinato la concentrazione di metalli nel tessuto polmonare sia di soggetti professionalmente esposti che di controlli senza esposizione occupazionale (**Andersen, 1989; Baumgardt, 1986; Brune, 1980; Dufresne, 1993; Gerhardsson e Wester, 1982; Gerhardsson e Wester, 1984; Gerhardsson, 1985; Gerhardsson, 1986a; Gerhardsson, 1986B; Gerhardsson, 1988; Gerhardsson, 1993A; Gerhardsson, 1993B; Gerhardsson, 2002; Hyodo, 1980; Ishikawa, 1994B; Raithel, 1993; Raithel, 1988; Rizzato, 1986; Saiki, 1999; Svenes, 1998; Wester, 1981**).
2. **Gruppo 2**: comprendente **22** lavori che avevano determinato la concentrazione di metalli nel tessuto polmonare di soggetti non professionalmente esposti (**Andersen, 1999; Bocio, 2005; von Bohlen, 1987; Dubick, 1991; Fortoul, 1996; Fortoul, 2001; Fortoul, 2002; Garcia, 2001; Ghio, 1994; Ingraio, 1990; Katoh, 2002; Kollemeier, 1987; Lech, 2004; Nicolaou, 1989; Raithel, 1987; Paakko, 1989; Paakko, 1988; Satarug, 2002; Takemoto, 1991; Tsuchiyama, 1997; Vanoeteren, 1986; Zuang, 1990**) indispensabili per la definizione di valori di riferimento per popolazione generale.
3. **Gruppo 3**: comprendente **5** lavori che avevano determinato la concentrazione di metalli in soggetti sani e in soggetti con neoplasia polmonare (**Adachi, 1991; Anttilla, 1989; Kollemeier, 1990a; Kollemeier, 1990B; Raithel, 1989**) e **3** lavori che avevano determinato la concentrazione di metalli in tessuto polmonare sano e in tessuto polmonare neoplastico (**Akslen, 1990; Diez, 1989; Drake, 1989**).

Del primo gruppo sono stati eliminati:

- 1 lavoro (Shen, 1994) che non aveva determinato la concentrazione di metalli del polmone essendo, in realtà, una revisione epidemiologica degli studi sulla determinazione del nichel in soggetti professionalmente esposti, in soggetti appartenenti alla popolazione generale, in soggetti con neoplasia polmonare;
- 1 lavoro (Seeman, 1990) il cui obiettivo non era quello di fornire la concentrazione dei metalli nel polmone ma piuttosto quello di definire la criticità delle modalità di conservazione e analisi dei campioni;
- 3 lavori (Dufresne, 1993 e 1996, Schwarz, 1998) che esprimevano la concentrazione come numero di particelle rilevate al microscopio su peso fornendo dati non confrontabili con gli altri lavori;
- 1 lavoro (Ishikawa, 1994 A) che esprimeva la concentrazione su superficie e non su peso di tessuto polmonare fornendo dati non confrontabili con gli altri lavori;

Del secondo gruppo sono stati eliminati i seguenti lavori:

- 3 lavori (Dubick, 1999, Bohlen, 1987, Ghio, 1994) in quanto nonostante l'abstract facesse pensare alla determinazione di metalli nel polmone non fornivano concentrazioni di metalli nello stesso;
- 1 lavoro (Nicolau, 1989) che forniva solo una presentazione grafica dei risultati senza presentare delle concentrazioni;

Del terzo gruppo **Akslen, 1990; Diez, 1989; Drake, 1989** sono stati utilizzati solo per ricavare le concentrazioni dei metalli nel tessuto neoplastico, non avendo espresso la concentrazione dei metalli nel tessuto sano di soggetti appartenenti alla popolazione generale e nel tessuto non neoplastico di soggetti con neoplasia polmonare in funzione della sede di campionamento.

I risultati della procedura di grading sono riportati in tabella 10. 13 lavori sono stato eliminati perché avevano totalizzato un punteggio inferiore a 5. La maggior parte dei lavori sono risultati di buona qualità, con un terzo dei lavori di ottima qualità.

Complessivamente sono stati eliminati 23 lavori come evidenziato in tabella 18.

Il numero definitivo di studi su cui è stata eseguita la meta-analisi è 37.

Tabella 18 Suddivisione dei lavori in seguito alla procedura di valutazione e grading

SOLO ESPOSTI	VALORI RIFERIMENTO	ESPOSTI-CONTROLLI	TUMORI POLMONARI-CONTROLLI	TESSUTO NEOPLASTICO VS TESSUTO SANO	ELIMINATI PER METODO O ALTRO	PUNTEGGIO < 5
Andersen, 2003	Andersen, 1999	Andersen, 1989	Adachi, 1991	Akslen, 1990	Ghio, 1994	Bocio, 2005
	Garcia, 2001	Brune, 1980	Anttila, 1989	Diez, 1989	Von Bohlen, 1987	Fortoul, 1996
	Katoh, 2002	Gerhardsson e Wester, 1982	Kollemeier, 1990	Drake, 1989	Nicolaou, 1989	Fortoul, 2001
	Kollemeier, 1987	Gerhardsson e Wester, 1984	Raithel, 1989		Dubick, 1991	Fortoul, 2002
	Kollemeier, 1990A	Gerhardsson, 1985			Seeman, 1990	Lech, 2004
	Paakko, 1988	Gerhardsson, 1986 (a)			Dufresne, 1996	Satarug, 2002
	Paakko, 1989	Gerhardsson, 1986 (b)			Ishikawa, 1994 A	
	Raithel, 1987	Gerhardsson, 1988			Schwartz, 1998	Barregard, 1999
	Takemoto, 1991	Gerhardsson, 1993 a			Shen, 1994	Rizzato, 1986
	Tsuchiyama, 1997	Gerhardsson, 1993 b			Dufresne, 1993	Ishikawa, 1994b
	Zhuang, 1990	Gerhardsson, 2002				Baumgardt, 1986
	Ingrao, 1989	Hyodo, 1980				Vanoeteren, 1986
		Raithel 1993				
		Raithel., 1988				
		Saiki, 1999				
		Svenes, 1998				
		Wester, 1981				

In tabella 19 sono presentati la sede di campionamento e la modalità di prelievo, conservazione e trattamento dei campioni nei 37 lavori esaminati.

Tabella 19 Modalità di prelievo e trattamento del campione per il dosaggio di metalli nel tessuto polmonare negli studi selezionati

Autore	Sede	Autopsia/ Biopsie	Conservazione	Trattamento del campione
Adachi, 1991	Lobo superiore destro	Autopsia	Formalina	Digestione acida (acido nitrico e perclorico)
Akslen, 1990	Tessuto neoplastico	Autopsia	Alcol assoluto	Rimanda ad altro lavoro
Andersen, 1989	Lobo inferiore destro	Autopsia	Formalina+ Na ₂ HPO ₄	Lavaggio per 3 volte con acqua deionizzata, asciugatura in stufa a 105° per 19 ore e successiva digestione acida
Andersen, 1999	Lobo inferiore destro	Autopsia	Congelamento – 18°	Asciugatura a 105°C per 19h e successiva digestione acida (acido nitrico, perclorico e solforico)
Anttila, 1989	Varie sedi	Autopsia controlli/ biopsia tumori	Formalina	Digestione acida acido nitrico e perclorico
Andersen, 2003	Più sedi solo per un solo soggetto	Autopsia	Formalina+ Na ₂ HPO ₄	Asciugatura a 105° per 24 ore, successivamente digestione acida (HClO ₄ , HNO ₃ , H ₂ SO ₄)
Brune, 1980	Lobo superiore destro (parte inferiore)	Autopsia	Congelamento a –20°C	Polverizzazione con mortaio di quarzo
Diez, 1989	Tessuto neoplastico	Biopsia	Congelamento a –80°	Liofilizzazione
Drake, 1989	Tessuto neoplastico	Autopsia	Congelamento a –20°	Omogeneizzazione
Garcia, 2001	Lobo superiore destro	Autopsia	Rimanda a lavoro precedente	Rimanda a lavoro precedente
Gerhardsson et al, 1982	Lobo superiore destro (parte inferiore)	Autopsia	Congelamento a secco	Polverizzazione con mortaio di quarzo
Gerhardsson et al., 1984	Lobo superiore destro (parte inferiore)	Autopsia	Congelamento a secco	Non descritto
Gerhardsson, 1985	Lobo superiore destro (parte inferiore)	Autopsia	Congelamento a secco	Non descritto
Gerhardsson, 1986 (a)	Lobo superiore destro (parte inferiore)	Autopsia	Congelamento a secco	Non descritto
Gerhardsson, 1986 (b)	Lobo superiore destro (parte inferiore)	Autopsia	Non specificato	Non descritto
Gerhardsson, 1988	Lobo superiore destro (parte inferiore)	Autopsia	Congelamento a secco	Digestione acida (H ₂ SO ₄ e H ₂ O ₂)
Gerhardsson, 1993 a	Lobo superiore destro (parte inferiore)	Autopsia	Congelamento a secco a -20°	Non descritto
Gerhardsson, 1993 b	Lobo superiore destro (parte inferiore)	Autopsia	Congelato a secco	Rimanda a studio precedente
Gerhardsson, 2002	Lobo superiore destro (parte inferiore)	Autopsia	Congelamento a -20°	Asciugatura a temperatura variabile da 110° per una notte a 450° fino a quando il

				campione risultava stabile per 10 ore poi digestione acida
Hyodo, 1980	Lobo superiore, medio, inferiore destro. Lobo superiore e inferiore sinistro	Autopsia	Congelamento a secco	Digestione acida (acido nitrico e perclorico)
Ingrao, 1990	Non specificato	Biopsia	congelamento	omogeneizzato
Katoh, 2002	Lobo superiore sinistro	Autopsia	Congelamento a -20°	Non descritto
Kollemeier, 1987	Lobo superiore destro	Autopsia	Congelamento a -20°	Liofilizzazione
Kollemeier, 1990 A	Lobo superiore destro	Autopsia	Liofilizzazione	Incenerimento sotto pressione a umido, chelazione ed estrazione
Kollemeier, 1990 B	Lobo superiore destro	Autopsia	Liofilizzazione	Incenerimento sotto pressione a umido, chelazione ed estrazione
Paakko, 1988	Lobo superiore (segmento anteriore)	autopsia	Tessuto fresco	Asciugatura e digestione acida (acido nitrico e perclorico)
Paakko, 1989	Lobo superiore (segmento anteriore e posteriore)	Autopsia	Tessuto fresco	Asciugatura e successiva digestione acida (acido nitrico e perclorico)
Raithel., 1987	1 campione per ogni segmento polmonare	Autopsia	Non precisato	Digestione acida (acido nitrico e solforico) e successivo riscaldamento a 220-270°C
Raithel, 1988	Vari segmenti per ciascun soggetto	Autopsia	Congelamento a secco	Digestione ossidativa
Raithel, 1989	Lobo superiore, medio inferiore	Autopsia	Analisi su tessuto fresco	Digestione acida (acido nitrico e solforico)
Raithel, 1993	Più segmenti polmone destro e sinistro	Autopsia	Rimanda a lavoro precedente	Digestione ossidativa
Saiki, 1999	Lobo medio destro	Biopsia esposti	Congelamento a secco, con perdita di peso di circa 80%	Omogeneizzazione
Svenes, 1998	11 campioni per ciascun soggetto	Autopsia	formalina 4 %+ Na ₂ HPO ₄	Lavaggio con acqua deionizzata, asciugatura a 105° per 19 ore e successiva digestione acida (acido nitrico solforico e perclorico)
Takemoto, 1991	Lobo superiore destro	Autopsia	Formalina	Essiccazione a 110° per 12 ore e digestione acida (acido nitrico e perclorico)
Tsuchiyama, 1997	Lobo superiore, medio inferiore	Autopsia	Congelamento a -30°	Essiccazione a freddo e digestione acida (acido nitrico e cloridrico)
Wester, 1981	Lobo superiore destro (parte inferiore)	Autopsia	Congelamento	Frantumazione in mortaio al quarzo e congelamento a secco
Zhuang, 1990	non specificato	Autopsia	congelamento	omogeneizzato

Come si può osservare la maggior parte dei lavori (20) hanno effettuato la determinazione dei metalli nel lobo polmonare superiore (17 a destra, 1 a sinistra, 2 senza precisare se a destra o a sinistra), 2 nel lobo inferiore (entrambi a destra), 1 nel lobo medio (destro), 9 in più lobi e infine 3 nel tessuto neoplastico.

La maggior parte delle determinazioni sono state effettuate su tessuto autoptico, solo in 2 lavori (Anttila et al., 1989 e Diez et al., 1989) il materiale oggetto dell'analisi proveniva da campioni bioptici.

Il tipo di strumento da taglio utilizzato per il prelievo del campione non è stato precisato da 14 autori (Garcia 2001; Paakko 1988; Takemoto 1991; Tsukiyama 1997; Andersen, 2003; Kollmeier 1990 a e b, Adachi 1991; Anttila, 1989; Asklen, 1990; Diez, 1989; Drake, 1989, Ingrao 1990, Zhuang, 1990). Alcuni hanno dichiarato l'uso di lame di ceramica o titanio (Katoh 2002), altri di lame al quarzo (Kollmeier 1987, Brune, 1990; Gerhardsson, 1982; 1984; 1985; 1986 a e b, 1988; 1993 a e b, 2002; Wester, 1981; Hyodo, 1980), altri di lame di rame e berillio (Raithel 1987, 1988, 1989, 1993), di lame in vetro o plastica (Paakko 1989), di acciaio inossidabile (Andersen, 1989; Svenes, 1998) e infine di teflon (Saiki, 1999). Solo Andersen (1999) ha confrontato i risultati della determinazione di metalli (nella fattispecie di nichel) su campioni polmonari dello stesso soggetto ottenuti utilizzando 2 diversi strumenti da taglio, uno in titanio e uno in acciaio riportando una differenza significativa nelle concentrazioni determinate (i campioni tagliati con lame al titanio e plastica mostravano livelli di nichel inferiori rispetto a quelli prelevati con lame tradizionali).

La modalità di conservazione del campione è risultata molto eterogenea, in particolare:

la maggioranza degli studi (19) ha analizzato tessuti congelati.

6 studi hanno eseguito le determinazioni su tessuti fissati in formalina, 1 su tessuto fissato in alcol assoluto.

- 3 hanno analizzato il tessuto fresco subito dopo il prelievo.
- 2 autori hanno liofilizzato il campione.
- 3 lavori non hanno fornito informazioni sulla modalità di conservazione.
- 1 ha rimandato a lavori precedenti.

Il trattamento del campione per l'analisi è stato descritto da alcuni autori in modo dettagliato(19), da altri in modo sintetico (7), alcuni l'hanno omissso (6), altri infine hanno rimandato per precisazioni a lavori precedenti (3).

La concentrazione degli elementi metallici determinati nel tessuto polmonare è stata espressa come rapporto su peso secco in circa la metà dei lavori (Andersen 1989, 1999, 2003; Paakko 1988, 1989; Tsuchiyama 1997 Kollmeier 1987, 1990A, 1990B, Takemoto

1991, Katoh, 2002; Svenes, 1998 Adachi, 1991; Anttilla, 1989; Raithel, 1989, Akslen, 1990; Diez, 1989; Drake, 1989, Ingraio, 1990, Zhuang, 1990) mentre le restanti pubblicazioni hanno espresso i risultati su peso umido (Garcia 2001; Raithel 1987, 1988, 1993; Brune, 1980; Gerhardsson, 1982; 1984; 1985; 1986 A e B, 1988; 1993 A e B, 2002; Hyodo, 1980; Saiki, 1999; Wester, 1981). Un autore in 3 differenti lavori (Raithel., 1988; Raithel., 1989; Raithel, 1993) ha riportato la concentrazione dei metalli determinati esprimendola sia su peso umido che secco. Ciò ha permesso di confrontare le concentrazioni evidenziando che la concentrazione espressa su peso secco è circa 5 volte superiore a quella espressa su peso umido.

In tabella 20 sono presentati il numero e il tipo di elementi metallici, la tecnica analitica, il limite di rilevabilità e il fatto che siano state seguite procedure di quality assurance in tutti i lavori selezionati e non eliminati.

Tabella 20 Metodi analitici utilizzati negli studi selezionati

Autore	N elementi metallici	Metodo	Limite di rilevabilità	Quality assurance
Adachi, 1991	9 (ferro, calcio, magnesio, zinco, rame, cobalto, nichel, piombo, cromo)	AAS	Non definito	Si
Akslen, 1990	2 (cromo, nichel)	AAS	Non definito	Si
Andersen, 1989	1 (nichel)	EAAS	Non definito	Non eseguito, ma dati confrontabili ad altri studi che lo avevano eseguito
Andersen, 1999	1 (nichel)	AAS	5 ng/g nichel	Definita precisione
Andersen, 2003	5 (nichel, cobalto, rame, ferro, cromo)	ICP-MS	0,5 mcg/g per nichel, 0,3 mcg/g per altri metalli	Non precisato
Anttilla, 1989	1 (cromo)	DCP-AES	0.017 mg/l	Si
Brune, 1980	23 (antimonio, arsenico, cadmio, rame, cesio, cromo, cobalto, piombo, manganese, mercurio, oro, lantanio, molibdeno, ferro, fosforo, scandio, selenio, argento, rubidio, tellurio, stagno, tungsteno, zinco)	INAA	Non definito	Si
Diez, 1989	5 (rame, zinco, magnesio, calcio, ferro)	AAS	Non definito	Si
Drake, 1989	16 (calcio, vanadio, manganese, ferro, nichel, rame, zinco, selenio, cromo, rubidio, stronzio, piombo, mercurio, arsenico, molibdeno, bromo)	EDXRF	Non definito	Non specificato
Garcia, 2001	12 (arsenico, cadmio, cobalto, cromo, rame, mercurio, piombo, manganese, nichel, stagno, vanadio, zinco)	ICP-MS	0,025 mcg/g cadmio e Co, 0,05 mcg/g As e Hg, 0,125 V	Si materiali certificati
Gerhardsson e Wester, 1982	1 (antimonio)	INAA	Non definito	Non specificato
Gerhardsson e Wester, 1984	3 (cromo, cobalto, lantanio)	INAA	Non definito	Non specificato
Gerhardsson, 1985	8 (selenio, antimonio, arsenico, cadmio, cromo, cobalto, lantanio,	INAA per selenio,	Non definito	Definite accuratezza e

	piombo)	antimonio, arsenico, cadmio, cromo, cobalto, lantano, AAS per piombo		precisione
Gerhardsson, 1986 (a)	3 (cadmio, zinco e piombo)	INAA per cadmio, AAS per zinco e piombo	Non definito	Definite accuratezza e precisione
Gerhardsson, 1986 (b)	8 (antimonio, arsenico, cadmio cobalto, cromo, lantano, selenio, piombo)	INAA per antimonio, arsenico, cadmio, cromo, cobalto, lantano e selenio AAS piombo	Non definito	Non precisato
Gerhardsson, 1988	9 (antimonio, arsenico, cadmio cobalto, cromo, lantano, selenio, piombo, zinco)	INAA per antimonio, arsenico, cadmio, cromo, cobalto, lantano e selenio AAS zinco e piombo	Non definito	Definite accuratezza e precisione
Gerhardsson, 1993 a	9 (antimonio, arsenico, cadmio cobalto, cromo, lantano, selenio, piombo, zinco)	INAA per antimonio, arsenico, cadmio, cromo, cobalto, lantano e selenio AAS zinco e piombo	Non definito	si rimanda a studi precedenti
Gerhardsson, 1993 b	9 (antimonio, arsenico, cadmio cobalto, cromo, lantano, selenio, piombo, zinco)	INAA per antimonio, arsenico, cadmio, cromo, cobalto, lantano e selenio AAS zinco e piombo	Non definito	Si controllo interlaboratoriale e uso materiali certificati
Gerhardsson, 2002	3 (cadmio, zinco, rame)	AAS	4 mcg/l per cadmio, 40 mcg/l per rame, 30 mcg/l zinco	Si NIST
Hyodo, 1980	3 (cromo,rame, zinco)	AAS	1 ppb cromo, 40 ppb rame, 400 ppb zinco	Non specificato
Ingrao, 1990	9 selenio mercurio cesio scandio rubidio zinco ferro cobalto antimonio	INAA	1.90 KeV per raggi γ 122 KeV	si
Katoh, 2002	20 (cloro, cobalto, rame, ferro, potassio, manganese, sodio, rubidio, selenio, zinco, arsenico, antimonio, alluminio, lantano, calcio, magnesio, cadmio, molibdeno, cesio, scandio)	INAA	Non definito	Si materiali certificati
Kollemeier, 1990 A	2 (cromo, nichel)	AAS	8 ng/g cromo 5 ng/g nichel	Si
Kollemeier, 1987	2 (cromo, nichel)	AAS	8 ng/g cromo 5 ng/g nichel	Si
Kollemeier, 1990 B	1 (cadmio)	AAS	2ng/g cadmio	Si
Paakko, 1988	1 (cadmio)	ICP-MS	Non precisato	Si
Paakko, 1989	2 (cadmio, cromo)	DGP-AES	0,010 ppm	Si

			cadmio, 0,017 ppm Cr	
Raithel, 1987	2 (nichel, cromo)	AAS	0,8 mcg/g Ni, 0,3 mcg/g Cr	Si
Raithel, 1988	2 (nichel, cromo)	AAS	Rimandato ad altro studio	Rimandato ad altro studio
Raithel, 1989	2 (nichel, cromo)	AAS	Non definito	Non precisato
Raithel, 1993	2 (nichel, cromo)	AAS	Rimandato ad altro studio	Rimandato ad altro studio
Saiki, 1999	12 terre rare (Sc, La, Ce, Nd, Sm, Eu, Tb, Yb, Lu, Hf, Th, U)	INAA	0.90 KeV per raggi γ 122 KeV 1.90 KeV per raggi γ 1332 KeV	Si
Svenes, 1998	1 (nichel)	AAS	5 ng/g nichel	Si
Takemoto, 1991	9 (ferro, calcio, magnesio, zinco, rame, cobalto, nichel, piombo, cromo)	AAS	Non definito	Si
Tsuchiyama, 1997	8 (alluminio, cadmio, cromo, nichel, piombo, manganese, rame, zinco)	AAS	0,04 mcg/g Al, 0,1 mcg/g Cr e Pb, 0,05 mcg/g Ni, 1 mcg/g Cu, 0,5 mcg/g Zn e Mn, 0,005 cadmio	Si
Wester, 1981	2 (arsenico, selenio)	spettrometro	Non definito	Non precisato
Zhuang, 1990	3 arsenico cadmio e mercurio	INAA	Non definito	Non precisato

Il numero degli elementi metallici determinati nei vari studi variava da un minimo di 1 ad un massimo di 23, con 7 lavori che avevano dosato un solo elemento, 13 lavori con la determinazione di 2-5 elementi, 10 lavori con un numero di elementi metallici determinati variabile fra 5 e 10 e infine 5 lavori con 10 o più elementi dosati.

La metodica analitica può influenzare in modo determinante la sensibilità della determinazione costituendo un fattore da tenere in stretta considerazione. Fra i metodi analitici quello più usato è risultato l'AAS (16) seguito dall'INAA (13), meno utilizzati ICP-MS (3), DCP AES (2), EAAS (1), gamma spettrofotometro (1), EDXRF (1).

Una criticità degli studi analizzati risiede nell'esiguo numero di lavori (14) che avevano precisato il limite di rilevabilità con altrettante (16) pubblicazioni che non l'avevano definito e ben 7 studi che rimandavano per ulteriori informazioni a lavori precedenti. Una buona attenzione è stata rivolta dai vari autori alle procedure di quality assurance con solo 8 lavori che non fornivano informazioni al riguardo.

La descrizione della casistica indagata in ciascun lavoro ed i risultati delle determinazioni dei vari metalli nel tessuto polmonare sono stati presentati mantenendo la suddivisione nei 3 gruppi: popolazione generale, esposti, soggetti con tumore polmonare.

Descrizione della casistica degli studi su soggetti appartenenti alla popolazione generale

Le informazioni relative ai soggetti indagati negli studi su popolazione generale sono riportati in tabella 21.

Tabella 21 Casistica degli studi sul dosaggio di elementi metallici nel tessuto polmonare di soggetti appartenenti a popolazione generale

Autore	Tipo di popolazione	N soggetti	Sesso	Età	Fumo
Adachi, 1991	Popolazione generale	1715	1003 Maschi 712 Femmine	61,1 (media)	Non precisato
Andersen, 1989	Popolazione generale	16	Non precisato	non specificata	Non precisato
Andersen, 1999	Popolazione generale	50	23 femmine 27 maschi	70.6 (media)	non specificato
Antilla, 1	Controlli in studio caso-controllo	43	Maschi	67 (media)	39 fumatori
Brune, 1980	Popolazione generale	8	Non precisato	43-72 (range)	3 non fumatori, 4 fumatori, 1 non informazioni
Garcia, 2001	Popolazione generale	78	73%maschi 27% femmine	56±20 (media±DS)	55%fumatori
Gerhardsson e Wester, 1982	Controlli in studio caso-controllo	11	Maschi	67,5 (media)	8 non fumatori, 1 fumatore, 2 non informazioni
Gerhardsson e Wester, 1984	Controlli in studio caso-controllo	14	Maschi	67,9 (media)	1 fumatore, 2 ex fumatori, 10 non fumatori, 1 non informazioni
Gerhardsson, 1985	Controlli in studio caso-controllo	15 rurali, 10 urbani	Maschi	67,7(media)rurali, 68,8(media)urbani	3 fumatori, 2 ex, 11 non fumatori, 10 non informazioni
Gerhardsson, 1986 (a)	Controlli in studio caso-controllo	16 rurali, 10 urbani	Maschi	67,7(media)rurali, 68,8(media)urbani	3 fumatori, 2 ex, 11 non fumatori, 9 non informazioni
Gerhardsson, 1986 (b)	Controlli in studio caso-controllo	15 rurali, 10 rurali	Maschi	67,7(media)rurali, 68,8(media)urbani	3 fumatori, 2 ex, 11 non fumatori, 10 non informazioni
Gerhardsson, 1988	Controlli in studio caso-controllo	15 rurali, 10 rurali	Maschi	67,7(media)rurali, 68,8(media)urbani	3 fumatori, 2 ex, 11 non fumatori, 10 non informazioni
Gerhardsson, 1993 (a)	Controlli in studio caso-controllo	15 rurali, 10 rurali	Maschi	67,7(media)rurali, 68,8(media)urbani	3 fumatori, 2 ex, 11 non fumatori, 10 non informazioni
Gerhardsson, 1993 (b)	Controlli in studio caso-controllo	15 rurali, 10 rurali	Maschi	67,7(media)rurali, 68,8(media)urbani	3 fumatori, 2 ex, 11 non fumatori, 10 non

					informazioni
Gerhardsson, 2002	Controlli in studio caso-controllo	15 rurali, 10 rurali	Maschi	70,6 (media)	Non precisato
Hyodo, 1980	Controlli in studio caso-controllo	5	4 maschi, 1 femmina	59-78 (range)	4 fumatori, 1 non fumatore, 1 non informazioni
Ingrao, 1990	pop generale con alto consumo di pesce	14	10 M 4 F valori non suddivisi per sesso	20-79	non specificata
Katoh, 2002	Popolazione generale	64	Maschi	6-82 (range)	non specificato
Kollemeier, 1987	Popolazione generale	25	Non precisato	Non specificata	Non specificato
Kollemeier, 1990 (a)	Popolazione generale di tre distretti di cui 1 noto per inquinamento da nichel e cromo	71 (Bochum) 16 (Dortmund) 23 (Munster)	61 maschi 39 femmine	26-92 (range)	Non specificata
Kollemeier, 1990 (b)	Popolazione generale	87	50 Maschi 37 Femmine	25-92 (range)	Non precisato
Paakko, 1988	Popolazione generale	45	Maschi	67.6±9.3 (media±DS)	4 non fumatori, 19 ex, 21 fumatori
Paakko, 1989	Soggetti con vario tipo di enfisema	45	Maschi	67(media)	4 non fumatori, 19 ex, 21 fumatori
Raithel 1993	Controlli in studio caso-controllo	30	29 maschi, 1 femmina	Non precisato	Non precisato
Raithel, 1987	Popolazione generale	15	14 Maschi, 1 femmina	17-83 (range)	8 fumatori, 4 non fumatori, 3 non informazioni
Raithel, 1989	Popolazione generale	19	11 Femmine, 8 Maschi	37-88 (range)	9 non fumatori, 1 ex fumatore, 9 non informazioni
Raithel., 1988	Controlli in studio caso-controllo	30	29 maschi, 1 femmina	49 (media)	19 fumatori, 5 non fumatori, 6 non informazioni
Saiki, 1999	Controlli in studio caso-controllo	4	Non precisato	Non precisato	Non precisato
Svenes, 1998	Controlli in studio caso-controllo	10	5 Maschi +5Femmine	1-88 (range)	Non precisato
Takemoto, 1991	Popolazione generale	2131	1353 Maschi 778 Femmine	30-99 (range)	non specificato
Tsuyiyama, 1997	Popolazione generale	17	12Maschi 5 Femmine	64 (media)	9 fumatori, 8 non fumatori
Wester, 1981	Controlli in studio caso-controllo	11	Maschi	67,4 (media)	8 non fumatori, 1 fumatore, 2 non informazioni
Zhuang, 1990	pop generale	24	tutti M	35-60	si diversi valori in fumatori ex fuma e non fuma per cadmio

Come si può osservare si distinguono 2 tipi di studi sulla popolazione generale:

- quelli tesi a definire valori di riferimento della concentrazione dei metalli nel tessuto polmonare (12);
- quelli volti a ricercare una differenza di dose fra soggetti professionalmente esposti e controlli non professionalmente esposti e fra soggetti con neoplasia polmonare e soggetti deceduti per cause diverse dalla neoplasia del polmone (20).

Il numero di soggetti studiati in ciascun lavoro variava da un minimo di 4 ad un massimo di 2131, con una casistica inferiore a 100 individui in tutti gli studi ad eccezione di quello di Takemoto et al., (1991). Nella maggior parte dei lavori (tutti ad eccezione di 4) sono state riportate informazioni relative al sesso dei soggetti indagati sebbene solo 5 autori (Takemoto, 1991; Garcia, 2001, Tsuchyama, 1997; Kollemeier, 1990 (a) e (b)) abbiano fornito concentrazioni metalliche distinte fra uomini e donne. Analogamente le informazioni relative all'età dei soggetti sono state fornite dalla maggior parte degli autori (tutti ad eccezione di 5) sebbene solamente 2 autori (Takemoto, 1991 e Kollemeier, 1990 b) abbiano fornito concentrazioni metalliche in funzione dell'età .

Anche le informazioni relative al fumo di sigaretta sono state precisate in un elevato numero di studi (19), sebbene solo in 5 di essi (Raithel., 1987; Raithel., 1988; Paakko, 1988, Paakko, 1989; Garcia, 2001; Tsuchyama, 1997) si possano ricavare concentrazioni diverse in funzione della variabile fumo.

Le informazioni relative a patologie polmonari concomitanti non sono state raccolte e precisate in modo così preciso e solamente 2 autori (Takemoto, 1991; Paakko, 1989) hanno fornito concentrazioni metalliche diverse in funzione del grado di patologia concomitante (enfisema).

Descrizione della casistica degli studi su soggetti professionalmente esposti

Le informazioni relative ai soggetti indagati negli studi che comprendevano professionalmente esposti sono riportati in tabella 22.

Tabella 22 Casistica degli studi sul dosaggio di elementi metallici nel tessuto polmonare di soggetti professionalmente esposti

Autore	Tipo di popolazione	N soggetti	Sesso	Età	Fumo
Andersen 1989	Lavoratori in raffineria di nichel	15 nel reparto fusione e 24 dell'elettrolisi	maschi	66±8 (media± DS)	22 forti fumatori, 10 medi fumatori, 5 non fumatori
Andersen, 2003	1 Lavoratore per 15 anni in raffineria di nichel	1	maschio	64 (media)	Non specificato
Brune, 1980	Lavoratori di fonderia e raffineria	21	maschi	55-76 (range)	8 non fumatori, 3 fumatori, 10 non informazioni
Gerhardsson e Wester, 1982	Lavoratori di fonderia	40	maschi	66,6 (media)	7 fumatori, 11 ex fumatori, 11 non fumatori, 11 non informazioni,
Gerhardsson e Wester, 1984	Lavoratori di fonderia	66	maschi	68,7 (media)	19fumatori, 22 ex, 22 non fumatori, 3 non informazioni
Gerhardsson, 1985	Lavoratori di fonderia	76	maschi	66-71 (range)	23 fumatori, 25 ex, 25 non fumatori, 3 non informazioni
Gerhardsson, 1986 (a)	Lavoratori di fonderia	86	maschi	68,3±9(media± DS)	23 fumatori, 27 ex, 26 non fumatori
Gerhardsson, 1986 (b)	Lavoratori di fonderia	76	maschi	66-71 (range)	23 fumatori, 25 ex, 25 non fumatori e 3 non informazioni
Gerhardsson, 1988	Lavoratori di fonderia	85	maschi	66-71 (range)	Raccolte ma non specificate
Gerhardsson, 1993 a	Lavoratori di fonderia	115	maschi	68,3±9,1(media± DS)	raccolte ma non specificate
Gerhardsson, 1993 b	Lavoratori di fonderia	85	maschi	66-71 (range)	Raccolte ma non specificate
Gerhardsson, 2002	Lavoratori di fonderia	32	maschi	67,4± 9,5(media± DS)	Raccolte ma non specificate
Hyodo, 1980	1 Cromatore	1	maschio	62	Fumatore
Raithel, 1988	11 lavoratori in raffineria di nichel, 2 saldatori, 1 fonditore e 1 elettrotecnico	15	maschi	Non precisata per tutti	Non precisata per tutti
Raithel, 1993	5 lavoratori in fonderia di nichel, 2 saldatori, 1 fonditore, 1 verniciatore, 1 addetto all'ossitaglio	10	maschi	Non precisata per tutti	Non precisata per tutti
Saiki, 1999	Minatori con pneumoconiosi	13	maschi	Non specificato	Non specificato
Svenes, 1998	Lavoratori in raffineria di	15	maschi	52-91 (range)	8 forti fumatori, 4

	nicel				moderati fumatori, 3 non fumatori
Wester, 1981	Lavoratori di fonderia	40	maschi	66,6 (media)	7 fumatori, 12 non fumatori, 11 ex fumatori e 10 non informazioni

Gli studi sugli esposti hanno riguardato lavoratori di sesso maschile in età prevalentemente pensionabile.

Si distinguono 2 tipi di studi sugli esposti : gli studi di coorte e gli studi caso controllo.

Fra gli studi di coorte si collocano gli studi di Gerhardsson e collaboratori che a partire dal 1970 hanno studiato una coorte di lavoratori addetti alla fusione raccogliendo una banca di campioni biologici e determinando in diversi studi pubblicati a partire dal 1982 al 2002 la concentrazione nel tessuto polmonare di antimonio (Gerhardsson, 1982), cromo, cobalto, lantanio (Gerhardsson, 1984), selenio (Gerhardsson, 1985), cadmio, piombo e zinco (Gerhardsson, 1986 a), antimonio, arsenico, cromo, cobalto, lantanio, selenio, cadmio, piombo e zinco (Gerhardsson, 1986 b, Gerhardsson 1988, Gerhardsson, 1993 a b), cadmio, rame e zinco (Gerhardsson, 2002).

Andersen, 2003 è l'unico ad aver fornito sia risultati delle determinazioni nel tessuto polmonare che dati di monitoraggio ambientale, evidenziando una buona correlazione fra le specie metalliche evidenziate nell'aria e quelle determinate nel tessuto polmonare.

Fra gli studi caso controllo ritroviamo gli studi di Andersen (1989), Svenes (1998), Hyodo (1980), Raithel (1988 e 1993), Brune (1980), Saiki (1999), Wester (1981). Per quanto riguarda la caratterizzazione dell'esposizione, i soggetti sono stati definiti esposti in funzione della mansione lavorativa (lavoratori di fonderia, di raffineria di nichel, saldatori, ecc). Alcuni studi hanno precisato sia la durata dell'esposizione che il tempo intercorso dalla cessazione dell'esposizione (Svenes, 1998, Brune, 1980, Hyodo, 1980, Wester, 1981) altri invece non hanno fornito informazioni a riguardo (Raithel, 1988 e 1993; Saiki, 1999). In particolare poiché la durata dell'esposizione ed il tempo intercorso dalla cessazione dell'esposizione possono influenzare la concentrazione di metalli nel polmone, Brune et al. hanno distinto gli esposti in 2 gruppi a seconda del tempo intercorso dalla cessazione dell'esposizione (nel primo gruppo rientravano i soggetti che avevano cessato l'esposizione da 0 a 1,5 anni, nel secondo quelli con

tempo di cessata esposizione variabile fra 2 e 19 anni) cercando di cogliere una relazione fra accumulo di elementi nel tessuto polmonare e durata della cessazione dell'esposizione soprattutto in relazione all'emivita biologica dei vari elementi.

Alcuni autori hanno inoltre determinato la concentrazione dei metalli oltre che nel tessuto polmonare in altre matrici biologiche: fegato e reni (Brune, 1980, Gerhardsson, 1982, 1984, 1986 a, 1988, 1993), fegato, reni, cervello, capelli, unghie (Gerhardsson, 2002), cervello, cervelletto, faringe, fegato, pancreas, aorta, reni, muscolo, surrene, midollo osseo, cute (Hyodo, 1980). I risultati di tali determinazioni non consentono di trarre conclusioni circa l'accumulo di metalli in parenchimi diversi dal polmone. Hyodo ha osservato concentrazioni di cromo più alte in tutti gli organi del cromatore rispetto ai controlli, mentre ha osservato concentrazioni di zinco e rame simili fra esposto e controlli nei vari organi diversi dal polmone. Wester, 1980 non ha osservato concentrazioni di arsenico e selenio in fegato e reni significativamente diverse fra esposti e controlli.

Brune non ha osservato concentrazioni di antimonio, arsenico, cobalto, cromo, lantanio e selenio significativamente differenti fra esposti e controlli (Brune, 1980), mentre ha osservato un aumento significativo di cadmio epatico e renale negli esposti rispetto ai controlli, in analogia a quanto evidenziato da Gerhardsson, (Gerhardsson,1988; Gerhardsson, 2002, Gerhardsson, 1986a) e di piombo epatico negli esposti rispetto ai controlli (Brune, 1980).

Descrizione della casistica degli studi su soggetti con neoplasia polmonare

Adachi (1991), Anttila (1989), Kollmeier (1990 A e B), Raithel (1989) hanno determinato la concentrazione di metalli nel tessuto polmonare di soggetti sani e lo hanno confrontato con quello di soggetti con neoplasia polmonare. Adachi (1991) e Kollmeier, (1990a b) hanno fornito concentrazioni diverse in funzione dell'istotipo di neoplasia.

Anttila (1989) ha fornito concentrazioni diverse in funzione del fumo di sigaretta e non ha evidenziato una correlazione fra accumulo di cromo nel polmone e istotipo di neoplasia.

Le caratteristiche della casistica dei lavori su soggetti con neoplasia polmonare sono riportati in tabella 23.

Tabella 23 Casistica degli studi inerenti sul dosaggio di elementi metallici nel tessuto polmonare di soggetti con neoplasia polmonare

Autore	Tipo di popolazione	N soggetti	Sesso	Età	Fumo
Adachi, 1991	Soggetti con k polmone 72 squamosi, 64 adenoc, 45 microcitomi, 21 altro	224	174 maschi 50 femmine	63 (media)	non specificato
Anttila, 1989	Soggetti con k polmone	53	Maschi	61±10 (media±DS)	si diversi valori in fumatori ex fumatori e non fumatori
Kollemeier, 1990 A	Soggetti con K polmone	5	Maschi	44-76 (range)	Non specificato
Kollemeier, 1990 B	Soggetti con K polmone	7	Maschi	44-76 (range)	Non specificato
Raithel, 1989	Soggetti con k polmone	15	13 Maschi, 2 Femmine	50-84 (range)	5 ex fumatori, 7 fumatori, 3 non informazioni

Gli elementi metallici determinati nel tessuto neoplastico polmonare sono stati nichel e cromo (Akslen, 1990), calcio, vanadio, cromo, manganese, ferro, nichel, rame, zinco, arsenico, selenio, bromo, rubidio, stronzio, molibdeno, piombo e mercurio (Diez, 1989) e zinco, rame, magnesio, calcio e ferro (Drake, 1989). Le caratteristiche dei soggetti indagati in studi che hanno proceduto alla determinazione degli elementi nel tessuto polmonare neoplastico sono riportati in tabella 24.

Tabella 24 Casistica degli studi sul dosaggio di elementi metallici nel tessuto polmonare neoplastico

Autore	Tipo di popolazione	N soggetti	Sesso	Età	Fumo
Akslen, 1990	Soggetti con k polmone	20	15Maschi e 5 Femmine	62 (mediana)	Informazioni disponibili solo per alcuni soggetti
Diez, 1989	Soggetti con K polmone	64	59 Maschi e 5Femmine	60±7 (media±DS)	non specificato
Drake, 1989	Soggetti con k polmone	14	non specificato	non specificato	non specificato

4.4 Discussione

4.4.1 Fattori condizionanti l'accumulo di elementi metallici a livello polmonare

L'analisi dei lavori raccolti in letteratura sulla determinazione degli elementi metallici nel tessuto polmonare aveva come obiettivo principale quello di comprendere l'influenza di parametri quali sesso, età, fumo di sigaretta, esposizione occupazionale sulla dose degli elementi accumulati nel polmone per poter poi definire il ruolo dell'accumulo di tali elementi nella patogenesi della patologia tumorale polmonare.

Sono state ottenute le seguenti informazioni:

Sesso

Pochi sono gli autori che hanno definito, nella popolazione generale, la concentrazione degli elementi metallici nel tessuto polmonare in funzione del sesso con risultati peraltro non univoci. Andersen (1999) non ha evidenziato differenze significative di accumulo di nichel a livello polmonare fra i due sessi. Tsuchiyama 1997 confrontando la concentrazione di 8 elementi (cadmio, cromo, piombo, manganese, rame, zinco, alluminio, nichel) in lobi polmonari corrispondenti nei 2 sessi, ha evidenziato una concentrazione di alluminio e di cromo più alta negli uomini che nelle donne come già evidenziato da Takemoto (1991) e Kollemeier (1990b). La concentrazione di questi elementi tuttavia era contemporaneamente più alta anche nei fumatori e nei soggetti con esposizione occupazionale per cui la differenza in funzione del sesso potrebbe per ammissione dello stesso autore essere determinata dal legame fra sesso e fumo o sesso ed esposizione occupazionale. Sempre in soggetti non professionalmente esposti Kollemeier e coll., hanno evidenziato concentrazioni rispettivamente di cromo e nichel (Kollemeier, 1990b) e cadmio (Kollemeier, 1990a) più alta negli uomini che nelle donne sebbene la differenza fosse significativa solo in residenti ad elevato inquinamento ambientale, ad indicare ancora una volta un fattore interferente non strettamente dipendente dal sesso.

Nei soggetti professionalmente esposti per la natura stessa delle lavorazioni studiate (cromatori, lavorazione del metallo duro, raffineria di nichel, etc) gli studi hanno riguardato esclusivamente soggetti di sesso maschile per cui non è possibile trarre delle conclusioni relativamente all'influenza del sesso sulla concentrazione degli elementi negli esposti.

Età

Anche la relazione fra concentrazione polmonare degli elementi metallici ed età non risulta chiara negli studi condotti su popolazione generale. Kollmeier (1987, 1990A) ha evidenziato un maggior accumulo polmonare di nichel e cromo all'aumentare dell'età (2,45% all'anno per il Cr e 3% per il Ni) mentre non ha evidenziato un'analogha relazione per il cadmio (Kollmeier, 1990B). Raithel, 1987 ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa fra **cromo** accumulato nel tessuto polmonare ed **età**, senza peraltro osservare analogha correlazione fra nichel ed età.

In soggetti professionalmente esposti Raithel, 1988 ha evidenziato una crescita della concentrazione di cromo all'aumentare dell'età e Kollmeier 1985 l'ha dimostrato sia per il nichel che per il cromo. Gerhardsson, 2002 studiando una coorte di lavoratori in una fonderia di rame non ha evidenziato una correlazione statisticamente significativa fra concentrazione di rame, zinco e cadmio nel tessuto polmonare, renale ed epatico da un lato ed età, tempo di esposizione e anni dal ritiro dal lavoro dall'altro, sebbene per sua stessa ammissione i risultati riguardassero una casistica numericamente molto limitata.

Fumo di sigaretta

Il tabacco oltre ai suoi numerosi componenti organici contiene elementi metallici derivanti da suolo, fertilizzanti, prodotti agricoli e piogge inquinate in concentrazioni variabili a seconda dell'area di coltivazione e delle stagioni. Fra gli elementi metallici quelli più studiati in relazione all'abitudine al fumo sono stati sia nei soggetti appartenenti alla popolazione generale che nei soggetti professionalmente esposti **cromo** e **cadmio**, in minor misura il **nichel**. Raithel, 1987 ha riportato una concentrazione di **nichel** variabile fra 800 e 1850 ng/g sigaretta e di cromo variabile fra 400 e 1500 ng/g sigaretta. Paakko, 1989 ha riportato una concentrazione di cadmio da 0,007 a 0,35 µg per sigaretta. Secondo Kollmeier (1990A) il fumo di sigaretta aumenta il carico polmonare di metalli sia per il contenuto intrinseco degli elementi nel tabacco sia indirettamente riducendo la clearance mucociliare e favorendo patologie polmonari come l'enfisema.

Paakko et al., (1988, 1989) hanno evidenziato una correlazione positiva fra **cadmio** polmonare e anni di fumo (33,3 anni) e fra cadmio polmonare e numero di pacchetti di sigarette (31,9 all'anno) con una correlazione negativa fra cadmio polmonare e anni intercorsi dalla cessazione dell'abitudine al fumo con una stima dell'emivita biologica del cadmio nei polmoni di 9,4 anni, per cui hanno concluso che il cadmio è un buon marker dell'abitudine al fumo, ma ha una emivita relativamente breve per cui viene eliminato alla cessazione del fumo. Kollmeier, 1990 B ha evidenziato una concentrazione di cadmio a livello polmonare 4 volte maggiore nei fumatori

rispetto ai non fumatori e ha concluso che la fonte principale dell'accumulo di cadmio a livello polmonare è rappresentata dal fumo di sigaretta, con un accumulo di 1,6 µg di cadmio al die per un fumatore di 20 sigarette al giorno (rispetto ad un accumulo di 0,25 µg per una persona residente in un area industriale con una concentrazione di cadmio nell'aria di 0,05 µg/m³).

Nel 1988 Gerhardsson studiando una coorte di lavoratori di una fonderia non ha evidenziato una differenze significativa della concentrazione polmonare di vari metalli (antimonio, arsenico, cadmio, cromo, cobalto, lantanio, selenio, zinco e piombo) fra fumatori, non fumatori ed ex fumatori fatta eccezione per il cadmio che è risultato significativamente più elevato nei fumatori, confermando i risultati di uno studio precedente in cui aveva evidenziato in soggetti professionalmente esposti concentrazioni polmonari di cadmio significativamente più alte nei fumatori rispetto ai non fumatori (Gerhardsson, 1986 a).

Correlazioni positive fra **cromo** polmonare e fumo di sigaretta sono state osservate in soggetti appartenenti a popolazione generale da Paakko 1990 e da Raithel, 1987.

In soggetti professionalmente esposti, Raithel 1998 ha evidenziato una correlazione significativa della concentrazione del cromo con il fumo.

In soggetti senza neoplasia polmonare Antttila, 1989 ha evidenziato una differenza statisticamente significativa della concentrazione polmonare di cromo fra fumatori e non fumatori (con una correlazione positiva fra accumulo di cromo e durata dell'abitudine al fumo di sigaretta, e fra accumulo di cromo a livello polmonare e numero di pacchetti di sigarette all'anno), senza evidenziare invece alcuna correlazione fra fumo e accumulo di cromo in soggetti con neoplasia polmonare, suggerendo per questi soggetti l'esistenza di altre fonti di esposizione.

Tsuchiyama et al., (1997) hanno evidenziato concentrazioni polmonari di **alluminio, cadmio, cromo, nichel, piombo e manganese** significativamente più elevate nei soggetti fumatori e con possibile esposizione occupazionale rispetto ai soggetti non fumatori e senza possibile esposizione professionale. Sia Raithel et al., (1987, 1988, 1989) che Andersen e Svenes (1989) non hanno, invece, evidenziato una correlazione significativa fra concentrazioni di nichel e di sigaretta.

Esposizione professionale

Alcuni elementi metallici, ad esempio nichel, cromo, cadmio, arsenico, sono noti per essere cancerogeni per il polmone e diversi studi epidemiologici hanno evidenziato una aumentata incidenza di neoplasie polmonari in alcune categorie di lavoratori ad essi esposti. Diversi studi a partire dagli anni '70 si sono posti l'obiettivo di verificare l'accumulo degli elementi metallici nel

tessuto polmonare di soggetti professionalmente esposti al fine di stabilire se tale accumulo potesse svolgere un ruolo nella patogenesi della patologia tumorale.

Numerosi autori hanno dimostrato una tendenza di alcuni elementi (soprattutto cromo in cromatori e nichel in lavoratori di una raffineria di nichel) ad accumularsi nel polmone con concentrazioni significativamente più elevate negli esposti rispetto ai controlli (Brune et al., 1980; Hyodo, 1980; Kollemeier 1985; Baumgart 1986; Raithel, 1987; 1988; Andersen e Svenes 1989; Svenes e Andersen, 1998; Saiki, 1999; Wester, 1981; Ishikawa, 1994) e in considerazione della maggior proporzione di neoplasie polmonari nei soggetti professionalmente esposti, tale aumentata concentrazione potrebbe, secondo alcuni autori essere interpretata come un fattore causale della neoplasia, sebbene considerazioni definitive siano difficili da trarre.

Nei suoi diversi studi su una coorte di ex lavoratori di una fonderia Gerhardsson (1982, 1984, 1986 a e b, 1988; 1993 a,b) ha evidenziato una concentrazioni di tutti gli elementi metallici determinati, ad eccezione dello zinco, significativamente più alta negli esposti che nei controlli evidenziando come la concentrazione di alcuni di essi (antimonio, cromo, cobalto, lantanio) non tendesse a diminuire al termine dell'esposizione a dimostrazione della lunga emivita di questi metalli.

Per quanto riguarda la caratterizzazione dell'esposizione, i soggetti sono stati definiti esposti in funzione della mansione lavorativa (lavoratori di fonderia, di raffineria di nichel, saldatori, etc). In realtà la definizione di esposto dovrebbe essere il più precisa possibile. Lo stesso profilo professionale in contesti diversi può dare luogo ad esposizioni differenti come dimostrato da Dufreshne, 1993 che ha evidenziato un accumulo di silicati in un elettricista impiegato nell'industria estrattiva e un accumulo di nichel in un elettricista impiegato in un'attività imprenditoriale.

Analogamente Andersen e Svenes 1989 studiando lavoratori di una raffineria di nichel hanno dimostrato una concentrazione di nichel nei polmoni significativamente più elevata rispetto ai controlli con una differenza altrettanto significativa fra i lavoratori del reparto fusione rispetto a quelli dell'impianto di elettrolisi.

Dati obiettivi di esposizione non sono risultati disponibili nella maggior parte dei casi e solo pochi studi hanno fornito dati derivanti da indagini ambientali o da monitoraggio biologico.

Secondo Andersen e Svenes (2003), inoltre, non è sufficiente determinare il carico polmonare di un elemento metallico ma sarebbe importante effettuare la speciazione dello stesso (nel caso specifico del nichel) in quanto sono i composti insolubili quelli che permangono nel tessuto anche circa 20 anni dopo la cessazione dell'esposizione.

Alcuni studi hanno precisato sia la durata dell'esposizione che il tempo intercorso dalla cessazione dell'esposizione (Andersen, 1989, Svenes, 1998, Brune, 1980, Hyodo, 1980, Wester, 1981) altri invece non hanno fornito informazioni a riguardo (Raithel, 1988 e 1993; Saiki, 1999). In particolare poiché la durata dell'esposizione ed il tempo intercorso dalla cessazione dell'esposizione possono influenzare la concentrazione degli elementi nel polmone, Brune et al. hanno distinto gli esposti in 2 gruppi a seconda del tempo intercorso dalla cessazione dell'esposizione (nel primo gruppo rientravano i soggetti che avevano cessato l'esposizione da 0 a 1,5 anni, nel secondo quelli con tempo di cessata esposizione variabile fra 2 e 19 anni) cercando di cogliere una relazione fra accumulo di elementi nel tessuto polmonare e durata della cessazione dell'esposizione soprattutto in relazione all'emivita biologica dei vari elementi.

Alcuni autori hanno inoltre determinato la concentrazione degli elementi oltre che nel tessuto polmonare in altre matrici biologiche: fegato e reni (Brune, 1980, Gerhardsson, 1982, 1984, 1986 a, 1988, 1993), fegato, reni, cervello, capelli, unghie (Gerhardsson, 2002), cervello, cervelletto, faringe, fegato, pancreas, aorta, reni, muscolo, surrene, midollo osseo, cute (Hyodo, 1980). I risultati di tali determinazioni non consentono di trarre conclusioni circa l'accumulo degli elementi metallici in parenchimi diversi dal polmone. Hyodo ha osservato concentrazioni di cromo più alte in tutti gli organi del cromatore rispetto ai controlli, mentre ha osservato concentrazioni di zinco e rame simili fra esposto e controlli nei vari organi diversi dal polmone. Wester, 1980, a fronte di un accumulo polmonare significativo non ha osservato concentrazioni di arsenico e selenio in fegato e reni significativamente diverse fra esposti e controlli.

Brune non ha osservato concentrazioni epatiche e renali di antimonio, arsenico, cobalto, cromo, lantanio e selenio significativamente differenti fra esposti e controlli (Brune, 1980), mentre ha osservato un aumento significativo di cadmio epatico e renale negli esposti rispetto ai controlli, in analogia a quanto evidenziato da Gerhardsson, (Gerhardsson,1988; Gerhardsson,2002, Gerhardsson, 1986a) e di piombo epatico negli esposti rispetto ai controlli (Brune, 1980).

Neoplasie polmonari

I risultati della determinazione degli elementi metallici nel tessuto polmonare di soggetti con neoplasia polmonare non consentono di trarre indicazioni conclusive relativamente al ruolo causale degli elementi nella genesi della patologia. Non è noto a che livello la deposizione degli elementi metallici riguarda composti cancerogeni o non cancerogeni e a quali cambiamenti chimico-fisici e metabolici questi composti vadano incontro dopo inalazione e deposizione a livello

polmonare. E' stato dimostrato da diversi autori che composti differenti dello stesso elemento non hanno la medesima attività cancerogena (Adachi, 1987).

La maggior parte degli autori che hanno affrontato il problema della relazione fra accumulo di elementi metallici e tumore polmonare hanno determinato la concentrazione degli elementi metallici nel tessuto polmonare di soggetti deceduti per neoplasia polmonare confrontandola con quella di soggetti deceduti per altre cause ottenendo peraltro risultati non univoci, di seguito presentati.

Adachi (1991) ha evidenziato una più alta concentrazione di **rame** e di contro una più bassa concentrazione di **zinco e magnesio** nei soggetti con neoplasia polmonare rispetto ai controlli e ha giustificato tali evidenze come il risultato di fluttuazioni fisiologiche dei livelli sierici di questi elementi nei soggetti con tumore polmonare nei quali sono stati dimostrati elevate concentrazioni ematiche di rame e basse di zinco (Hunt, 1980; Fujjii, 1990).

Anttila 1989, Kollemeier 1987, Akslen,1990, Raithel, 1989, Hyodo, 1980 hanno evidenziato una concentrazione di **cromo** significativamente più alta nei soggetti con tumore polmonare rispetto ai controlli. Tale dato è stato confermato da Adachi, 1991 limitatamente ai soli soggetti di sesso maschile. Alcuni autori hanno dimostrato una concentrazione di cromo più elevata nei lobi superiori rispetto ai lobi inferiori. Anttila inoltre ha evidenziato a livello dei lobi superiori concentrazioni significativamente differenti fra segmento apicale anteriore e posteriore.

L'accumulo di cromo in soggetti non professionalmente esposti secondo gli autori deriverebbe dal fumo di sigaretta che:

- contiene cromo,
- riduce il meccanismo di clearance mucociliare con accumulo di polveri,
- inibisce il drenaggio linfonodale.

Akslen, 1990 nei soggetti con neoplasia polmonare ha evidenziato una correlazione inversa fra concentrazione di cromo nel tessuto bronchiale e concentrazione nel tessuto neoplastico.

Akslen 1990, contrariamente a Diez, (1989), Andersen e Svenes 1989, Svenes 1998, hanno evidenziato concentrazioni di **nichel** significativamente più elevate in soggetti con neoplasia polmonare rispetto a soggetti deceduti per altre cause (Akslen, 1990), senza evidenziare correlazioni statisticamente significative fra nichel nel tessuto polmonare e nichel nel tessuto neoplastico.

Wester ha evidenziato una concentrazione di **arsenico** sostanzialmente sovrapponibile fra soggetti professionalmente esposti con e senza tumori polmonari (Wester, 1981)

In uno studio su ex lavoratori di una fonderia Gerhardsson (1988; 1993a,b) ha evidenziato nei soggetti esposti deceduti per K polmone la più bassa concentrazione nel polmone di **selenio** sia rispetto agli esposti deceduti per altre patologie che ai controlli. E' stato pertanto ipotizzato un ruolo protettivo del selenio rispetto alla genesi di neoplasie polmonari (Gerhardsson, 1985; 1988, 1993 a, b) funzione peraltro supportata da numerosi studi animali. Le concentrazioni di **cadmio** più elevate sono state osservate inoltre proprio nel gruppo di soggetti deceduti per K polmone nel quale tuttavia fumatori ed ex fumatori erano iperrappresentati (Gerhardsson, 1988; 1993a,b, 1986 a, 1986 b).

Gerhardsson, 1982 non ha evidenziato una concentrazione di **antimonio** più elevata nel tessuto polmonare di lavoratori esposti deceduti per neoplasia polmonare rispetto a esposti deceduti per altra causa.

Kollmeier 1987, 1990 a, 1990 b ha evidenziato concentrazioni di cadmio, cromo e nichel più elevate nei soggetti con neoplasia polmonare rispetto a soggetti sani o affetti da altre patologie.

Relativamente all'**istotipo** Adachi 1991 e Akslen, 1990 hanno evidenziato una più alta concentrazione di cromo e calcio nei soggetti con neoplasia squamosa.

Anttila non ha evidenziato una correlazione significativa fra accumulo polmonare di cromo e istotipo di neoplasia polmonare.

Ishikawa e coll. 1994 b in ex esposti a cromo hanno osservato un' aumentata incidenza di neoplasie multiple a localizzazione centrale del tipo "a cellule squamose" e "a piccole cellule" con una predominanza delle prime, con una concentrazione di cromo nel tessuto polmonare più alta negli esposti con tumore rispetto sia agli esposti senza neoplasia che ai controlli. A tal proposito, la maggior parte dei tumori conseguenti all'inalazione di cancerogeni sembrerebbe privilegiare le sedi centrali del polmone piuttosto che quelle periferiche e in particolare ci sono evidenze di una localizzazione prevalente a livello della biforcazione bronchiale (Ishikawa, 1994).

Fra coloro che hanno determinato la concentrazione di metalli nel tessuto polmonare neoplastico Diez et al. 1989 hanno dimostrato una concentrazione di rame, calcio, magnesio e rame/zinco più elevata nel tessuto neoplastico sia rispetto al tessuto sano di soggetti con neoplasia polmonare che rispetto ai controlli senza neoplasia polmonare. Diez, inoltre, non ha evidenziato correlazioni fra cambiamenti nella concentrazione polmonare di tali metalli e tipo istologico o stadiazione della neoplasia. Drake (1989) al contrario ha evidenziato livelli di cromo, piombo, rame e zinco significativamente più bassi nel tessuto polmonare neoplastico rispetto al tessuto non neoplastico.

Patologie respiratorie non neoplastiche

Nei soggetti non professionalmente esposti, alcuni autori hanno ricercato una relazione fra accumulo di elementi metallici a livello del parenchima polmonare e patologie quali l'enfisema polmonare, il cui grado di severità era stato determinato sulla base di referti istologici o radiografici. In particolare, Paakko 1989 ha riportato una correlazione statisticamente significativa fra accumulo di **romo** e gravità dell'**enfisema** fornendo 2 possibili spiegazioni del dato: da un lato l'accumulo di cromo potrebbe essere dovuto al fumo di sigaretta che peraltro è la principale causa dell'enfisema, dall'altro il dato potrebbe essere un artefatto in quanto la concentrazione di cromo viene espressa su peso del tessuto che decresce nell'enfisema per via della distruzione del tessuto stesso, sebbene a favore della prima ipotesi vi sia una correlazione significativa anche nelle forme lievi di enfisema. Non altrettanto significativa la correlazione fra contenuto polmonare di cadmio e severità dell'enfisema (Paakko, 1988 e 1989). Takemoto 1991 ha evidenziato una più elevata concentrazione di cromo e piombo ed una bassa concentrazione di zinco in soggetti con enfisema severo, rispetto agli altri, fornendo 2 possibili spiegazioni: secondo la prima bronchiti e d enfisema inibirebbero la clearance delle particelle esogene favorendo l'accumulo di metalli, secondo l'altra cromo e piombo avrebbero un ruolo patogenetico nella genesi delle suddette patologie polmonari.

Anttila, 1989 ha studiato la relazione fra cromo e grado di enfisema in soggetti con e senza neoplasia polmonare dimostrando che il contenuto di cromo a livello polmonare aumentava all'aumentare della gravità dell'enfisema, con una correlazione statisticamente significativa nei soggetti sani rispetto ai soggetti con neoplasia polmonare.

Un cenno meritano anche 2 studi eliminati durante la selezione dei lavori per la meta-analisi che in soggetti professionalmente esposti hanno studiato la relazione fra concentrazione polmonare di metalli e **fibrosi polmonare**. In particolare, Schartz ha osservato una associazione significativa fra carico polmonare di **alluminio** e altri **metalli duri** e le lesioni istopatologiche osservate nella fibrosi (1998) e Rizzato, 1986 ha evidenziato un aumentato carico di **tungsteno e tantalio** e in minor misura di **nichel, cobalto, cromo e torio** in un ex lavoratore del metallo duro con fibrosi polmonare.

4.4.2. Informazioni di carattere metodologico

L'analisi dei lavori selezionati in letteratura inoltre ha consentito di ricavare importanti informazioni di carattere metodologico.

Tipo e sede di campionamento

E' stato chiaramente dimostrato che esiste una considerevole variabilità intra e interindividuale nella concentrazione degli elementi metallici nel tessuto polmonare (Kollemeyer, 1989; Raithel, 1987, Vanoeteren, 1986; Seeman, 1990) e questo unitamente alle basse concentrazioni di elementi metallici che si vanno a determinare (Anttila, 1990) richiede una procedura standardizzata di prelievo e analisi dei campioni polmonari (Seeman, 1990).

Durante la raccolta-analisi dei campioni dovrebbero essere utilizzate le seguenti precauzioni per evitare la contaminazione del campione e per rendere più facilmente interpretabili i risultati:

- Utilizzare strumenti di taglio di quarzo, vetro o titanio, evitando strumenti di acciaio (Andersen, 1999);
- Utilizzare guanti al fine di evitare il contatto diretto delle mani con il pezzo anatomico;
- Utilizzare materiali di plastica per la imballaggio e conservazione;
- Prelevare il campione sempre dalla stessa area;
- Procedere all'essiccazione del campione per ridurre la variabilità legata al differente contenuto di acqua;

Diversi autori hanno definito l'importanza della **sede di campionamento** (Tsuchiyama, 1997, Andersen, 1989, Brune, 1980; Raithel, 1987, 1988) tanto che Raithel (1987) ha concluso che i risultati delle concentrazioni di metalli nel polmone possono essere confrontati solo quando provengono da uguali sedi di campionamento (lobi, segmenti). Anche Kollemeyer 1990B ritiene fondamentale un confronto fra concentrazioni ricavate da analoghi segmenti polmonari avendo evidenziato una bassa variazione intraindividuale della concentrazione polmonare di cadmio (circa 5 %) in 3 differenti campioni prelevati da una ristretta regione polmonare.

Tsuchiyama et al., (1997) studiando la variabilità inter e intraindividuale della concentrazione polmonare di 8 elementi metallici li hanno suddivisi in 2 gruppi. Al primo gruppo appartenevano rame e zinco con una bassa variabilità inter (CV<30%) ed intra (CV< 15%) individuale; nel secondo rientravano alluminio, cadmio, cromo, nichel, piombo, manganese che invece presentavano una elevata variabilità intraindividuale (fra i vari lobi) ed interindividuale e che pertanto a giudizio degli autori a differenza dei primi risentivano maggiormente di fattori quali sesso, fumo ed esposizione

professionale. Analogamente in studi su soggetti non professionalmente esposti Raithel ha evidenziato una variabilità intraindividuale del nichel caratterizzata da un coefficiente di variazione del 20-160° (Raithel, 1987, 1988) e del cromo 26-104%.

Un solo pezzo di polmone non può essere sufficiente per determinare il carico polmonare del metallo infatti sia Tsuchiyama et al., (1997) che Raithel (1988) hanno evidenziato una più alta concentrazione di metalli (rispettivamente rame, zinco, alluminio, cromo, nichel, piombo, manganese nello studio di Tsuchiyama e nichel, cromo in quello di Raithel) nei lobi superiori e medi in relazione ad una miglior ventilazione di queste regioni.

Modalità di conservazione e successivo trattamento del campione

Le opinioni riguardo alla conservazione in formalina sono discordanti sia negli studi sugli esposti che nella popolazione generale. Secondo Raithel 1987, 1988 la conservazione in formalina può portare ad una sottostima della concentrazione del nichel per la ionizzazione dello stesso in formalina. Secondo Andersen visto che i suoi risultati sono sovrapponibili a quelli di Raithel tale ipotesi non sarebbe confermata. Inoltre, Andersen 1999, afferma che la determinazione di nichel effettuata su tessuto congelato è confrontabile rispetto a uno studio precedente su campioni conservati in formalina, dimostrando che non avviene nessun rilascio e perdita del metallo dal tessuto al liquido.

Secondo Seeman et al., 1990 la conservazione del campione in formalina va bene per studi di natura medico legale in soggetti professionalmente esposti per il riconoscimento della patologia professionale ma non va bene per la determinazione di indicatori per misure scientifiche. Fortoul 1996, 2001, 2002 ha analizzato la formalina entro cui erano stati conservati i pezzi anatomici rilevando concentrazioni metalliche inferiori al limite di rilevabilità.

Modalità di espressione della concentrazione

Diversi autori (Kollemeyr 1987, 1990 a, 1990b, Seeman 1990) hanno sottolineato nei loro lavori come l'espressione dei dati su peso secco fosse la migliore, per quanto, per un adeguato confronto, sia importante ottimizzare e uniformare la tecnica di essiccazione variabile a seconda che il tessuto di partenza sia fresco (congelato) o fissato in formalina.

Secondo Kollemeyr (1987, 1990 a, 1990 b) la determinazioni su peso secco è preferibile poiché il contenuto di acqua del tessuto polmonare (corrispondente secondo Katoh 2002 all'80,2 ± 3 %) dipende da fattori fisici, chimici, e fisiologici e patologici e varia notevolmente fra apice e base. Anche secondo Anttila è meglio esprimere la concentrazione dei metalli nel tessuto polmonare

sottoposto ad essiccazione poiché il contenuto liquido varia soprattutto nei campioni autoptici a causa delle situazione emodinamica premortale e ai cambiamenti post-mortem.

Raithel è l'unico autore che ha espresso le concentrazioni di cromo e nichel nel tessuto polmonare sia su peso secco che su peso umido; rapportando le due concentrazioni si ottiene un valore di circa 5 volte maggiore per la concentrazione su peso secco rispetto a quella su peso umido (Raithel., 1993; Raithel., 1988). Secondo Kollemeier tuttavia è impossibile determinare un preciso rapporto di conversione secco-umido in quanto questo varia anche in funzione della modalità di conservazione del tessuto polmonare. In particolare il rapporto prima e dopo liofilizzazione è in media 5,65 con una variazione del 16% e range 4,1-12,8; per i campioni conservati in formalina il fattore medio è 6,8 con una variazione del 19%.

Metodica analitica

La metodica analitica può influenzare in modo determinante la sensibilità della determinazione, dato che tra l'altro è riportato solo in pochissimi lavori fra l'altro limitati allo studio della popolazione generale ed è un fattore da tenere in stretta considerazione nel caso di un confronto fra le concentrazioni dei diversi lavori.

I limiti di rilevabilità variano in funzione dell'elemento dosato e della tecnica analitica.

Importante è anche il controllo di qualità con la presenza di materiale di riferimento certificato.

Presentazione dei risultati e trattamento statistico

La maggior parte degli autori ha evidenziato che la concentrazione degli elementi metallici nel tessuto polmonare ha una distribuzione non normale e pertanto gli indicatori di posizione centrale più corretti sono la mediana o la media geometrica. Tale osservazione vale sia per gli studi sulla popolazione generale che sui professionalmente esposti.

4.4.3. Considerazioni conclusive meta-analisi elementi metallici

- Il sesso non sembra influire in modo determinante sull'accumulo di elementi metallici a livello polmonare. Le differenze di concentrazione fra uomini e donne evidenziate peraltro da un numero limitato di autori e per un numero limitato di elementi metallici sembrerebbero dovute alla relazione fra sesso e fattori quali l'abitudine al fumo di sigaretta ed esposizioni lavorative.
- L'età è un fattore in grado di condizionare l'accumulo di alcuni elementi metallici; questo è stato chiaramente dimostrato per il cromo. Meno univoca la relazione per il nichel. Certa l'assenza di correlazione per il cadmio (data la breve emivita dell'elemento).
- Il fumo di sigaretta è significativamente correlato all'accumulo polmonare di cadmio e cromo, più incerta la correlazione con nichel e piombo.
- Numerosi autori hanno dimostrato una tendenza di alcuni elementi metallici (soprattutto cromo in cromatori e nichel in lavoratori di una raffineria di nichel) ad accumularsi nel polmone con concentrazioni significativamente più elevate negli esposti rispetto ai controlli.
- Coloro che hanno studiato la concentrazione degli elementi metallici nel tessuto polmonare di soggetti deceduti per neoplasia polmonare confrontandola con quella di soggetti deceduti per altra causa hanno generalmente evidenziato un accumulo di rame, cromo, nichel e una riduzione di zinco e selenio.
- La determinazione degli elementi metallici nel tessuto neoplastico è stata effettuata da un numero limitato di lavori con risultati contrastanti
- Fra le patologie non neoplastiche studiate in relazione all'accumulo di elementi metallici nel parenchima polmonare spiccano l'enfisema e la fibrosi, il primo per lo più correlato ad un accumulo di cromo, la seconda all'accumulo di metalli pesanti.
- Per ottenere concentrazioni di elementi metallici nel tessuto polmonare il più vicine possibile ai valori reali i metodi analitici, inclusi la raccolta del campione, la sede di campionamento, la modalità di conservazione e la tecnica analitica vanno scrupolosamente standardizzate. In particolare è stato chiaramente sottolineato da più autori l'importanza di precisare la sede del campionamento e di confrontare le concentrazioni polmonari solo di segmenti polmonari corrispondenti. Non è possibile definire con esattezza quale sia la modalità di conservazione del campione preferibile. Appare comunque opportuno, qualora di tratti di formalina, escludere in essa la presenza di significative concentrazioni metalliche. La maggior parte degli

autori ritiene opportuno procedere all'essiccazione del campione prima dell'analisi al fine di ridurre la variabilità legata al contenuto di liquido del tessuto polmonare. Infine relativamente alla tecnica analitica indispensabili risultano sia la definizione del limite di rilevabilità che di controlli di qualità.

- Una corretta presentazione dei risultati non può prescindere da un'analisi della distribuzione dei dati per scegliere l'indicatore di posizione più corretto.

4.5 Ricerca dei lavori: dosaggio IPA sui tessuti polmonari

Il numero di pubblicazioni reperito in merito al dosaggio di idrocarburi policiclici aromatici nel tessuto polmonare è stato decisamente scarso (5).

I lavori sono stati poi suddivisi nei tre gruppi precedentemente definiti:

Gruppo 1: comprendente 2 lavori che avevano determinato la concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici nel tessuto polmonare di soggetti fumatori e relativi controlli (**Goldman, 2001 ;Lodovici, 1998**)

Gruppo 2: determinazione nella popolazione generale: nessun lavoro

Gruppo 3: comprendente 3 lavori che avevano determinato la concentrazione di metalli in soggetti sani e in soggetti con neoplasia polmonare (**Beach, 2000, Seto, 1993, Tokiwa, 1993**)

Degli studi selezionati è stato eliminato il lavoro di **Beach et al, 2000** in quanto aveva il solo scopo di validare un metodo e non ha fornito informazioni relative alle concentrazioni di IPA nel tessuto polmonare, pertanto è stato attentamente valutato solo per le informazioni relative alla metodica analitica.

Agli studi rimasti è stato attribuito un punteggio in base ai requisiti fissati in tabella 5 con lo scopo di eliminare gli studi con un punteggio inferiore a 5.

I risultati della procedura di grading sono riportati in tabella 25, tutti i lavori hanno punteggi compresi fra 5 e 10 e quindi nessuno è stato eliminato.

Tabella 25 Risultati della procedura di grading

Goldman, 2001 (6)

Lodovici, 1998 (6)

Seto, 1993 (9)

Tokiwa, 1993 (7)

NB: tra parentesi viene riportato il punteggio assegnato a ciascun lavoro

Tabella 26 Casistica studiata nei diversi lavori

Autore	Tipo di popolazione	N soggetti	Sesso	Età	Fumo
Goldman, 2001	soggetti popolazione generale	70	32 maschi 38 femmine	media 35 (15-65 range)	37 fumatori 33 non fumatori
Lodovici, 1998	soggetti popolazione generale	20	6 femmine 14 maschi	51-86	8 fumatori 3 ex 9 non fumatori
Seto, 1993	87 soggetti popolazione generale, 30 K polmoni, 149 K diverse sedi	364	236 maschi 128 femmine	maschi 65,9 ±12,8 femmine 67,3±13,1	74% maschi fumatori 24% femmine fumatrici
Tokiwa, 1993	137 tumori polmonari	158	118 maschi 40 femmine	28-68	Tutti non fumatori

Tabella 27 Prelievo e trattamento del campione

Autore	Sede	Autopsia/ Biopsia	Quantità	Conservazione	Trattamento del campione
Goldman, 2001	non specificato	autopsia	4 grammi	non specificato	1 estrazione con esano dopo saponificazione
Lodovici, 1998	lobo inf sn	autopsia	10 grammi	congelamento -20	estrazioni con metanolo e KOH, con isoottano, N-Ndimetilformammide
Seto, 1993	lobo inf	autopsia	50 grammi	formalina	omogeneizzazione estrazione con esano e KOH
Tokiwa, 1993	non specificato	pezzi operatori	0.08-7.4 grammi secco	formalina	Estrazione con diclorometano, acetone esano

Tabella 28 metodi analitici utilizzati

Autore	N IPA	Metodo	Limite di rilevabilità	Quality assurance
Goldman, 2001	11 [6 cancerogeni: benzo (a) antracene, benzo(a) pirene, benzo(b) fluorantene, benzo(k) fluorantene, dibenzo (ah) antracene, indeno(1,2,3) pirene] [5 non cancerogeni: fluorantene pirene, benzo(e) pirene, benzo(g,h,i) perilene, crisene,	GC-MS	0,07 ng/g benzo a pirene 0,05ng/g fluorantene 0,03 ng/g crisene 0.03ng/g benzo(a)antracene	non specificato
Lodovici, 1998	6 [5 cancerogeni: benzo (a) antracene, benzo(a) pirene, benzo(b) fluorantene, benzo(k) fluorantene, dibenzo (ah) antracene] [1 non cancerogeni: benzo(g,h,i) perilene]	HPLC FLUORIMETRIA	non specificato	non specificato
Seto, 1993	3 [2 cancerogeni: benzo(a) pirene, benzo(k) fluorantene] [1 non cancerogeni: benzo(g,h,i) perilene]	HPLC FLUORIMETRIA	1 pg/g benzo a pirene 2 pg/g benzo k fluorantene 5 pg/g benzo g,h,i, perilene	controllo interno standard certificato
Tokiwa, 1993	benzo(a) pirene, 1,3 dinitropirene, 1 nitropirene 9,10 diidobenzo (a) pirene-7-one	HPLC FLUORIMETRIA	non specificato	non specificato

Tre dei quattro lavori selezionati dosano gli idrocarburi policiclici aromatici nel tessuto polmonare di soggetti sani fumatori e non fumatori, solamente Tokiwa et al., 1993 studia una popolazione di soggetti affetti da neoplasia polmonare.

Il numero di soggetti analizzati varia da 20 a 364 e il sesso, l'età e l'abitudine al fumo sono sempre specificate così come le concentrazioni dei diversi sottogruppi.

La maggior parte dei campioni analizzati provengono da autopsie e conservati in formalina.

Le procedure pre-analitiche sono sempre descritte e sono sempre estrazioni liquido-liquido.

La determinazione analitica avviene in HPLC con rivelatore fluorimetrico per tutti i lavori eccetto che Goldman 2001 che esegue la determinazione in GC-MS.

4.6 Risultato meta-analisi dosaggio IPA nel tessuto polmonare

Il limitato numero di studi reperiti non permette di ricavare la stessa portata di informazioni recepite dalla precedente meta-analisi.

Le principali informazioni sono in merito all'abitudine al fumo anche se i risultati ottenuti sono contrastanti.

Seto, 1993 dimostra che solo la concentrazione di benzo(ghi)perilene è significativamente superiore nei fumatori. Tuttavia fra il gruppo dei non fumatori gli IPA degli uomini sono superiori alle donne. Goldman (2001) dice che la somma degli IPA dosati è superiore nei soggetti fumatori ($p=0,01$) ed è dose dipendente nel sottogruppo dei grandi fumatori, in particolare le concentrazioni di benzo(a)pirene raddoppiano ($0,25\pm 1$ ng/g nei soggetti fumatori contro $0,086\pm 0,026$ nei soggetti non fumatori). Il suo lavoro è particolarmente interessante in quanto ha suddiviso in classi di fumatori in base alla concentrazione di cotinina, metabolita della nicotina.

Lodovici et al 1998 dosa nel tessuto polmonare di soggetti fumatori concentrazioni maggiori di dibenzo(ah)antracene maggiori rispetto ai soggetti non fumatori ($p<0,05$).

In merito al sesso ed età Seto et al., 1993 afferma che benzo(a)pirene, benzo(k)fluorantene e benzo(ghi)perilene sono significativamente superiori negli uomini che nelle donne ($p<0,001$).

Tale dato è confermato anche da Goldman 2001 che riporta per gli uomini una concentrazione di IPA tot di 0,44 ng/g contro 0,31 per le donne ($p=0,03$). (IPA totali come somma di benzo(a)antracene, benzo(a)pirene, benzo(b)fluorantene, benzo(k)fluorantene, dibenzo(ah)antracene).

Nessuna differenza è invece riferita tra campioni di soggetti affetti da tumore e soggetti di controllo.

5 CONFRONTO DATI E META-ANALISI

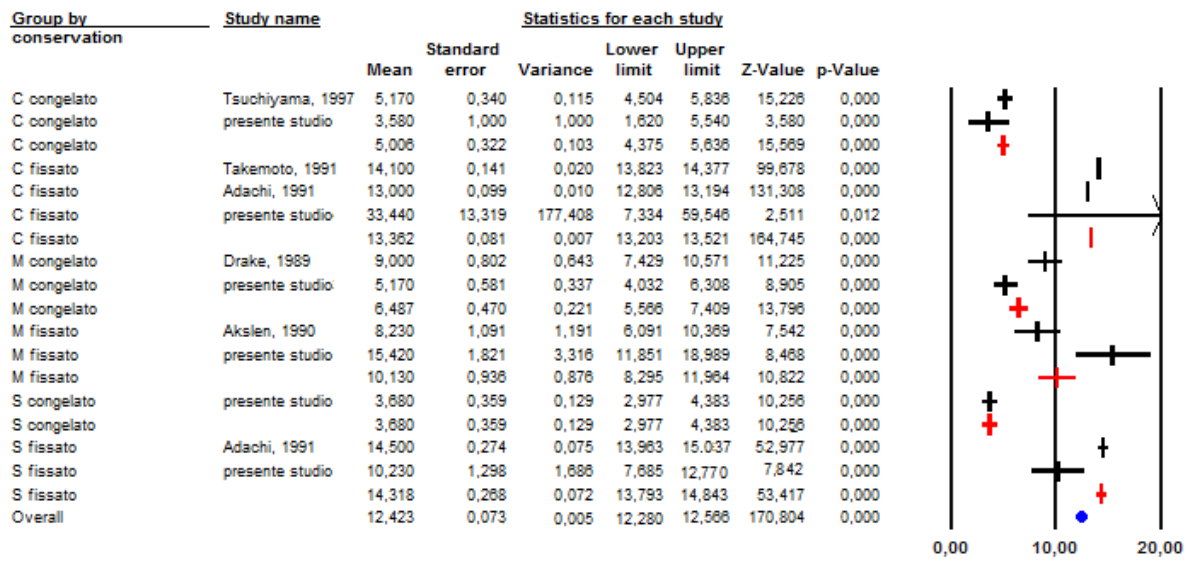
5.1 Elementi Metallici

Di seguito sono riportati gli output del software di elaborazione delle meta-analisi effettuate (CMA-Biostat); al fine di permettere un reale confronto con i dati derivanti dal progetto da noi effettuato sono state inserite solamente le determinazioni espresse su peso secco ($\mu\text{g/g}$ dry weight) ed è stata inserita l'analisi delle variabili in merito allo stato dei campioni (S tumorale indenne, M tumorale neoplastico, C controlli) e alle modalità di conservazioni.

Per un corretto confronto con i nostri dati sarebbe stato ideale selezionare le determinazioni effettuate con la medesima tecnica di analisi (ICP-MS per gli elementi metallici e HPLC per gli IPA) ma questo non è stato possibile poiché solo una minoranza degli studi hanno utilizzato tali metodiche.

Nelle figure seguenti sono rappresentati con linee nere le medie e i range pesati in base al numero di determinazioni per ogni singolo lavoro, in rosso il valore riassuntivo del gruppo di studi selezionati e in blu il consuntivo finale.

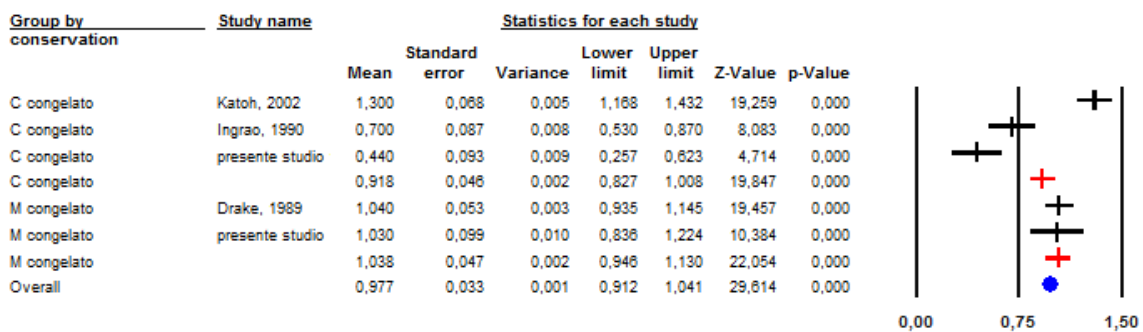
Rame



Meta Analysis

Figura 25 Valori di rame suddivisi per tipologia (C=controlli; S=tessuto indenne soggetti con tumore; M=tessuto neoplastico) e conservazione.

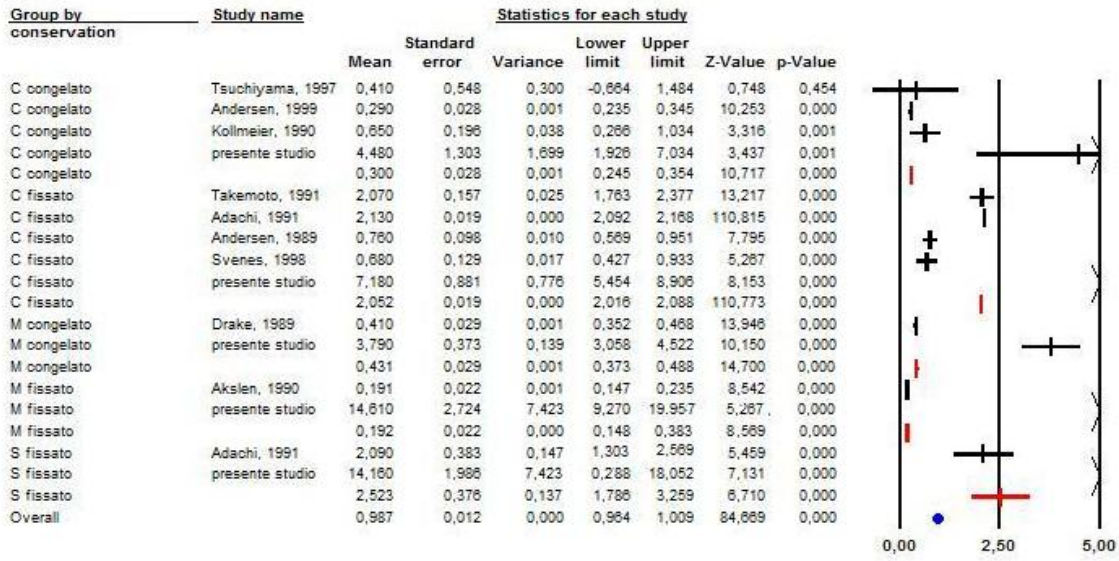
Selenio



Meta Analysis

Figura 26 Valori di selenio suddivisi per tipologia (C=controlli; S=tessuto indenne soggetti con tumore; M=tessuto neoplastico) e conservazione.

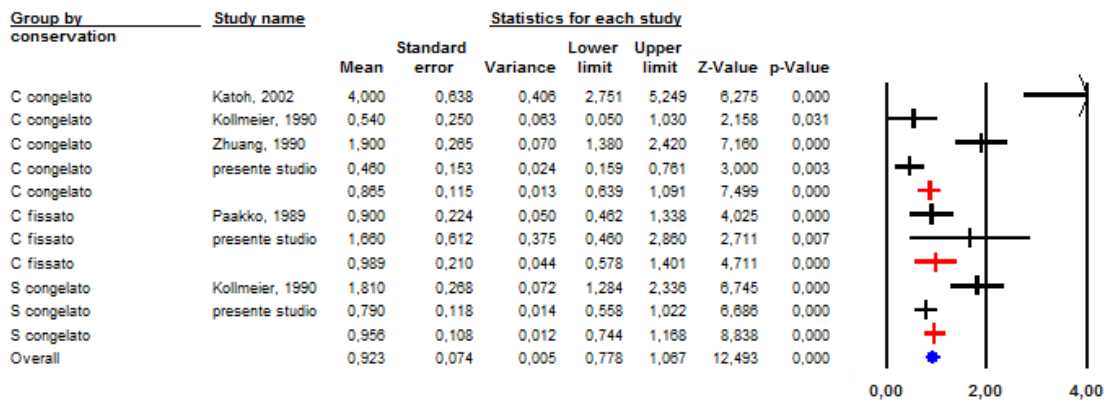
Nichel



Meta Analysis

Figura 27 Valori di nichel suddivisi per tipologia (C=controlli; S=tessuto indenne soggetti con tumore; M=tessuto neoplastico) e conservazione.

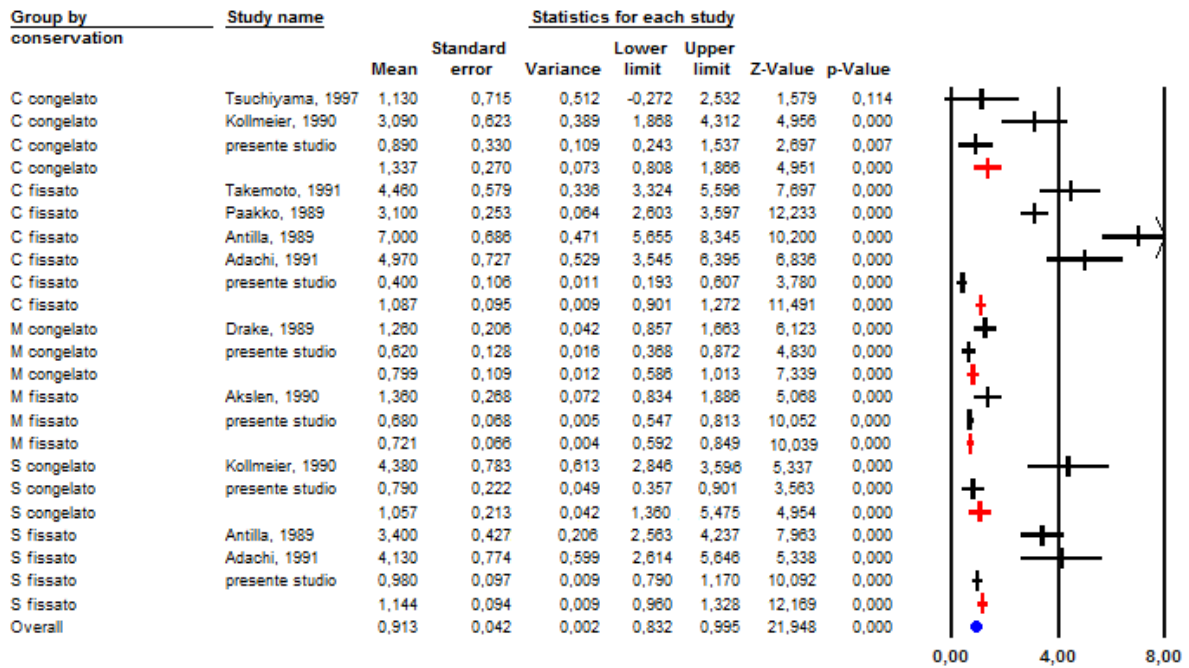
Cadmio



Meta Analysis

Figura 28 Valori di cadmio suddivisi per tipologia (C=controlli; S=tessuto indenne soggetti con tumore; M=tessuto neoplastico) e conservazione.

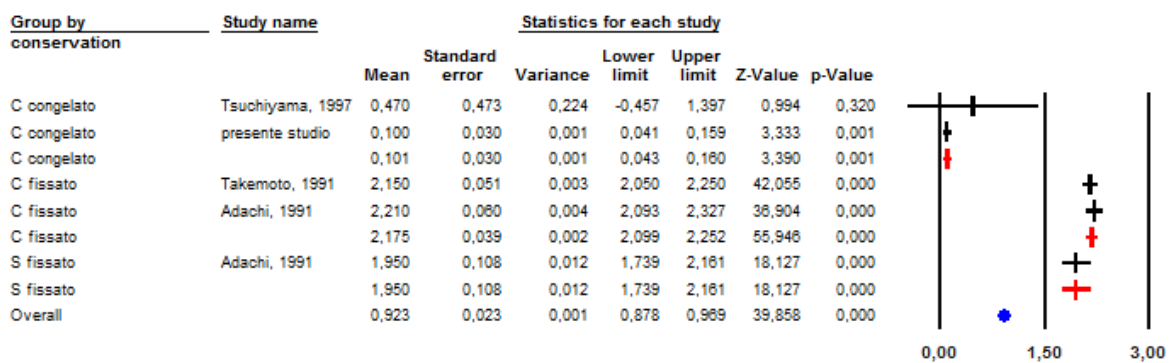
Cromo



Meta Analysis

Figura 29 Valori di cromo suddivisi per tipologia (C=controlli; S=tessuto indenne soggetti con tumore; M=tessuto neoplastico) e conservazione.

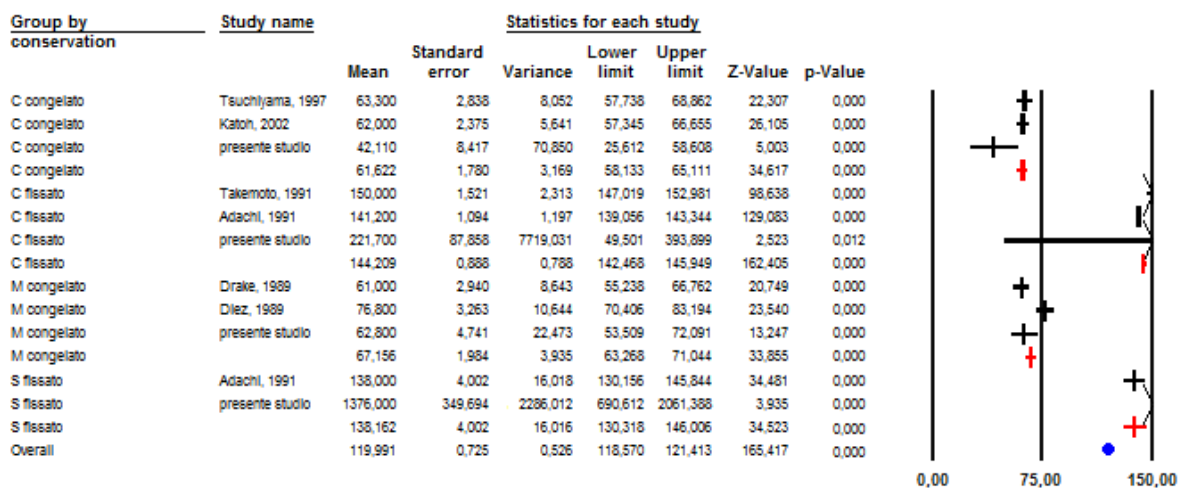
Piombo



Meta Analysis

Figura 30 Valori di piombo suddivisi per tipologia (C=controlli; S=tessuto indenne soggetti con tumore; M=tessuto neoplastico) e conservazione.

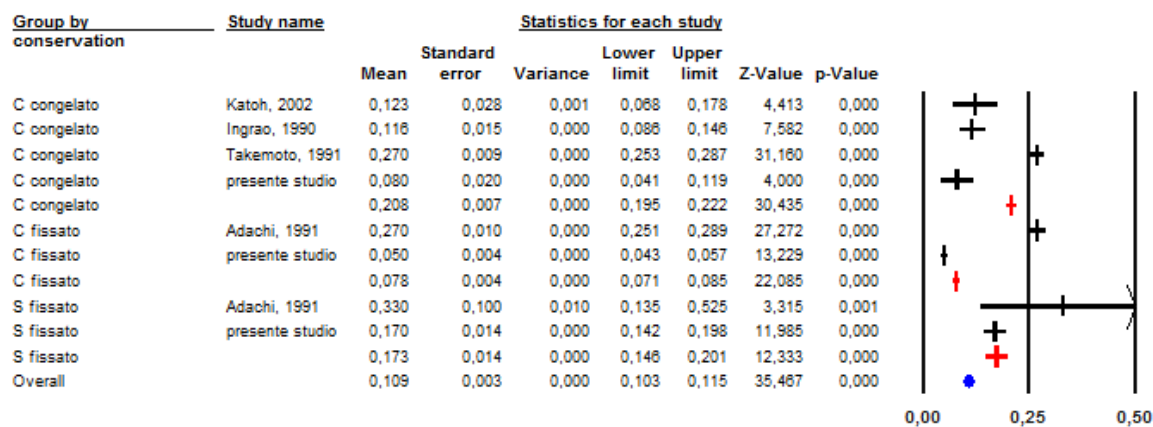
Zinco



Meta Analysis

Figura 31 Valori di zinco suddivisi per tipologia (C=controlli; S=tessuto indenne soggetti con tumore; M=tessuto neoplastico) e conservazione.

Cobalto



Meta Analysis

Figura 32 Valori di cobalto suddivisi per tipologia (C=controlli; S=tessuto indenne soggetti con tumore; M=tessuto neoplastico) e conservazione.

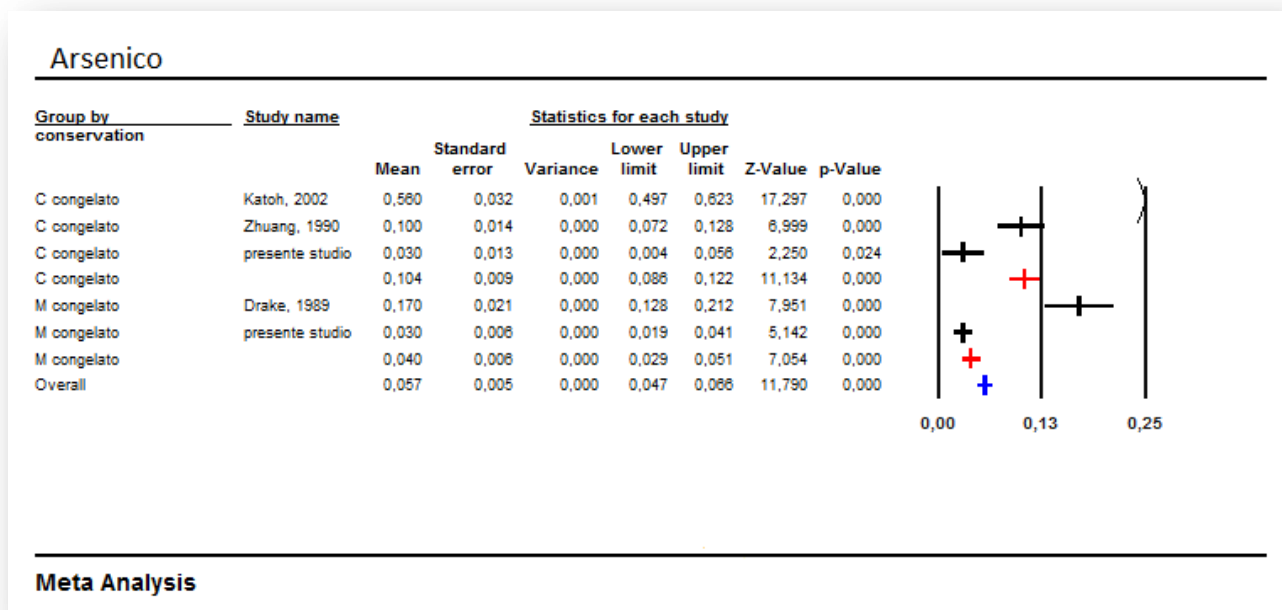


Figura 33 Valori di arsenico suddivisi per tipologia (C=controlli; S=tessuto indenne soggetti con tumore; M=tessuto neoplastico) e conservazione.

Rame

La differenza da noi riscontrati fra tessuti conservati in formalina e congelati è confermata dalla metanalisi anche dimensionalmente, infatti il valore desunto dagli studi che hanno analizzato il rame in campioni di controllo fissati è superiore ai campioni congelati (tabella 29)

Per quanto riguarda l'andamento di tale elemento nei soggetti affetti da tumore, il rame risulta essere inferiore nel tessuto indenne (S) rispetto al tessuto neoplastico (M) sia nei campioni fissati che congelati ($p < 0,001$ e $p = 0,03$) tale andamento è opposto rispetto a quello desunto dall'estratto della metanalisi.

Tabella 29

	C (controlli)		
	congelato	fissato	
	mediana	mediana	p
Presente studio	3,4	13,4	0,01
metanalisi	5,1	13	

Selenio

Gli studi analizzati hanno determinato solo campioni congelati per cui non è possibile valutare l'influenza della conservazione.

Nessuna variazione è riportata fra tessuti sani, tumorali e soggetti di controllo.

Nella casistica da noi studiata i livelli sono comparabili ed è stata evidenziata una concentrazione maggiore nel tessuto neoplastico rispetto all'indenne sia nel gruppo di campioni fissati che congelati.

Nichel

Le concentrazioni di nichel da noi determinate sono numericamente maggiori di quelle riportate dagli studi analizzati, tuttavia la presenza di livelli maggiori nel tessuto neoplastico rispetto al tessuto indenne è concorde.

L'estratto della metanalisi non mostra differenza fra campioni fissati e congelati mentre nel presente studio il nichel risulta essere sempre maggiore nel tessuto fissato rispetto al congelato.

La maggiore concentrazione di nichel nel segmento superiore da noi riscontrata è confermata anche da Tsuchiyama et al., (1997) e Raithel (1988).

Cadmio

Le concentrazioni da noi determinate sono sovrapponibili a quelle riportate dalla letteratura dove non è evidenziata nessuna variazione in base alla tipologia (conservazione, neoplasia..).

L'accumulo di cadmio nei fumatori è notevole rispetto ai non fumatori ($p < 0,001$).

Tale evidenza è confermata anche da diversi autori fra cui Kollemeier (1990) che afferma una concentrazione di cadmio a livello polmonare 4 volte maggiore nei fumatori rispetto ai non fumatori assegnando un accumulo di 1,6 μg di cadmio al die per un fumatore di 20 sigarette al giorno (rispetto ad un accumulo di 0,25 μg per una persona residente in un area industriale con una concentrazione di cadmio nell'aria di 0,05 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Cromo

Le concentrazioni dedotte dagli studi tessuti fissati sono superiori a quelle determinate su campioni congelati anche se i valori medi sono superiori a quelli dosati nella nostra casistica.

Inoltre i tessuti indenni di soggetti affetti da tumore hanno livelli superiori di tale elemento rispetto al frammento neoplastico.

Tabella 30

	Fissati		
	S	M	
	mediana	mediana	p
Presente studio	0,7	0,5	0,002
metanalisi	4,1	1,3	

Nessuna variazione è stata invece riscontrata nei soggetti fumatori.

Piombo

I lavori selezionati per la determinazione del piombo nel tessuto polmonare sono pochi (4) è comunque evidente una maggiore concentrazione nei campioni fissati rispetto ai congelati.

Livelli maggiori di piombo nei soggetti fumatori sono segnalati anche da Tsuchiyama et al., 1997.

Zinco

Lo zinco è un elemento ubiquitario ed essenziale, i valori da noi determinati e desunti dalla letteratura sono caratterizzati da ampi range.

Con queste premesse è comunque evidente che anche in letteratura le determinazioni su campioni fissati sono notevolmente superiori agli studi che hanno scelto campioni congelati.

I soggetti affetti da tumore polmonare hanno concentrazioni superiori rispetto ai controlli.

Cobalto

Non è riportata nessuna differenza in base alle modalità di conservazione e alle neoplasie.

I valori sono sovrapponibili.

Arsenico

Gli studi analizzati hanno dosato l'arsenico solamente da tessuti congelati. Il dato estrapolato dalla meta-analisi riporta concentrazioni superiori nella casistica di controllo rispetto al tessuto neoplastico di soggetti affetti da tumore.

5.2 IPA

Di seguito sono riportati gli estratti dell'elaborazione dei dati desunti dalla meta-analisi degli studi che hanno effettuato il dosaggio degli idrocarburi policiclici aromatici nel tessuto polmonare.

In figura sono riportate le concentrazioni di benzo(a)pirene, benzo(k)fluorantene e benzo(ghi)perilene e la loro media e il range pesato in base al numero delle determinazioni.

Non avendo determinazioni di soggetti non fumatori nella casistica da noi studiata e visto il ruolo del fumo come fattore confondente il confronto non è possibile.

Le uniche determinazioni di soggetti fumatori di benzo(a)pirene di Goldman 2001 e Lodovici 1998 (0,051 e $0,26 \pm 0,2$) e di benzo(ghi)perilene di Seto et al., 1993 ($1,05 \pm 0,64$) sono sovrapponibili a quelle da noi rilevate.

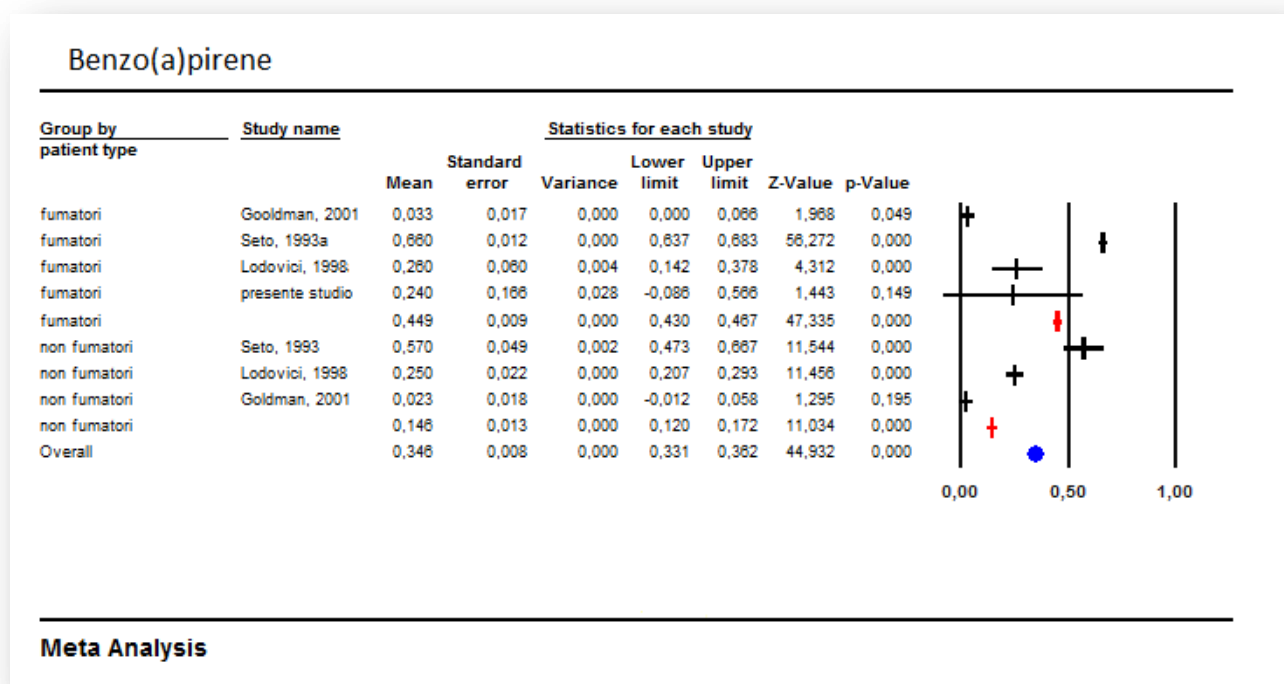
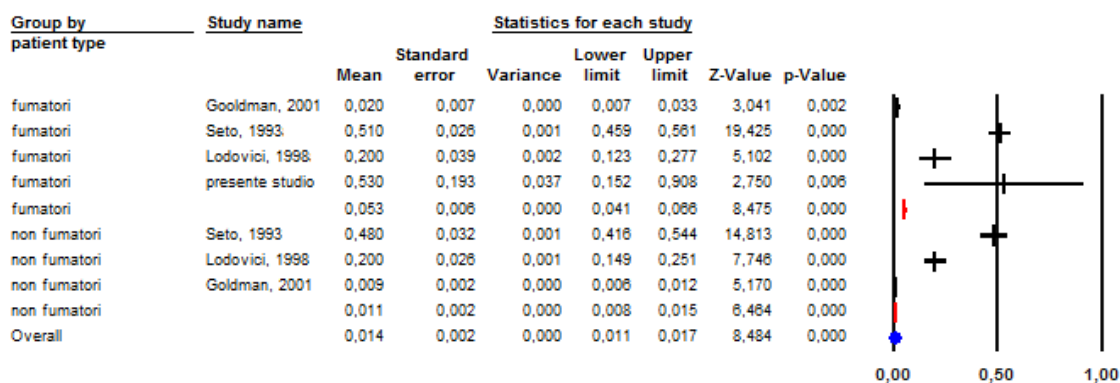


Figura 34 Valori di benzo(a)pirene suddivisi per tipologia soggetti fumatori e non fumatori.

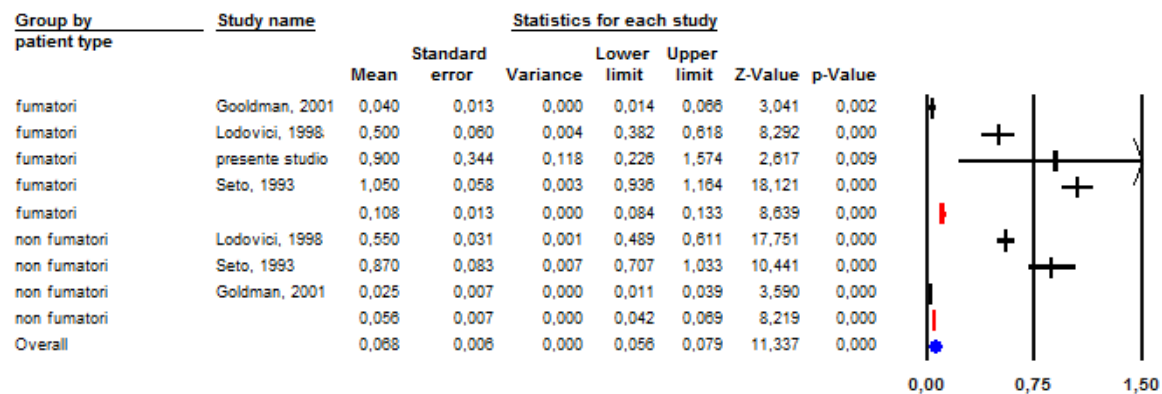
Benzo(k)fluorantene



Meta Analysis

Figura 35 Valori di benzo k fluorantene suddivisi per tipologia soggetti fumatori e non fumatori.

Benzo(ghi)perilene

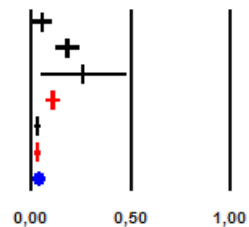


Meta Analysis

Figura 36 Valori di benzo ghi perilene suddivisi per tipologia soggetti fumatori e non fumatori.

Dibenzo(ah)antracene

Group by patient type	Study name	Statistics for each study						
		Mean	Standard error	Variance	Lower limit	Upper limit	Z-Value	p-Value
fumatori	Goldman, 2001	0,053	0,024	0,001	0,005	0,101	2,184	0,030
fumatori	Lodovici, 1998	0,180	0,030	0,001	0,121	0,239	5,970	0,000
fumatori	presente studio	0,280	0,110	0,012	0,045	0,475	2,372	0,018
fumatori		0,108	0,019	0,000	0,071	0,145	5,789	0,000
non fumatori	Lodovici, 1998	0,030	0,008	0,000	0,015	0,045	3,873	0,000
non fumatori		0,030	0,008	0,000	0,015	0,045	3,873	0,000
Overall		0,041	0,007	0,000	0,027	0,055	5,784	0,000



Meta Analysis

Figura 37 Valori di dibenzo(ah)antracene suddivisi per tipologia soggetti fumatori e non fumatori.

6 SVILUPPI FUTURI

Alla luce dei risultati ottenuti si rende necessario ampliare la casistica dei controlli per meglio determinare il possibile accumulo degli elementi metallici cancerogeni nei soggetti malati rispetto ai sani.

Le conclusioni dedotte in merito al metodo di conservazioni vanno confermate ripetendo l'analisi su ulteriori campioni conservati in entrambe le modalità al momento del prelievo.

Nonostante le difficoltà sarebbe interessante reclutare controlli e casi non fumatori per determinare il ruolo di elementi metallici e soprattutto degli idrocarburi policiclici aromatici propri del fumo di sigaretta nella patogenesi della malattia.

7 DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

Il presente studio si proponeva di valutare se l'analisi di campioni biotipici prelevati da pazienti affetti da tumore polmonare potesse permettere una valida stima della misura dell'esposizione di elementi cancerogeni e di valutare eventuali carenze o accumuli di altri elementi essenziali e non.

Gli elementi metallici sono stati dosati sul tessuto polmonare indenne e neoplastico di soggetti affetti da tumore polmonare e su una casistica di controllo con lo scopo di verificare se i soggetti affetti da tumore polmonare presentassero un carico corporeo, soprattutto degli elementi classificati come cancerogeni, rispetto ad una popolazione sana.

Le evidenze presenti in letteratura in merito all'influenza della modalità di conservazione dei campioni affermano che tendenzialmente i livelli determinati nei tessuti conservati in formalina sono confrontabili o inferiori rispetto ai freschi, come se la formalina eseguisse una sorta di lisciviazione degli elementi.

Nel corso dello studio si è dimostrato su prove singole, su un'ampia casistica e in dati meta-analitici che i tessuti fissati in formalina presentano in genere valori maggiori di elementi metallici rispetto ai tessuti congelati, per cui le due casistiche sono state studiate separatamente.

Tenendo in considerazione il grosso limite dello scarso numero dei campioni di controllo, è emerso che fra gli elementi cancerogeni o potenzialmente tali, il piombo ($p=0,01$, casistica campioni congelati), cobalto e debolmente cromo ($p<0,001$ e $p=0,05$, casistica campioni fissati) sono superiori nei soggetti affetti da tumore polmonare (tessuto indenne) rispetto ai controlli.

Il confronto per dati appaiati delle concentrazioni degli elementi metallici nel tessuto neoplastico e indenne di soggetti affetti da tumore polmonare ha evidenziato livelli maggiori di alcuni elementi nel tessuto indenne rispetto al relativo neoplastico, in particolare nichel, bario e ferro (casistica congelati) e cadmio, cromo, cobalto, lantanio e cerio (casistica fissati).

Interessante segnalare il comportamento inverso, ossia concentrazione maggiori nel tessuto neoplastico rispetto al corrispondente indenne sia nella casistica congelata che fissata, di due elementi come rame e selenio, essenziali e implicati in processi di protezione cellulare.

Soggetti esposti professionalmente ad elementi metallici presentano concentrazioni maggiori di arsenico, tungsteno, uranio ($p=0,02$; $0,008$; $0,001$) e cromo la cui concentrazione è maggiore senza raggiungere la significatività.

L'accumulo di nichel, cadmio e piombo è fortemente influenzato dall'abitudine al fumo. Sia soggetti fumatori che ex-fumatori hanno livelli significativamente superiori di tali elementi rispetto ai soggetti non fumatori.

Lo studio di altre variabili come sesso, età e istotipo non ha dato ulteriori risultati.

In parallelo è stato condotto il dosaggio di idrocarburi policiclici aromatici, il limite della quantità di tessuto necessaria all'analisi ha impedito l'applicazione all'intera casistica.

Anche in questo caso in fase preliminare sono stati indagati gli effetti delle modalità di conservazione e nonostante gli idrocarburi policiclici aromatici siano composti chimicamente più instabili degli elementi metallici non si nota alcuna differenza fra campioni congelati e fissati.

Il benzo(a)pirene e il benzo(a)antracene sono risultati in concentrazioni superiori nei soggetti affetti da tumore rispetto ai controlli e sono inoltre fortemente influenzati dall'esposizione professionale a IPA.

L'andamento dei nostri dati, anche se pochi, confermano la letteratura riguardo alla maggior concentrazione determinata negli uomini rispetto alle donne e in rapporto all'età.

L'inserimento della determinazione del dibenzo(al)pirene nell'elenco degli IPA ricercati aveva lo scopo di verificare quello che fino ad ora era stato solo determinato *in vitro*; tuttavia nei campioni da noi analizzati il livello di tale IPA è sempre inferiore al limite di rilevabilità.

Lo studio meta-analitico della letteratura ha consentito di combinare i dati di più studi condotti sullo stesso argomento generando un unico dato conclusivo.

L'analisi della letteratura ha consentito di valutare la validità di ciascun contributo relativamente alla caratterizzazione dell'esposizione, ai fattori interferenti e desumere, in seguito all'analisi dei dati, dei valori di riferimento.

La maggior parte degli autori che hanno affrontato il problema della relazione fra accumulo di elementi metallici e tumore polmonare hanno determinato la concentrazione degli elementi metallici nel tessuto polmonare di soggetti deceduti per neoplasia polmonare confrontandola con quella di soggetti deceduti per altre cause ottenendo risultati non univoci.

Nonostante la discordanza dei risultati emersi dai vari studi emerge che concentrazioni di rame, cromo e nichel sono significativamente più elevate in soggetti con neoplasia polmonare rispetto a soggetti deceduti per altre cause, mentre zinco e magnesio sono in concentrazioni inferiori. Fra coloro che hanno determinato la concentrazione di metalli nel tessuto polmonare neoplastico è evidente una concentrazione di rame, calcio, magnesio e rame/zinco più elevata nel tessuto

neoplastico rispetto al tessuto sano di soggetti con neoplasia mentre cromo, piombo e zinco sono significativamente più bassi.

Le altre informazioni estrapolate dallo studio delle pubblicazioni sugli elementi metallici sono essenzialmente che il sesso non sembra influire in modo determinante sull'accumulo di elementi metallici a livello polmonare che l'età può essere un fattore in grado di condizionare l'accumulo di alcuni elementi come il cromo.

Inoltre, il fumo di sigaretta è significativamente correlato all'accumulo polmonare di cadmio e cromo, più incerta la correlazione con nichel e piombo.

È stato chiaramente dimostrato che esiste una considerevole variabilità intra e interindividuale nella concentrazione degli elementi metallici nel tessuto polmonare e questo unitamente alle basse concentrazioni di elementi metallici che si vanno a determinare richiede una procedura standardizzata di prelievo e analisi dei campioni polmonari.

Per concerne gli idrocarburi policiclici aromatici il limitato numero di studi reperiti non ha permesso di ricavare la stessa portata di informazioni recepite dalla meta-analisi degli elementi metallici. Le principali informazioni sono in merito all'abitudine al fumo anche se i risultati ottenuti sono contrastanti.

Il benzo(ghi)perilene, il benzo(a)pirene e il dibenzo(ah)antracene risultano significativamente superiori nei tessuti polmonari di soggetti fumatori rispetto ai non fumatori. Mentre in merito al sesso il benzo(a)pirene, benzo(k)fluorantene e benzo(ghi)perilene sono significativamente superiori negli uomini che nelle donne. Nessuna differenza è invece riferita tra campioni di soggetti affetti da tumore e soggetti di controllo.

Il confronto dei dati numerici estrapolati dalla meta-analisi degli elementi metallici conferma la presenza di un range di variabilità consistente per quasi tutti gli elementi.

Tranne il nichel che nella casistica da noi esaminata è presente in concentrazioni notevolmente superiori e il cromo che invece risulta inferiore gli altri elementi sono presenti in un range confrontabile in tutte le tipologie di tessuto (tessuto indenne, neoplastico e di controllo).

Il risultato della meta-analisi della determinazione degli IPA ha confermato la presenza di concentrazioni superiori nel tessuto di soggetti fumatori; purtroppo la mancanza nella nostra casistica di soggetti non fumatori non ha permesso di ripetere tale correlazione.

Tuttavia i dati da noi determinati sono del tutto confrontabili con i dati tabellati.

Interessanti conclusioni sono emerse in merito alla modalità di conservazione dei tessuti presi in analisi.

Dalle concentrazioni degli elementi metallici della casistica e da prove preliminari di analisi su tessuti conservati sia congelati che fissati emerge che i tessuti conservati in formalina presentano valori notevolmente superiori.

Nonostante le opinioni espresse nei singoli studi riguardo alla conservazione in formalina si orientano verso l'ipotesi che la conservazione in formalina può portare ad una sottostima della concentrazione degli elementi metallici, il confronto dei dati estrapolati dalla meta-analisi dimostra il contrario.

I valori degli elementi metallici ricavati da studi che hanno effettuato il dosaggio su tessuti fissati sono notevolmente superiori rispetto agli studi che hanno effettuato la stessa determinazione su tessuti congelati.

Poiché l'analisi della formalina fresca e di "conservazione" non ha dato nessun risultato, la spiegazione può essere in una possibile modificazione istologica-cellulare dei tessuti e quindi in errori sistematici di espressione dei risultati peso/peso.

Invece, nonostante gli idrocarburi policiclici aromatici siano composti chimicamente più instabili degli elementi metallici non si nota alcuna differenza di concentrazioni nelle due modalità di conservazione dei campioni.

In definitiva, i dati suggeriscono che non è presente un vero e proprio accumulo di elementi cancerogeni nel tessuto polmonare dei soggetti affetti da tumore, si osservano infatti comportamenti diversi e opposti sia fra gli elementi metallici che fra gli idrocarburi policiclici aromatici che non consentono di trarre indicazioni conclusive relativamente al ruolo causale di tali composti nella genesi della patologia

Fattori come solubilità dei composti, instabilità molecolari, meccanismi di clearance muco-ciliare, ventilazione polmonare giocano sicuramente un ruolo importante nella distribuzione ed eliminazione dei composti dai tessuti.

Si può affermare che nel tentativo di determinare valori di riferimento o concentrazioni basali o di accumulo di elementi in campioni tissutali è necessario stabilire e valutare la modalità di conservazione.

Il presente lavoro ha voluto inoltre sottolineare l'importanza di una lettura critica degli studi presenti in letteratura per meglio comprendere limiti metodologici e problematiche di interpretazione dei dati.

8 BIBLIOGRAFIA

- ADACHI S, TAKEMOTO K, OHSHIMA S, SHIMIZU Y, TAKAHAMA M. Metal concentrations in lung tissue of subjects suffering from lung cancer. *Int Arch Occup Environ Health* 1991; 63: 193-197.
- AKSLEN LA, MYKING O, MORKVE O, GULSVIK A, RAITHEL HJ, SCHALLER KH. Increased content of chromium and nickel in lung tissues from patients with bronchial carcinoma. *Path Res Pract* 1990. 186: 717-722.
- ANDERSEN I, SVENES K. Establishing normal values for nickel in human lung disease. *J Environ Monit*, 1999; 1: 553-555.
- ANDERSEN I, SVENES K. X-ray diffraction spectrometric analysis of nickel refinery aerosols, process materials and particulates isolated from worker lung tissues. *J Environ Monit* 2003;5(2):202-205.
- ANDERSEN I, SVENES KB. Determination of nickel in lung specimens of thirty-nine autopsied nickel workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1989;61:289-295.
- ANTTILA S, KOKKONEN P, PAAKKO P, RAINIO P, KALLIOMAKI P. High concentrations of chromium in lung tissue from lung cancer patients. *Cancer* 1989;63: 467-473.
- ARAKAWA H, AHMAD R, NAOUI M, TAJMIR-RIahi HA.. A comparative study of calf thymus DNA binding to Cr(III) and Cr(VI) ions. Evidence for the guanine N-7-chromium-phosphate chelate formation. *J Biol Chem* 2000; 275: 10150-10153.
- AYRTON AD, MCFARLANE M, WALKER R, NEVILLE S, COOMBS MM, IOANNIDES C. Induction of the P-450 I family of proteins by polycyclic aromatic hydrocarbons: possible relationship to their carcinogenicity. *Toxicology* 1990; 60 (1-2): 173-186.
- BARREGARD L, SALLSTEN G, CONRADI N. Tissue levels of mercury determined in a deceased worker after occupational exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1999;72:169-173.
- BATT AM, MAGDALOU J, VINCENT-VIRY M, OUZZINE M, FOURNEL GIGLEUX S, GALTEAU MM, SIEST G. Drug metabolizing enzymes related to laboratory medicine: cytochrome P-450 and UDP-glucuronosyltransferases. *Clin Chim Acta* 1994; 226: 171-190.
- BAUMGARDT B, JACKWERTH E, OTTO H, TOLG G. Trace analysis to determine heavy metal load in lung tissue. *Int Arch Occup Environ health* 1986; 58: 27-34.

- BAX L, YU LM., IKEDA N, MOONS KG. A systematic comparison of software dedicated to meta-analysis of causal studies. *BMC Med Res Methodol* 2007 ;10:40-46.
- BEACH J, PELLIZARI E, KEEVER J, ELLS L. Determination of benzo(a)pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at trace levels in human tissues. *Journal of analytical toxicology* 2000; 24: 670-674.
- BEYERSMANN D. Effect of carcinogenic metals on gene expression. *Toxicol Lett.* 2002; 28; 127: 63-68.
- BOCIO A, NADAL M, GARCIA F, DOMINGO JL. Monitoring metals in the population living in the vicinity of hazardous waste incinerator. *Biol Trace Elem Res* 2005;106:41-50.
- BOFFETTA P, PERSHAGEN G, JOCKEL KH, GABORIEAU V, HEINRICH J, JAHN I, KREUZER M, ERLETTI F, ROSCH F, SIMONATO L. Cigar and pipe smoking and lung cancer risk: a multicenter study from Europe. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 697-701.
- BOFFETTA P, JOURENKOVA N, GUSTAVSSON P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* 1997 ;8 :444-472.
- BOSE RN, MOGHADDAS S, MAZZER PA, DUDONES LP, JOUDAH L, STROUP D. Oxidative damage of DNA by Cr(VI) complexes :relative importance of base versus sugar oxidation. *Nucl Acids Res* 1999; 27: 2219-2229.
- BRUNE D, NORDBERG G, WESTER PO. Distribution of 23 elements in the kidney, liver and lungs of workers from a smeltery and refinery in North Sweden exposed to a number of elements and of a control group. *Sci Total Environ* 1980;16:13-35.
- BUSH VJ., MOYER TP., BATTS KP, PARISI JE. Essential and toxic element concentrations in fresh and formalin-fixed human autopsy tissues. 1995. *Clin Chem.* 41: 284-294.
- DAVIES JM, EASTON DF, BIDSTRUP PL. Mortality from respiratory cancer and other causes in United Kingdom chromate production workers. *Br J Ind Med* 1991; 48: 299-313.
- DAYAN A.D, PAINE AJ. Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of literature from 1985 to 2000. *Hum Exp Toxicol* 2001; 20: 439-451.
- DE FLORA S, BAGNASCO M, SERRA D, ZANACCHI P. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res* 2000;238: 99-172.
- DE FLORA S., MORELLI A, BASSO C, ROMANO M, SERRA D, DE FLORA A. Prominent role of DT-diaphorase as a cellular mechanism reducing chromium(VI) and reverting its mutagenicity. *Cancer Res* 1985 ; 45: 3188-3196.

- DIEZ M, ARROYO M, CERDAN FJ, MUNOZ M, MARTIN A, BALIBREA JI. Serum and tissue trace metal levels in lung cancer. *Oncology* 1989; 46: 230-234.
- DONG Z. The Molecular Mechanisms of Arsenic-Induced Cell Transformation and Apoptosis. *Environ Health Perspect* 2002; 110 : 757-759.
- DOPP E, HARTMANN LM, FLOREA AM, VON RECKLINGHAUSEN U, PIEPER R, SHOKOUHI B, RETTENMEIER AW, HIRNER AV, OBE G. Uptake of inorganic and organic derivatives of arsenic associated with induced cytotoxic and genotoxic effects in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004 ;201:156-165.
- DRAKE EN, HOWARD SP. Discriminant analysis of trace element distribution in normal and malignant human tissue. *Cancer Research* 1989; 49: 4210-4215.
- DUBICK MA, KEEN C. Influence of nicotine on tissue trace element concentrations and tissue antioxidant defense. *Biol Trace Element Research* 1991; 31: 97-109.
- DUFRESNE A, KRIER G, MULLER JF, PERRAULT G. Measurement of metallic particles extracted from the lung parenchyma of two electricians and one electrotechnician. *Am Ind Hyg Assoc J* 1993;54:564-568.
- ELINDER CG, KJELLSTROM T, HOGSTEDT C, ANDERSSON K, SPANG G. Cancer mortality among cadmium workers. *Br J Ind Med* 1985; 42: 651-655.
- EVANS CD., LADOW K., SCHUMANN BL., SAVAGE RE., CARUSO J, VONDERHEIDE A., SUCCOP P., TALASKA G. Effect of arsenic on benzo[a]pyrene DNA adduct levels in mouse skin and lung. *Carcinogenesis* 2004; 25: 493:497.
- EZZATI M, KAMMEN DM, The health impacts of exposure to indoor air pollution from solid fuels in developing countries: knowledge, gaps, and data needs. *Environ Health Perspect* 2002; 110:1057-1068.
- EZZATI M, LOPEZ AD, RODGERS A, HOOM SV, MURRAY CJL. Selected mayor risk factors and global and regional burden of disease. *Lancet* 2002; 360: 1347-1360.
- FINCH GL, HOOVER MD, HAHN FF, NIKULA KJ, BELINSKY SA, HALEY PJ, GRIFFITH WC. Animal Models of Beryllium-induced Lung Disease. *Environ Health Perspect* 1996; 104S:973-979.
- FORTOUL TI, MENDOZA ML, AVILA MC, QUAN TORRES A, OSORIO LS, ESPEJEL GM, FERNANDEZ GO. Manganese in lung tissue: study of Mexico city residents's autopsy records from the 1960s and 1990s. *Arch Environ Health* 2001; 56:187-190.

- FORTOUL TI, OSORIO LS, TOVAR AT, SALAZAR D, CASTILLA ME, FERNANDEZ GO. Metals in lung tissue from autopsy cases in Mexico city residents: comparison of cases from the 1950s and 1980s. *Environ Health Perspect* 1996; 104:630-632.
- FORTOUL TI, QUAN-TORRES A., SANCHEZ I., LOPEZ IE, BIZARRO P, et al. Vanadium in ambient air : concentrations in lung tissue from autopsies of Mexico city residents in 1960s and 1990s. *Arch Environ Health* 2002; 57; 446-449.
- FUJII H., KAKINUMA K. Study on the superoxide releasing site in plasma membranes of neutrophils with ESR spin-labels. *J Biochem* 1990;108: 292-296.
- GARCIA F, ORTEGA A, DOMINGO JL, CORBELLA J. Accumulation of metals in autopsy tissues of subjects living in Tarragona County, Spain. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2001;36:1767-1786.
- GEFFARD O., GEFFARD A., HIS E., BUDZINSKI H.: Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea Gigas* embryos and larvae. *Marin Pollut Bull.* 2003 ; 46 : 481-490.
- GELLEIN K, FLATEN TP, ERIKSON KM, ASCHNER M, SYVERSEN T. Leaching of trace elements from biological tissue by formalin fixation. *Biol Trace Elem Res* 2007; 19:
- GERHARDSSON L, BRUNE D, LUNDSTROM NG, NORDBERG G, WESTER PO. Biological specimen bank for smelter workers. *Sci Total Environ* 1993;139-140:157-173.
- GERHARDSSON L, BRUNE D, NORDBERG GF, WESTER PO. Distribution of cadmium, lead and zinc in lung, liver and kidney in long-term exposed smelter workers. *Sci Total Environ* 1986a; 50:65-85.
- GERHARDSSON L, BRUNE D, NORDBERG GF, WESTER PO. Selenium and other trace elements in lung tissue in smelter workers relationship to the occurrence of lung cancer. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1986b; 59:256-259.
- GERHARDSSON L, BRUNE D, NORDBERG GF, WESTER PO. Multielemental assay of tissues of deceased smelter workers and controls. *Sci Total Environ* 1988 ; 74:97-110.
- GERHARDSSON L, BRUNE D, NORDBERG IG, WESTER PO. Protective effect of selenium on lung cancer in smelter workers. *Br J Ind Med.* 1985 Sep;42(9):617-626.
- GERHARDSSON L, ENGLYST V, LUNDSTROM NG, SANDBERG S, NORDBERG G. Cadmium, copper and zinc in tissues of deceased copper smelter workers. *J Trace Elem Med Biol* 2002; 16 : 261-266

- GERHARDSSON L, NORDBERG GF. Lung cancer in smelter workers: interactions of metals as indicated by tissue levels. *Scand J Work Environ Health* 1993; 19: 90-94.
- GERHARDSSON L, WESTER PO, NORDBERG GF, BRUNE D. Chromium, cobalt and lanthanum in lung, liver and kidney tissue from deceased smelter workers. *Sci Total Environ* 1984 ;37(2-3):233-246.
- GERHARDSSON L, BRUNE D, NORDBERG GF, WESTER P. Multielemental assay of tissue of deceased smelter workers and control. *The science of total environment* 1988; 74: 97-110.
- GHIO AJ, STONEHUERNER J, QUIGLEY DR. humic-like substances in cigarette smoke condensate and lung tissue smokers. *Am J Physiol* 1994; 266: L382-388.
- GIBB HJ, LEES PS, PINSKY PF, ROONEY BC. Lung cancer among workers in chromium chemical production. *Am J Ind Med* 2000; 38:115-126.
- GLADEN BC, ZADOROZHNAJA TD, CHISLOVSKA N. Polycyclic aromatic hydrocarbons in placenta. *Human Exp Toxicol* 2000; 19: 597-603.
- GOLDMAN R, ENEWOLD L, PELLIZZARI E, BEACH J, BOWMAN E, KRISHNAN S, SHIELDS P. Smoking increases carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer research* 2001; 61: 6367-6371.
- GORDON T, BOWSER D .Beryllium: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutat Res* 2003. 10 ;533: 99-105.
- GRASSESCHI RM, RAMASWAMY RB, LEVINE DJ, KLAASSEN CD, WESSELIUS LJ. 2003. Cadmium accumulation and detoxification by alveolar macrophages of cigarette smokers.*Chest* 2003;124:1924-1928.
- HA L, CERYAK S, PATIERNO SR.Chromium (VI) activates ataxia telangiectasia mutated (ATM) protein. Requirement of ATM for both apoptosis and recovery from terminal growth arrest. *J Biol Chem* 2003;16:17885-17894.
- HABER LT, ERDREICHT L, DIAMOND GL, MAIER AM, RATNEY R, ZHAO Q, DOURSON ML. Hazard identification and dose response of inhaled nickel-soluble salts. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000;31:210-230.
- HARRIS GK, SHI X. Signalling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species. *Mutat Res* 2003; 533; 183-200.
- HARTWIG A, SCHWERDTLE T. Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes. *Toxicol Letter* 2002; 127: 47-54.

- HAYES R. The carcinogenicity of metals in humans. *Cancer Causes and Control* 1997; 8, 371-385.
- HAYS AM, SRINIVASAN D, WITTEN ML, CARTER DE, LANTZ RC. 2006. Arsenic and cigarette smoke synergistically increase DNA oxidation in the lung. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006; 19: 129-138.
- HECKBERT SR, WEISS NS, HORNING SK, EATON DL, MOTULSKY AG. Glutathione S-transferase and epoxide hydrolase activity in human leukocytes in relation to risk of lung cancer and other smoking related cancers. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 414-422.
- HIGGINBOTHAM S., RAMAKRISHNA NV., JOHANSSON SL., ROGAN EG.,CAVALIERI EL. Tumor-initiating activity and carcinogenicity of dibenzo(a,l)pyrene versus 7,12dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene at low doses in mouse skin. *Carcinogenesis* 1993; 14:875-878.
- HU W, FENG Z., TANG MS. Nickel (II) enhances benzo[a]pyrene diol epoxide-induced mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism. for nickel (II)-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2004;25: 455-462.
- HUANG C, MA W-Y, LI J, DONG Z. Arsenic induces apoptosis through a c-Jun NH2-terminal kinase-dependent, p53-independent pathway. *Cancer Res* 1999; 59:3053–3058.
- HUNT DM, Copper and neurological function. *Ciba Found Symp* 1980; 79: 247-266.
- HYODO K, SUZUKI S, FURUYA N, MESHIZUKA K. An analysis of chromium, copper, and zinc in organs of a chromate worker. *Int Arch Occup Environ Health* 1980;46:141-150.
- INGRAO G, BELLONI P, DI PIETRO S, SANTARONI G. Levels of some trace elements in selected autopsy organs, and in hair and blood samples from adult subjects of the italian population. *Biological trace element research* 1990; 26-27: 699-708 .
- International Agency for Research on Cancer. Polycyclic aromatic hydrocarbons.. Lyon, France: IARC, 2007, Vol 92 (in press)
- International Agency for Research on Cancer. Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in Glass Manufacturing. Lyon, France: IARC, 1993; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 58
- International Agency for Research on Cancer. Chromium, Nickel and Welding. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1990. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol. 49: 463-474.

- International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs programme on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: IARC, 2002
- ISHIKAWA Y, NAKAGAWA K, SATOH Y, KITAGAWA T, SUGANO H, HIRANO T, TSUCHIYA E. Characteristics of chromate workers' cancers, chromium lung deposition and precancerous bronchial lesions: an autopsy study Br J Cancer. 1994a;70:160-166.
- ISHIKAWA Y, NAKAGAWA K, SATOH Y, KITAGAWA T, SUGANO H, HIRANO T, TSUCHIYA E. "Hot spots" of chromium accumulation at bifurcations of chromate workers' bronchi. Cancer Res 1995b;54:2342-2346.
- KASPRZAK KS, SUNDERMAN FW JR, SALNIKOW K .Nickel carcinogenesis. Mutat Res 2003; 533:67-97.
- KATOH Y, SATO T, YAMAMOTO Y. Determination of multielement concentrations in normal human organs from the Japanese. Biological trace element research 2002; 90: 57-62.
- KAZANTSIS G, BLANKS RG, SULLIVAN KR. Is cadmium a human carcinogen? In: Nordberg GF, Herber RFM, Alessio L, eds. Cadmium in the Human Environment: Toxicity and Carcinogenicity. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1992; IARC Sci. Pub. No. 118; 435
- KITCHIN KT, WALLACE K. Arsenite binding to synthetic peptides based on the Zn finger region and the estrogen binding region of the human estrogen receptor-alpha. Toxicol Appl Pharmacol 2005;206:66-72.
- KLEIN, C.B., SU, L., BOWSER, D., LESZCZYNSKA 2002. Chromate-induced epimutations in mammalian cells. Environ Health Perspect 2002; 110: 739-743.
- KOLLMEIER H, SEEMANN JW, ROTHE G, MULLER KM, WITTIG P. Age, sex and region adjusted concentrations of chromium and nickel in lung tissue. British J Ind Med 1990; 47: 682-687.
- KOLLMEIER H, SEEMANN J, WITTIG P, ROTHE G, MULLER K. Cadmium in human lung tissue. Int Arch Occup Environ Health 1990; 32: 373-377.
- KOLLMEIER H, SEEMANN JW, MULLER KM, ROTHE G, WITTIG P, SCHJAL VB. Increased chromium and nickel content in lung tissue and bronchial carcinoma. Am J Ind Med 1987; 11: 659-669.
- KORALLUS U, ULM K, STEINMANN-STEINER-HALDENSTAETT W. Bronchial carcinoma mortality in the German chromate producing industry: the effects of process modification. Int Arch Occup Environ Health 1993; 65: 171-178.

- KRIEBEL D, SPRINCE NL, EISEN EA, GREAVES IA. Beryllium exposure and pulmonary function: a cross-sectional study of beryllium workers. *Br J Ind Med* 1988; 45: 167-173.
- LAU AT, CHIU JF. Proteomic and biochemical analyses of in vitro carcinogen-induced lung cell transformation: synergism between arsenic and benzo[a]pyrene *Proteomics* 2006;6:1619-1630.
- LECH T, SADLIK JK. Total mercury levels in human autopsy materials from a nonexposed Polish population. *Arch Environ Health* 2004;59:50-54.
- LIU J, KADIISKA MB, CORTON JC, QU W, WAALKES MP, MASON RP, LIU Y, KLAASSEN CD. Acute cadmium exposure induces stress related gene expression in wild type and metallothionein I/II-null mice. *Free Radic Biol Med* 2002; 32: 525-535.
- LIU K, HUSLER J, YE J, LEONARD SS, CUTLER D, CHEN F, WANG S, ZHANG Z, DING M, WANG L, SHI X. 2001. On the mechanism of Cr (VI)-induced carcinogenesis: dose dependence of uptake. *Mol Cell Biochem* 2001; 222: 221-229.
- LIU YT, CHEN Z. A retrospective lung cancer mortality study of people exposed to insoluble arsenic and radon. *Lung Cancer* 1996; 14: S137-48.
- LODOVICI M, AKPAN V, GIOVANNINI L, MIGLIANI F, DOLARA P. Benzo(a)pyrene diol-epoxide DNA adduct and levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in autoptoc sample from human lungs, *Chemico-biological interactions* 1998; 116: 199-212.
- LODOVICI M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in *Laurus nobilis* leaves as a mesure of air pollution in urban and rural sites of Tuscany. *Chemosphere* 1998;36: 1703-1712.
- LU H, SHI X, COSTA M, HUANG C. Carcinogenic effect of nickel compounds. *Mol Cell Biochem* 200 ;279:45-67.
- LUCH A., FRIESEL H., SEIDEL A., PLATT KL. Tumor initiang activity of the (+)-(S-S) and (-)-(R-R)-enantiomers of trans-11,12-dihydroxy-11,12-dihydrodibenzo(a,l)pyrene in mouse skin. *Cancer Letters*. 1999;136: 119-128.
- LYU RM, SMITH JB. Genistein inhibits calcium release by platelet-derivated growth factor but not bradikinin or cadmium in human fibroblasts. *Cell biol toxicol* 1993; 9; 141-148.
- MAIER A, SCHUMANN BL, CHANG X, TALASKA G, PUGA A. Arsenic co-exposure potentiates benzo(a)pyrene genotoxicity. *Mutat Res* 2004; 517: 101-111.
- MCNULTY TJ, TAYLOR CW. Extracellular heavy metal ions timulate Ca²⁺ mobilization in hepatocytes. *Biochem J* 1999; 339; 555-561.

- MIKALSEN SO. Effects of heavy metal ions on intercellular communication in Syrian hamster embryo cells *Carcinogenesis* 1990; 11:1621-1626.
- MISRA UK, GAWDI G, PIZZO SV. Beryllium fluoride-induced cell proliferation: a process requiring P21ras-dependent activated signal transduction and NF- κ B-dependent gene regulation *J Leukoc Biol* 2000; 71:487-494.
- MISRA RR, CRANCE KA, BARE RM, WAALKES MP. Lack of correlation between the inducibility of metallothionein oxidative stress. *Cell Biol Toxicol* 1997; 18: 29–42.
- MOOIBOEK D, HOOGERBRUGGE R, STOFFELSEN BHG. Comparison of various extraction techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in worms. *J. Chromatogr. A* 2002,; 975: 165-173.
- NESNOW S, ROOP BC, LAMBERT G, KADIISKA M, MASON RP, CULLEN WR, MASS MJ. 2002. DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chem Res Toxicol* 2002;15:1627-1634.
- O'BRIEN TJ, CERYAK S, PATIERNO SR. Complexities of chromium carcinogenesis role of cellular response, repair and recovery mechanism. *Mutat Res* 2003; 10; 533: 3-36.
- OKONA-MENSAH KB, BATTERSHILL J, BOOBIS A, FIELDER R. An approach to investigating the importance of high potency polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the induction of lung cancer by air pollution. *Food Chem Toxicol* 2005; 43: 1103-1116.
- OLLER AR. Respiratory Carcinogenicity Assessment of Soluble Nickel Compounds. *Environ Health Perspect* 2002; 110: 841–844.
- PAAKKO P, ANTTILA S, KOKKONEN P, KALLIOMAKI P. Cadmium in lung tissue as marker for smoking. *The lancet* 1988; 27: 477-480.
- PAAKKO P, KOKKONEN P, ANTTILA S, KALLIOMAK P. Cadmium and chromium as markers of smoking in human lung tissue. *Environmental research* 1989; 49: 197-207.
- PASTIDES H, AUSTIN R, LEMESHOW S, KLAR J, MUNDT KA. A retrospective-cohort study of occupational exposure to hexavalent chromium. *Am J Ind Med* 1994; 25: 663-675.
- POPE III CA, BURNETT RT, THUN MJ, CALLE EE, KREWSKI D, ITO K, THURSTON GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002; 287: 1132-1141.
- PRAHALAD AK, ROSS JA, NELSON GB, ROOP BC, KING LC, NESNOW S, MASS M. Dibenzo[a,l]pyrene-induced DNA adduction, tumorigenicity, and Ki-ras oncogene mutations in strain A/J mouse lung. *Carcinogenesis* 1997; 18: 1955-1963.

- PRITCHARD DE, CERYAK S, HA L, FORNSAGLIO JL, HARTMAN SK, O'BRIEN TJ, PATIERNO SR. Mechanism of apoptosis and determination of cellular fate in chromium(VI)-exposed populations of telomerase-immortalized human fibroblasts. *Cell Growth Differ* 2001; 12:487-496.
- PROZIALECK WC, LAMAR PC, LYNCH SM. Cadmium alters the localization of N-cadherin, E-cadherin, and β -caderin in the proximal tubule epithelium. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; 189:180–195.
- QUAN M, MULDERMS MS, MELTZER DGA. The effect of storage conditions on samples for the evaluation of copper status in blesbok (*damaliscus pygargus phillipsi*). *J S Afr Vet Assoc* 2003; 73: 111-114.
- RAITHEL H J, SCHALLER KH, KRAUS T, LENHERT G. Biomonitoring of nickel and chromium in human pulmonary tissue. *Int Arch Environ Health* 1993; 65: 197-200.
- RAITHEL HJ, EBNER G, SCHALLER K, SCHELLMANN B, VALENTIN H.1987. Problems in establishing norm values for nickel and chromium concentrations in human pulmonary tissue. *Am J Ind Med* 1987; 12: 55-70.
- RAITHEL HJ, SCHALLER KH, AKSLEN LA, MYKING AO, MORKVE O, GULSVIK A. Analyses of chromium and nickel in human pulmonary tissue. *Int Arch Occup environ Health* 1989; 61: 507-512.
- RAITHEL HJ, SCHALLER KH, REITH A, SVENES KB, VALENTIN H. Investigations on the quantitative determination of nickel and chromium in human lung tissue. *Int Arch Occup environ Health* 1988; 60: 55-66.
- REES ED, MANDELSTAM P, LOWRY JQ, LIPSCOMB H. A study of the mechanism of intestinal absorption of benzo[a]pyrene. *Biochim. Biophys Acta* 1971; 225: 96-107.
- REN XY, ZHOU Y, ZHANG JP, FENG WH, JIAO BH. Metallothionein gene expression under different time in testicular Sertoli and spermatogenic cells of rats treated with cadmium. *Reprod Toxicol* 2003;17:219-227.
- RIZZATO G, LO CICERO S, BARBERIS M, TORRE M, PIETRA R, SABBIONI E. Trace of metal exposure in hard metal lung disease. *Chest* 1986; 90: 101-106.
- ROSENMAN KD, STANBURY M. Risk of lung cancer among former chromium smelter workers. *Am J Ind Med* 1996; 29: 491-500
- SAIKI M, SALDIVA PH, HAERTEL S.1999. Evaluation of trace elements in lung samples from coal miners using neutron activation analysis. *Biol trace element research*. 71-72: 291-296

- SALNIKOW K., COSTA M. Epigenetic mechanism of nickel carcinogenesis. *J Environ Toxicol Oncol* 2000 ; 19; 307-318.
- SANKARAN B, BHAGAT S, SENIOR AE. Inhibition of P-glycoprotein ATPase activity by beryllium fluoride. *Biochemistry* 1997; 36:6847-6853.
- SARTORELLI P, APREA C, NOVELLI MT, SCIARRA G, MATTEUCCI G. Studio dell'assorbimento cutaneo di idrocarburi policiclici aromatici: modello in vitro con cute di scimmia. In: Ambrosi L. (Ed.) *Atti I Congresso Nazionale A.U.I.M.L. Bernardino Ramazzini, Il rischio chimico professionale ed ambientale*. Bari, 1993: p. 132
- SATARUG S, BAKER JR, REILLY PE, MOORE MR, WILLIAMS DJ. Cadmium levels in the lung, liver, kidney cortex, and urine samples from Australians without occupational exposure to metals. *Arch Environ Health* 2002 ;57:69-77.
- SAVOLAINEN H.1996. Biochemical and clinical aspects of nickel toxicity. *Rev Environ Health*. 11:167-173.
- SCHWAB M. Oncogene amplification in neoplastic development and progression of human cancers. *Crit Rev Oncog* 1990; 2: 35–51.
- SCHWARZ Y, KIVITY S, FISHBEIN A, ABRAHAM JL et al. Evaluation of workers exposed to dust containing hard metals and aluminium oxide. *Am J Ind Med* 1998; 34: 177-182.
- SEEMAN J, WITTIG P, KOLLMEIER H. Trace metal analysis of chromium and nickel in lung tissue fixed and stored in formalin . *Path res pract* 1990; 186: 197-201.
- SHEN HM., ZHANG QF. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ Health Perspect* 1994; 102: 275-282.
- SHI SR, COTE RJ, WU L, LIU C, DATAR R, SHI Y, LIU D, LIM H, TAYLOR CR. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections based on the antigen retrieval principle: heating under the influence of pH. *J Histochem Cytochem* 2002; 50:1005-1011.
- SIMENOVA PP, LUSTER MI. Mechanism of arsenic carcinogenicity: genetic or epigenetic mechanisms? *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19: 281-286.
- SOLOMON E, BORROW J, GODDARD AD. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 1991; 254: 1153–1160.
- SORAHAN T, LISTER A, GILTHORPE MS, HARRINGTON JM. Mortality of copper cadmium alloy workers with special reference to lung cancer and non-malignant diseases of the respiratory system, 1946-92. *Occup Environ Med* 1995; 52: 804-812.

- STAYNER L, SMITH R, THUN M, SCHNORR T, LEMEN R. A dose-response analysis and quantitative assessment of lung cancer risk and occupational cadmium exposure. *Ann Epidemiol* 1992; 2: 177-194.
- STEENLAND K, WARD E. Lung cancer incidence among patients with beryllium disease: a cohort mortality study. *JNCI* 1991; 83: 1380-1385.
- SUGDEN KD, STEARNS DM. The role of chromium (V) in the mechanism of chromate-induced oxidative DNA damage and cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000; 19: 215-230.
- SUGDEN KD., Campo CK., Martin BD. Direct oxidation of guanine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine in DNA by a high-valent chromium complex: a possible mechanism for chromate genotoxicity. *Chem. Res. Toxicol* 2001; 14: 1315-1322.
- SVENES KB, ANDERSEN I. Distribution of nickel in lungs from former nickel workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71:424-428.
- TAKAGI Y, SUGITA K, MUTO M, KATO Y, KOHZAKI K, ENDO O, GOTO S. measurement of polynuclear aromatic hydrocarbons in canine lung after alkaline decomposition. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 793-796.
- TAKEMOTO K, KAWAI H, KAWAHARA T, NISHINA M, ADACHI S. Metal concentrations in human lung tissue, with special reference to age, sex, cause of death, emphysema and contamination of lung tissue. *Int Arch Occup Environ Health* 1991; 62: 579-586.
- TAKIGUCHI M, ACHANZAR WE, QU W, LI G, WAALKES MP. Effects of cadmium on DNA-(cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Exp. Cell Res* 2003. 286, 355–365.
- TAPIO S, GROSCHE B. Arsenic in the aetiology of cancer. *Mutat Res* 2006;612:215-246.
- TOKIWA H, SERA N, HORIKAWA NAKANISHI Y, SHIGEMATU N. The presence of mutagens/carcinogens in the excised lung and analysis of lung cancer induction, *Carcinogenesis* 1993; 14: 1933-1938.
- TORIBA A, KURAMAE Y, CHETIYANUKORMNKUL T. Quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human hair by HPLC with fluorescence detection: a biological monitoring method to evaluate the exposure to PAHs. *Biomed Chromat* 2003; 17: 126-132.
- TSUCHIYAMA F, HISANAGA N, SHIBATA E, AOKI T, TAKAGI H, ANDO T, TAKEUCHI Y. Pulmonary metal distribution in urban dwellers. *Int Arch Occup Environ Health* 1997; 70: 77-84.
- VALLYATHAN V, SHI X, CASTRANOVA V. Reactive oxygen species: Their relation to pneumoconiosis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1998; 106: 1151–1155.

- VAN VAECK L, VAN CAUWENBERGHE K. Deposition and resorption of organic aerosol constituents in the respiratory tract as calculated from particle size distribution data. *Toxicol Environ Chem* 1983; 6: 297-325.
- VANOETEREN C, CORNELIS R. Evaluation of trace elements in human lung tissue: concentration and distribution. *Sci Tot Environ* 1986; 54: 217-230.
- Von BOHLEN A, KLOCKENKAMPER R, OTTO H, TOLG G, WIECKEN B. Qualitative survey analysis of thin layers of tissue samples. *Int Arch Occup Environ Health* 1987; 59: 403-411.
- WAALKES, MP. Cadmium carcinogenesis in review. *J Inorg Biochem* 2000; 79: 241–244.
- WAISBERG M, JOSEPH P, HALE B, BEYERSMANN D. Molecular and cellular mechanism of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003; 192: 95-117.
- WANG S, SHI X. Mechanisms of Cr(VI)-induced p53 activation: the role of phosphorylation, mdm2 and ERK. *Carcinogenesis* 2001; 22:757-762.
- WARD E, OKUN A, RUDER A, FINGERHUT M, STEENLAND KA. Mortality study of workers at seven beryllium processing plants. *Am J Ind Med* 1992; 22: 885-904.
- WESTER PO, BRUNE D, NORDBERG G. Arsenic and selenium in lung, liver, and kidney tissue from dead smelter workers. *Br J Ind Med* 1981;38:179-184.
- ZHUANG GS, WANG YS, TAN MG, ZHI M, PAN WQ, CHENG YD. Preliminary study of distribution of the toxic elements As, Cd and Hg in human hair and tissues by RNAA. *Biol Trace Elem Res* 1990; 27: 729-736.
- ZIKIC RV, STAJN AS, OGNJANOVIC B, SAICIC ZS, KOSTIC MM, PAVLOVIC SZ, PETROVIC VM,. The effect of cadmium and selenium on the antioxidant enzyme activities in rat heart. *J. Environ. Pathol Toxicol Oncol* 1998; 17: 259–264.

