



# UNIVERSITÀ DI PARMA

## UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE MEDICHE CHIRURGICHE E  
TRASLAZIONALI

CICLO XXXVII°

### “EXPOASMA”

Inquinamento ed esposoma:

ricerca di indicatori di effetto

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Nicola Sverzellati

Tutor:

Chiar.ma Prof.ssa Roberta Andreoli

Dottoranda: Dott.ssa Chiara Maccari

Anni Accademici 2021/2022 – 2023/2024



## Sommario

<b>Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Introduzione</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Inquinamento ambientale</b> .....	<b>10</b>
<b>1.2 Stress ossidativo</b> .....	<b>18</b>
1.2.1 Lipidi.....	26
1.2.2 Proteine.....	27
1.2.3 Acidi nucleici.....	28
1.2.4 Fonti di stress ossidativo.....	30
1.2.5 Potenziale ossidativo.....	32
<b>1.3 Valutazione ambientale</b> .....	<b>35</b>
<b>1.4 Patologie respiratorie</b> .....	<b>38</b>
<b>1.5 Asma</b> .....	<b>43</b>
1.5.1 Eziologia dell'asma.....	48
1.5.2 Patogenesi dell'asma.....	50
1.5.3 Aspetti clinici.....	52
1.5.4 Diagnosi dell'asma.....	53
1.5.5 Terapia.....	55
1.5.6 Prognosi.....	56
<b>1.6 Monitoraggio biologico e Biomarkers</b> .....	<b>56</b>
<b>1.7 Polimorfismi genetici</b> .....	<b>65</b>
1.7.1 polimorfismi metabolici.....	69
<b>1.8 HMGB-1, High Mobility Group Box 1</b> .....	<b>74</b>
<b>2 Scopo</b> .....	<b>78</b>
<b>3 Materiali e metodi</b> .....	<b>80</b>
<b>3.1 Soggetti da reclutare durante la fase di arruolamento</b> .....	<b>83</b>
<b>3.2 Questionario</b> .....	<b>87</b>
<b>3.3 Analisi UHPLC-MS/MS</b> .....	<b>89</b>
3.3.1 protocollo UHPLC-MS/MS.....	94
<b>3.4 Analisi GC-MS</b> .....	<b>95</b>
3.4.1 Protocollo GC-MS.....	97

<b>3.5</b>	<b>Creatinina .....</b>	<b>99</b>
<b>3.6</b>	<b>Polimorfismi .....</b>	<b>100</b>
3.6.1	Protocollo isolamento .....	102
3.6.2	PCR multiplex .....	104
3.6.3	Protocollo PCR-RFLP .....	106
<b>3.7</b>	<b>TEST E.L.I.S.A HMGB-1 .....</b>	<b>109</b>
3.7.1	Protocollo E.L.I.S.A. ....	111
<b>3.8</b>	<b>Statistica descrittiva .....</b>	<b>113</b>
3.8.1	Popolazione generale .....	113
3.8.2	Popolazione adulta .....	115
3.8.3	Popolazione bambini.....	117
<b>3.9</b>	<b>Analisi statistica.....</b>	<b>119</b>
<b>4</b>	<b><i>Risultati e discussione</i> .....</b>	<b>121</b>
<b>4.1</b>	<b>Soggetti adulti (AS vs AA) .....</b>	<b>122</b>
4.1.1	T di student per dati indipendenti .....	122
4.1.2	Modello lineare generalizzato - GLM .....	126
4.1.3	Analisi delle componenti principali PCA .....	134
4.1.4	Correlazioni.....	138
<b>4.2</b>	<b>Soggetti bambini .....</b>	<b>142</b>
4.2.1	T di studenti.....	142
4.2.2	GLM – modello lineare generalizzato .....	145
4.2.3	PCA.....	151
4.2.4	Correlazione.....	155
<b>4.3</b>	<b>Fattori confondenti.....</b>	<b>158</b>
4.3.1	Asma allergica .....	158
4.3.2	Sesso ed età .....	159
4.3.3	BMI .....	160
4.3.4	Fumo .....	162
<b>4.4</b>	<b>Effetto dei polimorfismi .....</b>	<b>165</b>
<b>5</b>	<b><i>Conclusioni</i>.....</b>	<b>167</b>
<b>6</b>	<b><i>Bibliografia</i>.....</b>	<b>169</b>



## Abstract

Questo progetto di dottorato dal titolo “inquinamento ed esposoma: ricerca indicatori d’effetto” è basato sul progetto EXPOASMA che è uno studio finanziato dalla fondazione Cariparma.

Lo studio è di tipo osservazionale e ha come obiettivo primario quello di studiare e descrivere la stretta relazione tra il problema emergente dell’aumento di inquinanti nell’aria e la salute della popolazione generale con particolare attenzione ai soggetti più fragili.

L’inquinamento ambiente è un fenomeno estremamente complesso, eterogeneo e multifattoriale; a questo c’è da aggiungere che anche i fattori connessi con esso svolgono un ruolo importante nella sua composizione ed influenzano la sua potenza.

Le fonti stesse d’inquinamento sono le più svariate tra cui le attività industriali e il traffico urbano, che sono attività in grado di generare vari tipi di inquinanti che a loro volta possono scatenare danni infiammatori, diretti e indiretti a carico dei tessuti, promuovendo sintomi allergici, anche gravi, e interferendo con risposta farmacologica.

Il problema delle patologie respiratorie riguarda circa il 40% della popolazione mondiale, con un impatto significativo sulla qualità della vita per coloro che ne soffrono ed un forte impatto anche economico a livello di salute pubblica (Traina et al, 2020)<sup>1</sup>.

Le manifestazioni cliniche più comuni sono rari sono la rinocongiuntivite allergica e l’asma esacerbata da fattori genetici e ambientali che possono alterare lo sviluppo polmonare in bambini e adolescenti portando ad un esordio precoce della patologia.

In questo contesto fattori epigenetici, meccanismi cellulari e molecolari agiscono, direttamente o indirettamente, già nel periodo prenatale e possono contribuire negativamente sullo sviluppo del feto e di conseguenza poi sulla qualità della vita.

Un altro attore di questo studio è lo stress ossidativo che al pari dell’inquinamento è un fenomeno molto eterogeneo e può essere generato da molte fonti, ma di base è sempre uno squilibrio dell’omeostasi cellulare.

Lo studio si pone come obiettivo primario il dosaggio dei livelli di specifici indicatori di esposizione a contaminanti ambientali comuni con una successiva analisi dell’eventuale correlazione tra gli indicatori di infiammazione e gli indicatori di esposizione in soggetti sani e

asmatici, insieme alla correlazione tra la quota di marcatori di effetto quantificati in questa coorte e le loro percentuali di mutazione a casa di geni specifici coinvolti nella biotrasformazione.

Al fine di quantificare i biomarkers utili per indagare queste differenze sono state utilizzate tecniche analitiche avanzate come UHPLC-MS/MS e GC-MS per i markers d'effetto e d'esposizione, mentre i biomarkers di suscettibilità sono stati indagati tramite PCR sia PCR multiplex che PCR-RFLP; infine, HMGB-1 è stato quantificato con kit E.L.I.S.A.

La popolazione reclutata è composta da due macro gruppi adulti e bambini, ogni gruppo è composto da soggetti sani e soggetti asmatici con un rapporto 2:1 tra sano e asmatico ed anche tra adulto e bambino.

Lo studio ha evidenziato una differenza tra soggetti sani ed asmatici sia negli adulti che nei bambini in termini di escrezione urinaria soprattutto di indicatori di danno agli acidi nucleici ma anche in termini di metaboliti degli inquinanti soprattutto nella popolazione adulta.

Essendo il problema molto eterogeneo e multifattoriale prima di valutare di valutare i dati è importante individuare quali sono i fattori confondenti per confermare che la differenza è significativa e attribuibile davvero alla patologia.

I risultati ottenuti hanno evidenziato come il fumo sia in grado di influenzare le concentrazioni urinarie di alcuni indicatori in particolare il benzene ed un suo metabolita sia nei soggetti adulti fumatori attivi sia nei bambini esposti a fumo passivo, tale effetto risulta essere più marcato nei soggetti asmatici.

In conclusione, con questo studio sono state osservate differenze statisticamente significative nelle concentrazioni urinarie di indicatori di esposizione e di effetto nella popolazione adulta stratificando per stato di salute, in particolare più elevate nei soggetti asmatici.

Nella popolazione dei bambini è stato confermato che i soggetti asmatici tendono ad eliminare concentrazioni maggiori di indicatori di inquinamento ambientale e di danno ossidativo e di metilazione agli acidi nucleici rispetto ai soggetti sani.

# 1 Introduzione

La vita di un ricercatore è sempre dedicata al pensiero scientifico, la sua forma mentis è legata al porsi quesiti e formulare ipotesi, ma soprattutto su quelle ipotesi cercare risposte e la motivazione ad esse attraverso un processo strutturato di osservazione, raccolta dati, interpretazione dei dati e validazione degli stessi.

Il motivo che spinge un ricercatore a intraprendere, durante tutta la sua vita lavorativa, continui viaggi partendo da ipotesi per raggiungere conclusioni è da un lato la voglia di conoscenza ma anche la voglia di poter condividere e divulgare nuove conoscenze, non solo utili nella vita quotidiana delle persone, ma anche atte a migliorarne la stessa.

A questo serve la ricerca scientifica: rendere evidente attraverso l'interpretazione dei dati cosa determinano le attività quotidiane nella vita delle persone e degli esseri viventi in generale.

Ricerca è pensare, studiare, analizzare, sperimentare, sbagliare e ripetere, ma tutto secondo un processo strutturato con lo scopo finale di riuscire a far emergere meccanismi incogniti o semplicemente approfondire la conoscenza su un argomento.

E' nell'essenza dell'essere ricercatore la costante voglia di sapere e la spiccata curiosità di comprendere e divulgare conoscenza; per rispondere a queste necessità il ricercatore crea un disegno sperimentale, raccoglie dati, osserva e sperimenta, in modo da articolare una risposta a supporto dell'ipotesi iniziale, tenendo presente che nell'analisi sperimentale ciò che accade spesso, durante percorso scientifico, è che sorgano nuove domande e si aprano nuovi spiragli.

La mente del ricercatore, da sempre, è alla ricerca di una spiegazione scientifica ad ogni evento ed è il motivo per cui dopo la laurea ho continuato a fare ricerca.

Le domande alla base di questo progetto nascono dal vivere in Pianura Padana, uno dei luoghi più inquinati d'Europa:

Quali e quanti degli inquinanti presenti nell'aria che respiriamo vengono assorbiti dal nostro organismo e metabolizzati? Ci sono delle differenze tra individuo e individuo? Le patologie dell'apparato respiratorio, visto che quest'ultimo è la porta d'accesso, che influenza hanno sull'assorbimento degli inquinanti?

Il progetto legato a questa tesi è nato proprio dalla volontà di rispondere a queste domande.

## EXPOASMA

EXPOASMA è l'acronimo di questo studio dal titolo "inquinamento ed esposoma: ricerca indicatori d'effetto".

Lo studio è uno studio osservazionale che vuole studiare e descrivere la stretta relazione tra il problema emergente dell'aumento di inquinanti nell'aria e la salute della popolazione generale con particolare attenzione ai soggetti più fragili.

La comprensione del fenomeno è un importante punto di partenza per attuare misure preventive al fine di preservare la salute dei cittadini e monitorare con maggior attenzione i soggetti più a rischio relativamente ai danni derivati dall'inquinamento; per comprendere è essenziale utilizzare un approccio multidisciplinare che possa indagare da diversi punti di vista e con diversi strumenti un fenomeno così complesso ed articolato.

Già dal titolo è possibile evincere che il focus del progetto ha l'intento di descrivere come e quanto la popolazione è esposta agli inquinanti e l'effetto che questi ultimi hanno sull'omeostasi, sui livelli di stress ossidativo, sulla salute di soggetti sani ma anche di soggetti affetti da asma bronchiale.

È indubbio e di conoscenza ormai comune che negli ultimi anni i livelli degli inquinanti sono aumentati, il loro aumento è intrinsecamente legato all'evoluzione umana e alla progressiva urbanizzazione ma anche all'evoluzione dell'industrializzazione.

E' necessario però sottolineare che se è vero che se la concentrazione degli inquinanti nell'atmosfera è aumentata è anche vero che parallelamente a ciò, c'è stato un aumento delle conoscenze sulla natura degli inquinanti, intesi come composti e molecole con proprietà intrinseche, e quindi la capacità di rilevarli.

La maggiore possibilità di isolare nuovi composti ha mostrato nei dati un aumento della concentrazione, ma in realtà, questi composti probabilmente in quantità minore e con una

natura leggermente diversa, erano presenti anche in passato, semplicemente non venivano quantificati.

L'evoluzione dell'industrializzazione ha portato ad una modifica nella composizione degli inquinanti ma parallelamente lo sviluppo delle conoscenze, in questo ambito, ha portato alla luce la natura degli stessi e condotto alla scoperta di effetti nocivi che in passato erano ignoti con la conseguenza che sostanze fino a poco tempo fa considerate sicure sono state riclassificate come nocive, possibili cancerogene o anche cancerogene certe.

Come conseguenza di queste nuove conoscenze negli ultimi anni si sta ponendo sempre più attenzione alle esposizioni croniche a basse dosi, studiando la natura degli inquinati si è osservato che la nocività di sostanze, non è solamente in relazione alla quantità a cui si è esposti in acuto, ma è anche correlata alla durata dell'esposizione, in quanto un'esposizione a dosi, in acuto considerate non nocive, può diventare pericolosa quando il lungo lasso di tempo di esposizione porta sia ad accumulo della sostanza nel nostro organismo fino ad arrivare a concentrazioni nocive, sia ad un insulto continuo che il nostro corpo non avendo a disposizione il tempo necessario per attivare i processi di riparazione, arriva ad avere un danno che altera l'omeostasi cellulare; per questo motivo l'esposizione cronica a basse dosi agli inquinanti ambientali merita di essere indagata esattamente come le più note esposizioni massive in un lasso di tempo breve.

La scienza negli anni precedenti si è concentrata giustamente sull'individuazione della concentrazione soglia d'esposizione e sulle capacità di arrecare danno da parte dei tossici, portando poi l'ambito legislativo a muoversi in questa direzione e definire i limiti di emissione di esposizione sia in ambito industriale e lavorativo, che in relazione alla popolazione generale, ma ora è di rilevante importanza indagare anche l'esposizione cronica a basse dosi poiché sta diventando un problema emergente che intacca la salute della popolazione generale.

Al fine di raggiungere l'obiettivo prefissato è importante in prima istanza conoscere a fondo ogni aspetto del problema ed ogni attore coinvolto in questo processo.

## 1.1 Inquinamento ambientale

“Ogni modificazione dell'aria atmosferica, dovuta all'introduzione nella stessa di una o di più sostanze in quantità e con caratteristiche tali da ledere o da costituire un pericolo per la salute umana o per la qualità dell'ambiente oppure tali da ledere i beni materiali o compromettere gli usi legittimi dell'ambiente” (D.Lgs.n.152, 2006).<sup>2</sup>

Il decreto legislativo n.152 è entrato in vigore per la sua prima parte nell'aprile del 2006 e per la seconda parte nell'agosto dello stesso anno, con l'intento di definire e regolamentare il fenomeno dell'inquinamento atmosferico, fino al 2006 la legislazione precedente considerava quasi esclusivamente i fenomeni relativi ai rifiuti ed alla contaminazione delle acque, ma l'avanzare dell'industrializzazione ha reso necessario una regolamentazione in termini di emissioni, inoltre lo sviluppo della scienza ha fornito gli strumenti necessari per conoscere e descrivere gli effetti di molte sostanze rendendo così necessario un loro controllo ed una loro classificazione in base alle conoscenze acquisite.

L'inquinamento altera un mezzo in modo tale da renderlo dannoso per le persone o per la natura, può avere un'origine varia e anche il suo effetto può essere locale o a lungo raggio; Il rapporto «Segnali 2020» dell'EEA (European Environmental Agency) osserva l'inquinamento attraverso diverse prospettive legate al lavoro dell'Agenzia e alla normativa UE

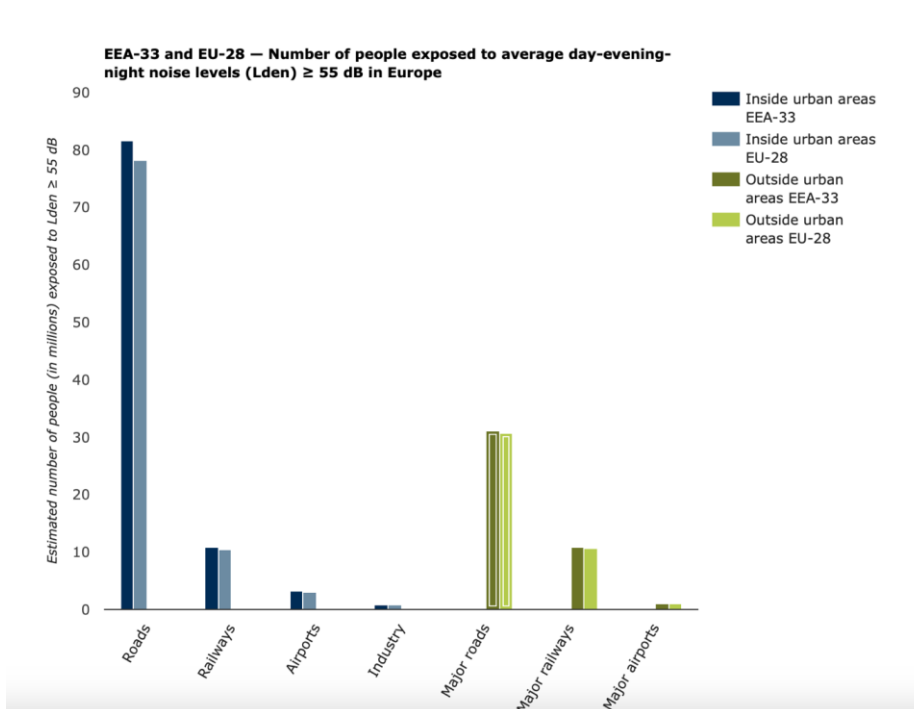


Figura 1 Grafico riportato nel rapporto della EEA2020 dove si analizza il numero persone esposte giornalmente nelle diverse aree cittadine

Il pensiero comune identifica, banalmente, l'inquinamento con le emissioni delle attività industriali, considerando come sostanze tossiche dell'aria gli scarti di produzione, ma in realtà la situazione è diametralmente diversa; infatti al contrario di ciò che è il pensiero comune i dati, come si può vedere anche nel grafico pubblicato dall'EEA, mostrano che le sostanze tossiche nell'aria contribuiscono in piccolissima percentuale, come numero di persone esposte, in realtà, infatti, il numero maggiore di individui esposti ad inquinanti è correlato al traffico veicolare all'interno dei centri urbani.

L'inquinamento ambientale è definito come la presenza in un determinato ecosistema di sostanze tossiche che possono essere nocive per l'uomo, per gli animali e per la vegetazione; queste sostanze, dette per l'appunto inquinanti, sono in grado di alterare i componenti dell'ecosistema stesso come l'acqua, il suolo e la composizione dell'aria stessa.

La natura dell'inquinamento può essere di due origini:

- Naturale: generato quindi dall'ambiente stesso, per lo più dall'attività dei vulcani, ed è di entità nettamente minore.
- Causato dalle attività umane: tutte le attività che l'uomo ha svolto e svolge per la sopravvivenza e per aumentare il suo livello di benessere.

L'inquinamento causato dalle attività umane è quello che maggiormente è preso in considerazione nello studio per l'effetto nocivo sia sull'ambiente che sulla popolazione, questo tipo di attività rilasciano nell'ambiente sostanze tossiche che vengono poi classificate in base al componente quindi aria, acqua o suolo su cui agiscono, oppure in base alla loro natura, che sia essa di natura chimica, biologica, radioattiva, fisica o acustica.

Il problema sanitario più urgente è nei grandi centri urbani, da quelli con alta densità abitativa a quelli con importanti zone industriali, dove l'inquinamento atmosferico è principalmente prodotto da impianti di riscaldamento domestico, motorizzazione e attività industriali.

Una città di questo tipo immette quotidianamente tonnellate di anidride solforosa, di polveri in sospensione, di idrocarburi, di ossidi di azoto ed il dosaggio di queste sostanze è utilizzato, con il rispettivo valore assoluto, per valutare la qualità dell'aria e l'evoluzione temporale di queste concentrazioni e consente di valutare sia la qualità dell'aria che la potenziale tossicità derivante da quest'ultimi.

Queste sostanze una volta riversate nell'aria grazie ai moti convettivi vengono portate verso l'alto e poi disperse dalle correnti atmosferiche; questi moti convettivi di origine ascensionale sono dovuti al gradiente di temperatura fra il suolo e le quote alte dell'atmosfera, questo fenomeno è la causa della dispersione degli inquinanti atmosferici.

Ci sono poi particolari condizioni meteorologiche dove negli strati superiori dell'atmosfera si riscontrano temperature più elevate rispetto a quelli inferiori (inversione termica) e quindi i moti convettivi si invertono, non si verifica più il moto ascensionale dell'aria, motivo per cui a una certa quota che può essere anche di poche centinaia di metri, si forma una barriera che impedisce ai gas e alle particelle di sfuggire innalzandosi, la conseguenza di questo fenomeno crea un comparto isolato tra suolo e strati superiori dell'atmosfera, nel quale non circola l'aria e gas e polveri si accumulano, creando concentrazioni che possono superare i livelli di pericolosità, specie per la presenza di anidride solforosa, di ossidi di azoto e di sostanze tossiche volatili.

Non sempre gli inquinanti che vengono versati nell'atmosfera agiscono nella forma in cui vengono emessi, essi infatti possono modificarsi o interagire tra di loro per dare origine ad altri prodotti, detti inquinanti secondari, che in alcuni casi risultano anche più tossici.

Gli inquinanti considerati più pericolosi per la salute dell'uomo sono: gli ossidi di zolfo (SO<sub>x</sub>), gli ossidi di azoto (NO<sub>x</sub>), il monossido di carbonio (CO), l'ozono (O<sub>3</sub>), il benzene (C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>), gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), i metalli pesanti (come il Pb) ed il particolato atmosferico (PM); gli effetti dell'ozono, forma allotropica dell'ossigeno ed inquinante fotochimico, si palesano quando la radiazione solare reagisce con inquinanti già presenti nell'aria; per questo il motivo durante il periodo estivo si osserva una correlazione positiva tra quest'ultimo ed i livelli degli altri inquinanti, correlazione che invece non è presente durante il periodo invernale (Enweasor et al. 2021)<sup>3</sup>.

Il particolato atmosferico, PM, un insieme di polveri sottili, è una delle minacce più rilevanti la salute umana, in particolare nelle aree urbane; la pericolosità è legata alla sua natura poiché è formato da particelle microscopiche che si trovano nell'aria e sono in grado di trasportare altri contaminanti, tipo gli idrocarburi policiclici aromatici o i metalli, incrementando gli effetti nocivi.

I PM vengono classificati in base alla loro dimensione in PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>, PM<sub>1</sub> dove il numero indica il diametro aerodinamico di questa particella, il PM<sub>10</sub> possiamo ritrovarlo in atmosfera

o può essere il risultato di processi di combustione e per questo viene considerato particolato primario o secondario, questo particolato permane in atmosfera per un lungo periodo e, pertanto, rappresenta un indicatore della qualità dell'aria, in quanto soggetto a fenomeni di rimescolamento, provocati da eventi meteorologici che ne comportano il trasporto a grandi distanze o deposito al suolo.

Tra gli inquinanti, oltre alle polveri sottili, ci sono anche altre sostanze che hanno un ruolo rilevante per la salute come gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), sono inquinanti ubiquitari di derivazione antropica e generati da combustioni incomplete di combustibili fossili; queste sostanze risultano essere tossiche ed in alcuni casi anche cancerogene.

Appartenenti alla classe degli IPA e di interesse per una caratterizzazione del fenomeno troviamo:

- Il benzene, composto chimico liquido e idrocarburo aromatico monociclico. È un costituente naturale del petrolio e porta alla formazione del IDROQUINONE, il quale induce stress ossidativo e in casi più gravi può arrecare danni all'espressione della proteina tumorale p53, che regola il ciclo cellulare ed è un gene oncosoppressore; questa sostanza è associata all'emissione del traffico veicolare, motivo per cui ne funge da marcatore ed è inoltre uno dei maggiori costituenti del fumo di tabacco. Il benzene una volta che entra in circolo subisce il processo di metabolizzazione ed i suoi prodotti sono in acido trans,trans-muconico (tt-MA) e acido-S-fenilmercapturico (SPMA); questi due composti sono il prodotto di un meccanismo che parte dall'ossidazione del benzene, ad opera del citocromo P-450, a composti fenolici. Questi metaboliti sono poi eliminati nelle urine e la concentrazione urinaria del tt-MA rappresenta circa 2-25% e del benzene con cui il soggetto è venuto a contatto, mentre quella del SPMA rappresenta circa l'1-2%.

I metaboliti del benzene non sono solo un prodotto di scarto ma giocano un ruolo cruciale nel determinare la tossicità del benzene inducendo sia alcalinizzazione del DNA che stress ossidativo e arrivando a determinare disordini sistemici come sonnolenza, vertigini, senso di stordimento, tachicardia, tremori, stato confusionale, fino alla morte. Il processo di metabolizzazione è però affetto da variabilità individuale e nel caso del benzene è rappresentata chimicamente dal SPMA, poiché questo è un anello benzenico coniugato con il glutatione che è presente in diversi isoenzimi.

- Il toluene è un idrocarburo aromatico e viene usato come solvente in sostituzione al benzene in quanto meno tossico, non ha effetti mutageni, soprattutto nei diluenti per vernici ma è anche presente nella benzina.

La minor tossicità rispetto al benzene è dovuta alle differenze nel processo di metabolizzazione durante il quale il toluene viene ossidato non sull'anello, come il benzene, ma principalmente sulla catena laterale, questo avviene a causa dell'enzima monoossigenasi P450 che possiede un'elevata selettività per il gruppo metile del toluene. Grazie a questa selettività, l'ossidazione produce molti meno epossidi, che sono i composti responsabili dell'effetto cancerogeno attribuito al benzene; piccole quantità di epossido si formano comunque ma, vengono ulteriormente ridotte dalla coniugazione con il glutatione e da riarrangiamenti spontanei a fenolo o dall'idrolisi enzimatica a dioli.

Infine, come ultimo step del processo di metabolizzazione, il toluene viene convertito nei suoi principali metaboliti l'acido benzoico e l'acido ippurico, che vengono eliminati nelle urine insieme a piccole quantità di o-cresolo.

- Il naftalene, idrocarburo aromatico biciclico, è impiegato nell'industria chimica nell'ambito della sintesi, si ritrova nei preparati utilizzati come insetticida contro le tarme, essendo quindi un composto di uso comune l'esposizione ad esso è semplice e la sua presenza nell'organismo può danneggiare o peggiorare la citotossicità e fisiologia dei tessuti.
- Lo stirene è un monomero che appartiene alla famiglia degli idrocarburi aromatici presente in petrolio, gas naturale e a bassa concentrazione anche in alimenti, anche la sua esposizione è abbastanza comune

In generale comunque tutti gli inquinanti hanno una rilevanza tossicologica e attivano una risposta immunitaria insieme ad altri fattori di rischio come esposizione ad allergeni, dieta povera di vitamina C, E, acidi grassi, omega 3 ed i fattori perinatali; questo poiché il materiale inquinante depositato nell'apparato respiratorio può sia agire tramite i neuro recettori presenti nelle vie respiratorie superiori sia provocare una risposta adattiva dopo l'interazione con i diversi tipi cellulari quali cellule epiteliali e macrofagi (D'Amato G et al. 2000)<sup>4</sup>.

In base alla loro origine, gli inquinanti dell'aria possono raggrupparsi in: inquinanti da impianti di riscaldamento domestico, inquinanti da motorizzazione e inquinanti da impianti industriali.



Figura 2 Descrizione inquinanti ([https://www.eea.europa.eu/it/segnali/segnali-2020/infografica/che-cos2019e-l2019inquinamento/image/image\\_view\\_fullscreen](https://www.eea.europa.eu/it/segnali/segnali-2020/infografica/che-cos2019e-l2019inquinamento/image/image_view_fullscreen))

Ogni attività dell'uomo in misura diversa inquina, ogni azione umana trasforma una sostanza trovata in natura in un'altra sostanza necessaria alla vita dell'uomo, ma dalla trasformazione non ne deriva solo la nuova sostanza ma anche residui che vengono liberati nell'aria più comunemente chiamate emissioni, alcune di queste vengono da sempre considerate irrilevanti nella complessità dell'azione inquinante, ma non bisogna dimenticare che anche queste contribuiscono al conto totale delle sostanze presenti nell'atmosfera.

Dopo decenni in cui le emissioni sono state in costante aumento, negli ultimi due decenni i livelli di inquinamento atmosferico sono diminuiti, con un conseguente miglioramento della qualità dell'aria; ma nonostante questa variazione positiva, l'inquinamento atmosferico rimane il più grande rischio ambientale per la salute in Europa.

L'esposizione a livelli al di sopra delle raccomandazioni dell'Organizzazione mondiale della sanità di particolato fine e di biossido di azoto hanno causato nel 2021, rispettivamente, circa 253.000 e 52.000 morti premature; questi inquinanti hanno effetti maggiori in soggetti affetti da asma, malattie cardiache e ictus (sito organizzazione mondiale).

Oltre all'aumento di morti premature, in particolare in soggetti affetti di patologie dell'apparato respiratorio, l'inquinamento atmosferico è anche un fattore di co-morbilità, in persone che sono affette da malattie legate all'esposizione ad inquinamento atmosferico;

questo effetto dell'inquinamento è un onere in termini di sofferenza personale ma anche in termini di costi significativi per il settore sanitario.

Oltre ai soggetti affetti dalle patologie appena citate, vanno attenzionati anche le persone più vulnerabili della società perché più suscettibili agli impatti dell'inquinamento atmosferico, infatti i soggetti appartenenti a gruppi socio-economici più bassi tendono ad essere esposti a livelli più elevati di inquinamento, mentre le persone anziane, i bambini insieme a quelli con condizioni di salute precarie sono più suscettibili, a causa di ciò si stima che oltre 1.200 morti in persone di età inferiore ai 18 anni siano causati dall'inquinamento atmosferico ogni anno nei paesi membri e collaboratori del SEE (Spazio Economico Europeo) sito.

Oltre ai problemi sanitari che sono ingenti ed in aumento, l'inquinamento atmosferico può avere un impatto considerevole sull'economia europea a causa non solo dell'aumento dei costi sanitari, della riduzione dell'aspettativa di vita e della perdita di giorni lavorativi in tutti i settori, ma anche danneggiando la vegetazione, gli ecosistemi, la qualità dell'acqua, del suolo, portando ad una minor produzione di risorse e sviluppo economico.

Dal dibattito in corso sul cambiamento climatico emergono due termini rilevanti "adattamento" e "mitigazione", che creano co-benefits sia per la salute della comunità sia per l'individuo, promuovendo comportamenti sani e riducendo i rischi di esposizione. In particolare, l'adattamento si riferisce alla capacità di adeguarsi ad un cambiamento per moderare il danno potenziale o le conseguenze, mentre la mitigazione consente di eliminare o ridurre il rischio e il pericolo sulla salute.

Visto il dibattito in corso ed il crescente utilizzo di questi due termini applicati nel campo dei cambiamenti climatici e la stessa EEA a darne definizione:

"Adattamento significa anticipare gli effetti avversi dei cambiamenti climatici e adottare misure adeguate per prevenire o ridurre al minimo i danni che possono causare oppure sfruttare le opportunità che possono presentarsi. Esempi di misure di adattamento sono modifiche infrastrutturali su larga scala, come la costruzione di difese per proteggere dall'innalzamento del livello del mare, e cambiamenti comportamentali, come la riduzione degli sprechi alimentari da parte dei singoli. In sostanza, l'adattamento può essere inteso come il processo di adeguamento agli effetti attuali e futuri dei cambiamenti climatici."

Da questa definizione è possibile evincere come il concetto chiave che si vuole esprimere con questo termine sia legato ad una modifica dello stato attuale come la costruzione di infrastrutture adeguate, la sostituzione o modifica di alcuni processi ed il cambiamento sia a livello mentale che di comportamento da parte dell'uomo, tutto al fine di evitare o prevenire future emissioni o eventi catastrofici.

“Mitigazione significa rendere meno gravi gli impatti dei cambiamenti climatici prevenendo o diminuendo l'emissione di gas a effetto serra (GES) nell'atmosfera. La mitigazione si ottiene riducendo le fonti di questi gas (ad esempio mediante l'incremento della quota di energie rinnovabili o la creazione di un sistema di mobilità più pulito) oppure potenziandone lo stoccaggio (ad esempio attraverso l'aumento delle dimensioni delle foreste). In breve, la mitigazione è un intervento umano che riduce le fonti delle emissioni di gas a effetto serra e/o rafforza i pozzi di assorbimento.”

Nella mitigazione invece lo scopo non è evitare ma ridurre l'impatto di eventi inquinanti ormai inevitabili, in questo caso quindi le risorse son usate con moderazione e non miglior modo possibile.

Il dibattito sull'inquinamento e il cambiamento climatico sono molto attuali, tantissimi aspetti, interazioni sono state approfondite e sono, quindi, diventate comunemente note alla popolazione ma ci sono ancora alcuni aspetti che meritano di essere indagati, in particolare quelli legati alla salute e agli effetti indiretti a lungo termine.

Il problema è eterogeneo e multifattoriale per questo motivo non può essere affrontato da un solo punto di vista, ma deve essere affrontato valutando contemporaneamente più variabili, non basta indagare la natura dei singoli inquinati ed i loro singoli effetti avversi. Valutare l'effetto singolarmente di un agente inquinante non permette di prendere in considerazione che le sostanze nocive sono sempre presenti in miscela e incidono in modo sinergico sul corpo umano inoltre utilizzando questo approccio non si valutano tutti quei piccoli effetti secondari che incidono considerevolmente nell'alterazione dell'omeostasi cellulare.

Siamo quotidianamente esposti non solo ad inquinanti più o meno tossici ma anche a sostanze ossidanti che in modo sinergico provocano negli organismi umani stress ossidativo.

## 1.2 Stress ossidativo

Gli organismi viventi sono continuamente esposti ad una miriade di agenti dannosi per il DNA, i quali possono avere un impatto sulla salute e modulare gli stati di malattia. La conservazione delle informazioni sulla sequenza genomica è fondamentale per la perpetuazione della specie e nell'ereditarietà, ma nello stesso tempo la mutagenesi gioca un ruolo indispensabile nel suo mantenimento, nell'evoluzione e nella diversità, ma è anche implicata nell'invecchiamento, nella genesi del cancro e in alcune patologie umane. Tuttavia, le cellule sono dotate di sistemi complessi quali riparazione del DNA, tolleranza ai danni, checkpoint del ciclo cellulare e meccanismi di morte cellulare, che nel complesso permettono di ridurre le conseguenze deleterie del danno al DNA.

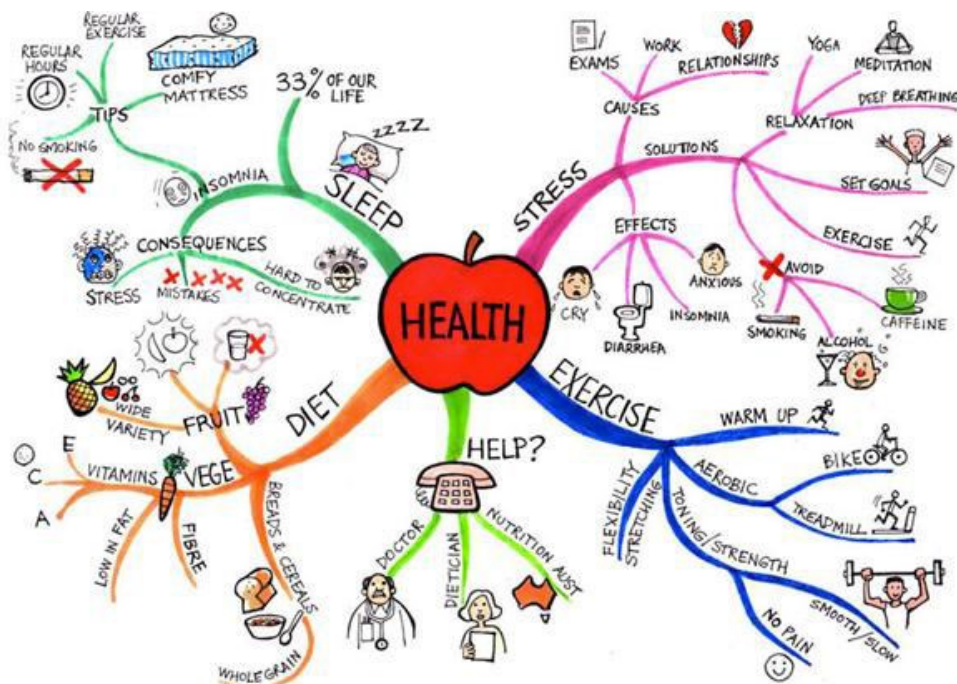


Figura 3 <https://www.centrostressossidativo.it/razionale/stress-ossidativo/salute/>

L'inquinamento contribuisce in varia misura ad alterare lo stato di salute assieme ad uno stile di vita non corretto, ad un'alimentazione priva di regole, all'abuso di bevande alcoliche, alla sedentarietà, al fumo, tutti questi elementi costituiscono i principali fattori di rischio "prevenibili" per morbilità e mortalità.

A questi fattori di rischio prevedibili si aggiungono vari agenti fisici, come radiazioni e campi elettromagnetici, agenti chimici, quali inquinanti, pesticidi e metalli pesanti ed agenti infettivi,

come virus e batteri, che possono alterare l'omeostasi dell'organismo a vari livelli; l'insieme di tutti questi possono contribuire a generare maggiori quantità di radicali liberi.

In genere scorrette abitudini alimentari si associano, a scarso apporto di sostanze antiossidanti, un cofattore cruciale che può generare lo sbilanciamento omeostatico che evolve in stress ossidativo.

La possibilità di valutare lo stato REDOX dell'organismo, anche in condizioni di apparente assenza di malattie può consentire di mettere in atto programmi di interventi sullo stile di vita, specie delle abitudini alimentari, utili a prevenire o a rallentare la comparsa di molteplici patologie.

In condizioni fisiologiche, nella cellula, la produzione di ROS è controllata da meccanismi omeostatici, infatti una volta che questi si sono formati intervengono i meccanismi di scavenger mediati da enzimi antiossidanti (catalasi, glutatone redattasi) che sono in grado di convertire le specie reattive in  $O_2$  e  $H_2O$ , ma quando il livello di ROS eccede la capacità di neutralizzazione da parte dei sistemi antiossidanti, si verifica, per l'appunto la condizione denominata stress ossidativo, ovvero quella condizione in cui le difese antiossidanti dei tessuti sono superate dalla reattività dei radicali liberi.

Il problema è molto complesso e quindi non basta considerare i fattori appena elencati ma è l'importante anche andare a considerare lo stress causato dal ritmo pressante dello stile di vita attuale e molteplici situazioni quotidiane, tipiche della vita della maggior parte delle persone dei paesi industrializzati.

Lo stress ha un ruolo ben definito a livello fisiologico e costituisce una reazione importante e salvifica dell'organismo nelle situazioni di pericolo, sia fisico che psicologico, ma se tale condizione è prolungata produce effetti che a lungo termine risultano essere del tutto negativi; sono proprio questi stati di stress prolungati e non fisiologici che producono grandi quantità di radicali liberi che il nostro organismo non è più in grado di bilanciare e generano, di conseguenza, deterioramento fisico e mentale, in questo caso sono gli stessi ormoni implicati nello stress, quali l'adrenalina e i glucocorticoidi, che possono diventare produttori di radicali liberi e essere la causa della cosiddetta sindrome da adattamento.

È proprio in questo quadro complesso ed interconnesso che si inserisce l'inquinamento come fattore di rischio; la vita attuale ci costringe costantemente al contatto con sostanze

inquinanti (respirate o ingerite col cibo) estranee al nostro organismo, che avrebbero necessità di essere neutralizzate come monossido di carbonio, conservanti, fertilizzanti, farmaci, fumo, radiazioni, etc.

Non sono del tutto noti i meccanismi endogeni di questi interventi di neutralizzazione, anche a causa del fatto che si presentano nuovi inquinanti costantemente, ma è certo che l'esposizione prolungata a tossici genera cospicui quantitativi di radicali liberi nell'organismo.

In ultimo è importante inserire tra le interconnessioni anche i disordini dell'alimentazione che possono provocare reazioni psicobiologiche e possono innescare reazioni ormonali/metaboliche che vanno sotto il nome di stress; gli errori dietetici, un eccessivo introito calorico ed un eccessivo consumo di alcuni cibi (carni rosse, alcol, cibi affumicati, insaccati, cibi in scatola, etc.) sono essi stessi responsabili della produzione di sostanze tossiche e radicali liberi.

Attualmente la dieta è un'ottima arma ed un elemento indispensabile per mantenere il miglior stato di salute, può anche essere un'arma formidabile per combattere sia l'insorgenza che la progressione di molte patologie, ma se attuata senza logica e razionalità può diventare un importante fattore di danno per l'organismo, sia dal punto di vista psicologico che fisico.

Tutte le cellule viventi sono costantemente esposte a specie radicaliche potenzialmente dannose, queste possono essere di origine sia endogena, prodotte cioè dal normale metabolismo cellulare, sia esogena, originate per esempio dall'esposizione a radiazioni o a sostanze tossiche. (Pilger e Rüdiger, 2006)<sup>5</sup>.

Lo stress ossidativo può essere classificato in due categorie principali in base alla sua origine: endogeno ed esogeno. La maggior parte del danno endogeno al DNA deriva dal DNA coinvolto in reazioni idrolitiche con l'acqua e in reazioni di ossidazione con le specie reattive dell'ossigeno (ROS). Il danno esogeno invece coinvolge l'azione di agenti chimici, fisici e ambientali. (Chatterjee, 2017)<sup>6</sup>.

Gli inquinanti ambientali, il fumo, alcool e l'utilizzo di farmaci rientrano tra gli agenti tossici in grado di provocare danno ossidativo alle cellule; in particolare, questi agenti chimici esogeni sono suddivisi in varie categorie, tra cui gli agenti alchilanti rappresentati da additivi e sostanze tossiche presenti negli alimenti, i prodotti del fumo di sigaretta, i prodotti della

combustione di biomasse, residui di processi industriali, mentre altri sono rappresentati da farmaci antitumorali utilizzati nella chemioterapia.

Tra gli agenti esogeni troviamo le ammine aromatiche, presenti nel fumo di sigaretta, nel carburante, nel carbone, nei coloranti industriali, nei pesticidi e in certe sostanze negli alimenti che si sviluppano a seguito della cottura ad alte temperature, insieme agli idrocarburi policiclici aromatici (IPA), provenienti da fumo di sigaretta, gas di scarico delle automobili, cibo carbonizzato e combustione incompleta di materia organica e combustibili fossili.

Altri elettrofili reattivi che possono danneggiare il DNA sono le N-nitrosammine, potenti cancerogeni sottoprodotto del fumo di sigaretta e presenti anche nelle carni conservate, e la 4-nitrochinolina-1-ossido, che è sia cancerogena che mutagena, queste due sostanze formano addotti covalenti con C8 o N2 della guanina e N6 dell'adenina che oltre a causare stress ossidativo determinano una lesione dell'8-idrossiguanina, aggiungendosi agli eventi di rottura del filamento e aumentando la probabilità di carcinogenesi orale.

Altri agenti capaci di causare danno ossidativo e classificati come esogeni sono le tossine naturali, composti genotossici e cancerogeni; l'esposizione umana e animale, a quest'ultime deriva da cereali contaminati, semi oleosi, spezie, frutta a guscio, latte e derivati.

È stato dimostrato inoltre che fattori di stress ambientali come caldo o freddo estremo, ipossia e stress ossidativo possano essi stessi causare danni al DNA. (Chatterjee, 2017).

Oltre al danno ossidativo di tipo esogeno il nostro organismo è soggetto anche a danno di tipo endogeno, in questo rientrano sia errori di replicazione da parte delle DNA polimerasi, appaiamento o incorporazione dei nucleotidi in modo errato, che sfuggono ai sistemi di correzione di bozze e ai sistemi di riparazione, sia anche l'azione delle topoisomerasi; un'altra importante fonte di questo tipo di danno è la deaminazione spontanea delle basi che porta a mutazioni geniche: in questo caso l'adenina perde il suo gruppo amminico e diventa

ipoxantina, la guanina diventa xantina, la citosina viene convertita in uracile, infine la 5-metilcitosina diventa timina.



Figura 4 possibili fonti di stress ossidativo con conseguente danno al DNA

Nei sistemi biologici i radicali liberi sono di varia natura ma, le specie reattive dell'ossigeno (ROS), cioè radicali liberi contenenti ossigeno, sono quelle che risultano essere di particolare interesse per il danno agli acidi nucleici. Anche i ROS, come tutti gli altri radicali liberi si possono formare sia durante i normali processi metabolici, sia a seguito dell'esposizione ad agenti esogeni, presenti sia nell'ambiente di vita sia in quello di lavoro.

In condizioni fisiologiche produzione dei ROS è un processo normale e nelle cellule sono presenti meccanismi antiossidanti che hanno come obiettivo quello di mantenere un equilibrio tra produzione e eliminazione dei ROS e controllare l'alterazione ossidativa delle macromolecole e la loro riparazione/turnover.

Lo squilibrio tra la produzione dei ROS e la loro eliminazione è una condizione che porta ad un accumulo di componenti cellulari danneggiati dall'ossidazione ed è nota come stress ossidativo, questa condizione è stata associata all'invecchiamento e all'insorgenza di patologie croniche correlate all'età. (Andreoli et al., 2011)<sup>7</sup>.

Le specie reattive dell'ossigeno si possono formare da fonti diverse. Possono avere origine esogena (esposizione a radiazioni ionizzanti o raggi UV, inquinanti ambientali, fumo, alcool) o endogena (metabolismo dell'ossigeno).

Negli organismi aerobi i ROS sono sottoprodotti della catena di trasporto degli elettroni, generati durante la respirazione cellulare nei mitocondri, ma derivano anche da ossidasi cataboliche, da processi anabolici e metabolismo perossisomico; questi organismi richiedono ossigeno molecolare perché funge da accettore di elettroni durante l'ossidazione dei substrati energetici, ma nello stesso tempo l'ossigeno rappresenta una minaccia, infatti, durante il metabolismo l'ossigeno acquista due elettroni, quando in realtà è in grado di riceverne solo uno per volta, convertendosi così nello ione superossido.

Inoltre i ROS possono formarsi nel contesto dell'infiammazione sia acuta che cronica, nel sistema immunitario i neutrofili e i macrofagi sono deputati alla distruzione di sostanze estranee (antigeni), mentre i leucociti, in particolare neutrofili e monociti, contengono un enzima, la mieloperossidasi, che genera ROS per distruggere gli antigeni, questa converte il perossido di idrogeno in ione cloruro in acido ipocloroso; nello specifico, queste cellule dell'immunità producono un anione superossido tramite il sistema enzimatico NADPH ossidasi presente nei leucociti, che è in grado di ridurre l'ossigeno molecolare ad anione superossido utilizzando NADPH come agente riducente, questa reazione, chiamata scoppio respiratorio o esplosione respiratoria, richiede due molecole di ossigeno.

I ROS hanno un ruolo rilevante nella difesa dell'organismo, nello specifico sono utilizzati per distruggere agenti patogeni e microbi dai globuli bianchi dopo averli fagocitati, la loro attività è potenziata dalla presenza di un'infiammazione, è quindi il processo infiammatorio ad attivare e potenziare l'azione protettiva dei ROS. (Ighodaro e Akinloye, 2018)<sup>8</sup>.

I ROS non hanno solamente un'azione difensiva, sono anche coinvolti nei meccanismi di segnalazione intercellulare e intracellulare, nella proliferazione delle cellule, in quanto possono fungere da messaggeri cellulari o possono modificare lo stato di ossido-riduzione; la produzione di ROS da parte dei mitocondri può essere un segnale redox che integra la funzione mitocondriale con quella del resto della cellula, questa segnalazione redox può avvenire tramite il rilascio di  $H_2O_2$  da parte dei mitocondri, che modula l'attività di proteine bersaglio, alterando così l'attività di enzimi, chinasi, fosfatasi e di fattori di trascrizione nei mitocondri, nel nucleo e nel citosol (Murphy, 2009)<sup>9</sup>; infine l'anione superossido e il perossido di idrogeno agiscono come mitogeni, promuovendo la replicazione del DNA e la proliferazione cellulare.

I ROS, all'interno del nostro organismo possono sia interagire con altri radicali sia con molecole organiche non radicaliche (lipidi, proteine e acidi nucleici, quindi DNA e RNA), andando a scatenare una serie di reazioni a catena potenzialmente dannose per i sistemi biologici.

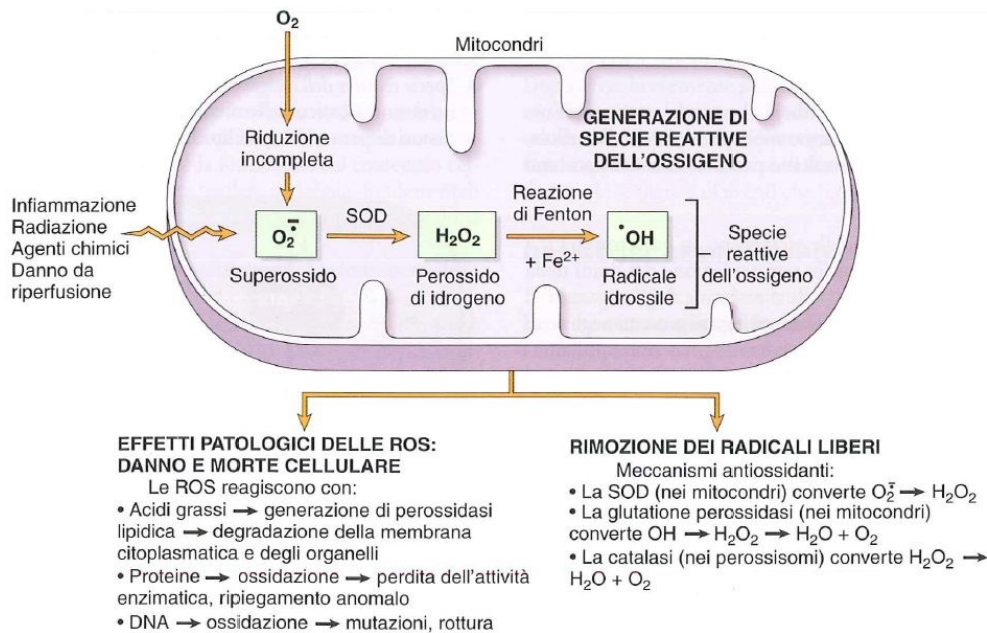


Figura 5 <https://www.bmscience.net/blog/2020/09/01/danno-da-radicali-liberi-dellossigeno-ros/>

I ROS quando interagiscono con le macromolecole possono scatenare effetti negativi e nocivi in quanto possono alterarne morfologia e dimensione e di conseguenza poi possono indurre apoptosi cellulare, oppure possono provocare infiammazione o alterare le funzioni cellulari. Tutti questi processi prendono parte in alcune patologie, come cancro, malattie neurodegenerative come morbo di Parkinson o di Alzheimer, malattie cardiovascolari, nonché nell'invecchiamento cellulare. (Rowe et al., 2008)<sup>10</sup>.

L'instabilità dei ROS è causata dalla presenza di un elettrone spaiato sull'orbitale più esterno che possiede un'elevata instabilità e tendenza all'interazione con elettroni di altre molecole dando così il via al processo noto come stress ossidativo.

Meccanismo dello stress ossidativo è determinato da un eccesso di radicali liberi, caratterizzati appunto da elevata reattività ed instabilità chimica, che si sono prodotti a livello cellulare prevalentemente in sede mitocondriale; l'azione dei radicali liberi si estrinseca principalmente su componenti costituenti della cellula con conseguenti alterazioni strutturali cellulari.

Questa cascata di interazioni viene innescata a livello cellulare durante i processi metabolici che richiedono la presenza e l'utilizzo di ossigeno, dove l'anione superossido ( $O_2^-$ ) è il principale radicale libero prodotto a livello mitocondriale.

L'anione formatosi, per le sue proprietà, può reagire con centri sulfurici di diversi enzimi e viene poi rapidamente convertito in perossido di idrogeno ( $H_2O_2$ ) attraverso l'enzima superossido dismutasi (SOD1, SOD2, SOD3), perossido che poi a sua volta può reagire con metalli intermedi in fase ridotta attraverso la reazione di Fenton e produrre un radicale libero altamente reattivo, ovvero il radicale idrossile ( $OH^*$ ), inoltre l'anione superossido può a sua volta interagire con l'ossido nitrico (NO) e generare l'anione perossinitrico ( $ONOO^-$ ).

Grazie a questi meccanismi di riparo quando i danni dello Stress Ossidativo arrivano a compromettere in modo irreversibile le funzioni più vitali della cellulari, si attivano in genere i meccanismi della apoptosi o "suicidio programmato" dove la cellula va incontro a fenomeni regressivi sino alla necrosi; questi meccanismi servono per preservare l'omeostasi e prevenire i danni legati all'alterazione di quest'ultima; ci sono casi in cui questo evento non si manifesta, ma i danni sono di entità tale da permettere comunque il funzionamento della cellula anche se in modo non ottimale, iniziano a configurarsi i segni della senescenza

cellulare a cui si associano molteplici disordini di tipo cronico degenerativo, compresi i tumori.

I ROS una volta che si sono formati possono interagire con le principali macromolecole:

- Lipidi
- Proteine
- Acidi nucleici

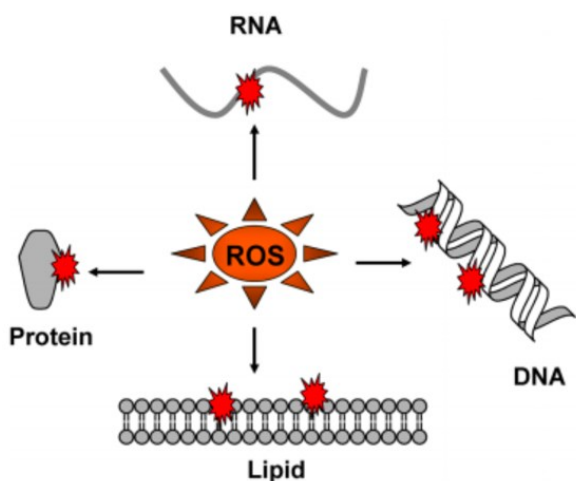


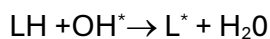
Figura 6 Interazione tra i ROS e le macromolecole biologiche. (Zou et al., 2017)<sup>11</sup>.

### 1.2.1 Lipidi

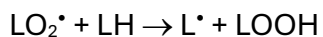
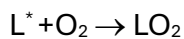
I lipidi sono la classe di macromolecole maggiormente soggette all'attacco dei radicali per la loro formulazione con molti legami insaturi. Il danno alle membrane è causato principalmente dal radicale  $\text{OH}^*$ , che è l'unico in grado di innescare la reazione a catena nota come "perossidazione lipidica"; i bersagli principali di questa reazione sono le catene laterali dei lipidi della membrana plasmatica e delle membrane degli organelli.

Questa reazione a catena ha tre passaggi fondamentali:

- Fase di inizio. Lo ione radicale  $\text{OH}^*$ , generato nei pressi della membrana, è in grado di "estrarre" un atomo di idrogeno di un doppio legame e di combinarsi con esso per formare una molecola d'acqua, l'elettrone radicalico spaiato rimane quindi sulla molecola lipidica di membrana.



- Fase di propagazione. È in questa fase che il radicale lipidico spaiato rimasto sulla membrana reagisce con l'ossigeno, formando un radicale perossidico che reagisce con un nuovo acido grasso polinsaturo, formando da un lato un nuovo radicale, che ricomincia la catena, e dall'altro un idroperossido  $\text{LOOH}$ .



È dalla degradazione dell'idroperossido che si formano dei frammenti tossici, le aldeidi (Halliwell B, 1991)<sup>12</sup>, ma l'idroperossido può comunque venire convertito ad idrossiacido per reazione con un sistema antiossidante (come il glutatione ridotto, GSH).

- Fase di terminazione. È l'ultima fase ed è contraddistinta dall'incontro di due radicali, più specificatamente mettendo in comune gli elettroni spaiati si neutralizzano reciprocamente, oppure può entrare in gioco un sistema scavenger sulfidrilico antiossidante (come il GSH) che assume l'elettrone spaiato e lo neutralizza.

Un bersaglio lipidico, tipico di questo tipo di danno, sono le lipoproteine a bassa densità (LDL), che in presenza di ROS diventano molto facilmente LDL ossidate, quest'ultime sono particolarmente citotossiche poiché sono in grado di danneggiare l'integrità dell'endotelio del vaso sanguigno in cui si trovano; di conseguenza l'azione prolungata dei radicali liberi

induce lo sviluppo e la progressione delle lesioni aterosclerotiche e quindi delle malattie cardiovascolari (Yia- Herttuala S, 1999; Steinberg D, 1997)<sup>1314</sup>.

Se la reazione non si ferma e il danno prosegue abbastanza a lungo, le catene laterali degli acidi grassi sono alterate si alterano negativamente a tal punto, nella loro struttura, che l'integrità e la funzionalità della membrana può venire seriamente danneggiata.

## 1.2.2 Proteine

Il danno ossidativo a carico delle proteine avviene a causa di modificazioni agli amminoacidi che le compongono, in particolare i bersagli più suscettibili all'attacco dei ROS sono gli amminoacidi tirosina, fenilalanina, triptofano, istidina, metionina e cisteina (DaviesKJ, 1987)<sup>15</sup>; il gruppo che risulta essere più sensibile all'ossidazione è il gruppo tiolico (-SH), presente nella cisteina.

Il gruppi -SH può essere modificato in diversi modi:

- ossidazioni successive che possono dare origine a gruppi sulfenici (-SOH), sulfinici (-S<sub>2</sub>H) o sulfonici (-S<sub>3</sub>H).
- ossidazione di due gruppi tiolici, adiacenti in una stessa proteina o di due proteine vicine, che generano un ponte disolfuro intra o intercatena (-S-S-) a causa dell'attacco dei ROS (Cooper CE et al, 2002)<sup>16</sup>.
- Frammentazione come conseguenza dell'ossidazione della catena proteica, non sono rari, infatti, anche i ponti formati da due tirosine: -Tyr-Tyr-.

Anche altri amminoacidi come la prolina, l'arginina e la lisina possono andare incontro a carbonilazioni, i gruppi carbonilici si originano sia da diretta ossidazione delle catene laterali di amminoacidi, sia dall'interazione di carboidrati ridotti con il gruppo amminico in s di una Usina; in letterature si riportata che i derivati carbonilati possano derivare anche dall'ossidazione degli acidi grassi polinsaturi di membrana, attraverso la modificazione delle aldeidi che si vengono a formare e che possono poi reagire con le catene laterali di lisine e istidine(Stadtman ER, 1992)<sup>17</sup>.

Inoltre, sussiste una stretta correlazione tra modificazioni ossidative delle proteine ed il loro turnover, le proteine ossidate vengono degradate più rapidamente ad opera della proteasi alcalina che le riconosce (Levine RL et al, 1981; Fulks RM et al, 1985)<sup>18,19</sup>.

Approfondire e studiare i meccanismi alla base delle modificazioni a carico delle proteine è fondamentale per capire in che modo il ruolo dei ROS si espliciti in queste vie di trasduzione del segnale.

<b>Residui modificati</b>	<b>Tipi di modificazioni</b>
Cisteina	Ponti -S-S; ossidazioni
Tirosina	Ponti - Tyr-Tyr-
Metionina	Ossidazioni
Lisina	Carbonilazioni
Prolina	Carbonilazioni
Arginina	Carbonilazioni

*Tabella 1 Modificazione causate dai ROS*

### 1.2.3 Acidi nucleici

Quando i ROS entrano in contatto con gli acidi nucleici si innescano reazioni tra questi e le basi nucleotidiche a livello del DNA nucleare e mitocondriale che producono rotture del DNA a filamento singolo; si ritiene che questo danno al DNA sia connesso all'invecchiamento cellulare e nella trasformazione maligna delle cellule.

Tra i vari ROS, la specie più reattiva che reagisce più facilmente con il DNA è lo ione OH<sup>-</sup>, questo agisce sia a livello dei doppi legami delle basi azotate che, più difficilmente, allontanando un atomo di idrogeno dalle basi o da ciascuno dei legami C-H del desossiribosio; nel caso delle basi purine OH<sup>-</sup> reagisce tipicamente con le posizioni C4, C5 e C8, producendo dei derivati con altri gruppi -OH.

A partire dalle basi modificate derivano poi molte altre basi ulteriormente modificate mediante altri meccanismi di ossidazione, di riduzione, di deaminazione o di perdita di molecole di acqua, in funzione della presenza o assenza di ossigeno e dell'ambiente redox limitrofo.

Il radicale  $\text{OH}^*$  può agire, non solo a livello del doppio legame, ma può anche reagire con la porzione glicosidica del nucleotide, in questo caso a seguito dell'allontanamento di un atomo di idrogeno la modificazione dello zucchero può essere tale da provocare la rottura del filamento di DNA stesso; il radicale in C5' del desossiribosio può inoltre combinarsi con la posizione C8 dell'anello purinico a cui è legato e dare così una ciclizzazione intramolecolare.

Parte di queste modificazioni sono mutagene, poiché le alterate proprietà di appaiamento della base modificata determinano errori nella fase di replicazione del DNA (Mathews CK e Van Holde KE, Biochimica).

Le rotture non colpiscono solo il DNA a singolo filamento, ma possono colpire anche il DNA a doppio filamento, queste ultime, a differenza di quelle che coinvolgono solo un singolo filamento del DNA, non possono essere riparate.

Lo stress ossidativo sembrerebbe implicato nel processo di morte cellulare in diverse patologie degenerative del sistema nervoso centrale, ma i ROS non sono soltanto dannosi, ma hanno anche capacità benefiche. Ad esempio, hanno un ruolo positivo nella lotta contro le infezioni, per contrastare i batteri e per controllare il tono della muscolatura liscia che regola il funzionamento degli organi interni e dei vasi sanguigni.

È fondamentale, affinché i radicali liberi svolgano nell'organismo un'azione protettiva non dannosa, che non siano compromessi gli equilibri tra questi ed i vari sistemi difensivi che le cellule hanno sviluppato per proteggersi per rimuovere o minimizzare gli effetti dannosi creati dagli stessi radicali, questi equilibri sono noti come i sistemi antiossidanti; vengono definiti antiossidanti quelle sostanze che ostacolano l'ossidazione delle varie strutture dell'organismo ad opera dell' $\text{O}_2$  e dei suoi derivati.

Per controllare la concentrazione intracellulare dei ROS e garantire l'omeostasi redox, la cellula si serve di meccanismi di tipo enzimatico e di tipo non enzimatico che permettono una prevenzione "primaria", nel senso che limitano o prevengono la produzione di ROS. Sebbene di notevole importanza, questi sistemi di difesa non sono completamente efficienti

nell'impedire che il danno si verifichino. Una volta che le strutture cellulari sono state danneggiate, esiste un livello di difesa secondario in grado di ripristinare o eliminare DNA, proteine o membrane che siano state alterate nella loro funzionalità.

#### 1.2.4 Fonti di stress ossidativo

Le nostre cellule ed il nostro corpo producono costantemente fisiologicamente radicali liberi, e altrettanto fisiologicamente esiste un equilibrio tra produzione di radicali liberi e di sostanze antiossidanti, in questa condizione è assente l'alterazione dell'omeostasi; in determinate circostanze si può determinare la iperproduzione di ROS che quindi altera l'equilibrio, l'eccessiva presenza di sostanze ossidanti può derivare da diverse fonti sia interne che esterne all'organismo.

Fino a quando le sostanze ossidanti e antiossidanti si bilanciano tra loro, si dice che l'organismo è in equilibrio redox, ma è proprio quando questo equilibrio viene meno e, nello specifico, le sostanze ossidanti prendono il sopravvento su quelle antiossidanti e iniziando a moltiplicarsi senza controllo, che si genera uno stato di stress ossidativo.

Esistono dei sistemi di difesa naturali che aiutano a mantenere l'omeostasi, in particolare, il nostro corpo è dotato di una vera e propria "rete di protezione antiossidante" (RAO), una struttura costituita da sostanze di varia natura, che possono essere sia sintetizzate internamente che assimilate con la dieta, tra queste sostanze troviamo: alcune vitamine (E, C, A), flavonoidi, albumina, polifenoli, selenio, zinco, L-cisteina, acido alfa lipoico, Coenzima Q10 e glutathione.

Fino a quando le sostanze ossidanti e antiossidanti si bilanciano tra loro, si dice che l'organismo è in equilibrio redox, ma è proprio quando questo equilibrio viene meno e, nello specifico, le sostanze ossidanti prendono il sopravvento su quelle antiossidanti, iniziando a moltiplicarsi senza controllo, che si genera uno stato di stress ossidativo.

Le fonti esterne all'organismo sono svariate, sono tutte collegate allo stile di vita e l'ambiente in cui si vive:

- inquinamento ambientale
- fumo attivo e passivo

- abuso di alcol e sostanze stupefacenti
- assunzione di determinati farmaci
- esposizione a sostanze chimiche nocive
- abitudini alimentari scorrette
- squilibri del metabolismo, come ad esempio diabete, sovrappeso ed obesità
- eccessiva e scorretta esposizione alle radiazioni UV o ai raggi X
- attività fisica aerobica prolungata e troppo intensa
- stress psicofisico

E' necessario sottolineare come la presenza contestuale di più fattori, esterni ed interni, moltiplica l'effetto negativo sulla produzione di radicali liberi e quindi sul livello di stress ossidativo.

Le fonti endogene di stress ossidativo sono collegate allo stato di salute ed alla presenza di patologie che incrementano la produzione di ROS.

Lo stress ossidativo stesso non può essere considerato una patologia nel senso tradizionale del termine e, di conseguenza, non ha sintomi evidenti direttamente correlati o prognostici, ma essendo la conseguenza della rottura di un equilibrio biochimico dell'organismo, può però influenzare l'insorgenza o il decorso di altre patologie. La condizione di stress ossidativo si nasconde, quindi, dietro ai sintomi e ai segni di altre condizioni, sono numerose le malattie correlate con lo stress ossidativo o note come promotrici della produzione di ROS.

Tra queste troviamo:

- obesità
- ipertensione
- patologie cardiovascolari
- patologie neurodegenerative
- patologie infiammatorie croniche
- alcune patologie oculari e della pelle.

Lo stress ossidativo è promosso da queste patologie ma la relazione è a doppio senso, infatti, è anche lo stesso stress ossidativo a promuovere queste patologie, influenzando i processi patologici e accelerando i processi di invecchiamento cellulare, creando una circolarità in cui i ROS sono al contempo causa ed effetto della malattia.

Grazie a queste caratteristiche e questi molteplici aspetti in cui è coinvolto lo stress ossidativo possiamo sicuramente affermare che è un fenomeno molto complesso ed eterogeneo con molte correlazioni e per descriverlo è importante indagarle.

Tra le cause endogene dello stress ossidativo troviamo l'inquinamento ambientale dal momento che sono sia le sostanze presenti nell'aria con le loro caratteristiche tossicologiche a stimolarlo sia le particelle aerodisperse.

La correlazione tra inquinamento ambientale e stress ossidativo è caratterizzata dal primo che incentiva il secondo e poi sinergicamente stimolano lo stato patologico nell'organismo umano.

In base alla natura della sostanza stessa la capacità di indurre stress ossidativo è diversa.

La natura della sostanza inquinante determina la sua stessa capacità di indurre stress ossidativo, conseguentemente anche la capacità della sostanza stessa di alterare l'omeostasi, questa "potenza" della sostanza, soprattutto in relazione al particolato atmosferico, è definita come "potenziale ossidativo".

### 1.2.5 Potenziale ossidativo

Il potenziale ossidativo (OP) del particolato atmosferico viene definito come una misura della capacità del PM di ossidare le molecole bersaglio nei tessuti e negli organi, promuovendo la produzione di ROS a livello di tutte le macromolecole; misurare e quantificare l'OP di una determinata sostanza è considerato come un indicatore globale dei potenziali effetti sulla salute ad essa attribuibili.



La misura del potenziale ossidativo (PO) è quindi considerata come un indice predittivo della capacità del PM di generare specie reattive dell'ossigeno (ROS) nell'intero organismo biologico. In letteratura sono riportati alcuni studi dedicati all'osservazione di diversi saggi acellulari per la determinazione del PO; nonostante ciò, l'argomento è ancora molto controverso e ci sono diversi aspetti che meritano approfondimenti (Fang et al., 2016, Huang et al., 2016)<sup>20,21</sup>.

Il potenziale ossidativo del particolato è un argomento con crescente interesse ed uno studio condotto da un gruppo di ricerca dell'Istituto di Scienze dell'atmosfera e del clima del Consiglio nazionale delle ricerche (Isac-Cnr) di Lecce mostra come il potenziale ossidativo vari a seconda della composizione chimico-fisica e delle sorgenti del particolato stesso a dimostrazione del fatto che non conta solo la quantità presente nell'aria ma anche la tipologia delle sostanze disperse (studio condotto nel 2017)<sup>22</sup>.

L'articolo riporta: “È stato valutato mediante specifici test il potenziale ossidativo di tre tipologie raccolte presso l'Osservatorio climatico-ambientale Isac-Cnr di Lecce, provenienti da diverse sorgenti: campioni 'standard' in giornate di normali condizioni climatico-atmosferiche, campioni contenenti polveri trasportate dal Sahara e campioni ad alto contenuto di carbonio (derivante da traffico veicolare, combustioni industriali, di biomasse e/o incendi) – spiega Daniele Contini (Isac-Cnr), ricercatore che ha coordinato lo studio – I risultati mostrano che questi ultimi, cioè i campioni ad alto contenuto di carbonio, hanno un potenziale ossidativo molto elevato, mentre durante gli eventi di trasporto di polveri africane si registrano grandi incrementi di concentrazione del particolato, ma il potenziale ossidativo rimane relativamente basso, simile a quello dei campioni standard” (D.Chirizzi et al., 2017)<sup>22</sup>.

L'oggetto dello studio è incentrato in particolare su particelle con diametro inferiore a 2,5 micron (PM2.5) e a 10 micron (PM10) ed i test utilizzati per la valutazione sono test già ampiamente utilizzati a livello internazionale (DTT test o test di velocità di deplezione del ditiotreitolo, che analizza, nel tempo, la quantità di sostanze ossidanti presenti nei campioni).

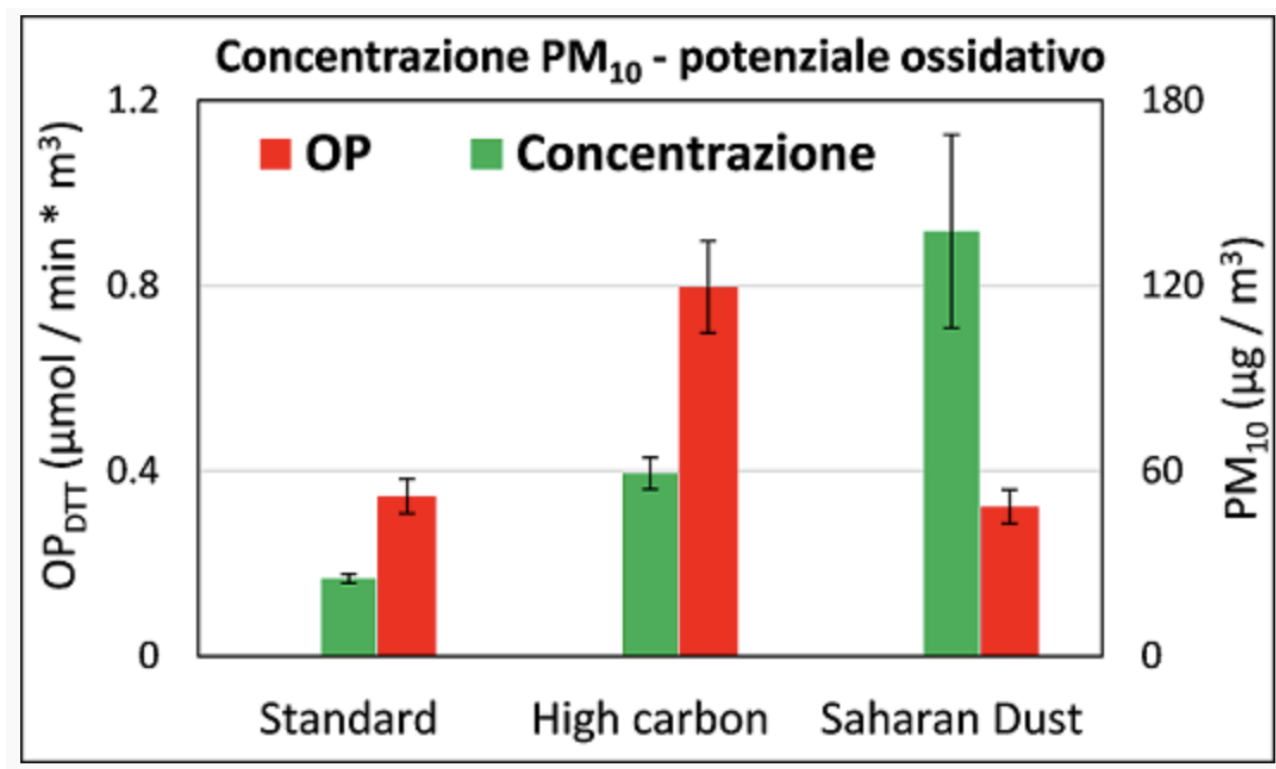


Figura 7 risultati studio Contini et al di Lecce

L'articolo ha suscitato molto interesse non solo nella comunità scientifica, ma anche nella popolazione generale poiché, come si può notare dal grafico, è evidente come sia distinto l'andamento tra concentrazione e potenziale ossidativo; in un'intervista il ricercatore principale Prof. Contini ha sottolineato come fosse proprio questo l'obiettivo iniziale.

“L'obiettivo era approfondire i meccanismi della tossicità del particolato atmosferico nel tempo: il confronto ha dimostrato che le proprietà ossidative di campioni provenienti da diverse sorgenti sono molto diverse. Questo è un aspetto di cui si dovrebbe tenere conto negli studi epidemiologici: il potenziale ossidativo è, infatti, un indicatore quantitativo diretto, spesso ancora più significativo dell'incremento di concentrazione dovuto a una specifica sorgente. Ciò permetterebbe una migliore interpretazione dei dati di qualità dell'aria e dell'esposizione dei cittadini a sostanze potenzialmente dannose per la salute”.

Da questo come da tanti altri studi successivi traspare che la tossicità per la salute umana dipende sensibilmente dalla composizione del particolato stesso più che dalla sua concentrazione effettiva, rendendo così essenziale una sua sempre più attenta caratterizzazione.

La valutazione del potenziale ossidativo si ricava attraverso la raccolta del particolato con filtri appositi e la successiva analisi delle particelle raccolte, ma questo non basta per andare a descrivere a pieno il fenomeno e la sua pericolosità.

### 1.3 Valutazione ambientale

Il livello di salubrità ambientale viene valutato anche attraverso l'effetto che ha sulla salute della popolazione; questa analisi è possibile con la determinazione delle concentrazioni dei metaboliti urinari dei prodotti di riparo riferiti al danno ossidativo a carico delle macro molecole come la malondialdeide urinaria (MDA), la dimetilarginina (ADMA/SDMA) e 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-OHdG), tutti indicatori di stress ossidativo ai lipidi, alle proteine ed agli acidi nucleici; inoltre poi è importante studiare anche la percezione dell'inquinamento, della salubrità dell'aria.

Le due misure, l'una di natura percettivo, affettivo, emotiva e l'altra di natura bio-fisiologica permettono poi così di ottenere una valutazione integrata d'impatto sul benessere complessivo della popolazione generale ed in particolare per persone che risiedono in quartieri caratterizzati da presenza di inquinamento di origine industriale, rispetto a persone che vivono in quartieri urbani lontani da aree industriali.

È importante in questo frangente ricordare la grande variabilità dei biomarcatori di stress ossidativo in relazione all'età, al genere, al trattamento farmacologico, alla dieta, allo stato di salute generale e agli stili di vita.

In letteratura sono presenti studi con un disegno sperimentale che prevede un'analisi dei dati accurata, soprattutto in termini di percezione della popolazione, dove si incentra il focus su questi fattori che vengono utilizzati per descrivere una popolazione campione marcatamente eterogenea; sono proprio questi aspetti che possono influenzare il risultato finale (P. Gabassi, 2016)<sup>23</sup>.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità nel 1948 ha dato una definizione della qualità della vita: "la percezione soggettiva che un individuo ha della propria posizione nella vita, nel contesto di una cultura e di un insieme di valori nei quali egli vive, anche in relazione ai propri obiettivi, aspettative e preoccupazioni".

Ed è proprio sulla base di questa definizione che successivamente nel 1995 un gruppo di lavoro multiculturale e multiprofessionale denominato “The WHOQOL Group” ha creato un questionario con lo scopo di creare uno strumento di valutazione della qualità della vita che intercetta gli ambiti ritenuti significativi in diversi contesti:

- il poter avere buone relazioni sociali,
- potersi muovere e spostare in autonomia in un determinato contesto,
- disporre di alcune sicurezze anche economiche,
- poter dormire bene e avere energia psichica per affrontare i problemi,
- essere soddisfatti del proprio stato di salute,
- vivere in un ambiente non minaccioso per la salute.

L’obiettivo di questo gruppo di lavoro era, appunto, quello di poter disporre di una gamma di dimensioni descrittive del costruito qualità della vita aventi valenza transculturale; ed è stata proprio la sua trasversalità che ha consentito l’applicazione successiva di questo strumento, sia nella sua versione estesa che breve, in numerose ricerche di grande rilevanza scientifica, non solo nella valutazione dell’impatto ambientale in quartieri limitrofi a insediamenti industriali, ma anche in contesti sanitari.

Questo strumento è stato utilizzato in studi che hanno indagato la qualità della vita, soprattutto in Paesi che hanno vissuto un rapido e intenso sviluppo manifatturiero al fine di comparare la qualità della vita delle popolazioni rurali versus popolazioni urbanizzate (Ibrahim, Chung, 2003; Sopsuk et al., 2013)<sup>24,25</sup>.

Nel campo della valutazione della qualità ambientale si tende ad isolare le due variabili principali, variabili oggettive e variabili soggettive, di conseguenza, anche le ricerche in questo ambito tendono a dividersi, talune ricerche si concentrano su misure di carattere prevalentemente oggettivo, come la presenza o meno di inquinanti, e altre, invece, privilegiano un approccio più di tipo soggettivo, legato quindi alla percezione delle persone che vivono in quell’ambiente.

Gli studi di tipo oggettivo tendono a essere effettuati da ricercatori che non necessariamente vivono e frequentano i luoghi oggetto della studio, ma che dispongono di strumenti di misura che possono fornire le informazioni ricercate e confrontarle in tempi successivi, sono quindi ricerche che confrontano dati campionati in momenti successivi senza un’interpretazione

personale; mentre gli studi di tipo soggettivo sono basati sull'analisi di dati raccolti tramite lo sguardo dell'osservatore che deve essere persona del luogo in quanto il suo ruolo in questa ricerca fa sì che è chiamato ad esprimere giudizi e valutazioni di tipo percettivo sulle caratteristiche ambientali che vengono indagate.

L'utilizzo della distinzione oggettivo/soggettivo in realtà è una mera convenzione di tipo scientifico, poiché tutte le ricerche hanno comunque dei margini di discrezionalità che caratterizzano la valutazione oggettiva, nonostante si cerchi di ridurre al massimo l'incidenza; dunque, le valutazioni oggettive contengono in ogni caso un certo grado di soggettività, mentre al contrario quelle definibili soggettive devono avere, sia pur entro certi limiti, parametri che le rendono oggettivabili.

La valutazione della qualità dell'aria di zone residenziali effettuata da esperti è maggiormente oggettivante di quella effettuata dai residenti, ma al tempo stesso ci sono aspetti e dimensioni che l'esperto non può valutare, tra cui l'attaccamento al luogo di residenza, che rappresenta uno degli aspetti più complessi nella definizione di valutazione soggettiva.

La gratificazione derivata dalla fruizione di un luogo è ciò che convenzionalmente viene chiamata la soddisfazione residenziale, che è sintesi delle componenti affettiva, cognitiva, comportamentale.

Quando si effettuano valutazioni dell'impatto sull'ambiente urbano di una fonte di inquinamento industriale si prediligono tradizionalmente studi con un approccio oggettivo, in quanto tende a misurare gli elementi tangibili dell'ambiente (ad esempio presenza di polveri o di sostanze nocive nell'aria) in relazione a soglie ritenute accettabili; tuttavia, esiste anche una scelta strategica, e quindi in parte soggettiva, di mettere l'enfasi su una o sull'altra variabile di tipo tecnico.

Tutte queste considerazioni sono un tema molto in particolare la corrispondenza fra misure tecniche e percezioni delle persone che fruiscono di quell'ambiente specifico, ma che tende a rimanere sottotraccia in quanto, la presenza di un inquinante nell'aria racconta è solo una parte del problema reale, scatenando molte domande:

Come vivono le persone in un ambiente?

Cosa percepiscono come inquinato?

Le impressioni sono al di là del monitoraggio degli indicatori che ne valutano oggettivamente l'inquinamento?

Attualmente c'è un filone di ricerca, dedicato allo studio della soddisfazione ambientale; questo filone sembra voler analizzare, pur nell'intrinseca complessità relativa agli indicatori individuabili, la distinzione dicotomica tra oggettivo-soggettivo, andando nella direzione di un metodo integrato che mira ad avvicinare la prospettiva fisica-bio-naturalistica a quella sociopsicologica.

## 1.4 Patologie respiratorie

Le malattie respiratorie croniche (MRC) sono patologie per l'appunto ad evoluzione cronica e alcune di esse con una componente degenerativa, possono riguardare tutti gli organi dell'apparato respiratorio dai polmoni alle alte e basse vie respiratorie; appartenenti a questa classe di patologie troviamo:

- Asma
- Broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO)
- Rinite allergica
- Malattie polmonari correlate al lavoro
- Ipertensione polmonare.

La caratteristica di alcune delle patologie respiratorie è quella di colpire direttamente il tessuto polmonare e alveolare, inoltre la loro cronicizzazione può portare a sequele non solo respiratorie, ma anche vascolari e psicosomatiche e disabilità, le complicanze legate a queste patologie possono evolvere in gravi situazioni cliniche in taluni casi con conseguenze irreversibili o addirittura mortali.

Queste malattie sono così frequenti e presenti nella popolazione generale che l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) stima 235 milioni di persone affette da asma e 64 milioni di persone affette da BPCO; inoltre, la stessa afferma che ogni anno circa 4 milioni di persone in tutto il mondo muoiono a causa delle MRC, fra cui la BPCO che risulta essere la prima causa di morte.

Al di là di queste malattie più complesse qualsiasi condizione o affezione che colpisce l'apparato respiratorio è considerata un disturbo respiratorio e quindi l'elenco appena descritto diventa decisamente più consistente ed oltre a quelle già citate comprende anche: asbestosi, polmone nero, bronchiolite, bronchite, enfisema, empiema, polmonite eosinofila, tumore laringeo, laringomalacia, legionellosi, tumore polmonare, raffreddore comune, tubercolosi, febbre della valle, influenza, sinusite, faringite, linfangioleiomiomatosi, tosse persistente, pleurite, polmonite, pneumotorace, embolia polmonare, fibrosi polmonare, sindrome da distress respiratorio, virus respiratorio sinciziale, sarcoidosi, sindrome respiratoria acuta grave e silicosi.

Le malattie respiratorie croniche (MRC) rappresentano in Italia la terza causa di morte dopo le malattie cardiovascolari e neoplastiche, con più di 16.000 decessi all'anno, e per questo sono state inserite nelle Piano nazionale di Azione 2008-13 e sono una delle quattro priorità del di quest'ultimo per le malattie non trasmissibili dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

L'asma e la bronchite cronica sono le più frequenti MRC e, pur avendo differenti meccanismi fisiopatologici, possono associarsi e provocare uno stato funzionale di ostruzione cronica delle vie respiratorie, non pienamente reversibile e generalmente evolutivo; quando la bronchite evolve e cronicizza anche in termini di ostruzione viene denominata broncopneumopatia cronica ostruttiva.

Le MRC non solo hanno meccanismi eziopatologici spesso simili, ma riconoscono anche fattori di rischio e di aggravamento comuni, tra cui hanno grande rilevanza quelli eliminabili come il fumo di tabacco, diversi tipi di esposizioni occupazionali, inquinamento indoor e outdoor, basso peso alla nascita.

Visto il grande effetto di questi fattori di rischio, più o meno controllabili, su queste patologie è consigliato al fine di controllarne e moderarne l'evoluzione la cessazione del fumo, se presente, la terapia farmacologica specifica, l'esercizio fisico e la vaccinazione antinfluenzale ed antipneumococcica (Global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD. Global initiative for chronic obstructive lung disease (GOLD) 2020 ([www.goldcopd.org/](http://www.goldcopd.org/))).

Vista la grande percentuale di popolazione affetta da queste patologie e l'impatto sulla qualità della vita che esse comportano nonché l'impatto economico e assistenziale, nel 2004

è stata creata la Global Alliance against Chronic Respiratory Diseases (GARD), che è un'alleanza internazionale affiliata all'OMS che comprende vari partner istituzionali e non, questa alleanza è nata con lo scopo di sviluppare una strategia integrata, tesa a migliorare la salute respiratoria globale, ma l'obiettivo prioritario è prevenire e contrastare precocemente le MRC, per raggiungere l'obiettivo prefissatosi l'alleanza lavora sulla riduzione dell'esposizione ai fattori di rischio, ma anche favorendo una diagnosi più tempestiva e quindi arrivare ad un trattamento precoce e quindi maggiormente efficace.

Le azioni di prevenzione sono essenziali, ma per intraprendere tali azioni è necessario capire e approfondire le patologie e le relazioni eziopatogenetiche con l'ambiente. Per sostenere le azioni di prevenzione primaria e secondaria è necessario disporre di dati sulla frequenza con cui i fattori di rischio, fattori predittivi l'aggravamento delle patologie respiratorie e i fattori protettivi ricorrono tra le persone affette da tali condizioni.

Il sistema di sorveglianza PASSI (Progressi delle Aziende Sanitarie per la Salute in Italia) si caratterizza come una sorveglianza in Sanità Pubblica sul modello della Behavioural Risk Factor Surveillance adottato in molti Paesi, dal 2008 raccoglie in continuo informazioni sugli stili di vita e fattori di rischio comportamentali della popolazione adulta tra i 18 e i 69 anni residente in Italia, connessi all'insorgenza delle malattie croniche non trasmissibili e sul grado di conoscenza e adesione ai programmi di intervento che il Paese sta realizzando per la loro prevenzione. Strumento necessario alla costruzione dei profili di salute per le Regioni, PASSI, coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità (ISS), è come strumento interno al Sistema Sanitario Nazionale in grado di produrre, in maniera continua e tempestiva, informazioni a livello di ASL e Regione al fine di guidare a livello locale le azioni di prevenzione e valutarne l'efficacia nel tempo verso gli obiettivi di salute fissati nei Piani Nazionali e Regionali della Prevenzione.

L'ulteriore ricchezza di informazioni socio-anagrafiche raccolte consente di far emergere e analizzare le disuguaglianze sociali nella salute e nella prevenzione. I dati raccolti da PASSI rendono possibile anche la rilevazione, attraverso la risposta la percezione dell'utente, dell'attenzione che medici e operatori sanitari dedicano ai determinanti comportamentali della salute dei loro assistiti.

La raccolta delle informazioni avviene tramite interviste telefoniche in cui viene somministrato un questionario standardizzato, tali interviste vengono effettuate nel corso di

tutto l'anno da operatori delle ASL, opportunamente formati, a campioni rappresentativi per genere ed età della popolazione di 18-69 anni del proprio bacino di utenza, residenti in Italia, iscritti nelle anagrafi sanitarie di pertinenza e non istituzionalizzati (non ospedalizzati o residenti in strutture educative o riabilitative). I nominativi dei campioni della popolazione presi in considerazione, e relativi dati personali, vengono, appunto, estratti dalle anagrafi sanitarie degli assistiti delle ASL.

Dal 2008 ad oggi sono state effettuate, ogni anno, 35.000-37.000 interviste. I dati raccolti vengono riversati via web in un database nazionale, a cui hanno accesso i coordinatori aziendali e regionali. Il numero complessivo di ASL partecipanti supera ogni anno il 90% delle aziende totali sul territorio italiano, fornendo indicazioni su oltre il 90% della popolazione nazionale residente in Italia. Il tasso di risposta ogni anno supera l'85% del campione e il tasso di rifiuto non supera il 10%.

I dati si riferiscono alla popolazione generale di 18-69 anni residente in Italia e iscritta alle anagrafi sanitarie e non istituzionalizzata (ospedalizzata o residente in strutture educative o riabilitative).

Il sistema di sorveglianza PASSI è attivo dal 2007 e rileva molte delle informazioni utili all'alleanza per raggiungere il suo scopo e consente anche, di descrivere un quadro articolato della situazione.

Si riporta di seguito in breve l'ultimo aggiornamento del 25/7/2024 - ASL TO3 (Piemonte): i dati PASSI relativi al biennio 2021-2022.

“Nell'ASL TO3 nel biennio 2021-2022 più di tre persone su dieci (38%) di età compresa tra i 18 e i 69 anni è in sovrappeso/obesa e solo il 19% della popolazione intervistata aderisce alla raccomandazione dell'OMS circa l'adeguato consumo di frutta e verdura (5 porzioni al giorno). Per quanto riguarda la mobilità attiva, il 22% della popolazione pratica mobilità attiva nelle quantità raccomandate dall'OMS (almeno 150 minuti/settimana fra cammino e bici per gli spostamenti abituali), il 27,5% pratica parzialmente la mobilità attiva e il 50% non pratica mobilità attiva. Sono alcuni dei dati riportati nelle schede del territorio dell'ASL di TO3 relativi al periodo 2021-2022.”

I temi indagati dal sistema sono svariati e cercano di coprire tutto ciò che può intervenire sulla salute della popolazione, di seguito si riporta elenco dettagliato dei temi suddivisi per categorie.

#### Guadagnare salute

- Attività fisica OMS
- Sovrappeso e obesità
- Mobilità attiva
- Consumi di frutta e verdura
- Consumo di alcol
- Abitudine al fumo
- Fumo passivo
- Smettere di fumare
- Consumo di sale

#### Rischio cardiovascolare

- Rischio cardiovascolare
- Diabete

#### Sicurezza

- Dispositivi per la sicurezza stradale
- Guida sotto l'effetto dell'alcol
- Sicurezza domestica

#### Programmi di prevenzione individuale

- Screening cervicale
- Screening mammografico
- Screening coloretale
- Vaccinazione per l'influenza stagionale
- Vaccinazione anti-rosolia

#### Benessere

- Percezione dello stato di salute

- Depressione
- Patologie croniche

Altro

- Caratteristiche socio-anagrafiche

Tutti questi parametri sono stati indagati suddividendo la popolazione per fasce d'età e per sesso poiché ogni sottogruppo ha delle fragilità ed esigenze diverse.

## 1.5 Asma

L'asma è una malattia infiammatoria cronica delle vie aeree, caratterizzata dalla restrizione e/o nei casi più severi dall'ostruzione, generalmente reversibile, del lume bronchiale (broncospasmo), questa patologia accompagna chi ne soffre per tutta la vita; infatti, i farmaci a disposizione possono solamente trattare i sintomi e non agire sulla malattia. Dall'asma non si può guarire per cui è importante che chi ne soffre assuma regolarmente i farmaci prescritti dal medico e si sottoponga a regolari visite di controllo. L'aderenza terapeutica al piano di cura della persona affetta da asma che comprende non solo l'assunzione con regolarità della terapia, ma anche il rispetto dei controlli medici come indicati dallo specialista oltre ad uno stile di vita adeguato, permette al malato di mantenere un compenso fisiopatologico, come viene definito in medicina.

Leggendo la definizione della patologia risulta evidente che di asma non si guarisce, ma a ciò c'è una piccola eccezione in quanto ci sono casi documentati di soggetti affetti da asma occupazionale che a seguito dell'allontanamento dal luogo di lavoro, dove si è esacerbata la patologia, hanno sperimentato una remissione stabile della patologia.

Questi casi sono un'eccezione, ma evidenziano come la patologia sia complessa ed eterogenea e con tante manifestazioni diverse che portano a decorsi estremamente differenziati.

Secondo l'Organizzazione mondiale della sanità (OMS), ci sono oltre 235 milioni di persone che soffrono di questa patologia in tutto il mondo e si stima che in Europa siano affette da asma bronchiale più di 30 milioni di persone, in Italia la prevalenza nell'età adulta risulta attorno al 5%, con una buona parte dei casi ascrivibile alla presenza di una o più allergie.

Analizzando la totalità della popolazione asmatica si stima che fino al 10% di questa soffra di una forma più severa di malattia (cosiddetta asma grave).

Se si guardano i dati pubblicati dalla Global initiative for asthma (Gina)<sup>26</sup>, ve ne sono, addirittura, 300 milioni, una ogni 20 di persone al mondo che soffrono di asma.

È da sottolineare come sia rilevante non solo il dato della prevalenza, ma anche che le morti associate alla malattia, secondo i dati dell'OMS, sono circa 250mila ogni anno con una perdita di 15 milioni di DALY (anni di vita aggiustati per la disabilità).

L'asma non è solo una malattia dell'età adulta, ma rappresenta la malattia cronica respiratoria più frequente in età pediatrica con una prevalenza generale in Italia che si stima attorno al 10%; l'andamento nel tempo dei dati di prevalenza dei diversi sintomi e della diagnosi di asma mostra un lieve ma sensibile incremento negli ultimi anni, sia nei bambini che negli adolescenti.

In particolare, proprio nella popolazione degli adolescenti italiani i dati di prevalenza dell'asma negli ultimi 12 mesi variano dall'1.7% per l'asma senza rinite al 5.1% per l'asma con rinite fino ad arrivare al 10.7% per asma con rinocongiuntivite (GINA)<sup>27</sup>.

Nel mondo l'asma è la prima patologia cronica per morbilità e mortalità in età pediatrica, secondo uno studio del 1996 la prevalenza dell'asma varia da 2 a 3,3% in Germania, Spagna, Grecia, Austria, Italia e Algeria, mentre oscilla tra 8 e 11,9% in Australia, Regno Unito e Nuova Zelanda (Dharmage SC et al, 2019)<sup>28</sup>, nel 2013 è stato stimato che 241 milioni di persone al mondo soffrivano di asma, e 1000 ne morivano ogni giorno (Lancet, 2016)<sup>29</sup>, nel 2017 la prevalenza media di asma negli USA è stata pari al 7,9%, con un valore maggiore in età pediatrica (8,4%) rispetto alla adulta (7,7%) (Stern J et al, 2020)<sup>30</sup>.

In Italia nel 2024 il ministero della salute stima che circa 3 milioni di persone (5% della popolazione) soffrano di asma, di cui il 10% di asma grave. L'87% degli asmatici italiani ha almeno una comorbidità, il 77% due (<https://www.salute.gov.it/portale/gar>).

Per comprendere al meglio la patologia ed i suoi effetti sulla salute è importante conoscere la struttura delle vie aeree.

Le vie aeree (trachea, bronchi, bronchioli) sono simili a un albero con tanti rami, più piccoli man mano che si diramano, e terminano con una sorta di piccoli palloncini, detti "alveoli" polmonari.

Le vie aeree servono a veicolare nei polmoni l'aria che respiriamo, fino agli alveoli dove avviene lo scambio tra l'ossigeno che inspiriamo con l'aria e l'anidride carbonica prodotta dall'organismo; in condizioni di normalità l'aria entra nelle vie aeree e arriva senza ostacoli fino agli alveoli polmonari, al contrario se un soggetto è asmatico l'infiammazione delle pareti delle vie bronchiali le rende ispessite ed edematose con maggiore produzione di muco, ostacolando il passaggio dell'aria, inoltre le cellule muscolari che circondano le vie aeree si contraggono restringendole (broncospasmo), spesso con aumento eccessivo del tono contrattile in risposta a stimoli esterni, sotto forma di un vero e proprio spasmo, contribuendo, così, a ostacolare maggiormente il passaggio dell'aria stessa, fino all'ostruzione totale o subtotale in corso di crisi asmatica acuta.

Ci sono vari sintomi caratteristici che possono far sorgere il sospetto della presenza di asma tra cui:

- respiro sibilante o fischi
- tosse cronica (generalmente secca)
- sensazione soggettiva di difficoltà respiratoria e/o oggettiva (dispnea)
- senso di costrizione od oppressione toracica
- respiro affannoso

Questi sintomi caratteristici dell'asma tendenzialmente non sono sempre presenti, ma hanno un andamento altalenante influenzato da vari fattori possono, infatti, presentarsi o peggiorare di notte, essere stagionali e/o manifestarsi in seguito all'esposizione ad allergeni, fumo, a emozioni, sforzi intensi, o in seguito a infezioni virali.

Il respiro sibilante e il "fiato corto" sono tra i sintomi maggiormente frequenti nel bambino asmatico di età inferiore ai 5 anni (circa 1 bambino su 3 nei primi 3 anni di vita).

Quando questi sintomi si presentano regolarmente è importante indagare ed approfondire per arrivare nel caso ad una diagnosi che prevede come step iniziale da parte del personale medico di una raccolta molto dettagliata dei dati e accurato esame obiettivo.

Insieme alla diagnosi di asma e la raccolta dati è utile anche l'identificazione di patologie (rinosinupatia, reflusso gastro-esofageo) o condizioni (sovrappeso/obesità) che possono essere alla base dell'asma o condizionarne l'evoluzione; in questo frangente è altrettanto importante verificare se il paziente assume farmaci (come l'aspirina) la cui intolleranza può scatenare un attacco d'asma.

Superato lo step iniziale il medico dopo aver raccolto l'anamnesi e visitato il paziente, se lo riterrà opportuno, potrà richiedere una serie di esami strumentali utili a descrivere la patologia ed il suo stadio:

- esami allergologici, per evidenziare se il soggetto che ha mostrato episodi d'asma è allergico o meno e in caso di positività ai test, di identificare a quali allergeni
- misurazione della funzionalità respiratoria mediante spirometria, meglio se eseguita con tecnica pletismografica, per valutare il grado di ostruzione bronchiale e la sua eventuale reversibilità (miglioramento) dopo somministrazione di broncodilatatore
- valutazione della reattività della parete bronchiale a stimoli aspecifici non allergenici mediante test di stimolazione bronchiale, il più comune dei quali è quello alla metacolina (test aspecifico), utile per la diagnosi di asma in caso di spirometria normale.

Una volta descritta la patologia e le condizioni di salute si passa poi alla definizione della terapia utile a mantenere sotto controllo la patologia.

La terapia dell'asma prevede la somministrazione di farmaci inalatori che possono essere somministrati singolarmente o in associazione tra loro, la prescrizione può essere "al bisogno", cioè indicata solo nelle fasi accessuali e di recrudescenza dei sintomi patologici, oppure in trattamento a lungo termine con somministrazione quotidiana in continuo, le indicazioni farmacologiche vanno in rapporto alla gravità della patologia tramite inalatori predosati pressurizzati, polveri secche o aerosolterapia, con eventuale uso di distanziatori.

I farmaci sono broncodilatatori beta 2 agonisti o anticolinergici (a breve o lunga durata d'azione), cortisonici che possono essere utilizzati per via inalatoria in diverse combinazioni tra loro, cromoni.

I cortisonici in caso di asma più grave possono essere somministrati anche per via orale. Altri farmaci a disposizione e sempre somministrabili per via orale sono gli antileucotrieni ed i teofillinici.

La terapia desensibilizzante tramite immunoterapia specifica è potenzialmente utile in caso di asma allergico e se effettuata precocemente può prevenirne lo sviluppo. In casi gravi e selezionati è utile il ricorso a farmaci biologici.

L'asma è una malattia molto complessa con la quale chi ne soffre convive per tutta la vita, esistono delle linee guida globali, periodicamente aggiornate, utili a migliorare la qualità della vita dei pazienti con un'attenzione anche al lavoro di prevenzione.

Queste linee guida sono le GINA (Global Initiative for Asthma), definiscono l'asma come: "Una malattia eterogenea, solitamente caratterizzata da infiammazione cronica delle vie aeree e da una storia di sintomi respiratori come respiro sibilante, mancanza di respiro, oppressione toracica e tosse, che variano nel tempo e nell'intensità, insieme a limitazioni variabili del flusso aereo espiratorio" (Conrad LA et al, 2021; GINA 2023)<sup>26,31</sup>.

L'asma bronchiale è una patologia caratterizzata principalmente da cinque differenti fenotipi clinici:

- Asma allergico: inizia in età pediatrica e si accompagna a atopia e familiarità;
- Asma non allergico: inizia in età infantile ma non è la conseguenza di una reazione allergica;
- Asma dell'adulto: inizia in età adulta e generalmente non si accompagna a allergia, comprende l'asma occupazionale;
- Asma con persistente limitazione del flusso d'aria: complicanza che si sviluppa in pazienti asmatici di lungo periodo
- Asma associato a obesità: non è di tipo allergico (Bel EH, 2004)<sup>32</sup>.

Le linee guida GINA definiscono l'asma grave come: "Una forma di asma che non riesce a essere controllato nonostante l'aderenza alla terapia massimale ottimizzata e il trattamento dei fattori contribuenti, oppure che peggiora quando si riduce il trattamento ad alte dosi".

### 1.5.1 Eziologia dell'asma

L'asma bronchiale, come già accennato, è una patologia multifattoriale, in cui ad un substrato genetico, si va a sommare un effetto ambientale; il tutto porta poi all'esordio della patologia (Mims JW, 2015)<sup>33</sup>.

Nell'eziologia di questa patologia la genetica ricopre un ruolo di grande rilievo; infatti, il rischio di svilupparla può aumentare dal 35 fino al 95% a causa di mutazioni genetiche che il soggetto possiede già alla nascita; ad oggi sono state identificate centinaia di mutazioni che aumentano il rischio di asma (Ober C et al, 2011)<sup>34</sup>.

Analizzando questo aspetto e considerando le principali differenze tra soggetti asmatici e sani, in termini di mutazioni genetiche, queste si concentrano sul locus 17q21; in particolare, le più frequenti mutazioni si trovano a carico dei geni ORMDL3, GSDMB, ZBP2 e IKZF3 e riducono il folding proteico nel reticolo endoplasmico, provocando un effetto pro-infiammatorio.

Nell'insorgenza e nell'evoluzione della patologia non solo le mutazioni ma anche l'epigenetica riveste un ruolo importante; la metilazione del DNA mitocondriale è stata infatti correlata con una deregolazione dei meccanismi infiammatori (Harb H et al, 2015)<sup>35</sup>.

È ormai noto in letteratura che anche infezioni da rhinovirus o virus respiratorio sinciziale nei primi anni di vita possono essere poi in fase di crescita dei fattori di rischio per l'insorgenza della patologia (Jackson DJ et al, 2008; Castro-Rodriguez JA et al, 2016)<sup>36,37</sup>; insieme a numerosi aspetti dello stile di vita e dell'ambiente in cui viviamo che possono favorire o interferire con questa patologia.

#### Fattori di rischio ambientali:

- *Fumo di tabacco.* Diversi studi hanno dimostrato che in età pediatrica i figli di genitori fumatori hanno un rischio doppio di sviluppare asma, per questo motivo questa relazione vale sia per il fumo attivo che passivo; infatti, è stato dimostrato anche che il fumo passivo durante l'infanzia aumenta il rischio di sviluppare asma in età adulta (Skorge TD et al, 2005)<sup>38</sup>. Inoltre, i fumatori, e soprattutto le fumatrici attive, hanno un rischio più elevato di sviluppare asma, in particolare forme resistenti ai corticosteroidi (Vozoris NT et al, 2011)<sup>39</sup>.

- *Inquinamento* (particolato e biossido di azoto). L'esposizione all'inquinamento dell'aria esterna e negli ambienti indoor, quindi sia inquinamento indoor che outdoor, rimangono un fattore di rischio significativo sia per lo sviluppo dell'asma che per l'insorgenza dei sintomi dell'asma (Jung KH et al, 2012)<sup>40</sup>; inoltre sono fattori di rischio sia il particolato fine, PM10 (Particulate Matter less than 10 µm), che il biossido di azoto, NO<sub>2</sub>, i quali sono presenti sia all'esterno che all'interno delle abitazioni e sono prodotti dai motori a combustione interna e dagli impianti industriali, ma anche dai fornelli di casa e dagli impianti di riscaldamento (Toskala E et al, 2015)<sup>41</sup>.
- *Obesità*. Numerosi studi hanno confermato un rapporto tra obesità e asma; i soggetti obesi hanno più probabilità di essere asmatici e di contrarre asma grave, che risulta poi non responsiva alla terapia.  
L'ipotesi è che l'obesità aumenti l'infiammazione sulle vie aeree, con sviluppo di un fenotipo più difficile da controllare (Weiss ST, 2005)<sup>42</sup>.
- *Esposizione professionale*. Ci sono una classe di sostanze a cui si può essere esposti professionalmente che sono considerate agenti sensibilizzanti (attivanti una reazione allergica), queste sostanze possono essere a alto peso molecolare (HMW – High Molecular Weight) o basso peso molecolare (LMW – Low Molecular Weight). Tra gli HMW più rilevanti troviamo farina, enzimi, alimenti, gomme, tabacco, allergeni di origine animale. Tra gli LMW, invece, troviamo i poli isocianati, le anidridi acide e i metalli. Oltre alla più comune forma di asma allergica collegata a queste sostanze, esiste anche un fenotipo di asma definita asma occupazionale che non è su base allergica, ma dovuta agli effetti irritanti sulle vie aeree intrinseci all'agente stesso (fumi di incendio, aldeidi, emissioni di motori Diesel, acidi).  
L'asma occupazionale non è da sottovalutare perché ha un impatto importante sulla sfera economica, sociale e lavorativa della persona (Karvala K et al, 2011)<sup>41</sup>.
- *Infezioni virali*. Diversi studi mostrano l'esistenza di un'associazione tra le infezioni virali delle vie aeree, contratte in tenera età, e lo sviluppo di asma infantile; gli agenti eziologici principali sono: rhinovirus umano (HRV), virus respiratorio sinciziale (RSV), virus dell'influenza e della parainfluenza, coronavirus, adenovirus, metapneumovirus umano e bocavirus (Holt PG et al, 2012)<sup>43</sup>.
- *Ipotesi igienica*. Negli ultimi decenni il maggiore uso di antibiotici, il miglioramento dell'igiene e l'urbanizzazione hanno ridotto l'esposizione infantile a infezioni che

precedentemente erano comuni, rendendoci le vie aeree superiori più sensibili all'infiammazione, questa ipotesi è supportata da modelli murini, in cui si è studiato come l'esposizione agli agenti patogeni in fase precoce di vita favorisca un certo grado di tolleranza immunologica e dunque una diminuzione del livello di infiammazione delle vie aeree (Prokopakis E et al, 2013)<sup>44</sup>.

- *Stress*. Recenti scoperte suggeriscono potenziali meccanismi alla base di una associazione tra stress sociale cronico e asma, a supporto di questa nuova associazione esistono anche evidenze che indicano l'esistenza di geni di suscettibilità che predispongono i giovani cronicamente stressati sia al disturbo da stress post-traumatico (PTSD) che all'asma (Rosenberg SL et al, 2014)<sup>45</sup>.
- *Ansia*. In letteratura esistono molti studi anche che evidenziano una correlazione tra l'asma e stati ansiogeni (Ye et al, 2021)<sup>46</sup>.

### 1.5.2 Patogenesi dell'asma

L'evoluzione eziopatologica dell'asma si articola essenzialmente su tre meccanismi principali concatenati tra di loro: infiammazione, iperreattività e rimodellamento delle vie aeree (Russell RJ et al, 2017)<sup>47</sup>.

Il condizionamento a vicenda di questi tre elementi è governato da dinamiche che possono cambiare durante la vita di un soggetto asmatico oltre ad essere affette da variabilità interindividuale, ma il quadro si complica ulteriormente se si prendono in considerazione anche gli effetti della farmacoterapia, dello stile di vita del paziente e di eventuali comorbidità (Russell RJ et al, 2017)<sup>47</sup>.

Nello spettro asmatico il profilo infiammatorio dominante è quello mediato dai linfociti Th2, con conseguente eosinofilia nell'espettorato, dove i linfociti Th2 differenziati e attivati producono le interleuchine IL-4, IL-5 e IL-13, fondamentali per la regolazione dell'infiammazione e del processo infiammatorio; una volta in circolo gli eosinofili si attivano e si accumulano nei tessuti infiammati, con un processo mediato dalle interleuchine IL-4 e IL-5, mentre gli eosinofili aderiscono all'endotelio vascolare, si formano legami tra le integrine sulla superficie degli eosinofili e i recettori di adesione sulla superficie dell'endotelio vascolare (come P-selectina/P-selectin glicoproteina ligando-1 e VCAM-1 ligando).

A questo punto della cascata infiammatoria gli eosinofili vengono reclutati nella mucosa bronchiale sotto l'influenza della famiglia di chemochine delle eotaxine (CCL11, CCL24 e CCL26), ed è proprio l'eosinofilo a regolare diversi aspetti della risposta infiammatoria nell'asma. Specifiche proteine basiche rilasciate dagli eosinofili localizzati nella parete bronchiale, causano danni all'epitelio di superficie (proteina cationica eosinofila – ECP, neurotossina derivata dagli eosinofili – EDN, perossidasi eosinofila – EPO, proteina basica maggiore – MBP), inoltre la MBP può indurre iperreattività delle vie aeree.

Gli eosinofili sono anche una fonte di cisteinil-leucotrieni, che hanno come azione principalmente quella di causare broncocostrizione, fenomeno tipico della malattia, che porta a dispnea e difficoltà respiratorie.

Un altro aspetto fondamentale e caratterizzante nella fisiopatologia è l'iperreattività bronchiale (AHR), AHR è una risposta patologica caratterizzata dall'aumento o dalla disfunzione della contrattilità della muscolatura liscia delle vie aeree (ASM) di fronte a una serie di stimoli e stressor, in particolare a fronte dello stimolo da stress ossidativo, oppure da esposizione a inquinanti ambientali inalati o ad altre particelle irritanti; l'ASM risulta in forma più severa quando è correlata a livelli più elevati di stress ossidativo, inducendo una maggiore espressione di NADPH ossidasi 4 (NOX4), in questo caso anche l'IL-33, prodotta dall'epitelio, contribuisce anch'essa al mantenimento dell'AHR durante la sfida allergenica; Infine, il danno delle vie aeree ed il conseguente aumento dell'infiammazione sistemica, favoriscono il rilascio nel torrente ematico di High Mobility Group BOX- 1 (HMGB-1), che amplifica l'ipercontrattilità dell'ASM mediante l'attivazione del recettore Toll-like-4 (TRL-4).

Il fenomeno del rimodellamento delle vie aeree consiste in una serie di eventi che portano a modifiche strutturali, tra cui alterazioni dell'epitelio, iperplasia delle ghiandole mucose, ispessimento dello strato di collagene sotto epiteliale, aumento della deposizione di matrice sottomucosa, ipertrofia e iperplasia dell'ASM, insieme alla localizzazione e degranolazione dei mastociti nel fascio dell'ASM.

Se si prendono in considerazione i soggetti affetti da asma grave in questi si osserva, comunemente, un ispessimento della parete bronchiale e la presenza di bronchiectasie che è possibile andare ad identificare tramite imaging TC, mentre nei soggetti asmatici che contestualmente sono forti fumatori, vi è un considerevole e significativo riscontro di bronchiectasie rispetto agli asmatici non fumatori, questo dato suggerisce una maggiore

suscettibilità da parte degli asmatici alle modifiche della parete delle vie aeree in risposta a esposizioni ambientali. Tuttavia, rimane incerto e di difficile definizione se le bronchiectasie siano una conseguenza naturale dell'asma grave o costituiscano piuttosto una comorbidità separata che contribuisce alle sfide nel trattamento.

Le valutazioni del rimodellamento macroscopico a carico delle vie aeree avvengono tramite TC macroscopica ed i dati sono poi correlati con quelli dell'indagine microscopica relativa alle modifiche osservate nelle biopsie bronchiali; la massa dell'ASM e lo spessore epiteliale misurati su queste biopsie possono comprendere l'area del lume bronchiale in sezione trasversale e l'area della parete delle vie aeree alla TC.

Di conseguenza, un aumento della massa dell'ASM e dello spessore epiteliale potrebbero contribuire all'ispessimento della parete bronchiale nei pazienti asmatici gravi (Russell RJ et al, 2017)<sup>47</sup>.

Il confronto tra le biopsie bronchiali, prelevate da pazienti con diversi gradi di gravità di asma, e biopsie eseguite su soggetti sani evidenzia quanto sia direttamente proporzionale l'aumento dell'iperplasia e della metaplasia epiteliale alla gravità della malattia; i cambiamenti nella struttura e nell'integrità della barriera epiteliale possono, come conseguenza, portare ad una disfunzione ciliare che è caratterizzata da una ridotta frequenza del battito ciliare ed un aumento delle ciglia discinetiche e immobili, questa disfunzione è anche associata ad importanti manifestazioni cliniche, come aumento della suscettibilità alle infezioni, compromissione della funzione polmonare e AHR, suggerendo, quindi, un'origine complessa che include fattori come l'esposizione a irritanti inalatori e infezioni batteriche (Russell RJ et al, 2017)<sup>47</sup>.

### 1.5.3 Aspetti clinici

I sintomi respiratori caratteristici includono respiro sibilante, difficoltà respiratoria, tosse e/o oppressione toracica (Levy ML et al, 2006)<sup>48</sup>:

- Nei pazienti, soprattutto adulti, è comune la presenza di più di uno di questi sintomi.
- I sintomi generalmente tendono ad essere più pronunciati durante la notte o al mattino in corrispondenza del nadir del cortisolo.
- La frequenza e l'intensità dei sintomi possono variare nel tempo.

- Gli eventi scatenanti comprendono infezioni virali (come le infezioni delle alte vie aeree), attività fisica, allergeni, cambiamenti meteorologici (si intende il passaggio da ambienti umidi a secchi e vv, oppure da ambienti caldi a freddi e vv), risate o irritanti come il fumo o odori forti.

Ci sono però caratteristiche che riducono la probabilità che si tratti di asma, visto che questi sintomi possono essere comuni ad altre patologie:

- Tosse isolata senza altri sintomi respiratori.
- Presenza cronica di espettorato.
- Mancanza di respiro accompagnata da vertigini, stordimento o sensazioni di formicolio periferico (parestesia).
- Dolore toracico.
- Dispnea durante l'esercizio fisico, con respiro rumoroso all'inspirazione.

#### 1.5.4 Diagnosi dell'asma

Secondo le linee guida GINA prima che avvenga una diagnosi definitiva di asma è necessaria, in primo luogo, una storia di sintomi respiratori tipici della patologia, ovvero respiro sibilante, respiro affannoso, costrizione toracica e tosse (GINA, 2023); inoltre questi devono avere delle caratteristiche specifiche:

- Più di un tipo di sintomo respiratorio (negli adulti, la tosse isolata è raramente dovuta all'asma).
- I sintomi si manifestano in modo variabile nel tempo e variano di intensità.
- I sintomi sono spesso peggiori di notte o al risveglio.
- I sintomi sono spesso scatenati da esercizio fisico, risate, allergeni, aria fredda.
- I sintomi spesso compaiono o peggiorano con infezioni virali.

Seguendo le linee guida, una volta accertata la presenza di queste manifestazioni cliniche ed effettuata l'anamnesi, è necessario confermare la limitazione del flusso d'aria espiratorio, ed inoltre accertare l'alterazione della funzione polmonare per la quale è necessario avere la positività per almeno uno di sei criteri seguenti (GINA, 2023):

1. Test positivo di reattività (reversibilità) del broncodilatatore (BD). Adulti: aumento del FEV1 del >12% e >200 ml (maggiore confidenza se l'aumento è del >15% e >400 ml). Bambini: previsto un aumento del FEV1 rispetto al basale del >12%. Misurare il cambiamento 10-15 minuti dopo 200-400 mcg di salbutamolo (albuterolo) o equivalente, rispetto alle letture pre-BD. Test positivo più probabile se BD trattenuto prima del test: SABA ≥4 ore, LABA due volte al giorno 24 ore, LABA una volta al giorno 36 ore.
2. Eccessiva variabilità del PEF due volte al giorno nell'arco di 2 settimane. Adulti: variabilità media giornaliera della PEF diurna >10%. Bambini: variabilità media giornaliera della PEF diurna >13%.
3. Miglioramento della funzionalità polmonare dopo 4 settimane di trattamento. Adulti: aumento del FEV1 del >12% e di >200 ml (o PEF del >20%) rispetto al basale dopo 4 settimane di trattamento contenente ICS, in assenza di infezioni respiratorie.
4. Test di provocazione positivo all'esercizio fisico. Adulti: calo del FEV1 >10% e >200 ml rispetto al basale Bambini: calo del FEV1 >12% o PEF >15% rispetto al basale.
5. Test di provocazione bronchiale positivo (di solito solo per gli adulti). Calo del FEV1 rispetto al basale ≥20% con dosi standard di metacolina, o del ≥15% con iperventilazione standardizzata, soluzione salina ipertonica o provocazione con mannitolo.
6. Eccessiva variazione della funzione polmonare tra una visita e l'altra (buona specificità ma scarsa sensibilità) Adulti: variazione del FEV1 >12% e >200 ml tra le visite, in assenza di infezioni respiratorie. Bambini: variazione del FEV1 >12% o del >15% nel PEF tra una visita e l'altra (anche in presenza di infezioni respiratorie).

Infine, come ultima conferma per la diagnosi, è necessario che la limitazione del flusso d'aria espiratorio sia documentata, cioè, in un momento in cui il FEV1 è ridotto (ad es. durante i test di cui sopra), è necessario verificare che anche il FEV1/FVC sia ridotto rispetto al limite inferiore della norma (di solito è >0,75-0,80 negli adulti, >0,90 nei bambini).

La diagnosi differenziale è da eseguire con:

- Sindrome da tosse cronica delle vie aeree superiori;
- Inalazione di corpo estraneo;
- Bronchiectasia;

- Discinesia ciliare primitiva;
- Cardiopatie congenite;
- Displasia broncopolmonare;
- Fibrosi cistica;
- Tubercolosi;
- Pertosse.

In particolare, negli adulti la diagnosi differenziale si esegue in relazione alle seguenti patologie ostruzione laringea inducibile, iperventilazione, BPCO (Bronco-Pneumopatia Cronica Ostruttiva), scompenso cardiaco, tosse correlata ai farmaci, embolia polmonare e ostruzione delle vie aeree centrali.

Nella popolazione adulta, è necessario porre l'attenzione anche sull'asma professionale e sull'asma esacerbato dal lavoro; infatti, si stima che il 5-20% dei casi di asma con esordio in età adulta sia dovuto a esposizione professionale (Baur X et al, 2012), in quest'ultimo caso per la conferma della diagnosi è fondamentale chiedere al paziente se i sintomi migliorano nel fine settimana o quando non pratica un determinato hobby, o è comunque lontano dall'attività lavorativa, ed altresì utile misurare il picco di flusso espiratorio (PEF) sia durante l'attività lavorativa che a riposo.

### 1.5.5 Terapia

In caso di comparsa di sintomi asmatici ed in caso di riacutizzazioni, le linee guida GINA, suggeriscono la somministrazione di corticosteroidi inalatorio (come beclometasone e fluticasone) e formoterolo (agonista selettivo dei recettori  $\beta_2$ -adrenergici a lunga durata d'azione, con effetto broncodilatatorio), ma in alternativa, sempre le linee guida, consigliano di iniziare la terapia dell'asma con corticosteroidi inalatorio e  $\beta_2$  agonisti a breve durata d'azione (come il salbutamolo).

Nel caso l'asma si presenti con una esacerbazione acuta si può iniziare il trattamento con corticosteroidi inalatorio e  $\beta_2$  agonisti a lunga durata d'azione (come il salmeterolo), mentre come terapia sul lungo periodo con l'obiettivo di arrivare al pieno controllo dei sintomi asmatici è indicato l'utilizzo di corticosteroidi inalatorio e formoterolo, inizialmente al bisogno e successivamente a dose di mantenimento; nel caso che questi due farmaci non

fossero efficaci a basso dosaggio, medio o alto è opportuno impostare una nuova terapia, infine, come ultima scelta, si può provare con l'integrazione di un antagonista muscarinico a lunga durata di azione (come l'ipratropio), oppure un farmaco anti-IgE, anti IL-5/5R, anti IL-4R $\alpha$ , anti-TSLP (LinfoProteina Timica Stromale).

### 1.5.6 Prognosi

Andando ad analizzare la prognosi è importante sottolineare che l'asma allergico ad esordio infantile ha una prognosi migliore rispetto all'asma con esordio in età adulta, infatti circa 3 bambini asmatici su 4 guariscono dall'asma entro i 40 anni (Tuomisto LE et al, 2015)<sup>49</sup>; in particolare, la remissione completa della patologia asmatica (non smettono di essere asmatici ma non hanno più sintomi) a esordio infantile è circa quattro volte più probabile rispetto all'asma con esordio in età adulta; i pazienti con asma con esordio in età adulta hanno un rischio tre volte maggiore che la patologia progredisca e determini una limitazione persistente del flusso aereo rispetto ai pazienti con asma che si sviluppa entro l'adolescenza (prima del diciottesimo compleanno).

Oltre all'età, la prognosi è influenzata dall'ottima risposta ai glucocorticoidi inalatori nell'asma adolescenziale, tanto che negli adulti sono spesso necessarie diverse terapie integrative, creando quindi una differenza nel trattamento farmacologico che può differenziare le due popolazioni.

## 1.6 Monitoraggio biologico e Biomarkers

La caratterizzazione dell'esposoma e della correlazione tra tutti gli attori fino ad ora descritti è possibile sono avvalendosi di strumenti tipici della medicina del lavoro come gli indicatori utilizzati nel monitoraggio biologico ed ambientale.

L'istituto superiore di sanità definisce il monitoraggio biologico nel seguente modo:

“Per monitoraggio biologico si intende la valutazione dell'esposizione attraverso la misura di una sostanza (xenobiotico) o dei suoi prodotti di trasformazione metabolica in compartimenti biologici eticamente raggiungibili o attraverso la misura di effetti biologici riferibili alla sostanza stessa”.

Il principale vantaggio del monitoraggio biologico rispetto al monitoraggio ambientale è rappresentato dalla possibilità di disporre di dati che riflettono la dose assimilata dall'organismo attraverso tutte le vie di ingresso (dermica, inalatoria e digestiva). Il monitoraggio biologico è particolarmente rilevante per l'assorbimento dei fitofarmaci, infatti a causa delle molteplici vie attraverso le quali si può verificare l'esposizione, questo tipo di monitoraggio consente di valutare in maniera congiunta sia l'esposizione occupazionale che extralavorativa.

Il monitoraggio biologico assume un valore aggiunto quando sono ben note le relazioni tra dosi esterne, dosi interne ed effetti sulla salute. Nel caso in cui siano note soltanto le relazioni tra dosi esterne e interne il parametro biologico può essere usato solo come indice di esposizione. La stima corretta delle dosi assorbite necessita di conoscenze adeguate sul metabolismo e sulla farmacocinetica della sostanza, sull'uomo e/o sugli animali da esperimento. Tali dati risultano utili per la scelta della matrice biologica e delle modalità di campionamento.”

Nel mondo della medicina occupazionale il monitoraggio biologico è definito come:

“Misura ripetitiva nei tessuti, nei secreti, nell'aria espirata del soggetto esposto degli agenti presenti nel luogo di lavoro o dei loro metaboliti per valutare l'esposizione e il rischio per la salute in rapporto ad appropriati riferimenti. I parametri studiati per questo scopo sono definiti "Indicatori Biologici / Indicatori Biologici di Esposizione" o “Biological Exposure Indices”, acronimo “BEI””.

Il monitoraggio biologico è la valutazione dell'esposizione dei lavoratori alle sostanze di lavoro mediante determinazione di un Indicatore Biologico (Indicatore Biologico di Esposizione) in una matrice biologica accessibile; l'indicatore può essere di varia natura sia la sostanza di lavoro stessa che un suo metabolita o anche una sostanza propria dell'organismo che viene influenzata dalla sostanza a cui si è esposti.

Il materiale biologico, in cui viene effettuata la rilevazione ed il dosaggio è costituito per lo più da urina o sangue.

Il monitoraggio biologico permette di valutare il carico tossico interno causato da una sostanza specifica presente sul lavoro o la conseguente reazione del lavoratore esposto a tale

sostanza. La concentrazione nell'aria ambientale descrive il carico esterno, mentre l'effetto sull'organo bersaglio consiste in una sollecitazione o in un effetto avverso.

L'applicazione degli Indicatori Biologici di Esposizione (BEI) per la valutazione dell'esposizione al rischio agenti chimici, in aggiunta ai metodi chimico-fisici per la misura degli agenti cancerogeni, stanno trovando una crescente applicazione in questo ambito, nonostante le norme europee ed italiane non riportano, ad oggi, valori di BEI nel D.Lgs. 81/2008 (salvo Pb), e metodi analitici a cui fare riferimento, quindi rientra nella prassi fare riferimento ai valori dei BEI dell'AICGQ.

Andare a misurare contemporaneamente degli indicatori biologici di esposizione e le concentrazioni ambientali potenzia la possibilità di effettuare una corretta valutazione dell'esposizione, diventando così la via preferenziale da seguire per la valutazione degli agenti cancerogeni e mutageni soprattutto a basse dosi.

Lo scopo principale del monitoraggio biologico è indagare la presenza di eventuali rischi per la salute dei lavoratori, attraverso la misurazione della quantità assorbita di composti tossici durante lo svolgimento delle attività lavorative, per garantire una maggiore attendibilità e descrivere meglio il rischio, il monitoraggio biologico dovrebbe essere utilizzato in combinazione con il monitoraggio ambientale e la sorveglianza sanitaria.

Monitoraggio biologico

+

Monitoraggio ambientale

+

Sorveglianza sanitaria

I BEI possono essere classificati in base a diversi criteri, tra cui:

- materiale biologico (matrice biologica) in cui vengono analizzati (urine, sangue etc..)
- organo o tessuto in cui hanno origine o che li ha prodotti (renale, epatico, etc.)
- caratteristiche chimico-fisiche (volatili, liposolubili etc.)
- significato tossicologico che viene loro attribuito.

In base a quest'ultimo criterio si differenziano in:

- Indicatori di esposizione (indicano la quantità di sostanza assorbita (ad es. piombemia assorbita, metaboliti urinari dei solventi, cadmiuria, cromuria)
- Indicatori di effetto (o risposta) (ad es. ALA U, HbCO, Protoporfirina IX, acetilcolinesterasi)
- Indicatori di suscettibilità (genetica, ambiente) (N)

Figura 8 monitoraggio biologico, schema esplicativo, e BEI

Questi strumenti sono tipici della medicina del lavoro e proprio le linee guida per il monitoraggio biologico della Società Italiana di Medicina del Lavoro (**SIML**) (Mutti, 2013), sottolineano come una corretta valutazione del rischio consista nel caratterizzare i potenziali effetti nocivi dell'esposizione umana a rischi ambientali e a tal fine si raccomanda una procedura articolata su quattro fasi:

1. Identificazione degli agenti di rischio per valutare se gli stessi possano essere causa di danno per la salute.
2. Definizione della/e relazione/i dose-risposta, per individuare se sussiste una relazione tra l'entità della dose o il livello di esposizione all'agente di rischio e l'incidenza di un particolare effetto nocivo nella popolazione esposta, ovvero quella che è la normale risposta biologica dell'organismo.
3. Valutazione dell'esposizione, valutazione che può essere di tipo qualitativo o quantitativo; analisi quantitativa che si ottiene attraverso misure di monitoraggio ambientale e biologico.
4. Caratterizzazione del rischio, utile per valutare la probabilità e la gravità di eventuali danni per la salute dei soggetti esposti ad una data dose o concentrazione.

Per effettuare una corretta valutazione del rischio, e anche una corretta descrizione dell'esposizione, è importante identificare prima le categorie di biomarkers necessarie e successivamente, per queste categorie, quali sono i makers più appropriati per descrivere l'inquinamento e dei suoi effetti sulla salute; inoltre per un'attenta analisi della valutazione dell'esposizione, nel caso di inquinanti ubiquitari, è utile applicare le regole del monitoraggio biologico, e gli strumenti che ci fornisce come i biomarkers correlati all'esposizione.

Un biomarker rappresenta un indice dell'effetto o della presenza di uno xenobiota all'interno di un organismo, presenza che si manifesta attraverso specifici cambiamenti molecolari, biochimici, fisiologici, istologici e morfologici nella popolazione animale e vegetale.

Entrando nello specifico della definizione dei biomarkers e del loro ruolo, l'International Program of Chemical Safety (IPCS) nel documento aggiornato al 23 luglio 2009 IPCS, dichiara che questi possono essere identificati e suddivisi in tre classi:

1. Biomarcatori d'esposizione: è la risposta di un organismo a seguito dell'esposizione a un composto chimico o a una classe di composti, ma che non fornisce nessuna indicazione dei reali effetti tossicologici sull'organismo.

2. Biomarcatori d'effetto: è una modificazione biochimica o fisiologica, misurabile in un tessuto o in un fluido corporeo, associata ad un possibile o effettivo stato di malattia.
3. Biomarcatore di suscettibilità: si riferisce all'innata o all'acquisita capacità di un organismo a rispondere ad una specifica sostanza xenobiotica.

Nel contesto scientifico, i confini tra queste classi non sono più così nitidi e queste non solo le uniche classi riconosciute; basta pensare che, i biomarkers, o indicatori, nel mondo della medicina del lavoro e soprattutto nel campo dell'esposizione a xenobiotici, attualmente possono essere suddivisi in 4 macroaree:

1. Biomarkers di esposizione
2. Biomarkers di effetto
3. Biomarkers di suscettibilità
4. Biomarkers infiammazione

I biomarcatori di esposizione hanno l'obiettivo di rivelare la presenza di xenobiotici, in questo caso specifico di inquinanti, o dei loro metaboliti, e possono essere utilizzati per confermare o stimare l'esposizione di individui considerati esposti ad una particolare sostanza o per valutare l'esposizione di una popolazione ad una o più tossici, fornendo così informazioni riguardo il legame tra esposizione esterna e dose interna.

Mentre, i biomarcatori d'effetto valutano la risposta dell'organismo ad una determinata esposizione e possono essere utilizzati sia per documentare effetti avversi dovuti a questa e all'assorbimento di una sostanza chimica sia per studiare gli effetti a lungo termine di esposizioni croniche.

Generalmente i markers d'effetto, che risultano essere più sensibili, sono rappresentati da sostanze la cui produzione è collegata da alterazioni nei livelli e nell'attività degli enzimi della biotrasformazione; infatti, parallelamente all'effetto negativo intrinseco della sostanza tossica, nell'organismo esposto si possono sviluppare delle risposte adattive che tendono a riportare il sistema ad uno stato di omeostasi ed è appunto la rilevazione di questi prodotti di riparo e la loro correlazione con il danno subito che aiuta a identificare l'effetto dell'esposizione.

Il nostro organismo tende sempre all'omeostasi, di conseguenza, a seguito di un danno subito mette in atto meccanismi di difesa e cerca di ripristinare la condizione iniziale così

che, le risposte a livello molecolare tendono a diminuire l'effetto tossico del composto inquinante, attraverso l'introduzione di sistemi multi-enzimatici o di proteine di legame.

Visto questo comportamento intrinseco del nostro corpo, i biomarkers possono essere specifici oppure generali in relazione alla loro specificità di risposta nei confronti di composti inquinanti.

Biomarkers specifici: rappresentano l'insieme delle risposte molecolari e/o biochimiche che si verificano in seguito all'esposizione ad una specifica classe di contaminanti, il loro dosaggio permette di risalire al responsabile della contaminazione e in alcuni casi anche allo specifico contaminante a cui si è stati esposti.

Biomarkers generali: rappresentano le risposte dell'organismo a livello molecolare, cellulare e fisiologico ad un danno subito, ma che non possono essere ricondotte ad un inquinante in particolare, rappresentano, infatti, uno stato generale di stress dell'organismo, il cui esempio maggiormente indicativo è lo stress ossidativo.

Biomarkers molecolari: danno informazioni riguardo le risposte degli organismi a livello di organizzazione biologica, permettendo così di ottenere informazioni tempestive e sensibili dell'influenza dei tossici sull'organismo o su sistemi specifici.

I biomarkers di suscettibilità sono indicatori biologici di una condizione geneticamente determinata o acquisita che rende il soggetto portatore sensibile all'esposizione ad una specifica sostanza.

La quarta nuova classe non è altro che un sottogruppo che si trova in uno spazio compreso tra le due precedenti; gli indicatori di infiammazione non sono altro che la risposta dell'organismo ad un danno, quindi indicano un effetto, ma al contempo la loro quantità assoluta non è solo dovuta all'effetto dello xenobiotico, ma anche dall'innata capacità dell'organismo di generare una risposta e quindi ne descrivono anche la suscettibilità.

Spostandoci nel mondo dell'epigenetica, o altri filoni di ricerca, troviamo anche altri tipi di biomarkers in base alle diverse definizioni che si possono adottare; seguendo appunto l'epigenetica vengono classificati e codificati i biomarkers anche di tipo:

1. Predittivo
2. Adattamento

### 3. Diagnosi precoce

Nello specifico per valutare l'esposizione dei lavoratori agli agenti chimici e il rischio correlato vengono utilizzati due metodi complementari:

1. La misurazione delle sostanze di lavoro nell'aria ambiente (airmonitoring).
2. Il monitoraggio biologico unito agli esami clinici preventivi da parte del medico competente.

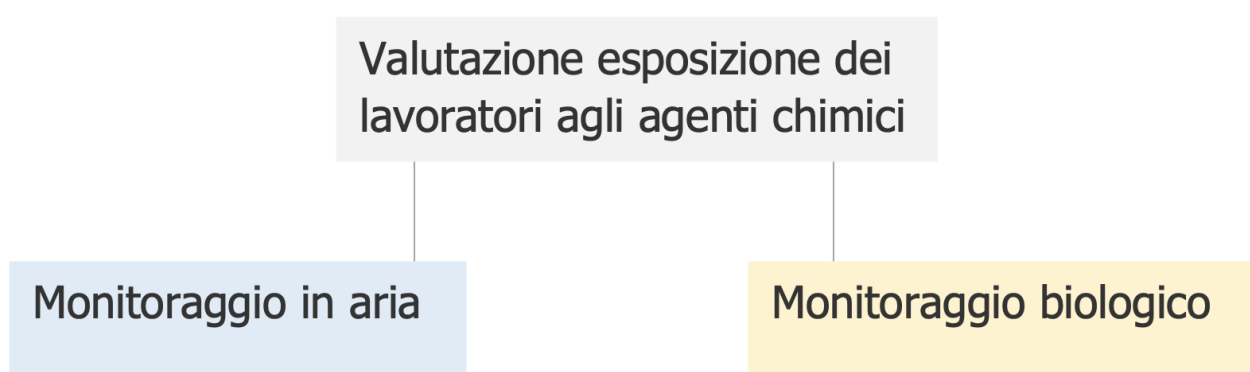


Figura 9 valutazione esposizione professionale

Ogni sostanza ha poi dei markers specifici che sono riconosciuti a livello di legge atti a descrivere l'esposizione ad essa e anche l'effetto sortito sull'organismo; se prendiamo come esempio il Benzene gli indicatori Biologici di esposizione (BEI) a quest'ultimo sono definiti da una norma UNI specifica: Benzene / Norma UNI (UNI 11608:2015). La norma definisce in primo luogo i livelli ambientali a cui un lavoratore può essere esposto ed i metodi per la quantificazione del benzene tale e quale sia ambientale che urinario ed in secondo luogo quale è per gli ambienti di lavoro l'indicatore d'esposizione occupazionale al benzene.

La valutazione dell'esposizione a benzene avviene attraverso la determinazione dell'acido trans,trans muconico (t,t-MA) che viene quantificato in urina mediante cromatografia liquida ad alta risoluzione con rivelatore a spettrometria di massa (HPLC-MS).

La norma specifica sia il biomarker sia i limiti di legge, ma anche il metodo per la determinazione della concentrazione ( $\mu\text{g/l}$ ) di acido trans, trans muconico (t,t-MA), utilizzato quale indicatore biologico d'esposizione (BEI) al benzene, in matrice urinaria.

Il monitoraggio biologico, se accurato e preciso, è utile nel fornire informazioni attendibili sulla quantità della sostanza tossica in esame realmente assorbita dall'organismo (dose interna) che può essere differente dalla quantità a cui si è esposti.

La valutazione del rischio, al fine di descrivere accuratamente l'esposizione, deve considerare tutti gli indicatori disponibili compresi quelli di suscettibilità, anche se il loro utilizzo può configurare situazioni difficili di selezione ed addirittura di discriminazione con implicazioni etiche non irrilevanti per il comportamento del medico e dello sperimentatore.

Nello specifico degli inquinanti ambientali, che sono sostanze ubiquitarie è importante adottare un approccio integrato che tiene in considerazione tutti i biomarkers a disposizione, inquanto un quadro così eterogeneo ha bisogno di essere studiato a vari livelli e da vari punti di vista.

Descrivere l'esposizione e l'effetto dell'inquinamento risulta complesso, a differenza dell'esposizione professionale, non è un'esposizione acuta e sostanza specifica, ma è un'esposizione cronica a basse dosi di un pool di sostanze che possono avere non solo il loro singolo effetto tossico, ma anche un effetto sinergico, o alterandosi a vicenda gli effetti diventando uno il confondente dell'altro; inoltre la popolazione presa in esame è la popolazione generale anch'essa caratterizzata da molteplici variabilità che influiscono sulla metabolizzazione e sull'effetto dell'esposizione, così che la medesima esposizione può avere effetti diversi su individui diversi.

Oltre alla variabilità propria della popolazione sana, in questo caso, è necessario tenere in considerazione anche della variabilità introdotta dalle patologie respiratorie, soprattutto in relazione al fatto che gli inquinanti sono dispersi nell'aria e quindi "la via di somministrazione" è proprio quella inalatoria e l'apparato respiratorio è deputato al loro assorbimento e quindi è il punto cruciale del passaggio dall'ambiente al corpo umano. Viene da sé che se un soggetto è portatore di una patologia che colpisce il sistema respiratorio, quest'ultima inciderà sull'assorbimento dell'agente inquinante.

La patologia influisce non solo sull'assorbimento ma anche sulla metabolizzazione rendendola quindi una variabile importante da monitorare.

Al fine di descrivere questo fenomeno, molto complesso ed eterogeneo, si è individuato un pool di markers appartenenti a tutte le classi in modo da valutare più aspetti possibili; infatti, si

sono considerati gli inquinanti tali e quali ed i loro metaboliti. Nello specifico per quanto riguarda i biomarkers di esposizione, le forme ossidate e metilate degli acidi nucleici come biomarkers d'effetto per indagare il danno ossidativo ed i livelli di stress ossidativo a carico degli acidi nucleici indotto dall'inquinamento.

Per valutare l'infiammazione sistemica indotta sia dalle patologie che dall'inquinamento è importante valutare la variabilità individuale prendendo in esame le mutazioni a carico degli enzimi coinvolti nella biotrasformazione degli inquinati come biomarkers di suscettibilità.

L'espressione genica è inducibile e ciò genera una vasta gamma di opzioni/modificazioni, dove la complessità delle possibili combinazioni o interazioni tra le diverse vie enzimatico-metaboliche coinvolte nei meccanismi di biotrasformazione, riparazione del danno genotossico, controllo della proliferazione cellulare ed apoptosi, delle risposte infiammatoria e immunitaria, l'influenza di condizioni acquisite, come patologie d'organo concomitanti, nonché la variabilità dell'esposizione a fattori di rischio pertinenti, componente essenziale perché la suscettibilità possa manifestarsi, o a fattori interferenti collegati allo stile di vita, alla dieta, all'ambiente in generale, sono tutti elementi che concorrono alla realizzazione di caratteri complessi, la cui distribuzione nella popolazione tende ad assumere il carattere gaussiano proprio della relazione dose-risposta.

Le interazioni gene-ambiente e gene-gene sono indotte in circa il 90% della popolazione a seguito di un'esposizione media a tossici, mentre il restante 10% è rappresentato dai soggetti geneticamente più suscettibili e da soggetti più resistenti, che necessitano di un'esposizione a dosi più basse, i primi, o più elevate, i secondi, per indurre la mutazione; in questa distribuzione c'è però da tenere presente come alcune reazioni metaboliche, come quelle di coniugazione con glutatione, catalizzate di norma dalle glutatione S-transferasi, possano avvenire anche spontaneamente, aumentando così la variabilità interindividuale della risposta biologica all'interno di una distribuzione di frequenza di tipo gaussiano.

I geni coinvolti possono agire in tre differenti modi o come alleli multipli indipendenti (eterogeneità genetica della patologia multifattoriale) o in maniera reciprocamente additiva (eredità poligenica) o come fattori epistatici, ma in ogni modo, essi non sono né necessari né sufficienti per lo sviluppo degli effetti, ma solo predisponenti.

I geni sono considerati predisponenti nel senso che agiscono da modificatori d'effetto, e dunque del rischio; rischio che si manifesta solo quando le interazioni gene-ambiente e gene-gene superano un certo valore soglia.

I tratti genetici implicati possono influenzare ciascuna delle tappe frapposte tra esposizione a xenobiotici e comparsa degli effetti biologici e possono dunque coinvolgere i sistemi enzimatico-metabolici, da cui dipendono la biotrasformazione delle sostanze chimiche, la riparazione degli acidi nucleici, il controllo della proliferazione cellulare e dell'apoptosi, della risposta immunitaria e dell'assetto neuroendocrino.

## 1.7 Polimorfismi genetici

Si definisce con il termine polimorfismo una variazione della sequenza del DNA presente in almeno l'1% della popolazione.

Un polimorfismo può essere rappresentato da variazioni della sequenza di varia natura, una delezione o inserzione di una o più basi o anche una sostituzione di un singolo nucleotide; in questo caso si parla di polimorfismi a singolo nucleotide (il cui acronimo è SNP), che può modificare l'amminoacido prodotto di un singolo codone.

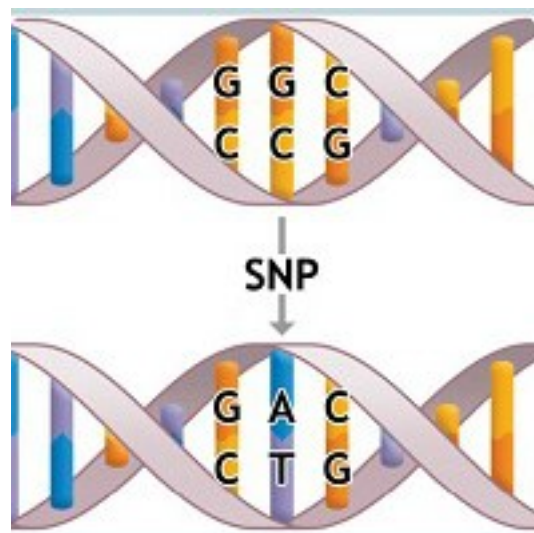


Figura 10 modificazione a singolo nucleotide

La localizzazione del polimorfismo ed il numero di nucleotidi coinvolti sono i principali determinanti delle conseguenze sulla cascata di eventi che dalla trascrizione genica conduce ad un prodotto proteico e funzionale.

Le variazioni possono poi essere correlate o meno ad una alterazione della normale attività della proteina che è codificata dal gene così modificato; la modificazione può avere sia effetti protettivi che nocivi.

Nella popolazione di una specie se sono presenti più alleli di uno stesso gene vengono considerati, per convenzione, polimorfismi genetici solo le forme che si presentano con una frequenza maggiore dell'1%.

Non tutte le sostituzioni nucleotidiche hanno, tuttavia, conseguenze fenotipiche apprezzabili.

Sono diversi i fattori che controllano ed influenzano le frequenze di presentazione dei polimorfismi genetici all'interno di una popolazione, il più importante dei quali è la selezione naturale; solo quando la frequenza di due o più polimorfismi rimane costante, si può parlare di polimorfismo bilanciato dovuto a selezione equilibrante (balancing selection).

Nel caso della balancing selection i diversi polimorfismi si manifestano con frequenze relativamente alte per tutti all'interno della popolazione, senza che nessuno di questi risulti assolutamente dominante rispetto agli altri.

Il caso più noto e studiato è l'equilibrio raggiunto con polimorfismi, come NQO1, che in eterozigosi sono selettivamente avvantaggiati rispetto all'omozigosi; questo vantaggio degli eterozigoti rispetto agli omozigoti però funge da freno alla diffusione del polimorfismo in questione, questo comportamento si verifica, ad esempio, con alcuni polimorfismi del gene codificante per l'emoglobina in aree di endemia malarica.

Esiste ,tuttavia, anche un altro meccanismo di selezione che mantiene i polimorfismi in equilibrio dinamico e si attiva quando l'aumento di frequenza di un polimorfismo specifico diventa un fattore limitante per l'ulteriore diffusione di dello stesso polimorfismo; tale fenomeno si osserva, per esempio, in alcune infezioni che portano alla morte dell'ospite, dove lo stesso agente infettivo si può presentare in forma più o meno virulenta e nel caso che sia presente la forma più infettiva, l'agente infettivo prende il sopravvento portando al collasso la popolazione di ospiti infettati, rendendo, così, temporaneamente avvantaggiata una forma meno virulenta dello stesso agente, che non uccida l'ospite.

Il bilanciamento dei polimorfismi può, inoltre, essere dovuto a condizioni ambientali che variano ciclicamente (come le stagioni), favorendo polimorfismi diversi in momenti differenti.

I polimorfismi del DNA nel corso degli ultimi decenni sono al centro di un grande interesse da parte della ricerca e della medicina, che ne sta approfondendo l'utilità in chiave clinica e preventiva e nella medicina di precisione che punta alla personalizzazione della terapia e della prevenzione.

Il genoma è l'insieme delle molecole di DNA di una cellula, è una struttura altamente complessa che può arrivare a racchiudere i suoi 2 m di lunghezza nello spazio microscopico del nucleo cellulare.

Il materiale genetico è un'alternanza di 4 lettere ed è simile ad una lunga sequenza di "lettere chimiche", queste lettere rappresentano i nucleotidi, che si dispongono in successione lungo il filamento per formare la molecola del DNA.

La sequenza di queste lettere, che all'apparenza può essere casuale, è un vero e proprio linguaggio in codice destinato alla cellula, linguaggio che la cellula è in grado di decodificarlo al fine di rimanere in vita, per mantenere e per riprodurre i processi biologici.

Il DNA è una sequenza di 3,2 miliardi di nucleotidi ed è oggetto dell'attività di numerosi fattori cellulari che regolano l'espressione genetica in risposta agli stimoli interni ed esterni alla cellula; questi fattori di natura genetica sono i principali determinanti dei tratti e dell'organizzazione dell'organismo, oltre ad essere la base essenziale per l'ereditarietà.

Ciò che siamo è il frutto degli effetti complessi ed interattivi tra la genetica ed i fattori ambientali.

Le varianti genetiche come i polimorfismi possono influenzare l'espressione del DNA e di conseguenza la struttura e la funzionalità delle proteine attraverso complesse ripercussioni sui network cellulari, che a loro volta possono poi sfociare in alterazioni molecolari e fisiologiche; arrivando a determinare delle differenze nel funzionamento dei processi biologici tra chi ne è portatore e chi al contrario non è portatore.

La base di questa modifica a livello di funzionamento è correlata alla capacità dei polimorfismi di modificare le istruzioni di base per la sintesi delle proteine enzimatiche o di altre attività cellulari.

Negli ultimi anni è emerso che le varianti genetiche interagiscono tra di loro e con lo stile di vita della popolazione per influenzare significativamente la condizione di salute o di malattia.

Due soggetti esposti alle stesse condizioni ambientali e con lo stesso stile di vita, ma con una diversa variante genetica possono sviluppare o mantenere una determinata patologia o alterazione in modo anche diametralmente diverso, in particolare il soggetto che possiede una variante genetica sfavorevole sarà esposto ad un maggior rischio e avrà una maggiore possibilità di manifestare una malattia o sintomi, rispetto ad un soggetto che non ha una variante genetica di questo tipo.

È proprio da questa scoperta che nasce la crescente importanza di mappare e studiare queste modificazioni per tenere in considerazione il “profilo genetico” individuale nella valutazione dello stato di salute.

Oltre alle mutazioni a singolo gene sono presenti anche dei riarrangiamenti più complessi che possono causare delezioni geniche più estese come quelle a carico delle glutation trasferarsi di classe T1 ed M1.

Le modifiche al DNA (polimorfismi) possono essere a carico di sequenze codificanti o non codificanti (introniche e/o regolatorie), ed in quest’ultimo caso sono generalmente prive di conseguenze, con eccezione di quelle che riguardano siti critici come le giunzioni introne-esone (allele\*4 per il CYP2D6) o siti di legame di fattori trascrizionali (GSTM3) o siti critici di sequenze regolatorie (CYP2E1, EGFR).

I comuni polimorfismi a carico di sequenze non codificanti determinano in modo funzionale l’assenza di prodotto proteico per alterazione dei processi di maturazione del trascritto primario, mentre nel caso delle sequenze codificanti il polimorfismo interferisce con i meccanismi che regolano l’espressione genica sia nel senso di un aumento che di una riduzione della sintesi proteica.

Gli SNP esonici si comportano analogamente alle mutazioni puntiformi e possono determinare conseguenze diverse a seconda del tipo di variazione nucleotidica introdotta, nello specifico si possono determinare: inserzioni o delezioni e sostituzioni di basi.

1. l’inserzione o delezione di una singola base azotata causa una sfasatura del modulo di lettura del trascritto (“frameshift”) in fase trasduzionale, con una conseguenza nella sintesi di prodotto diverso da quello originario ed inattivo dal punto di vista funzionale.
2. La sostituzione di una base (transizione o transversione) ha tre possibili conseguenze:

- a. il polimorfismo non modifica la sequenza aminoacidica della proteina corrispondente a causa della ridondanza del codice genetico (polimorfismo silente);
- b. il polimorfismo determina una sostituzione aminoacidica (“missense”), il quale a seconda della localizzazione nella sequenza e delle differenze strutturali e funzionali della proteina (polarità, dimensioni) può determinare variazioni di stabilità o di affinità nei confronti del substrato;
- c. il polimorfismo introduce un segnale di stop (“nonsense”), a causa di ciò la sintesi della proteina è prematuramente interrotta, con conseguente abolizione dell’attività proteica.

È importante anche sottolineare che sussiste la possibilità di polimorfismi multipli a carico dello stesso gene dove il fenotipo risultante può dipendere o dall’effetto dominante di uno di essi sugli altri, i quali risulteranno, quindi, ininfluenti (CYP2D6, NAT-2) oppure dalla sommatoria di effetti dei singoli polimorfismi (mEPHX, GSTP1).

Un ultimo fenomeno da considerare è quello della co-segregazione di varianti alleliche di geni adiacenti (“linkage disequilibrium”), nel campo dell’epidemiologia molecolare questo fenomeno è da sospettare quando l’associazione evidenziata non ha plausibilità biologica. (De Palma G., Mutti A. I polimorfismi metabolici come caratteri complessi: implicazioni per il monitoraggio biologico e la valutazione del rischio. *Folia Med* 71 (S2) 7-21, 2000.)

### 1.7.1 polimorfismi metabolici

I polimorfismi metabolici, sono una sottocategoria dei polimorfismi, sono potenzialmente i responsabili della variabilità e delle differenze inter-individuali più vistose, questi agiscono sulla capacità di bioattivare o detossificare le sostanze esogene.

La biotrasformazione di questi composti viene schematicamente ricondotta a due fasi e si spinge verso la conversione in prodotti a polarità progressivamente crescente al fine di favorire l’idrosolubilità e la successiva escrezione per via urinaria e/o biliare.

La presenza di mutazioni a carico dei polimorfismi metabolici di enzimi inducibili (GSTs, CYPs, mEPHX, NQO1) si distribuisce in modo gaussiano, con spostamento della mediana in funzione dell’esistenza o meno di fattori di induzione metabolica; tuttavia esiste un certo

grado di corrispondenza genotipo-fenotipo esiste per l'omozigote variante, ma solo se il polimorfismo determina una perdita di funzione metabolica (come nel caso di GSTM1, GSTT1, NQO1), motivo per cui la variabilità intra-individuale della relazione genotipo-fenotipo limita la validità della caratterizzazione genetica e, soprattutto, di studi retrospettivi.

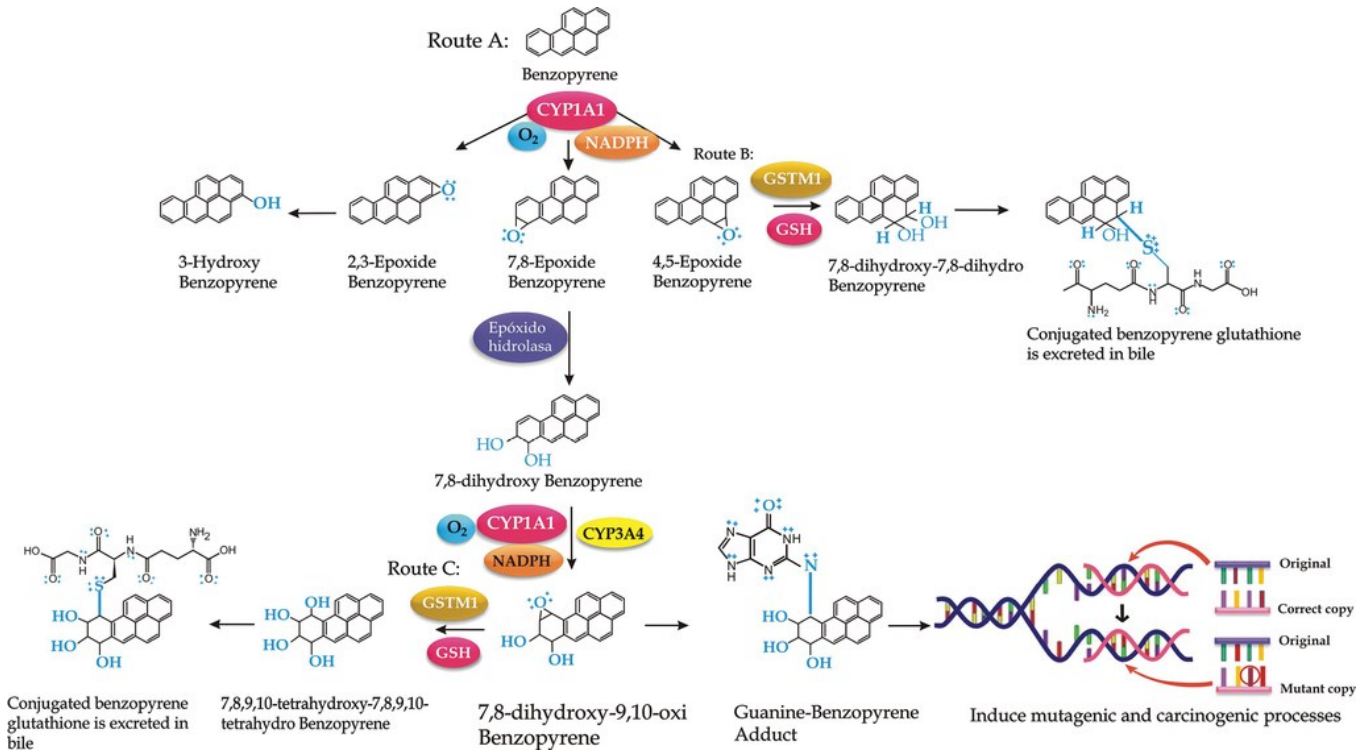


Figura 11 meccanismo d'azione CYP1A1 e GSTM1

Gli enzimi specifici possono appartenere al gruppo di fase I o al gruppo di fase II, i primi sono per lo più monoossigenasi a funzione mista citocromo P450-dipendenti, ed agiscono introducendo nella molecola gruppi polari per aumentare la sua idrofilia.

Mentre gli enzimi di fase II catalizzano reazioni sintetiche di coniugazione di intermedi a partire dai prodotti dagli enzimi di fase I, con molecole polari endogene (solfati, metili, acido glucuronico, glutazione etc.) a tal punto che il prodotto finale coniugato risulta assai più polare ed eliminabile con le urine o con la bile.

Le reazioni di fase I possono però anche generare intermedi elettrofili instabili dotati di elevata reattività verso le macromolecole cellulari (DNA, lipidi, proteine), ma oltre a generare questi intermedi elettrofili, queste reazioni alimentano la produzione di specie reattive dell'ossigeno (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>, OH•) che a loro volta, possono interagire con gli stessi bersagli macromolecolari, andando a sommarsi alle altre reazioni produttrici di ROS.

In generale, quindi, possiamo affermare che i polimorfismi degli enzimi di fase I possono modulare la capacità di bioattivazione (produzione di intermedi elettrofili altamente reattivi) degli xenobiotici, mentre ai polimorfismi collegati agli enzimi di fase II portano a differenze nella capacità di detossificare i composti chimici, o gli intermedi reattivi da essi derivati, tramite reazioni di coniugazione con molecole polari endogene, a basso peso molecolare.

La complessità dei polimorfismi metabolici è ulteriormente complicata negli studi epidemiologici dalla specificità delle interazioni enzima-substrato, che può dar luogo a conseguenze diverse a seconda della sostanza, della dose, della via di assorbimento, dell'esistenza di vie metaboliche alternative, dell'organo bersaglio e dell'effetto, nonché delle caratteristiche etniche della popolazione in esame.

Il problema di questo genere di schematizzazione è che non descrive, se non in maniera semplicistica, la complessità delle interazioni enzima-substrato; dove il fenotipo metabolico può presentare, nei confronti dello stesso substrato o di substrati differenti, un dualismo d'effetti in rapporto all'end-point considerato.

Molto utili in tal senso risultano gli esempi forniti da alcuni enzimi polimorfici come la glutatione S-transferasi teta1 (GSTT1), la glutatione S-transferasi pi1 (GSTP1), l'eossido idrolasi microsomiale (mEPHX), la NAD(P)H chinone ossido-reduttasi (NQO1) e l'N-acetil transferasi tipo 1 (NAT-1) e 2 (NAT-2).

La reazione di coniugazione con il glutatione catalizzata dalla GSTT1 ha un effetto di inattivazione metabolica nei confronti di butadiene ed etilene ossido, (Wiencke JK et al, 1995)<sup>50</sup> ma è invece un meccanismo di bioattivazione per aloalcani ed aloalcheni (Anders MW. Et al , 1998)<sup>51</sup>.

La bioattivazione di tali composti è conseguente alla degradazione del GSH-coniugato ad opera della g-glutamyl-transpeptidasi e cisteinil-glicinasi ed al successivo intervento di una  $\beta$ -liasi che catalizza la metabolizzazione a radicali tioacil fluoruri e tiocheteni; questa via di attivazione metabolica è condizionata dalla presenza di g-glutamyl-transpeptidasi (fegato, rene, intestino tenue), mentre non sembra pertinente per altri tessuti, in cui prevale il ruolo protettivo e detossificante.

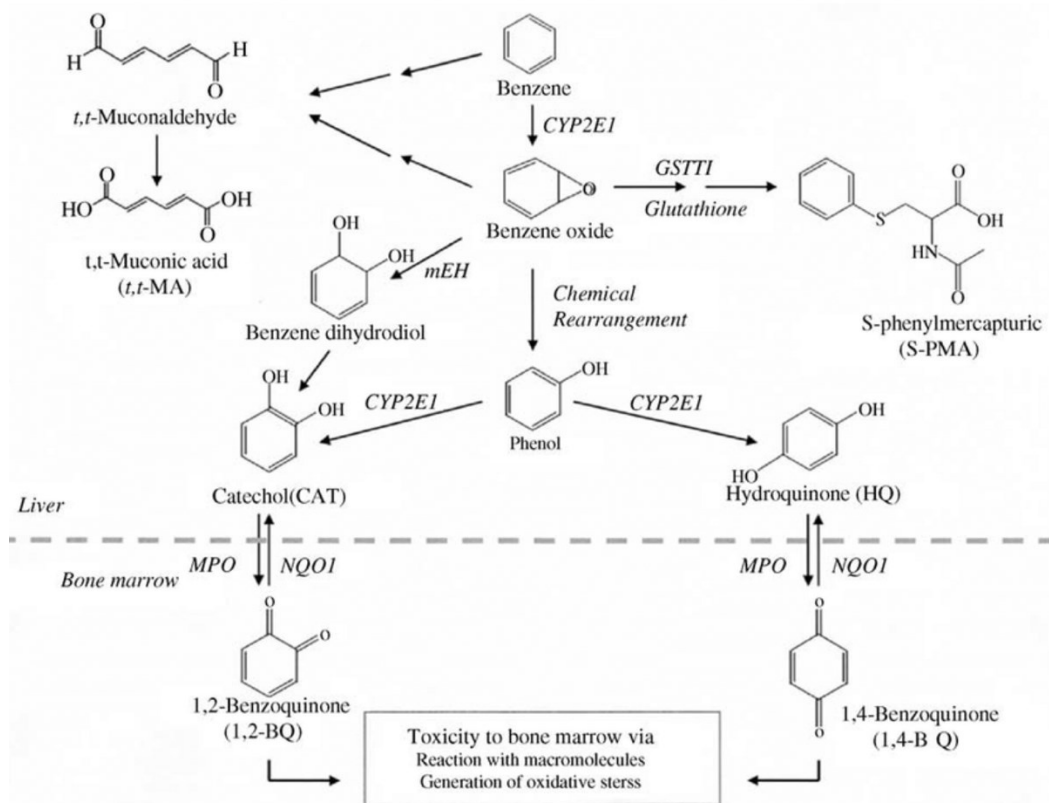


Figura 12 Metabolismo del benzene con enzimi coinvolti

L'mEPHX è un enzima di fase I, che catalizza l'idratazione degli epossidi, intermedi reattivi derivanti dal metabolismo monoossigenasico citocromo P450-dipendente di numerosi solventi organici, a dioli, composti dotati di maggiore stabilità; la reazione di idratazione ha un effetto di detossificazione, in particolare nel caso degli idrocarburi policiclici aromatici i dioli sono sequenzialmente ossidati a diolo-epossidi, composti altamente reattivi, dotati di effetti mutageni e cancerogeni (Puga A. et al 1997)<sup>52</sup>, a causa di ciò tale reazione assume un significato di bioattivazione tossicologica.

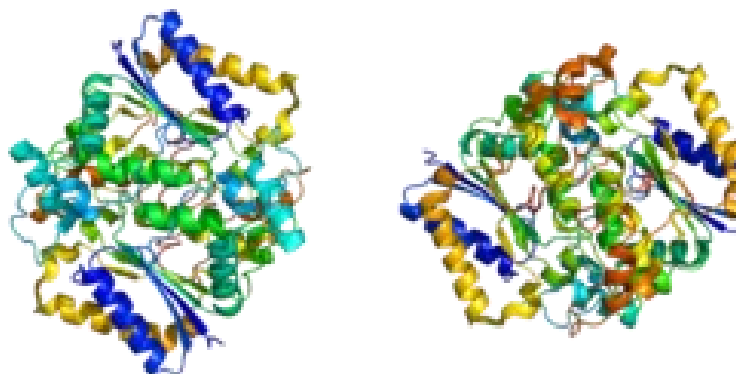


Figura 13 struttura NQO1

La NAD(P)H chinone ossido-reduttasi (NQO1) catalizza la riduzione obbligata a due elettroni di un gran numero di substrati, tra cui i chinoni, utilizzando sia NADH, che NADPH come cofattori; tale reazione assume il significato di una detossificazione, poichè favorisce la rimozione dai sistemi biologici di composti elettrofili come i chinoni, per riduzione a idrochinoni, inoltre ne previene la riduzione parziale, a carico di un solo elettrone, ad intermedio radicalico semichinone (SQ•), che, in condizioni aerobiche, induce la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Le conseguenze funzionali della reazione catalizzata dalla DTD dipendono dalle caratteristiche chimiche del substrato, caratteristiche che influenzano il potenziale redox, il quale è influenzato anche dal pH e dall'equilibrio redox intracellulare; il prodotto, in quanto il derivato idrochinonico, può a sua volta auto-ossidarsi, innescando un redox-cycling che produce SQ• e ROS.

In generale la presenza di sostituenti elettronegativi quali, gruppi alogeni, nitro e carbonilici aumenta il potere ossidante del chinone e fa sì che il derivato idrochinonico sia meno facilmente ossidabile; all'opposto la presenza dei sostituenti amminici, metossilici, idrossilici riduce il potere ossidante dei chinoni rendendo il derivato idrochinone va più facilmente incontro ad auto-ossidazione.

Un'ulteriore possibile conseguenza è l'alchilazione che collegata alla via bioreduttiva, ossia la tendenza al riarrangiamento intra-molecolare del derivato idrochinonico, con formazione di specie reattive alchilanti, che costituisce il principio di trattamenti antineoplastici a base di diaziqnone e mitomicina C; la GSH coniugazione (sia del chinone che dell'idrochinone), con formazione di composti tioeteri, può assumere significato di detossificazione o bioattivazione, a seconda delle proprietà chimiche del composto di partenza.

In letteratura, si riposta che i derivati GSH-coniugati dell'1-4 benzochinone, del 2-bromo-3,5(6)idrochinone e del menadione siano nefrotossici nel ratto (Monks TJ et al, 1992)<sup>53</sup>.

Si può dedurre che allo stato attuale della ricerca e della conoscenza la valutazione dei polimorfismi metabolici, utilizzati come potenziali indicatori di suscettibilità, non può prescindere dalla caratterizzazione dell'esposizione stessa, rafforzando l'esigenza di un approccio sinergico nella valutazione dell'esposizione.

## 1.8 HMGB-1, High Mobility Group Box 1

Il gruppo ad alta mobilità 1 (HMGB1, High Mobility Group Box 1), precedentemente nota come amfoterina, è una proteina nucleare non istonica che ha svariate funzioni a secondo della sua localizzazione a livello subcellulare, è un fattore architetturale non istonico del DNA, ed il suo nome deriva dalla rapida mobilità che la caratterizza in SDS-PAGE.

Da un punto di vista biochimico la HMGB1 è una proteina di 216 residui (30 kD), ma da un punto di vista strutturale, è costituita da tre domini: due domini omologhi che legano il DNA, chiamati “Box A” e “Box B” ed un dominio C terminale carico negativamente (figura 14); è una proteina estremamente frequente (è stato calcolato circa un milione di proteine per cellula (Bianchi et al, 2004) ed è distribuita in tutti i tessuti dei mammiferi.

Esistono proteine HMGB1-simili anche in lieviti, batteri e piante (Bianchi et al 1994; Stemmer et al 1997; Wittmeyer et al, 1997)<sup>54-56</sup>.

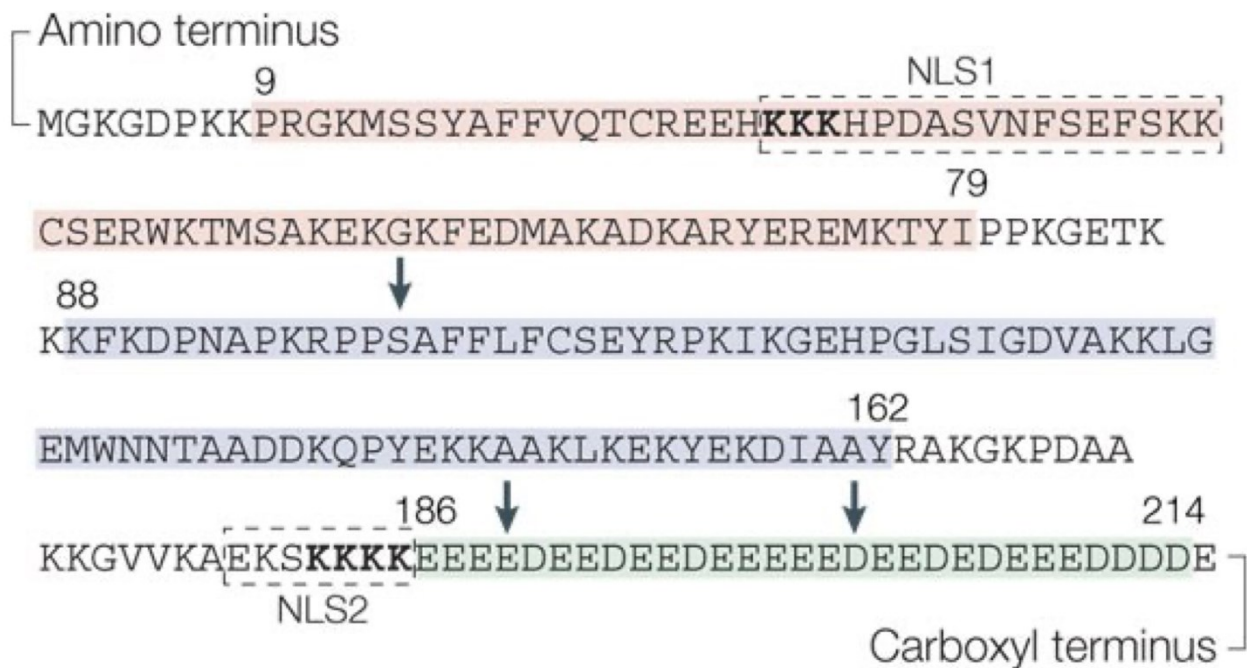


Figura 14 struttura HMGB-1

In figura si riporta la struttura primaria della proteina HMGB1, dove si può vedere il Box A (evidenziata in rosso), il Box B (evidenziata in blu) ed il C-tail (evidenziata in verde) con la rappresentazione anche delle sequenze di localizzazione nucleare1 (NLS 1 aa28-44) e 2 (NLS aa 179-185) (Lotze et Nature Reviews Immunology 2005)<sup>57</sup>.

Come fattore architetturale, HMGB1 lega il solco minore del DNA senza specificità di sequenza ed induce una distorsione (bending) della doppia elica, consentendo l'interazione fisica tra DNA e fattori di trascrizione come p53, NF- $\kappa$ B, proteine contenenti homeobox, recombination activating gene 1/2 (RAG1/2) e recettori di ormoni steroidei (Bianchi et al 2004)<sup>58</sup>; inoltre è una proteina che mostra un grande dinamismo: diversi studi hanno evidenziato che l'intero pool cellulare di HMGB1 vaga per il nucleo restando in contatto con il DNA per un tempo molto breve (Scaffidi et al 2002; Phair et al 2004)<sup>59,60</sup>.

HMGB1 è una proteina naturalmente presente nel nucleo delle cellule che viene rilasciata a seguito di un danno ai tessuti; il rilascio di questa proteina all'esterno della cellula funge da allarme innescando così un meccanismo di riparazione caratterizzato dall'attrazione verso il sito danneggiato di cellule infiammatorie del corpo, questo meccanismo è detto chemoattraente; l'HMGB1, per svolgere la sua funzione, forma un complesso con la proteina CXCL12 ed insieme queste proteine attivano il recettore CXCR4 scatenando l'effetto chemoattraente.

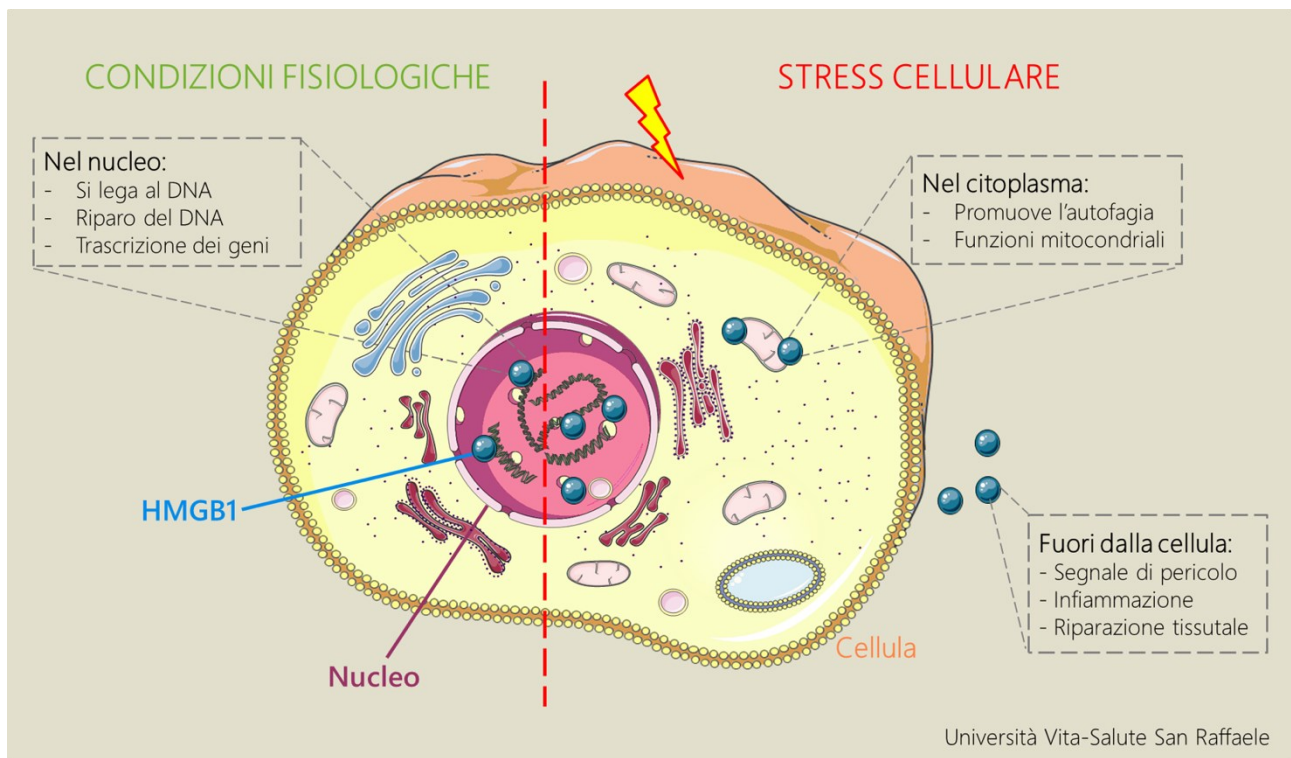


Figura 15 collocazione e funzione dell'HMGB-1

Fino al momento in cui si trova all'interno del nucleo, HMGB1 è uno chaperon del DNA che mantiene la struttura e la funzione dei cromosomi, mentre nel momento in cui viene liberato nel citoplasma l'HMGB1 può promuovere l'autofagia andandosi a legare la proteina BECN1.

La caratteristica di questa proteina è quella di venir rilasciata nel mezzo extracellulare con diverse modalità, infatti, è possibile osservare una secrezione passiva nel mezzo extracellulare di cellule necrotiche ed una secrezione attiva da cellule del sistema immunitario (Scaffidi et al 2002; Gardella et al 2002)<sup>59,61</sup>, mentre al contrario l'evento apoptotico non induce rilascio di HMGB1.

La traslocazione tra il nucleo ed il citoplasma è un passaggio strettamente controllato da due sequenze di localizzazione nucleare (NLS); la sequenza NLS1 è la regione compresa tra gli aa 28-44 e NLS2 che si trova tra gli aa 180-185, quando, in queste sequenze, residui di serina sono fosforilati, la frazione nucleare di HMGB1 trasloca dal nucleo al citoplasma (Youn et al 2006)<sup>62</sup>; in letteratura ci sono studi effettuati su cellule di carcinomi colorettali che dimostrano che questa fosforilazione coinvolge i residui di serina in posizione 35, 39 e 42 della sequenza NLS1 (Kang et al 2009)<sup>63</sup>; la fosforilazione specifica risulta a carico della proteina chinasi C (protein kinase C, PKC).

Inoltre, nei monociti è stato riportato che l'acetilazione dei residui di lisina di NLS inibisce l'entrata nel nucleo favorendo il trasporto attivo dal nucleo allo spazio extracellulare mediante speciali lisosomi secretori, mentre l'acetilazione di HMGB1 risulta a carico della CREB-Binding Protein (CBP), di p300 e p300/CBP associated factor (PCAF) (Gardella et al 2002, Bonaldi et al 2003)<sup>61,64</sup>.

È però importante ricordare che sono stati notati anche altri effetti importanti a livello polmonare, nervoso, e a livello delle articolazioni (pazienti affetti da artrite reumatoide possiedono elevati livelli di HMGB1 nel liquido sinoviale (Taniguchi et al 2003; Kokkola et al 2002)<sup>65,66</sup>.

La sua funzione cambia a seguito della sua secrezione attiva o il suo rilascio passivo, l'HMGB1 extracellulare di solito agisce come molecola del modello molecolare associato al danno (DAMP), che regola l'infiammazione e le risposte immunitarie attraverso diversi recettori o assorbimento diretto.

La secrezione ed il rilascio di HMGB1 sono influenzati da una grande varietà di fattori, tra cui la sua modifica post traduzionale (ad esempio, acetilazione, ADP-ribosilazione, fosforilazione e metilazione) ed il meccanismo molecolare connesso alla morte cellulare (apoptosi, piroptosi, necroptosi, alcaliptosi e ferroptosi). Comprendere il meccanismo alla base della

secrezione e del rilascio di HMGB1 è essenziale per comprendere il suo ruolo nelle malattie infiammatorie e nei processi che causano danni tissutali.

HMGB1 è una proteina nucleare onnipresente che viene rilasciata dalle cellule che sono state danneggiate per inviare un messaggio di danno tissutale avvenuto e per attivare, di conseguenza, la cascata dell'infiammazione e la rigenerazione dei tessuti.

In letteratura vengono riportati molteplici studi dove le proprietà rigenerative di HMGB1 sono state studiate in svariati tessuti e organi, ma soprattutto nel tessuto muscolare in cui HMGB1 sembra essere un fattore limitante in condizioni fisiologiche, proprio in questa sede sembra che l'HMGB1 derivi principalmente da cellule non muscolari presenti nel muscolo danneggiato.

In studi condotti su ratti deleti è stato osservato una grave compromissione della rigenerazione muscolare ed anche un ritardo nel reclutamento dei leucociti, questo a conferma del ruolo cruciale di HMGB1 in questo processo riparativo, ma è da sottolineare come ancora, ad eccezione di alcuni studi incentrati principalmente sui macrofagi, il destino di HMGB1 dopo il rilascio nell'ambiente extracellulare sia in gran parte inesplorato.

Questa è una domanda chiave perché un'accurata regolazione del livello extracellulare di HMGB1 è essenziale per supportare la rigenerazione dei tessuti, ma anche per evitare effetti dannosi come l'infiammazione persistente; il processo di internalizzazione e di risparmio proteico potrebbe svolgere un ruolo fondamentale nella rigenerazione dei tessuti durante la progressione di patologie come il cancro, ma anche in molte condizioni fisiologiche e patologiche in cui è stato riportato un contributo da parte dell'HMGB1.

## 2 Scopo

Il presente progetto denominato “EXPOASMA”, la cui fase di raccolta dei campioni è 18 mesi, è nato con l’obiettivo di esplorare ed approfondire diversi aspetti relativi all’inquinamento, ai suoi effetti sulla salute della popolazione generale, la capacità di interagire con l’organismo e la sua nocività, inoltre oltre a ciò lo studio vuole indagare la relazione tra l’inquinamento e le patologie respiratorie infiammatorie, in particolare la patologia asmatica ,ciò per capire gli effetti che possono esserci sull’esordio e sulla progressione patologica per contribuire alla comprensione e all’approfondimento in questo ambito.

L’inquinamento ambientale è in costante crescita, ha diversi impatti sulla salute umana così come l’esposizione a composti inquinanti è correlata all’aumento dell’incidenza di malattie respiratorie, tra cui l’asma.

Gli effetti degli inquinanti non sono solo diretti ma anche indiretti per questo motivo questo studio cerca di coprire i possibili effetti indagando sia i metaboliti degli inquinanti che i markers di stress ossidativo, inoltre per approfondire il quadro generale lo studio vuole anche indagare i livelli di infiammazione e descrivere al meglio la variabilità inter-individuale.

La quantificazione di specifici biomarkers di esposizione agli inquinanti ambientali, di ossidazione e di metilazione di acidi nucleici, biomarkers di effetto e di suscettibilità è possibile tramite l’utilizzo di matrice urinaria per i primi e tramite un brush boccale per i polimorfismi ed è proprio per questo scopo che a tutti i soggetti reclutati verranno raccolte queste matrici insieme ad un questionario anamnestico.

Quindi nello specifico, lo studio si pone come obiettivo primario il dosaggio dei livelli di specifici indicatori di esposizione a contaminanti ambientali comuni con una successiva analisi dell’eventuale correlazione tra gli indicatori di infiammazione e gli indicatori di esposizione in soggetti sani e asmatici, insieme alla correlazione tra la quota di marcatori di effetto quantificati in questa coorte e le loro percentuali di mutazione a casa di geni specifici coinvolti nella biotrasformazione.

Lo studio ha lo scopo, infine, di studiare anche le differenze legate all'età e agli anni di cronicizzazione andando a campionare sia una popolazione adulta che una pediatrica.

L'idea di partenza di questo studio è quella poi di applicare i risultati e poterli usare per favorire la comprensione della relazione tra inquinamento e asma con lo scopo di andare a migliorare le strategie di prevenzione e a sviluppare tecniche per ridurre l'esposizione a questi contaminati.

### 3 Materiali e metodi

Il presente lavoro di tesi ha avuto inizio con la stesura del disegno sperimentale in relazione alla domanda iniziale ed i nostri obiettivi, inoltre prima di iniziare la parte sperimentale e poter procedere con l'arruolamento dei volontari è stato necessario procedere con la stesura della documentazione necessaria al fine di sottomettere lo studio all'approvazione del comitato etico e per arrivare poi alla sua approvazione in data 04/10/2022 con codice **Prot. n. 46597 del 10/11/2022.**

La sottomissione del progetto al Comitato Etico anche di progetti osservazionali ma con la raccolta di campioni biologici, anche se a basso rischio e a impatto ridotto è essenziale per ottimizzare al i vari step del progetto stesso e, per garantire la tutela ed i diritti di chi partecipa; infatti, è un compito proprio del comitato etico vigilare sulla tutela dei diritti della persona e con la sua approvazione garantisce l'eticità dello studio come si può evincere dalla definizione seguente.

“I comitati etici sono organismi indipendenti che hanno la responsabilità di garantire la tutela dei diritti, della sicurezza e del benessere delle persone in sperimentazione e di fornire pubblica garanzia di tale tutela. Ove non già attribuita a specifici organismi, i comitati etici possono svolgere anche funzioni consultive in relazione a questioni etiche connesse con le attività scientifiche e assistenziali, allo scopo di proteggere e promuovere i valori della persona. I comitati etici, inoltre, possono proporre iniziative di formazione di operatori sanitari relativamente a temi in materia di bioetica”.

Trattandosi di uno studio osservazionale non farmacologico che prevedeva la raccolta materiale biologico ed il coinvolgimento di soggetti volontari il passaggio dal comitato era necessario.

Il protocollo dello studio, nello specifico, recita quanto segue riguardo per la struttura dello studio ed i suoi obiettivi.

**OBIETTIVO PRIMARIO:** *Descrivere i livelli di alcuni indicatori di esposizione a contaminanti ambientali ubiquitari in campioni di urina di soggetti con patologie respiratorie, come l'asma, e di soggetti sani a Parma.*

**OBIETTIVO SECONDARIO:** *Descrivere il grado di associazione tra indicatori di effetto, di infiammazione e di suscettibilità e i livelli urinari degli indicatori di esposizione.*

**DISEGNO DELLO STUDIO:** *studio che prevede la raccolta di materiale biologico, come urine e brush buccale, volto a descrivere l'impatto dell'inquinamento su soggetti volontari asmatici e sani*

### **DURATA DELLO STUDIO**

- *Durata dell'arruolamento: 12 mesi dalla data di approvazione dello studio e nulla osta del Responsabile legale della struttura sanitaria presso cui si svolge lo studio*
- *Durata della raccolta campioni: 12 mesi dalla data di inizio dell'arruolamento*
- *Durata delle analisi: 12 mesi dalla data di inizio dell'arruolamento*
- *Durata totale dello studio: 18 mesi dalla data di approvazione dello studio e nulla osta del Responsabile legale della struttura sanitaria presso cui si svolge lo studio*

### **DISEGNO SPERIMENTALE**

*Lo studio prevede:*

- *il reclutamento, su base volontaria, di 4 gruppi così suddivisi:*

*GRUPPO A) 200 adulti sani in età lavorativa sottoposti a sorveglianza sanitaria, afferenti al Servizio di Medicina Preventiva dei Lavoratori dell'Università di Parma a cui verrà illustrato lo studio durante la routinaria visita di sorveglianza sanitaria;*

*GRUPPO B) 100 adulti asmatici in età lavorativa, afferenti alla clinica pneumologica ambulatorio Asma dell'AUIO di Parma a cui verrà illustrato lo studio durante la routinaria visita di controllo;*

*GRUPPO C) 100 minori in età scolare (6-11 anni) sani, frequentanti le scuole primarie di primo grado del Comune di Parma ai cui genitori verrà illustrato lo studio dal personale che ha aderito a questo progetto;*

*GRUPPO D) 50 minori in età scolare (6-11 anni) asmatici, afferenti al Centro di Fisiopatologia Respiratoria Infantile UOC Clinica Pediatrica AOU Parma e frequentanti le scuole primarie di primo grado del Comune di Parma a cui verrà illustrato lo studio durante la routinaria visita di controllo;*

*la raccolta di informazioni sui dati anamnestici (anamnesi fisiologica, patologica e, nel caso dei soli adulti, lavorativa) dei soggetti appartenenti ai gruppi A, B, e D da parte del personale medico afferente al Servizio di Medicina Preventiva dei Lavoratori dell'Università di Parma o afferente al Centro Asma dell'Università di Parma o afferenti al Centro di Fisiopatologia Respiratoria Infantile, UOC Clinica Pediatrica AOU Parma (rispettivamente per i gruppi A, B e D), previa autorizzazione degli stessi o dei tutori legali in caso di minori, come specificato nel consenso informato attraverso la compilazione di un questionario (allegato 22);*

*-la raccolta di informazioni sui dati anamnestici per i soggetti appartenenti al gruppo C da parte del personale medico afferente al Laboratorio di Tossicologia Industriale e metodiche analitiche avanzate di UNIPR o frequentante la Scuola di Specializzazione in Medicina del Lavoro di UNIPR attraverso la compilazione di un questionario auto-compilato dai genitori/tutori legali (allegato 22), previa autorizzazione degli stessi e assenso da parte del minore, come specificato nel consenso informato. La raccolta delle informazioni e dei campioni sarà effettuata nei locali delle scuole di Parma che hanno aderito allo studio previa autorizzazione del dirigente scolastico all'accesso ai locali per il personale dello studio al fine d'effettuare le sole operazioni necessarie alla spiegazione del progetto e alla sola raccolta del campione;*

**CRITERIO DI INCLUSIONE:** *I soggetti devono essere residenti nella provincia di Parma e svolgere la loro attività lavorativa o di studio all'interno del Comune di Parma.*

*I soggetti appartenenti ai gruppi A e C devono godere di buona salute (soggetti sani), cioè non deve essere stata diagnosticata loro asma o altra patologia dell'apparato respiratorio prima della loro adesione allo studio. Tale aspetto (assenza di patologie dell'apparato respiratorio) viene verificato attraverso l'auto compilazione di un questionario (allegato 22) somministrato dai medici coinvolti nel reclutamento di soggetti sani (personale medico afferente al Laboratorio di Tossicologia Industriale e metodiche analitiche avanzate di UNIPR o frequentante la Scuola di Specializzazione in Medicina del Lavoro di UNIPR che aderiscono a questo studio) durante l'arruolamento dei soggetti stessi.*

*I soggetti appartenenti ai gruppi B e D non devono avere altre patologie oltre l'asma e devono afferire ai Centri Asma.*

*I soggetti o il loro genitori/tutori legali devono aderire al protocollo dello studio, attraverso la firma del consenso informato.*

**CRITERIO DI ESCLUSIONE:** *La non adesione al protocollo di studio, la nota presenza di patologie croniche diverse dall'asma incluse le neoplasie, la raccolta di un campione di urine non idoneo, l'esposizione professionale a noti fattori che possono influenzare gli indicatori urinari oggetto dello studio, l'incomprensione, da parte dei soggetti o dei genitori/tutori legali, in caso di minori, delle modalità di svolgimento e/o della tipologia di studio a cui è stata proposta la partecipazione.*

**COPERTURA ASSICURATIVA:** *Lo studio prevede la raccolta di materiale biologico non invasivo e a basso rischio, non è necessario attivare un'assicurazione specifica. In ogni caso si segnala che l'Ateneo è provvisto di una copertura assicurativa per responsabilità civile verso terzi.*

### 3.1 Soggetti da reclutare durante la fase di arruolamento

Per raggiungere l'obiettivo prefissato il disegno dello studio prevede il reclutamento di una coorte di soggetti per raccogliere i dati utili all'analisi e alla determinazione dei valori dei livelli di riferimento degli specifici biomarcatori di esposizione ad inquinanti ambientali ubiquitari, di indicatori di metilazione e ossidazione degli acidi nucleici nell'urine e indicatori di suscettibilità nei brush buccali.

La popolazione selezionata è la popolazione adulta residente in provincia di Parma e non professionalmente esposta ad agenti ossidanti ed inquinanti ove lo fosse viene segnalato nel questionario e considerato in fase di rielaborazione dati; si è scelto di concentrarsi sulla popolazione di Parma in modo da avere un gruppo di soggetti da poterli considerare confrontabili e omogenei in termini di esposizione agli stessi livelli di inquinamento urbano.

La popolazione è così suddivisa:

1. GRUPPO AS -> adulti sani in età lavorativa sottoposti a normale sorveglianza sanitaria, afferenti al Servizio di Medicina Preventiva dei Lavoratori dell'Università di Parma a cui verrà illustrato lo studio durante la routinaria visita di sorveglianza sanitaria;

2. GRUPPO AA-> adulti asmatici in età lavorativa, afferenti alla clinica pneumologica ambulatorio Asma dell'AUO di Parma a cui verrà illustrato lo studio durante la routinaria visita di controllo.
3. Gruppo BS-> bambini sani residenti nella provincia di Parma ed in età scolare, nello specifico nella fascia dell'elementari (6-11 anni), i bambini di questo gruppo sono stati reclutati in 5 scuole del comune di Parma, 4 delle quali afferenti a due diversi istituti comprensivi e collocate in due zone diverse della città, l'IC Parma centro e l'IC Parmigianino.

Il reclutamento è avvenuto seguendo lo stesso protocollo in tutte le scuole:

- Primo contatto con il dirigente scolastico per richiedere la disponibilità a partecipare e la possibilità di presentare lo studio al consiglio d'istituto
  - Presentazione al consiglio d'istituto ed ai rappresentanti dei genitori delle varie classi; in questa occasione è stato spiegato lo studio in termini di contenuti e d'impegno da parte delle famiglie
  - Comunicazione, tramite avviso, alle famiglie della data selezionata per la raccolta dei campioni d'urina, dei documenti e dell'effettuazione del brush boccale.
  - Distribuzione della documentazione e del boccettino per la raccolta delle urine alle famiglie interessate.
  - Nella giornata prestabilita è stata allestita una postazione all'ingresso della scuola nella fascia oraria dalle 7.30 all'inizio delle lezioni e all'arrivo degli alunni sono stati raccolti i campioni d'urina insieme al consenso informato, l'informativa privacy, il modulo di assenso ed il questionario contestualmente è stato effettuato il brush boccale.
4. Gruppo BA-> bambini asmatici nella stessa fascia d'età 6-11 dei bambini sani, residenti in provincia di Parma ed afferenti al Centro di Fisiopatologia Respiratoria Infantile UOC Clinica Pediatrica AOU Parma cui lo studio viene proposto durante la normale visita di controllo della patologia e nel caso di risposta affermativa il reclutamento viene fatto contestualmente dal personale medico.

I criteri di inclusione la residenza nella provincia di Parma così come l'attività lavorativa o di studio all'interno del comune di Parma sono stati controllati con domande specifiche in fase di arruolamento, poiché come appena sottolineato era, a nostro parere, importante

standardizzare la popolazione per questo parametro in modo da rendere soggetti sani ed asmatici confrontabili in termini di qualità dell'aria respirata.

Tutti i soggetti coinvolti devono essere sani o non presentare altre patologie dell'apparato respiratorio, diverse dall'asma in modo tale da non aggiungere ulteriori variabili o fonti d'infiammazione. Tale aspetto (assenza di patologie dell'apparato respiratorio) viene verificato con domanda del personale medico e attraverso l'auto compilazione di un questionario, che viene somministrato durante il reclutamento.

A tutti i soggetti reclutati è stato somministrato un questionario auto compilato, sia per stabilire eventuali patologie, zona di residenza, ma anche al fine di raccogliere informazioni inerenti ad eventuali terapie farmacologiche in atto, alle abitudini voluttuarie e alle eventuali fonti di esposizione alternative, oltre alle informazioni di base utili per stratificare la popolazione in base al sesso, il BMI, l'età, l'abitudine al fumo ed i conviventi fumatori.

I criteri che hanno portato all'esclusione dallo studio sono: la non adesione al protocollo, la nota presenza di patologie croniche diverse dall'asma incluse le neoplasie, la raccolta di un campione di urine non idoneo o l'incapacità di produrlo contestualmente all'arruolamento, l'esposizione professionale a noti fattori che possono influenzare gli indicatori urinari oggetto dello studio, età non lavorativa, solo per i soggetti adulti, l'incomprensione da parte dei soggetti delle modalità di svolgimento e/o della tipologia di studio a cui è stata proposta la partecipazione.

Prima di qualsiasi operazione e prima di raccogliere dati personali i soggetti devono aderire al protocollo dello studio, attraverso la compilazione e la firma del consenso informato.

Tutto il materiale biologico raccolto è poi stato aliquotato e conservato, nelle condizioni idonee a mantenere la sua integrità fino al momento dell'analisi, presso il laboratorio di tossicologia industriale; invece, per quanto riguarda la modulistica ogni centro reclutatore conserva la propria.

Il reclutamento dei soggetti è durato all'incirca 6 mesi per gli adulti e 10 mesi per i bambini, il reclutamento è stato un po' più lungo del previsto a causa di alcune difficoltà riscontrate legate al fatto che era indispensabile che i soggetti lavorassero e risiedessero a Parma; questo criterio era inderogabile affinché l'esposizione fosse omogenea. Al fine di ridurre la variabile tempo di raccolta, si sono organizzate le fasi di reclutamento in modo da arruolare i volontari

adulti sani nello stesso arco temporale dei soggetti adulti asmatici; successivamente è stata organizzata la fase di reclutamento dei minori sia sani che asmatici.

Per quanto riguarda i bambini abbiamo notato che per avere un'ampia partecipazione è fondamentale il coinvolgimento informato e consapevole dei genitori, che devono essere resi partecipi degli obiettivi dello studio e devono essere illustrate chiaramente tutte le fasi di reclutamento.

I bambini si mostrano sempre molto curiosi, con entusiasmo e con voglia di dare il loro contributo al punto che a volte erano loro stessi, vedendoci alla mattina davanti a scuola, a chiedere ai genitori di poter partecipare.

Al fine di agevolare la raccolta e la partecipazione la postazione di raccolta dei campioni e dei consensi informati è avvenuta all'ingresso della scuola attendendo l'arrivo dei bambini che potevano anche venire non accompagnati visto che i documenti era forniti prima e potevano essere letti e compilati comodamente a casa dai genitori.

Il coinvolgimento del minore è aumentato anche dalla presenza del documento nominato assenso che contiene una spiegazione dello studio semplificata e rivolta direttamente a lui con anche un'immagine giocosa del brush boccale; immagine che è stata messa apposta perché si è voluto esemplificare e rendere più leggera questa operazione che dopo il trauma del tampone covid poteva spaventare il bambino.

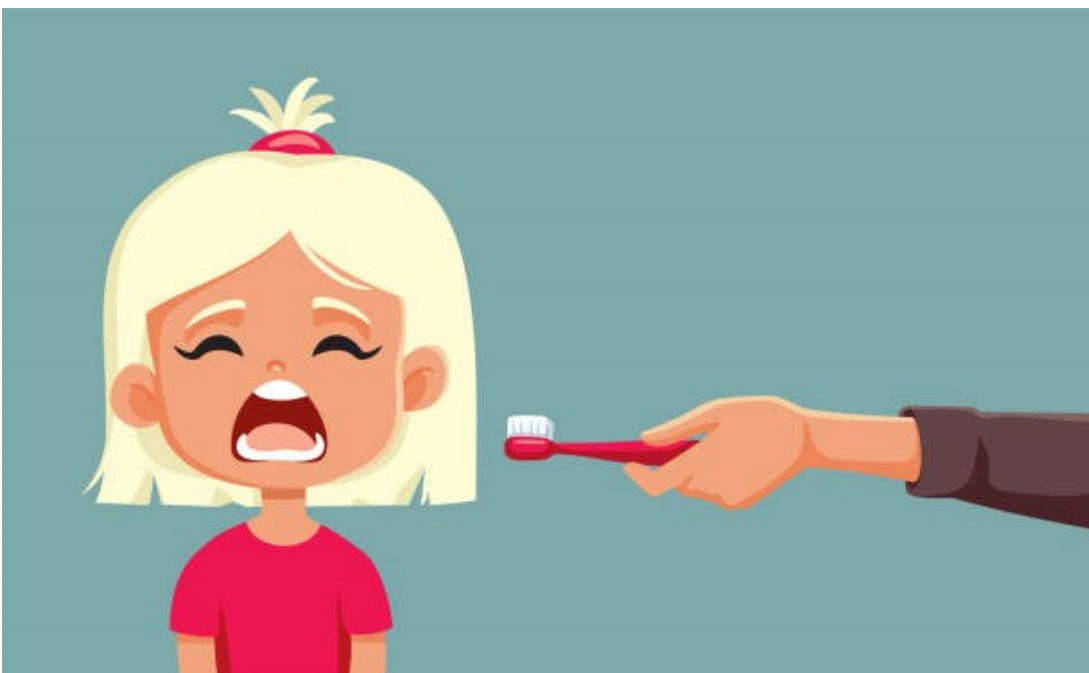


Figura 16 immagine del brush inserita nell'assenso

Il documento assenso doveva poi essere opportunamente firmato in calce dal bambino, anche se la firma non ha valore legale è importante per renderli partecipi e liberi di scegliere.



*Figura 17 esempio postazione*

## 3.2 Questionario

Al fine di raccogliere le informazioni anamnestiche necessarie per l'interpretazione del dato biologico, ad ogni soggetto reclutato, a seguito della firma del consenso informato, è stato sottoposto un breve questionario auto compilato.

Le informazioni raccolte, utili per la statistica descrittiva e la successiva analisi, sono state le seguenti:

- Età
- Sesso
- Peso e altezza (per calcolare il BMI)

- Abitudine al fumo
- Conviventi fumatori
- Patologie respiratorie diverse dall'asma
- Assunzione di farmaci, se si per quale patologia.
- Zona di residenza
- Zona attività lavorativa
- Eventuali esposizioni professionali
- Tipo di asma (allergica o no)
- Se si, che tipo di allergie

Le ultime due voci sono per i soggetti asmatici e compilate direttamente a cura del medico in sede di visita di controllo.

Tutti i dati raccolti sono poi stati inseriti nei database per l'analisi statistica, si sono fatti due database separati poiché il profilo degli asmatici era leggermente diverso tra adulti e bambini in termini di allergia.

I soggetti adulti asmatici sono stati divisi in:

1. Allergici:
  - 1.1. Perenne
  - 1.2. Stagionale
2. Non allergici

I soggetti minori invece sono stati divisi in:

1. Allergici
  - 1.1. Allergia agli acari
  - 1.2. Altre allergie
2. Non allergici

### 3.3 Analisi UHPLC-MS/MS

Le analisi condotte con questa tecnica sono state effettuate sulla matrice urina, in particolare, la tecnica, è stata applicata per quantificare i metaboliti degli inquinanti come biomarkers d'esposizione e le forme ossidate o metilate degli acidi nucleici come biomarkers di effetto.

La tecnica della cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem UHPLC-MS/MS è stata impiegata per quantificare questi due gruppi tutti gli analiti di interesse. Per un'analisi quantitativa accurata è stato necessario utilizzare e due differenti analisi metodi analitici, una per la determinazione delle basi ossidate e metilate della Guanina e della Citosina, escrete in forma libera nelle urine, ed una per la quantificazione dei metaboliti degli inquinanti sempre escreti nelle urine.

Anche se la determinazione di tutti gli analiti ha reso necessario due differenti corse cromatografiche, i due metodi sono stati sviluppati in modo da richiedere un'unica colonna cromatografica, un'unica fase mobile, con due diversi gradienti di eluizione, un'unica preparazione del campione, un'unica retta di taratura ed un'unica preparativa, questo in modo da ridurre la variabilità analitica, e a ridurre l'errore accidentale e i tempi della preparativa.

Per quanto riguarda i biomarkes di effetto relativi allo stress ossidativo sono stati quantificati i seguenti markers:

- 2'-deossiguanosina (dGuo) e 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8oxodGuo);
- Guanina (Gua), 8-idrossi-guanina (8oxoGua), 1MetilGuanina (1MeGua), 7MetilGuanina (7MeGua), 9MetilGuanina;
- Guanosina (Guo), 8-idrossi-guanosina (8oxoGuo) e 7metilGuanosina (7MeGuo);
- Deossicitidina (dCyt), 5metildeossicitidina (5MedCyt) e 5-drossimetildeossicitidina (5oxoMedCyt);
- Citosina (Cyto), 5-metilcitosina (5MeCyto) e 5idrossimetilcitosina (5oxoMeCyto);
- Citidina (Cyt) e 5-metilcitidina (5MeCyt).

In questa analisi oltre ai biomarkers di danno ossidativo e metilativo, per caratterizzare al meglio eventuali fattori di confondimento, nei campioni di urina è stata quantificata anche la cotinina (Cot), metabolita della nicotina che viene comunemente riconosciuto come indicatore di fumo di tabacco attivo o passivo.

Lo stesso campione, analizzato prima per i biomarkers d'effetto, è stato poi analizzato per quantificare i metaboliti degli inquinanti ambientali ubiquitari.

I metaboliti degli inquinanti ambientali ubiquitari che sono stati determinati sono:

- Metaboliti del benzene: acido S-fenilmercapturico (SPMA) e acido trans,trans muconico (tt-AM);
- Metabolita del toluene, acido S-benzilmercapturico (SBMA);
- Principale metabolita del 1,3-butadiene (DHBMA);
- Principali metaboliti dello stirene: acido mandelico (MA) e acido fenilgliossilico (PGA)
- Metabolita mercapturato del 3-MCPD (DHPMA);
- Metaboliti del Naftolo: naftil-gluconide (NG) e naftil-solfato (NS).

I campioni sono stati analizzati mediante cromatografia liquida (UHPLC) accoppiata a spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) e l'acquisizione in MS/MS è stata in ionizzazione positiva per gli indicatori di danno ossidativo, di metilazione e per la cotinina, mentre per i metaboliti degli inquinanti ambientali si è utilizzata la ionizzazione negativa.

Per entrambe le analisi l'acquisizione in MS/MS è avvenuta in modalità SMR (selected reaction monitoring), i metodi sono stati messi a punto andando a monitorare in Q1 i frammenti specifici di ogni composto (ione molecolare) e in Q3 gli ioni frammento corrispondenti, al fine di identificare e quantificare; inoltre, sono state monitorate anche le transizioni caratteristiche degli omologhi marcati isotopicamente, ISTD.

Come ISTD sono stati utilizzati:

- Guanina
- Guanosina + la sua forma ossidata
- Deossi guanosina + la sua forma ossidata
- Citidina

- Citosina
- Forma metilata della deossicitidina
- Cotinina

Nello specifico la separazione cromatografica è avvenuta tramite gradienti di eluizione con una fase mobile acquosa (10mM HCOOH pH=3.75 per ammonio) ed una fase mobile organica (MeOH), per le due corse le fasi sono uguali ma con gradienti leggermente diversi, inoltre viene poi aggiunto un make-up di MeOH post colonna per favorire la ionizzazione, ed entrambe le analisi sono state condotte con un flusso di 0.300ml/minuto.

Per le basi ossidate e metilate 2uL di campione vengono iniettati nel sistema mentre per la corsa dei metaboliti si inietta 1uL. Nel caso della cromatografia liquida la separazione viene effettuata in base al grado di affinità delle sostanze con la fase mobile della colonna; le sostanze arrivano in colonna e si legano più o meno stabilmente alla sua fase stazionaria, sarà poi il flusso della fase mobile che cambia a farle eluire.

Nello specifico di queste analisi la separazione è avvenuta con una colonna C18 Acquity UHPLC HSS T3 (1.8um 2.1 x 100mm) prodotta dalla ditta Waters e nelle seguenti tabelle si riportano i gradienti di eluizione per l'analisi degli indicatori di ossidazione e metilazione (Tabella 2) e dei metaboliti degli inquinanti ambientali (Tabella3).

Tempo (minuti)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	100	0
6	100	0
11	90	10
12	90	10
15	10	90
17	10	90
17.10	100	0
20	100	0

Tabella 2 Gradiente di eluizione Basi OX&Me

Tempo	Fase A	Fase B
0	98	2
1	98	2
3	90	10
4	90	10
6.50	10	90
9.90	10	90
10	98	2
14	98	2

Tabella 3 Gradiente di eluizioni corsa cromatografica per l'analisi dei Metaboliti

Lo spettrometro di massa è stato ottimizzato per ogni sostanza e in tabella 4 si riportano le transizioni utilizzate per l'analisi quantitativa.

Composto	Transizione (m/z)	IS	Transizione (m/z)
8-oxoGua	168→140	( <sup>13</sup> C <sub>1</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> )8-oxoGua	171→142
Gua	152→135	( <sup>13</sup> C <sub>1</sub> ) Gua	153→111
8-oxoGuo	300→168	( <sup>15</sup> N <sub>5</sub> )8-oxoGuo	305→173
Guo	284→152	( <sup>15</sup> N <sub>5</sub> )Guo	289→157
8-oxodGuo	284→168	( <sup>15</sup> N <sub>5</sub> )8-oxodGuo	289→173
dGuo	268→152	( <sup>15</sup> N <sub>5</sub> )dGuo	273→157
Ado	268→136	( <sup>15</sup> N <sub>5</sub> )Guo	289→157
dAdo	252→136	( <sup>15</sup> N <sub>5</sub> )dGuo	273→157
5-MeCyto	126→83	( <sup>13</sup> C <sub>1</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> )Cyto	115→70
Cyto	112→69	( <sup>13</sup> C <sub>1</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> )Cyto	115→70

5-MeCyt	258→126	( <sup>13</sup> C <sub>5</sub> )Cyt	249→112
Cyt	244→112	( <sup>13</sup> C <sub>5</sub> )Cyt	249→112
5-MedCyt	242→126	5-MedCyt-d <sub>3</sub>	245→129
dCyt	228→112	5-MedCyt-d <sub>3</sub>	245→129
1-MeGua	166→135	( <sup>13</sup> C <sub>1</sub> )Gua	153→111
7-MeGua	166→149	( <sup>13</sup> C <sub>1</sub> )Gua	153→111
9-MeGua	166→1	( <sup>13</sup> C <sub>1</sub> )Gua	153→111
7-MeGuo	298→166	( <sup>15</sup> N <sub>5</sub> )Guo	289→157
5-oxoMedCyt	258→142	5-MedCyt-d <sub>3</sub>	245→129
5-oxoMeCyto	141,9→124	( <sup>13</sup> C <sub>1</sub> , <sup>15</sup> N <sub>2</sub> )Cyto	115→70
Cot	177→80	Cot-d <sub>3</sub>	180→101

Tabella 4 Basi OX Legenda: ISTD; standard interno;;8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; Gua: Guanina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina; Guo: Guanosina; 8-oxodGuo: 8-idrossi-2'-deossiguanosina; dGuo: 2'-deossiGuanosina; Ado: Adenosina; dAdo: 2'-deossiAdenosina; 5-MeCyto: 5-Metil-Citosina; MeCyto: Citosina; 5-MeCyt: 5-Metil-Citidina; Cyt: Citidina; 5-MedCyt: 5-Metil-2'-deossi-Citidina; dCyt: 2'-deossiCitidina; 1-MeGua: 1-Metil-Guanina; 7-MeGua: 7-Metil-Guanina; 7-MeGuo: 7-Metil-Guanosina; 5-oxoMedCyt: 5-Idrossi-Metil-2'-deossi-Citidina; 5-oxoMeCyto: 5-Idrossi-Metil-Citosina

Composto	Transizione (m/z)	IS	Transizione (m/z)
SPMA	238 -> 109	S-PMA-d2	243→114
t,t-MA	141->97	t-t AM-d4	145→101
DHBMA	250->121	DHBM-d7	257→119
DHPMA	236→107	2,3-DHPMA-d5	241→112
NG	319->143 319->113		
NS	223->143		

VPG	295->143 295->113		
VPS	199->119		
MA	151->107	AM-d5	156->112
PGA	149->105	AFG-d5	154->110
SBMA		S-PMA-d2	243->114

Tabella 5 Metaboliti Legenda: ISTD; standard interno; S-PMA, acido S-fenilmercapturico; t,t-AM, acido trans,trans-muconico; AM,acido Mandelico; AFG, acido fenilgliossilico;; DHBMA, acido 1,2-diidrossibutilmercapturico; DHPMA,acido 2,3 diidropropil mercapturico;NG, naftil-glucuronide; NS, naftil-solfato;

### 3.3.1 protocollo UHPLC-MS/MS

E' stata sviluppata una procedura operativa per la preparazione degli standard e dei campioni da utilizzare per ogni seduta analitica, brevemente descritta in tabella 6.

Step	
1	Creazione della soluzione madre di mix di standard per entrambe le analisi a partire dai singoli std puri.
2	Retta di taratura in matrice tramite diluizione successiva della soluzione madre e aggiunta dei vari livelli con concentrazioni note e crescenti.
3	Creazione della soluzione contenente degli standard interni (composti marcati) che viene poi utilizzata per la diluizione della retta e dei campioni a concentrazione fissa.
4	Scongelamento dei campioni, conservati a -20°C, e centrifuga a 12000rpm per 7 minuti.
5	Diluizione 1:2 della retta in matrice e dei campioni incogniti con la mix degli standard interni

6	Creazione del batch operativo per UHPLC-MS/MS e caricamento dei campioni nell'auto campionatore
7	Analisi basi OX&Me e successivamente per i Metaboliti degli inquinanti

Tabella 6 procedura operativa analisi UHPLC-MS/MS

In tabella 7 si riassume la strumentazione utilizzata e le principali condizioni cromatografiche:

UHPLC	ExionLC (sciex)
MS/MS	API6500+
Colonna	Aquity C18 (Waters)
Flusso	0.300 ml/minuto
Make-Up	MeOH
Fase A	10mM HCOOC pH=3.75
Fase B	MeOH

Tabella 7 UHPLC-MS/MS

### 3.4 Analisi GC-MS

La matrice urina è stata utilizzata anche quantificare i livelli degli inquinanti escreti tali e quali come biomarkers d'esposizione mediante la gas cromatografia accoppiata alla spettrometria di massa (CG-MS) previa estrazione e concentrazione degli stessi mediante la micro estrazione in fase solida (SPME).

In questa analisi si sono quantificati i seguenti inquinanti:

- MTBE
- Benzene
- Toluene
- Etilbenzene
- Xileni totali
- Stirene

Come per la cromatografia liquida anche per quella gassosa avviene un'iniezione del campione ed una separazione in colonna in questo caso però il gradiente non è tra due fasi liquide diverse ma è un gradiente di temperatura e le sostanze non vengono separate in base alla loro maggior affinità con la fase stazionaria o fase mobile ma in base alla temperatura di passaggio in fase gas.

Le colonne per la GC sono colonne lunghe metri che trattengono le sostanze passano in fase gas e vengono rilevate dal detector.

L'estrazione SPME avviene con incubazione del campione a 35°C in agitazione per 15 minuti con la fibra (Smart SPME Fiber Assembly 75um CAR/PDMS, fused silica 23Ga Black, Supelco) esposta all'interno della vial.

La fibra viene poi desorbita all'interno del sito di iniezione del GC che si trova a 280°C dando il via al corso cromatografica, dove la separazione avviene tramite gradiente di temperatura (vedi tabella 8).

L'Inlets è settato a 280°C e 0,41 psi di pressione in modalità splitless con purge flow to split vent di 100ml/min per 1 minuto.

Le condizioni in cui avviene la separazione sono:

Parametri	Condizioni
Flusso	1,1 ml/min
Pressione	0,4109 psi
Velocità	56.327 cm/sec
Holdup tempo	0,89 minuti

Tabella 8 condizioni colonna GC

La colonna utilizzata è la Supelco SLB -ms FUSED SILICA Capillary Column 30m x 0,25mm x 0,25um film thickness ed il gas utilizzato è l'idrogeno proveniente dal generatore di H2.

Rate °C/min	Temperatura °C	Hold time(min)
	35	1

7	80	0
24	180	7

Tabella 9 Gradiente GC

La corsa cromatografica in totale dura 19 minuti ed è preceduta da 15 minuti di estrazione a 35°C (Tabella 9).

### 3.4.1 Protocollo GC-MS

E' stata sviluppata una procedura operativa per la preparazione degli standard e dei campioni da utilizzare per ogni seduta analitica, brevemente descritta in tabella 10.

Step	
1	Creazione della soluzione madre di mix di standard a partire dai singoli std puri.
2	Retta di taratura in matrice tramite diluizione successiva della soluzione madre e aggiunta dei vari livelli con concentrazioni note e crescenti.
3	Creazione della soluzione contenente degli standard interni (composti marcati) che viene poi utilizzata per la diluizione della retta e dei campioni a concentrazione fissa.
4	Scongelo dei campioni, conservati a -20°C, e trasferimento di 2ml di urina in vials da 4ml contenenti già 0,5g di NaCl.
5	Aggiunta dei vari livelli di concentrazione e della mix di standard interni alla matrice e aggiunta del solo mix IS ai campioni incogniti
6	Creazione del batch operativo per PAL/GC-MS e caricamento dei campioni nel PAL collegato allo strumento
7	Estrazione SPME e successiva analisi che avviene in modo automatizzato per ogni campione.

Tabella 10 procedura operativa analisi GC-MS

Il GC è accoppiato ad un singolo quadrupolo per la rilevazione in modalità SIM con i frammenti specifici delle sostanze d'interesse per lo studio ed i relativi composti marcati riportati in tabella 11.

<b>Composto</b>	<b>Transizione (m/z)</b>	<b>IS</b>	<b>Transizione (m/z)</b>
MTBE	73	ETBE	87
Benzene	78	Benzene*	84
Toluene	91	Toluene*	98
Etilbenzene	91	Etilbenzene*	98
Xileni	91		
Stirene	104	Stirene*	112

Tabella 11 Transizioni (m/z) monitorate in modalità SIM per l'analisi degli inquinanti ambientali

In tabella 12 si riassume la strumentazione utilizzata e di principali parametri:

Autocampionatore	Pal 3	Pal system
GC	8860 GC System	Agilent
MS	5977B GC/MSD	Agilent
Colonna	SLB- 5ms fused silica	Supelco (sigma)
Fibra	Black 75um CAR/PDMS	
GAS	H2	Generatore Claind BrezzaH200
Software	MassHunter	Agilent

Tabella 12 configurazione del GC-MS

### 3.5 Creatinina

In tutti i campioni d'urina raccolti viene effettuato il dosaggio della creatinina urinaria mediante saggio colorimetrico, test di jaffè, al fine di rendere confrontabili tra loro i diversi campioni ed eliminare la componente della variabilità legata ai soggetti ed al loro stile di vita.

La creatinina è un composto eterociclico risultante della degradazione della creatina fosfato presente a livello del muscolo scheletrico e cardiaco, questa viene utilizzata come fonte di energia per la contrazione dei muscoli stessi, l'uso come fonte di energia porta alla sua degradazione con conseguente eliminazione nelle urine; inquanto il composto viene filtrato dai glomeruli renali e completamente eliminato, senza essere riassorbito in parte a livello tubulare, rendendo così il valore urinario un indice attendibile per misurare la contrazione muscolare e della funzionalità renale.

La creatinina rappresenta un indice sensibile e specifico di funzionalità renale e permette di monitorare il trattamento delle patologie di certe terapie e la rispettiva clearance renale; è un indice riconosciuto, con dei valori di riferimento, l'intervallo dei valore nella popolazione generale sana è compreso tra 0.3-3 g/L, un valore al di sopra o al di sotto di quest'ultimi suggerisce una funzionalità e una clearance renale alterata che provocherà una maggiore concentrazione di creatinina a livello del circolo sanguigno.

Urine con valori al di fuori del range non posso essere utilizzate al fine di quantificare altri markers poiché il valore risulterebbe alterato e non attendibile a causa dell'inadeguata clearance renale che potrebbe alterare i meccanismi di eliminazione non solo della creatinina ma anche dei markers in studio.

Nello studio si raccoglieranno campioni spot di urina ed i dati dello studio saranno poi espressi per creatinina in modo da renderli confrontabili, la pratica di utilizzare l'urina spot corretta per creatinina è ormai ampiamente accettata e documentata.

L'European Standards Committee of Urinary (DNA) Lesion Analysis pone proprio all'interno del suo terzo obiettivo questa correzione, che recita proprio: "Evaluate correcting urinary lesion measurements for (i)creatinine, (ii) collection over a 24 hr period" (<http://escula.org>).

Nel monitoraggio biologico dell'esposizione a sostanze chimiche è comune la raccolta di singoli spot che tengono conto della tossico cinetica della sostanza e della sua emivita, ma proprio perché il volume urinario è influenzato da molti fattori (filtrazione glomerulare,

secrezione tubulare e riassorbimento, alimentazione, introduzione di liquidi e sudorazione), la concentrazione delle sostanze escrete può subire sostanziali variazioni ed è necessaria la correzione per creatinina che mira a ridurre questa variabilità (Andreoli et al, 2005)<sup>67</sup>.

Campioni di urina troppo diluiti o troppo concentrati possono quindi portare ad una sottostima o sovrastima dell'analita nei singoli volumi di campionamento (Alessio, 1985; Carrieri, 2001)<sup>68,69</sup>; l'attendibilità della correzione dei valori determinati in spot di urina rispetto alla diluizione o alla concentrazione del campione è stata spesso dibattuta ma comunemente accettata.

È pratica comunemente accettata in medicina del lavoro si utilizza di norma la correzione rispetto al valore di creatinina per tutti gli indicatori la cui concentrazione dipende dal volume di urina (ma non per quelli escreti per diffusione), convenzione generalmente applicata anche negli Indici di Esposizione Biologica (BEI) proposti dall' American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH).

Considerando queste valutazioni l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), tenendo conto del fatto che campioni di urina molto diluiti o molto concentrati non sono in genere idonei per il monitoraggio biologico, ha adottato dei valori di riferimento: un campione urinario è accettabile se il valore di creatinina è compreso tra 0.3 e 3.0 g/l (per il peso specifico tra 1,010 e 1,030); motivo per cui campioni con valori che cadono fuori da questo range devono essere scartati e raccolti nuovamente.

### 3.6 Polimorfismi

La suscettibilità individuale in relazione alla vulnerabilità al danno ossidativo e allo sviluppo di patologie di tipo infiammatorio è descritta tramite lo studio dei polimorfismi.

Ci sono tanti enzimi coinvolti nella biotrasformazione degli xenobiotici ed è possibile studiare diverse mutazioni, ma in questo studio ci sono concentrati in particolare su due enzimi GSTT-M1/T1 e NQO1.

Le mutazioni a carico dell'enzima glutatione-s-trasferasi di classe T1 ed M1 (GSTT1 e GSTM1); sono state selezionate per questo studio in quanto indicatori della sensibilità di un soggetto a subire l'attacco da parte degli xenobiotici ambientali, inoltre per questa attività enzimatica

GSTM1 e GSTT1 è presente un valore di riferimento al quale è possibile confrontare poi i valori della popolazione oggetto dello studio, l'enzima GSTM1/GTST1 è assente in circa il 50 e 20%, rispettivamente, della popolazione caucasica totale.

L'altro focus di questo studio al fine di valutare la variabilità interindividuale è NQO1, gene membro della famiglia NAD(P)H deidrogenasi (chinone) che codifica una reduttasi citoplasmatica a 2 elettroni, questa proteina legante il FAD forma omodimeri e riduce i chinoni in idrochinoni; l'attività enzimatica di questa proteina impedisce la riduzione di un elettrone dei chinoni che si traduce nella produzione di specie radicali, le mutazioni in questo gene sono state associate a discinesia tardiva (TD), un aumento del rischio di ematotossicità dopo l'esposizione al benzene e alla suscettibilità a varie forme di cancro.

L'espressione alterata di questa proteina è stata osservata in molti tumori ed è anche associata alla malattia di Alzheimer (AD), sono state caratterizzate varianti di giunzione trascrizionale alternative, che codificano diverse isoforme.

Questi polimorfismi presenteranno la delezione dei geni 1p13.3 e 22q.2 per la glutation traferasi rispettivamente per GSTM1 e GSTT1, mentre per quanto riguarda NQO1 abbiamo una sostituzione nel sito cromosomico 609 di una citosina con una serina (C609T) che porta poi alla sostituzione di una prolina con una serina (PRO187Ser).

Al fine di campionare il materiale cellulare per estrarre il DNA, utile ad effettuare queste analisi, i soggetti reclutati sono stati sottoposti a brush boccale per raccogliere le cellule di sfaldamento, nei soggetti adulti un unico spazzolino è stato sfregato all'interno delle due guance e poi nel liquido di lisi per rilasciarle, mentre nei bambini al fine di raccogliere più cellule possibili vista anche la minor produzione di cellule di sfaldamento si sono usati due spazzolini diversi, uno per guancia, e poi immersi nello stesso liquido lisi; ottenendo così un campione per paziente.

I brush boccali sono stati raccolti in provetta dove si ritrova 300 ul di soluzione di cellule di lisi, che permetterà di ottenere le cellule di nostro interesse; il DNA, una volta raccolto, è stato conservato a + 4°C fino al momento della procedura di isolamento al termine della quale è stato conservato fino al momento dell'amplificazione.

Il DNA è stato isolato utilizzando kit commerciale Puregene (Qiagen, CA, USA) ed è stato amplificato con metodiche di PCR Multiplex e PCR-RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM).

Prima di poter procedere con la PCR, è essenziale passare dall'isolamento/estrazione del DNA a partire dal campione di brush boccale raccolto e la sua purificazione.

Per questa analisi è stato utilizzato il kit di purificazione specifico Gentra per campioni salivari provvisto di:

- Cell lysis solution (dove è stato immerso lo spazzolino del brush per rilasciare le cellule di sfaldamento)
- Protein precipitation solution
- DNA Hydratation solution
- RNase A solution
- Glycogen solution

Tutti i reagenti sono stati conservati nelle condizioni migliori previste dal produttore prima di essere utilizzate per l'analisi.

Le cellule vengono lisate attraverso l'applicazione di detergenti anioni in presenza di uno stabilizzatore del DNA, che limita l'attività della DNase, successivamente al fine di purificare il campione i frammenti di RNA sono rimossi tramite la digestione enzimatica, mentre altri contaminati, come le proteine, sono rimossi tramite una precipitazione salina.

Una volta che la purificazione è avvenuta, tutti i contaminati sono rimossi, il DNA genomico viene recuperato tramite alcol e poi dissolto in una soluzione di idratazione (1mM EDTA, 10mM Tris- Cl ph 7.5), come si può vedere di seguito nel protocollo dettagliato.

### 3.6.1 Protocollo isolamento

In tabella 13 si descrive il protocollo di isolamento del DNA a partire da campioni di brush buccale.

Step	operazione
1	Aggiunta 100uL di protein precipitation
2	Vortexare per 20 secondi
3	Incubare 10 minuti a +4°C
4	Centrifugare a 15000 rpm per 5 minuti
5	Surnatante circa 400uL
6	Aggiungere al surnatante 300uL isopropanolo e 4ul di Glicogeno conservato a 4°C
7	Invertire 50 volte
8	Incubare 5 minuti a temperatura ambiente
9	Centrifugare a 15000 rpm per 5 minuti
10	Eliminare quantitativamente il surnatante
11	Aggiunta 300uL EtOH 70%
12	Invertire 50 volte
13	Centrifugare a 15000 rpm per 5 minuti
14	Scolare su carta assorbente per 10 minuti
15	Aggiunta 20uL nuclease free- water
16	1h bagnetto 65°C (idratazione)

*Tabella 13 procedura isolamento DNA dal brush*

Il DNA purificato viene poi stoccato e conservato a -20°C fino al momento della PCR.

Lo step successivo è diverso per le due macro-classi, ma con in comune l'utilizzo della tecnica PCR, reazione a catena della polimerasi, che ha permesso di amplificare le molecole di acido nucleico, seppur con metodiche specifiche diverse.

L'individuazione delle mutazioni a carico delle GSTM1 e GSTT1 viene effettuata tramite l'analisi PCR multiplex, mentre per quanto riguarda NQO1 si è utilizzata la tecnica PCR-RFLP.

### 3.6.2 PCR multiplex

Per procedere con la PCR multiplex si prepara una soluzione con volume 20uL contenente 4uL del nostro DNA campione più tutti i reagenti necessari alla procedura di amplificazione (Tabella 14):

Reagente	Volume (uL)
H2O	9
10x Buffer	2
MgCl <sub>2</sub>	3
dNTPs	0.4
Primers	0.4+0.4/0.4+0.4/0.4+0.4
Taq (tac polimerasi)	0.250

Tabella 14 soluzione per PCR multiplex

La PCR multiplex è stata eseguita tramite l'ausilio di un termociclatore sul quale è stato impostato un apposito protocollo di amplificazione che inizia con un tempo di denaturazione iniziale di 10 minuti eseguito a 94°C, seguito da 35 cicli di denaturazione che avvengono con il programma riportato in tabella 15.

Temperatura (°C)	Tempo (secondi)	<b>X 35</b>
96	20	
64	30	
72	30	

Tabella 15 programma di amplificazione

Infine, l'estensione finale è stata eseguita a 72°C per 2 min terminando così il protocollo di amplificazione e rendendo il campione pronto per lo step della separazione degli ampliconi che è stata effettuata utilizzando gel di agarosio in tampone Sybr Green.

I gel sono stati colorati con Xilene cianolo e blu bromofenolo e visualizzati con un transilluminatore UV, rilevando le diverse velocità di migrazione elettroforetica; dall'analisi si ottengono delle bande differenti in base agli amplificati in questo caso abbiamo come lunghezza degli amplificati:

- GSTM1 215 bp
- GSTT1 480 bp
- ALBUMINA 350 bp (utilizzata come controllo positivo).

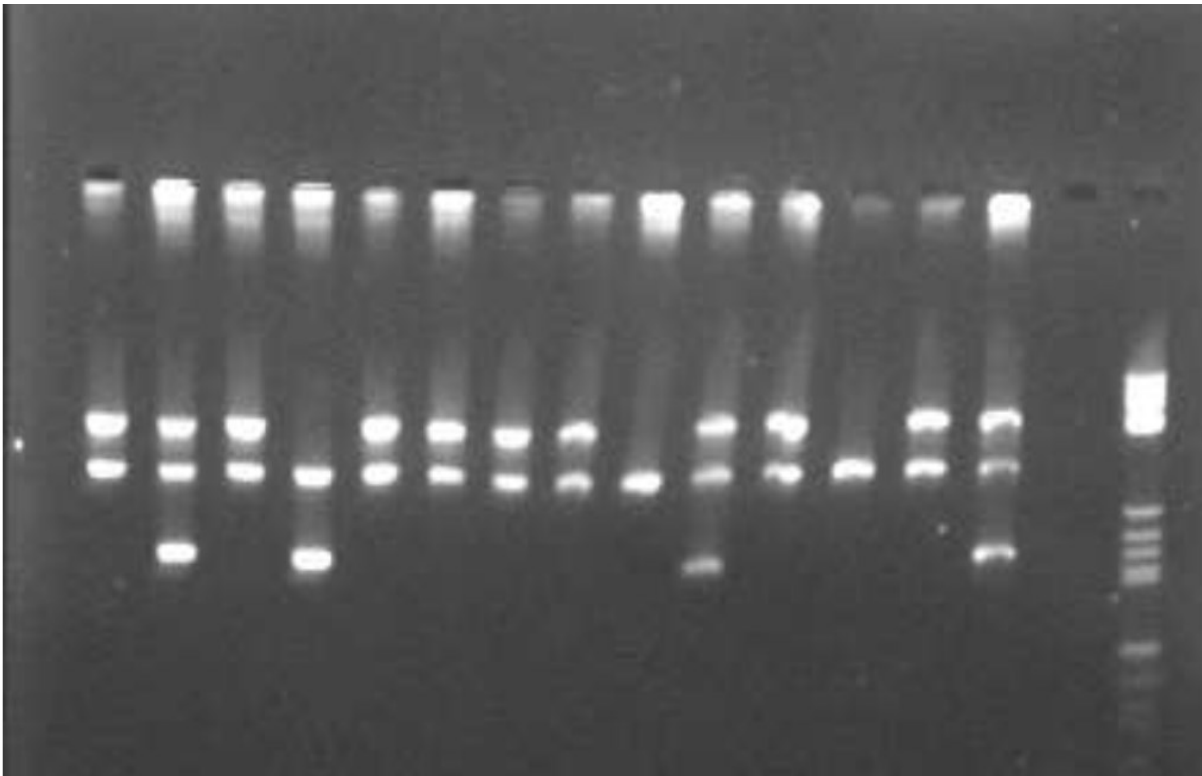


Figura 18 Gel GST-M1/T1

Per quanto riguarda le mutazioni a carico della glutatione transferasi quindi i risultati saranno espressi in termini di WT= wild type e MUT= mutato.

L'analisi è stata condotta sulla totalità della popolazione ma solo sul 90% è stato possibile rilevare il genotipo in quanto non è andata a buon fine l'amplificazione per scarsità di materiale genetico; le difficoltà maggior sono state riscontrate nei bambini a causa del fatto che, producendo loro meno cellule di sfaldamento, è più difficile recuperare con la procedura del brus boccale sufficiente materiale genetico.

### 3.6.3 Protocollo PCR-RFLP

Per procedere con la PCR-RFLP si prepara una soluzione con volume 30uL contenente 3uL del nostro DNA campione più tutti i reagenti necessari alla procedura di amplificazione (Tabella 16):

Reagente	Volume (uL)
H2O	19
10x Buffer	3
MgCl <sub>2</sub>	3
dNTPs	0.6
Primers	0.6+0.6
Taq (taq polimerasi)	0.2

Tabella 16 soluzione per PCR-RFLP

Il primer utilizzato per delimitare la sequenza di basi specifica e consentire l'attacco della taq polimerasi è composto da due frammenti inquanto una volta aperta l'elica è necessario delimitare da entrambi i lati sia con il frammento FOR che REV.

FOR:

GAGCGTAGCTCTGAACTGAT

REV:

ATTGAATTCGGGCGTCTGCTG

La PCR-RFLP è stata eseguita come per la PCR multiplex tramite l'ausilio di un termociclatore sul quale è stato impostato un apposito protocollo di amplificazione che inizia con uno step iniziale di 10 minuti eseguito a 95°C, seguito da 35 cicli di denaturazione che avvengono con il programma riportato in tabella 17.

Temperatura (°C)	Tempo (secondi)	<b>X 35</b>
95	20	
65	30	
72	30	

Tabella 17 programma di amplificazione

Infine, l'estensione finale è stata eseguita a 72°C per 2 min terminando così il protocollo di amplificazione e rendendo il campione pronto per lo step della digestione eseguita secondo protocollo seguente (Tabella 18).

Reagente	Volume (uL)
DNA	8
10x Buffer	1
E -> H	1

Tabella 18 digestione enzimatica per rilevazione NQO1

La digestione, del prodotto di amplificazione di 218 basi, è avvenuta tramite Hinf I.

I campioni digeriti sono poi stati caricati sul gel per la rilevazione, i gel sono stati colorati con Xilene cianolo e blu bromo fenolo e visualizzati con un transilluminatore UV, rilevando le diverse velocità di migrazione elettroforetica; dall'analisi si ottengono delle bande differenti in base agli amplificati in questo caso abbiamo come lunghezza degli amplificati:

- Mut (mutato) 163/53/22
- WT (well time) 218 22
- Het (eterozigote) 218 163/53/22

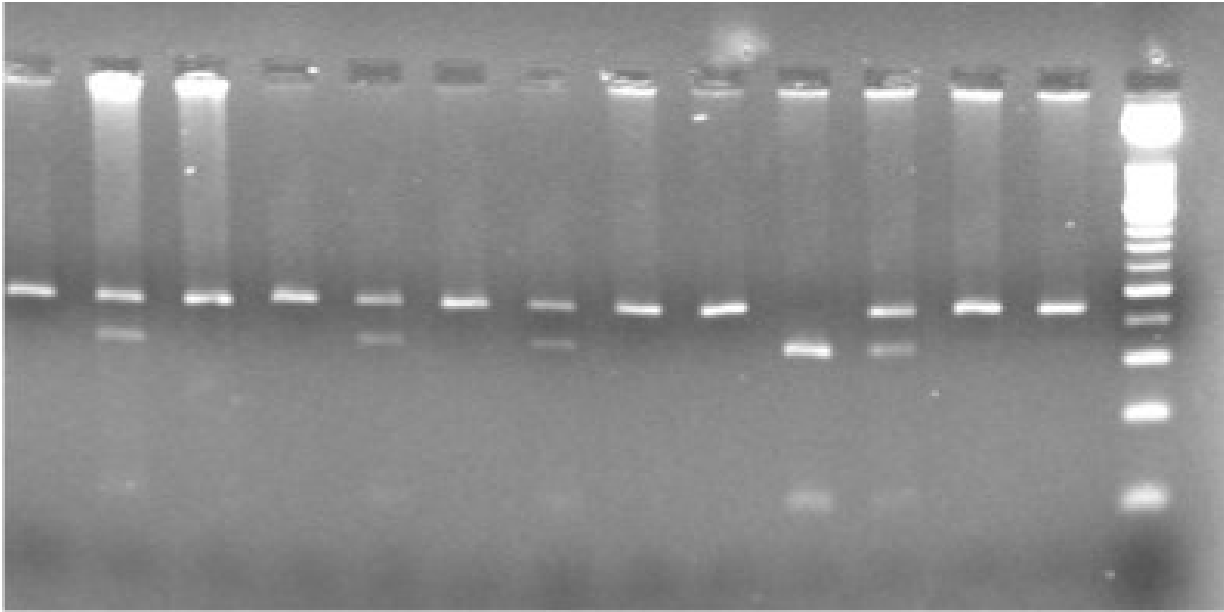


Figura 19 Gel elettroforetico NQO1

**NAD(PH) chinone ossido riduttasi (NQO1)**

Le reazioni di PCR sono state eseguite in un volume di 40  $\mu$ L, contenenti:  
 50-100 ng di DNA,  
 Tris-HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM,  
 dNTPs 200 nM,  
 0.2  $\mu$ M di ciascun primer,  
 MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM,  
 Taq polimerasi 1 U

Cicli di amplificazione:  
 denaturazione iniziale 5'...GANTC...3' 94 °C  
 3'...CTNAG...5'  
 seguita da 35 cicli di:  
 20 secondi a 94 °C  
 30 secondi a 65 °C  
 30 secondi a 72 °C

Nelle reazioni di PCR sono stati utilizzati i seguenti oligonucleotidi:

**primer forward 5' – GAGACGCTAGCTCTGAACTGAT – 3'**  
**primer reverse 5' – ATTTGAATTCGGGCGTCTGCTG– 3'**

Il prodotto di amplificazione, di 218 paia di basi (bp), è stato digerito con *Hinf I* e sottoposto a separazione elettroforetica su gel di agarosio NuSieve 3:1 al 3% in tampone TBE.

**PROFILO ELETTROFORETICO**

Wt	het	mut
218	218	
	165	165
	53	53

Figura 20 schema riassuntivo PCR per NQO1

L'integrazione di questi dati consentirà di ottenere informazioni circa i meccanismi molecolari indotti dall'esposizione ad inquinanti.

### 3.7 TEST E.L.I.S.A HMGB-1

Il fattore di infiammazione HMGB1 è stato quantificato tramite immunoassorbimento enzimatico E.L.I.S.A, ad alta sensibilità e la lettura della piastra è stata condotta con il lettore di micropiastre modulare a tecnologia multipla, Varioskan LUX, dotato da tecnologie di rilevamento di assorbanza e intensità di fluorescenza.

Questo marker è caratteristico del processo infiammatorio ed è riportato in letteratura la correlazione tra i suoi valori ematici e l'asma, ma in questo studio abbiamo voluto utilizzare un approccio più innovativo studiando la correlazione tra la patologia asmatica ed i valori di HMGB-1 in urina.

La scelta della matrice urinaria è una scelta volta all'utilizzo di una matrice non invasiva, inquanto individuare una correlazione o una differenza tra le due popolazioni in questa amplierebbe il parco di possibili matrici utilizzabili ed eviterebbe al paziente il campionamento del sangue che, seppur in quota ridotta, risulta essere una tecnica invasiva, inoltre potrebbe fornire un punto di vista diverso essendo l' HMGB-1 quantificato in urinaria la quota di quest'ultimo eliminata dall'organismo a differenza di quello quantificato nel sangue che invece è circolante.

Infine, dosare anche questo biomarkers in urina ci permettere di dosare tutti i diversi markers di esposizione nella stessa matrice.

L'utilizzo della matrice urina per quantificare questo marker è di recente scoperta e non molto utilizzata ad oggi, ma ci sono comunque lavori in letteratura che hanno utilizzato questa tecnica e riportano la correlazione tra HMGB-1 urinario ed alcune patologie autoimmuni (Burdano et al, 2019)<sup>70</sup>.

Il metodo utilizzato è Sandwich-ELISA, la piastra commerciale micro-ELISA viene venduta già ricoperta con anticorpo specifico per HMGB1 umano che interagisce con standard o campioni biologici.

I reagenti sono stati preparati a temperatura ambiente:

1. La wash solution è stata preparata diluendo in H<sub>2</sub>O il buffer (30ml in 750ml di H<sub>2</sub>O).
2. Lo standard è stato centrifugato 10 000 giri x 1 min e portato a volume per ottenere una soluzione con concentrazione 2000pg/mL, soluzione madre di partenza per la retta di

- taratura; la retta si ottiene tramite diluizioni successive fino ad avere 7 punti, più il bianco, con le seguenti concentrazioni 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25.
3. Il biotinilato, detection di Ab, si prepara utilizzando 120 ul del concentrato, dopo opportuna centrifuga, da diluire 100 volte.
  4. Per la perossidasi, HRP, enzima che marca gli anticorpi o antigeni si applica la stessa diluizione 100x del biotinilato

Gli anticorpi di rilevamento biotinilato specifici per HMGB1 e il coniugato Avidina 3 Horseradish Peroxidasi (HRP) vengono poi aggiunti dall'operatore in ciascun pozzetto della piastra in successione e incubati per i tempi previsti.

Dopo l'incubazione, i componenti liberi vengono lavati per eliminare ciò che non è adeso alla piastra e si aggiunge il reagente del substrato, sempre a ciascun pozzetto, che si legherà all'anticorpo, ove presente, rendendo possibile l'individuazione e quantificazione; il biotinilato e il coniugato Avidin-HRP, quando si legano, appaiono di colore blu con intensità variabile in base alla quantità del target presente.

La reazione enzima- substrato, che sviluppa la colorazione blu, necessita di uno stop che le viene dato dall'aggiunta della stop solution, soluzione acida che termina la reazione e fa virare a giallo il colore dei pozzetti contenenti il target.

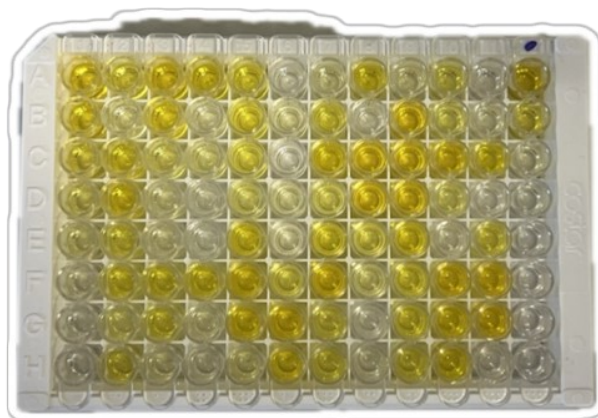


Figura 21 piastra E.L.I.S.A.

La rilevazione con scopo quantitativo avviene con tecnica spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 450 nm.

### 3.7.1 Protocollo E.L.I.S.A.

Prima di procedere con il caricamento della piastra e l'avvio della procedura è importante preparare le soluzioni necessarie alla concentrazione richiesta dalle specifiche, inquanto nel kit sono fornite soluzioni concentrate.

Assieme ai reagenti è necessario preparare la curva di calibrazione a partire dallo standard concentrato che è fornito nel kit

Una volta che le soluzioni sono state diluite come richiesto e descritto sopra si può procedere con la preparazione del campione urinario ed il caricamento della piastra (tabella 19).

Step	Operazioni
1	Centrifuga per 10min a 12000rpm del campione di urina scongelato
2	Caricamento della retta nella prima colonna della piastra con le soluzioni apposite 100ul ogni soluzione (2000/1000/500/250/125/62,5/31,25 mg/l)
3	Caricamento della piastra con diluizione 1:2 del campione (50uL urina + 50uL diluent)
4	Incubare 90 minuti 37°C
5	Rimozione del liquido e aggiunta biotinitato diluito 100uL per pozzetto
6	Incubare 1h a 37°C e successivo lavaggio per 3 volte con eliminazione totale del wash buffer
7	Aggiunta coniugato diluito 100uL per pozzetto
8	Incubare 30 minuti 37°C e successivo lavaggio per 5 volte con eliminazione totale del wash buffer
9	Aggiunta substrato 90uL per pozzetto
10	Incubare max 15 minuti e poi aggiungere stop solution 50uL per pozzetto
11	Lettura a 450 nm

Tabella 19 procedura ELISA per HMGB-1

Il valore OD rilevato dallo spettrofotometro è proporzionale alla concentrazione di HMGB1 presente nel pozzetto, quindi la concentrazione del campione di urina di partenza si ottiene confrontando l'OD dei campioni con la curva standard.

La lettura dei risultati è stata effettuata con Thermo Scientific Varioskan LUX multimode microplate reader, strumento che può analizzare assorbanza (UV-Vis), intensità di fluorescenza, luminescenza, AlphaScreen / AlphaLISA e TRF (time resolved fluorescence modules).

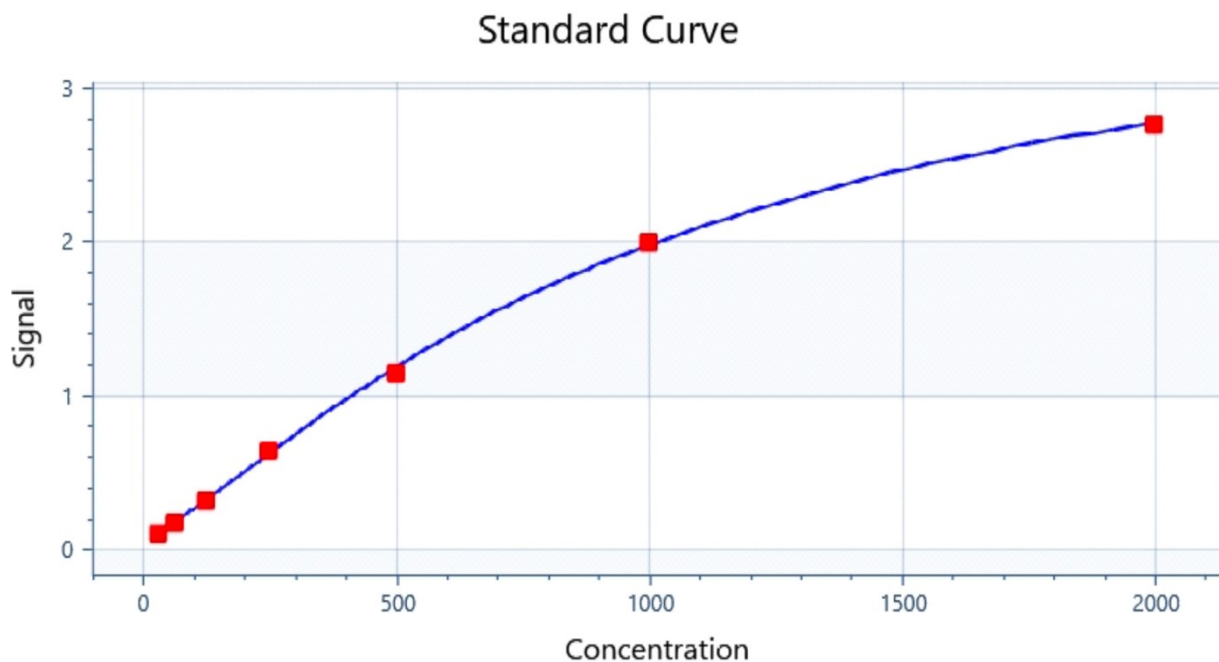


Figura 22 Standard curve HMGB-1

$$y = 3.87065 + (0.0661593 - 3.87065) / (1 + (x/996.276)^{1.28675})$$

$$y = a + (b - a) / (1 + (x/c)^d)$$

Where:

a =	3.87065215587127
b =	0.066159284892621
c =	996.275828167268
d =	1.28675155370625

R<sup>2</sup>: 1

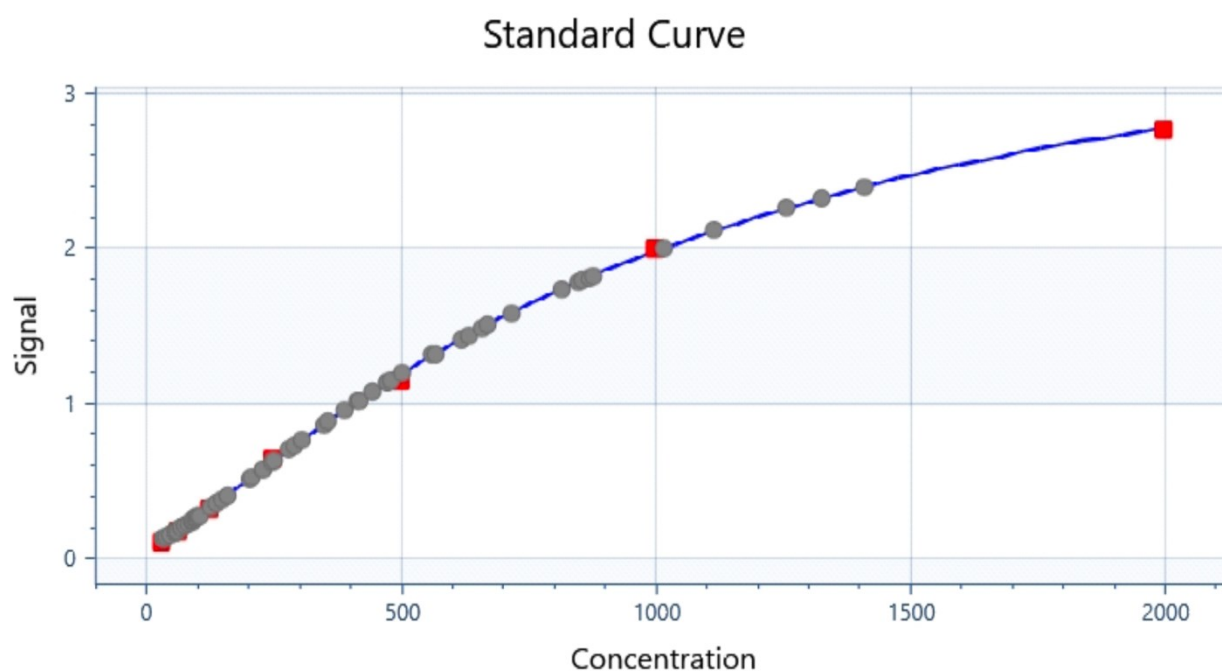


Figura 23 standard curve con samples

La prima immagine mostra la retta di taratura con solo i campioni di standard creati per la retta di taratura mentre nella seconda in grigio sono stati aggiunti anche i valori riferiti ai campioni incogniti a conferma del fatto che il range della retta è conforme ed idoneo per la quantificazione, i campioni che sono risultati oltre il punto massimo della calibrazione sono stati rianalizzati con un fattore di diluizione maggiore.

## 3.8 Statistica descrittiva

### 3.8.1 Popolazione generale

La popolazione oggetto di questo studio può essere suddivisa in 2 macro-popolazioni:

1. Adulti
2. Bambini

A loro volta ogni gruppo può essere diviso in sani ed asmatici creando così 4 sottogruppi.

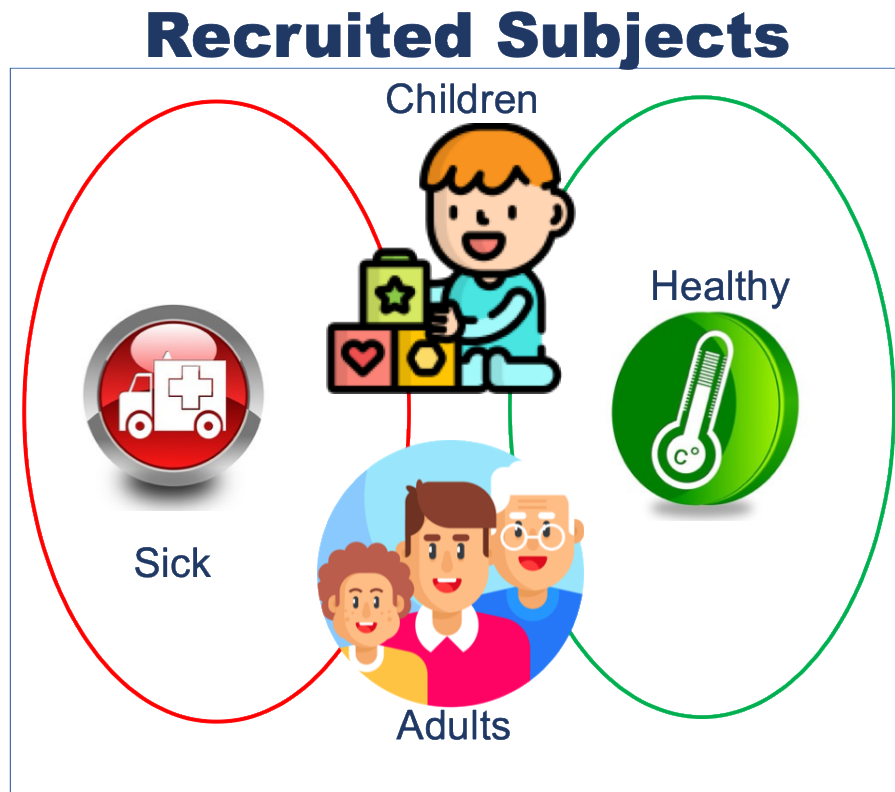


Figura 24 schema esplicativo della popolazione reclutata

Scendendo nello specifico dei numeri all'interno di ogni gruppo si è cercato di mantenere un rapporto di circa 2:1 tra sani ed asmatici.

I soggetti reclutati sono:

Adulti Sani (AS) = n° 213

Adulti Asmatici (AA) = n° 115

Bambini Sani (BS) = n° 120

Bambini Asmatici (BA) = n° 53

Il numero dei soggetti reclutati è leggermente in eccesso a quelli riportati nel CE poiché si è tenuto conto che non tutti fossero poi utilizzabili a causa del valore di creatinina esterno al range di normalità oppure che il materiale consegnato potesse essere incompleto o insufficiente.

Alcuni soggetti poi sono stati eliminati e non analizzati o per età fuori dal range accettabile o per valori di creatinina fuori dal range di normalità che rendevano il campione non idoneo, arrivando così ad una popolazione finale di:

Adulti Sani (AS) = n° 205

Adulti Asmatici (AA) = n° 103

Bambini Sani (BS) = n° 150

Bambini Asmatici (BA) = n° 49

### 3.8.2 Popolazione adulta

La popolazione adulta è composta da 213 soggetti sani, AS, in età lavorativa, dipendenti dell'Università di Parma, non professionalmente esposti ad agenti ossidanti o ad inquinanti ambientali, regolarmente sottoposti a sorveglianza sanitaria, afferenti al servizio di medicina preventiva dei lavoratori dell'università di Parma, e da 115 soggetti asmatici, AA, reclutati tra i pazienti monitorati dalla clinica pneumologica ambulatorio Asma dell'AUO di Parma.

In Tabella 20 è riportata la descrizione delle due popolazioni reclutate considerando diversi fatto come età, sesso, BMI, abitudine al fumo All'interno della popolazione si sono indagate le differenze in base al sesso, al BMI, alle abitudini al fumo, all'esposizione professionale e agli indicatori di suscettibilità in entrambi i sottogruppi; sia per capire le differenze sia per capire se le due popolazioni fossero confrontabili e la distribuzione dei polimorfismi relativi agli enzimi della biotrasformazione come GSTM1, GSTT1 ed NQO1,

Stratificando per sesso la frequenza dei maschi (41%) e delle femmine (59%) nei due gruppi (sani e asmatici) è sovrapponibile e in accordo con quanto riportato in letteratura (Fuseini et al., 2017); anche stratificando per abitudine al fumo i due gruppi sono confrontabili, sia per numerosità di soggetti fumatori che per numerosità dei conviventi fumatori.

Passando ad analizzare l'indice di massa corporea (BMI) quest'ultimo è leggermente più elevato nei soggetti asmatici rispetto ai soggetti sani, ma il dato non è statisticamente differente.

Statisticamente differente, invece, risulta essere l'età media delle due popolazioni, che sono rispettivamente di 35 +14,5 anni per gli AS e di 51 +15,4 anni per gli AA.

Relativamente alla frequenza di mutazioni a carico dei polimorfismi di GSTM1 e GSTT1, questa risulta essere confrontabile con quanto riportato in letteratura; il dato può essere usato a conferma della rappresentatività dei soggetti reclutati rispetto alla popolazione generale.

Nello specifico per quanto riguarda la mutazione a carico dell'enzima GSTT1, nella popolazione reclutata in questo studio si osserva che l'83% dei soggetti sani sono GSTT1 wild type, mentre solo il 74% dei soggetti asmatici non presenta la mutazione; questi dati sono in accordo con quanto riscontrato in letteratura, la quale riporta che i soggetti asmatici hanno una maggior frequenza con GSTT1 nulla rispetto alla popolazione sana (Piacentini et al., 2021), e l'assenza di mutazione dello stesso enzima (GSTT1 pos) è correlata ad un minor rischio di sviluppare la patologia (Turner et al.2018).

Variabile		AS - Sani	AA - Asmatici
Sesso	Maschio	40 %	36,5 %
	Femmina	60 %	63,5 %
Fumo	SI	18 %	13 %
	NO	82 %	87 %
Conviventi fumatori	1 o più	14,5 %	13,9 %
BMI		23 kg/m <sup>2</sup>	26 kg/m <sup>2</sup>
		± 3,8	± 4,7
Età		35 anni	51 anni
		± 14,5	± 15,4
GSTT1	Mutato	16,9 %	26,1 %

	Wild Type	83,1 %	73,9 %
GSTM1	Mutato	51,6 %	31,3 %
	Wild Type	48,4 %	68,7 %
NQO1	Eterozigote	33,5 %	30,5 %
	Omozigote mutato	6,2 %	3,8 %
	Omozigote Wild Type	60,3 %	65,7 %

Tabella 20 Statistica descrittiva Adulti

Prima di procedere con l'analisi statistica e al fine di programmare i test da applicare si esegue il test Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e test della sfericità di Bartlett per valutare la nostra potenza statistica e il valore della dimensione campionaria per ogni popolazione.

In figura 25 si mostrano i risultati del test KMO per valutare la potenza statistica della nostra dimensione campionari relativamente agli adulti.

<b>Test di KMO e Bartlett</b>		
Misura di Kaiser-Meyer-Olkin di		<b>0,868</b>
Test della sfericità di Bartlett	Appross. Chi-quadrato	<b>7822,040</b>
	gl	<b>561</b>
	Sign.	<b>0,000</b>

Figura 25 Test KMO per potenza statistica Adulti

### 3.8.3 Popolazione bambini

La popolazione dei soggetti minori è composta da 100 soggetti sani, BS con un'età compresa tra i 6 e gli 11 anni, frequentati le classi elementari degli istituti comprensivi che hanno collaborato al progetto e da 53 soggetti asmatici, BA, reclutati dalla clinica pneumologica ambulatorio Asma dell'AUO di Parma.

Anche all'interno di questa popolazione come per quella adulta si sono indagate le differenze in base al sesso, al BMI, alle abitudini al fumo dei genitori o conviventi e agli indicatori di

suscettibilità in entrambi i sottogruppi; anche in questo caso con un duplice obiettivo sia per capire le differenze sia per capire se le due popolazioni fossero confrontabili (Tabella 21).

Variabile		BS - Sani	BA - Asmatici
Sesso	Maschio	51,3 %	54,7 %
	Femmina	48,6 %	45,3 %
Conviventi fumatori		7,4 %	20,7 %
BMI			
Età		9 Anni	10 Anni
GSTT1	Mutato	25,9 %	22,2 %
	Wild Type	74,1 %	77,8 %
GSTM1	Mutato	42,3 %	35,8 %
	Wild Type	57,7 %	64,2 %
NQO1	Eterozigote	23,1%	7,4%
	Omozigote mutato	5%	2%
	Omozigote Wild Type	50,5%	56,6%

Tabella 21 descrittiva Bambini

Nei bambini il materiale genetico raccolto in alcuni casi non è stato sufficiente per valutare tutti polimorfismi, per questo motivo non è stato possibile valutare nel 100% della popolazione, inoltre è importante sottolineare che eventuali differenze con la letteratura in merito alla distribuzione dei polimorfismi nella popolazione caucasica sono da imputare al fatto che la nostra popolazione non è interamente caucasica ma di razza mista, soprattutto quella minore.

In figura 26 si mostrano i risultati del test KMO per valutare la potenza statistica della nostra dimensione campionari relativamente ai bambini.

<b>Test di KMO e Bartlett</b>		
Misura di Kaiser-Meyer-Olkin di		<b>0,912</b>
Test della sfericità di Bartlett	Appross. Chi-quadrato	<b>5230,019</b>
	gl	<b>435</b>
	Sign.	<b>0,000</b>

Figura 26 Test KMO per potenza statistica\_Bambini

### 3.9 Analisi statistica

Per la dimensione della popolazione dei soggetti adulti e pediatrici asmatici, si specifica che la numerosità è determinata dalla fattibilità, in base al numero dei pazienti afferenti agli ambulatori del Centro Asma e al Centro di Fisiopatologia Respiratoria Infantile, UOC Clinica Pediatrica di Parma nell’arco temporale di un anno, senza alcun calcolo statistico.

La numerosità dei soggetti sani adulti e bambini si è stimato, sulla base dei dati della letteratura, possa essere circa il doppio di quella della popolazione asmatica, inoltre si sono effettuati i calcoli necessari per selezionare un samples size che permettesse una potenza sufficiente a rivelare una differenza significativa, ove presente, sui principali biomarkers d’interesse.

L’analisi statistica è stata condotta utilizzando il programma SPSS (“Statistical Package for Social Science, Chicago, IL, USA) per Windows, versione 29.0.

L’adeguatezza della dimensione campionaria è stata valutata con il test Kaiser-Meyer-Olkin (KMO) e test della sfericità di Bartlett, applicato distintamente alle due popolazioni.

Le differenze tra i gruppi sono state valutate con test parametrici, vista la dimensione campionaria le differenze tra i gruppi sono state valutate con test parametrici ed in particolare applicando il T di student.

Per la valutazione delle differenze al netto dei fattori confondenti si è applicato un modello lineare generalizzato (GLM), su ogni analita, prima sui dati senza nessuna trasformazione poi lo stesso test è stato applicato applicando il test sui dati trasformati, normalizzati, con la trasformazione di Blom (Blom, 1959)<sup>68</sup>.

Vista la potenza statistica adeguata si è quindi proceduto con l'analisi delle componenti principali (PCA) sui dati normalizzati e poi si è lavorato sui fattori; l'analisi dei fattori e la costruzione dei plot è stata fatta con i dati elaborati con SPSS, ma su software Excel versione 16.9 del 2024.

Le correlazioni sono state indagate attraverso la rho di Spearman, applicando i test non parametrici.

Per tutti i test, i risultati sono considerati statisticamente significativi per  $p < 0,05$ .

Le concentrazioni dei vari analiti quantificati si riportano come valore medio ed il rispettivo errore standard e sono espresse divise per la concentrazione della creatinina, vista la numerosità di soggetti, mentre i risultati del GLM si riportano con valore medio accompagnato dal limite inferiore e superiore dell'intervallo di confidenza al 95% percentile.

## 4 Risultati e discussione

I risultati dello studio verranno trattati sulle due popolazioni, con la stessa modalità si analizzeranno inizialmente i dati della popolazione adulta e successivamente la popolazione pediatrica per poi passare alla valutazione dei fattori confondenti ed il loro peso sui biomarkers in esame, con focus sul fumo attivo e passivo; a conclusione si valuteranno gli effetti dei polimorfismi.

Lo schema applicato sarà il seguente:

- Valutazione delle differenze, in termini di valore assoluto, tra soggetti sani ed asmatici tramite T test per campioni indipendenti.
- Applicazione del modello lineare generalizzato (GLM) per valutare le differenze al netto dei fattori confondenti, anche tramite la trasformazione dei dati secondo Blom.
- Analisi delle componenti principali (PCA) per valutare la distribuzione dei fattori, il peso delle varianze e confermare la differenza tra le popolazioni.
- Analisi delle correlazioni tra vari analiti quantificati in matrice urinaria.
  
- Valutazione del peso dei fattori confondenti:
  - Età
    - BMI
    - Fumo:
      - Valutazione del peso reale
      - Valutazione della sua azione sui markers specifici
  
- Studio dell'effetto dei polimorfismi sui due sottogruppi quantificati nel brush buccale sul profilo di escrezione degli indicatori di esposizione e di effetto, stratificando anche per abitudine al fumo.

## 4.1 Soggetti adulti (AS vs AA)

In questa sezione ci si sofferma sulla sola popolazione adulta e si valutano i risultati ottenuti stratificando per patologia.

### 4.1.1 T di student per dati indipendenti

In tabella si riportano, per ogni biomarkers urinario, il valore medio con il suo errore standard stratificando la popolazione in base allo stato di salute (sano e asmatico); le concentrazioni sono riportate in ug/g di creatinina.

Biomarkers	AS	AA	p-value
HMGB-1	2150 ± 335	4294 ± 700	0,007
Gua	165 ± 11	235 ± 24,2	0,010
8oxoGua	11,2 ± 1,01	15,3 ± 2,93	NS
Guo	113 ± 8,54	185 ± 31,9	0,031
8oxoGuo	4,69 ± 0,30	6,38 ± 0,69	0,025
dGuo	3,95 ± 0,31	6,37 ± 1,54	NS
8oxodGuo	2,53 ± 0,19	2,90 ± 0,42	NS
Cot	105 ± 23,9	151 ± 51,8	NS
Cyto	288 ± 17,85	316 ± 35,0	NS
5MeCyto	26,8 ± 2,05	26,9 ± 2,30	NS
Cyt	239 ± 19,7	471 ± 69,7	0,002
5MeCyt	7,92 ± 0,85	12,5 ± 2,25	0,020
dCyt	4,52 ± 1,33	4,68 ± 0,48	NS
5MedCyt	5,18 ± 0,54	6,59 ± 1,20	NS
7MeGua	7933 ± 1425	6024 ± 784	NS

1MeGua	211 ± 23,9	221 ± 38,0	NS
9MeGua	2679 ± 1276	283 ± 107	<0,001
7MeGuo	54,9 ± 6,60	37,3 ± 7,58	NS
5oxoMeCyt	44,60 ± 3,07	44,82 ± 5,32	NS
5oxoMedCyt	5,06 ± 0,41	5,75 ± 0,89	NS
SPMA	1,31 ± 0,17	1,87 ± 0,28	NS
SBMA	187 ± 82	521 ± 242	NS
DHBMA	213 ± 15,8	124 ± 14,4	<0,001
DHPMA	669 ± 30,1	731 ± 59,5	NS
t,t-MA	141 ± 19,8	78,1 ± 13,8	0,008
NOH_tot	41,7 ± 3,71	118 ± 43,5	NS
MA	1404 ± 487	9058 ± 5417	NS
PGA	1626 ± 331	6540 ± 2336	0,04
VPOH_tot	157 ± 12,7	217 ± 25,4	0,035
MTBE	0,56 ± 0,06	1,27 ± 0,37	NS
Benzene	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	NS
Toluene	0,97 ± 0,09	0,73 ± 0,10	NS
Etilbenzene	1,40 ± 0,50	2,14 ± 1,24	NS
Stirene	0,77 ± 0,08	1,25 ± 0,22	NS

Tabella 22 descrittiva concentrazioni adulti espresse in **ug/g creatinina**; ; Indicatori di effetto o di infiammazione: HMGB-1, DA COMPLETARE LA LEGENDA Basi OX Legenda: 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; Gua: Guanina; 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina; Guo: Guanosina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina; dGuo: 2'-deossiGuanosina; 8-oxodGuo: 8-idrossi-2'-deossiguanosina; dGuo: 2'-deossiGuanosina; Ado: Adenosina; dAdo: 2'-deossiAdenosina; Cyt: Citosina; 5-MeCyt: 5-Metil-Citosina; MeCyt: Citosina; Cyt: Citidina; 5-MeCyt: 5-Metil-Citidina; Cyt: Citidina; dCyt: 2'-deossiCitidina; 5-MedCyt: 5-Metil-2'-deossi-Citidina; dCyt: 2'-deossiCitidina; 1-MeGua: 1-Metil-Guanina; 7-MeGua: 7-Metil-Guanina; 1-MeGua: 1-Metil-Guanina; 9-MeGua: 9-Metil-Guanina; 7-MeGuo: 7-

*Metil-Guanosina; 5-oxoMeCyt: 5-Idrossi-Metil-Citosina; 5-oxoMedCyt: 5-Idrossi-Metil-2'-deossi-Citidina; 5-oxoMeCyt: 5-Idrossi-Metil-Citosina; Indicatori di esposizione: cot, cotinina; Metaboliti Legenda: S-PMA, acido S-fenilmercapturico; SBMA, Acido benzilmercapturico; DHBMA, acido 1,2-diidrossibutilmercapturico; DHPMA, acido 2,3 diidropropil mercapturico; t,t-AMMA, acido trans,trans-muconico; NOH\_tot, naftoli totali; MAAM, acido Mandelico; PGA, Acido fenilgliossilico; DHBMA, acido 1,2-diidrossibutilmercapturico; DHPMA, acido 2,3 diidropropil mercapturico; NOH\_tot, naftoli totali; VPOH\_tot, fenilnaftolivinilfenolintotali; MTBE: metil-terzbutiletere.*

In tabella 22 si riportano, per ogni biomarkers quantificato in urina, il valore medio con il suo errore standard stratificando la popolazione in base allo stato di salute (sano e asmatico); i valori medi sono tutti espressi in ug/g di creatinina.

Le concentrazioni urinarie delle forme ossidate, metilate e native della guanina e della citosina escrete in forma libera nelle urine sono tendenzialmente maggiori nei soggetti asmatici rispetto ai soggetti sani, come si può in tabella 22 andando a confrontare il valore medio dei singoli composti nelle due popolazioni. Tali differenze, inoltre, risultano statisticamente significative per Gua ( $p=0,010$ ), Guo ( $p=0,031$ ), 8oxoGuo ( $p=0,025$ ), Cyt ( $p=0,002$ ) e 5MeCyt ( $p=0,020$ ). Anche le concentrazioni di HMGB-1, indicatore di infiammazione, sono significativamente superiori nei soggetti asmatici rispetto a quelli sani ( $p=0,07$ ). A differenza degli inquinanti escreti tal quali per cui non si osservano differenze significative nelle concentrazioni stratificando per stato di salute, andamenti differenti si osservano per quanto riguarda i metaboliti degli inquinanti ambientali. Infatti per DHBMA, metabolita dell'1,3-butadiene, e per t,t-MA, metabolita del benzene, si osserva che i soggetti adulti sani eliminano concentrazioni significativamente superiori di quelle dei soggetti adulti asmatici, rispettivamente  $p<0,001$  e  $p=0,008$  per DHBMA e t,t-MA mentre una tendenza ad eliminare concentrazioni maggiori da parte dei soggetti adulti asmatici e rispetto a quelli sani si osservano per tutti gli altri metaboliti (dati riportati in tabella 22). Questa tendenza diventa statisticamente significativa per PGA ( $p=0,04$ ) e VP-OH tot ( $p=0,035$ ), entrambi metaboliti dello stirene.

Per ogni analita dopo aver ottenuto il valore in ug/L si è provveduto a dividerlo per il valore di creatinina, in g/L, del soggetto.

L'espressione della concentrazione degli analiti in funzione della creatinina è un questo passaggio è essenziale nel caso in cui il campione di urina sia un campione estemporaneo e non come il nostro dove l'urina raccolta è un urina spot e non l'urina delle 24H; andare ad esprimere i dati per creatinina permette di eliminare la variabilità individuale legata al

funzionamento dei reni, allo stato di idratazione del soggetto, alla sua massa corporea, all'attività fisica svolta ed al tempo di campionamento.

In tabella 22 è da sottolineare la significatività del HMGB-1 biomarker di infiammazione che è significativamente più alto nella popolazione asmatica, questo andamento conferma l'assunzione iniziale, in cui si riteneva il soggetto asmatico, un soggetto che conviveva con uno stato d'infiammatorio cronico, inoltre dimostra come la quantificazione di questo in urina, matrice accessibile, sia attendibile quanto la quantificazione in siero; la quantificazione in urina del HMGB-1 è stata rivalutata solo recentemente ed ancora in esame ed il nostro dato può essere utile ad incentivare l'uso di questa matrice (Nakamura et al, 2023)<sup>71</sup>.

Sono da sottolineare anche le significatività a carico delle basi del DNA (Gua e Cyt) in quanto bersaglio dell'azione dei Ros indotti sia dall'esposizione ad inquinanti sia dallo stato infiammatorio, in letteratura è documentata un'azione degli inquinanti sul DNA, in particolare da parte degli IPA con poi un coinvolgimento delle PM10 che stimolano l'attivazione della cascata infiammatoria (Traina et al, 2020; Bowatte et al, 2017)<sup>1,72</sup>, motivo per cui questa correlazione può essere associata all'effetto sinergico di tutti questi fattori dove l'inquinamento sia contiene IPA che attaccano direttamente il DNA sia contiene sostanze che stimolano l'infiammazione e nel caso degli asmatici agiscono in modo sinergico alla patologia aumentandone così i livelli; l'azione sinergica è alimentata dall'infiammazione cronica presente in questi soggetti e dalla diversa permeabilità di loro tessuto polmonare.

Questa significatività si viene a perdere sulla forma ossidata dalla guanina (8oxoGua) in quanto molto probabilmente eccesso di infiammazione va a compromettere i sistemi di riparo, ricordo infatti che quantificare questi markers in urina rappresenta il danno subito e riparato dall'organismo; mentre le per la forma metilata della citosina (5MeCyt) questa significatività rimane, differenza è imputabile al fatto che il riparo del danno metilativo segue vie metaboliche differenti (Bengalli et al, 2019)<sup>73</sup>.

Le significatività a livello dei metaboliti meritano di essere analizzate con modelli più complessi in quanto tramite l'inquinamento la popolazione non è esposta alle varie sostanze in modo indipendente, ma ad una miscela di essere; è opportuno quindi valutarle al netto dei fattori confondenti.

#### 4.1.2 Modello lineare generalizzato - GLM

È però importante sottolineare che i biomarkers quantificati potrebbero essere affetti da bias quindi per valutare le differenze reali tra le due popolazioni si è impostato un modello lineare generalizzato (GLM) inserendo come fattori i parametri che potevano operare come confondenti.

Nello specifico per la popolazione adulta sono stati considerati come fattori confondenti, e quindi inseriti all'interno del modello, sesso, abitudine al fumo, età e BMI.

L'analisi è stata fatta applicando GLM configurata per i confondenti selezionati ed il test è stato ripetuto per ogni singolo biomarker; in tabella si riportano per ogni analita il valore medio con il valore minimo e massimo dell'intervallo di confidenza rispettivamente per il sottogruppo dei sani e degli asmatici.

In tabella 24 si riportano i valori medi per ogni sottogruppo ed il p-value per rilevare la differenza tra sano ed asmatico su ogni biomarker considerati i fattori confondenti come sesso, età, BMI e abitudine al fumo, valutando così se le differenze visti sui valori assoluti permangono, la netto dei fattori confondenti, o sono dovute a questi.

Biomarkers	AS	AA	p-value
HMGB-1	1947 [985-2909]	4010 [2725-5295]	0,004
Gua	148 [108-186]	292 [239-344]	<0,001
8oxoGua	12,2 [8,51-15,9]	15,4 [10,5-20,4]	NS
Guo	105 [68,1-142]	215 [165-264]	<0,001
8oxoGuo	4,78 [3,81-5,75]	5,76 [4,46-7,05]	NS
dGuo	3,13 [1,50-4,77]	6,75 [4,56-8,93]	0,003
8oxodGuo	2,43 [1,70-3,17]	2,99 [2,01-3,97]	NS
Cot	291 [232-350]	357 [279-435]	NS
Cyto	325 [254-397]	373 [278-469]	NS
5MeCyto	23,8 [18,7-28,9]	28,1 [21,3-34,9]	NS

Cyt	210 [129-291]	515 [406-623]	<0,001
5MeCyt	6,60 [3,83-9,36]	13,9 [10,2-17,6]	<0,001
dCyt	3,40 [0,64-6,16]	5,18 [1,50-8,87]	NS
5MedCyt	4,54 [2,96-6,13]	7,29 [5,18-9,40]	0,02
7MeGua	6656 [3676-9636]	7226 [3246-11205]	NS
1MeGua	185 [122-249]	248 [163-333]	NS
9MeGua	1959 [628-4546]	1991 [647-3263]	NS
7MeGuo	44,4 [27,3-61,4]	49,6 [26,8-72,4]	NS
5oxoMeCyto	44,8 [35,2-54,54]	48,9 [35,9-61,9]	NS
5oxoMedCyt	4,70 [3,06-6,34]	8,39 [6,20-10,6]	0,003
SPMA	1,80 [0,88-2,72]	3,86 [2,63-5,09]	0,003
SBMA	8201 [34710-18306]	27567 [7830-62964]	0,07
DHBMA	250 [205-295]	147 [87,0-207]	0,002
DHPMA	654 [519-789]	908 [727-1088]	0,01
t,t-MA	158 [111-205]	87,5 [24,1-151]	0,05
NOH_tot	43,3 [1,69-88,4]	126 [66,1-186]	0,01
MA	991 [622-6605]	11355 [3858-18851]	0,01
PGA	1192 [1125-3510]	6675 [3580-9770]	0,002
VPOH_tot	154 [41,7-263]	363 [216-511]	0,01
MTBE	0,50 [0,18-1,18]	1,42 [0,51-2,32]	0,07
Benzene	0,06 [0,04-0,08]	0,07 [0,04-0,10]	NS
Toluene	0,86 [0,57-1,15]	0,79 [0,40-1,18]	NS
Etilbenzene	1,18 [0,76-3,13]	2,67 [0,08-5,26]	NS

Stirene	1,76 [0,12-3,39]	3,73 [1,54-5,92]	NS
---------	------------------	------------------	----

Tabella 23 differenze tra Sani e Asmatici corrette per fattori confondenti; Indicatori di effetto o di infiammazione: HMGB-1, Basi OX Legenda: 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; Gua: Guanina; 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; Guo: Guanosina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; dGuo: 2'-deossiGuanosina; 8-oxodGuo: 8-idrossi-2'-deossiguanosina; dGuo: 2'-deossiGuanosina; Ado: Adenosina; dAdo: 2'-deossiAdenosina; Cyt: Citosina; 5-MeCyt: 5-Metil-Citosina; MeCyt: Citosina; Cyt: Citidina; 5-MeCyt: 5-Metil-Citidina; Cyt: Citidina; dCyt: 2'-deossiCitidina; 5-MedCyt: 5-Metil-2'-deossi-Citidina; dCyt: 2'-deossiCitidina; 1-MeGua: 1-Metil-Guanina; 7-MeGua: 7-Metil-Guanina; 1-MeGua: 1-Metil-Guanina; 9-MeGua: 9-Metil-Guanina; 7-MeGuo: 7-Metil-Guanosina; 5-oxoMeCyt: 5-Idrossi-Metil-Citosina; 5-oxoMedCyt: 5-Idrossi-Metil-2'-deossi-Citidina; 5-oxoMeCyt: 5-Idrossi-Metil-Citosina; Indicatori di esposizione: cot, cotinina; Metaboliti Legenda: S-PMA, acido S-fenilmercapturico; SBMA, Acido benzilmercapturico; DHBMA, acido 1,2-diidrossibutilmercapturico; DHPMA, acido 2,3 diidropropil mercapturico; t,t-AMMA, acido trans,trans-muconico; NOH\_tot, naftoli totali; MAAM, acido Mandelico; PGA, Acido fenilgliosilico; DHBMA, acido 1,2-diidrossibutilmercapturico; DHPMA, acido 2,3 diidropropil mercapturico; NOH\_tot, naftoli totali; VPOH\_tot, fenilnaftolivinilfenolintotali; MTBE: metil-terzbutiletere.

La cotinina, metabolita della nicotina, in entrambi i sottogruppi non è significativamente diversa rendendo così le due popolazioni confrontabili in termini di abitudine al fumo ed eliminando il bias legato al fumo di sigaretta ed i suoi effetti; questo dato conferma l'andamento visto studiando le risposte al questionario.

Attualmente, la base modificata maggiormente studiata è la 8-idrossiguanina (8oxoGua) ed il suo corrispondente nucleoside ossidato, la 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8oxodGuo). Questa attenzione è dovuta al fatto che la guanina è la base del DNA che presenta il potenziale di ossidazione più basso ed è quindi la più suscettibile agli attacchi degli agenti ossidanti e in particolare dei ROS; l'8oxodGuo ha evidenziato un potenziale mutageno che si esplica in vari modi, tra cui errori o perdita di specificità di accoppiamento fra le basi, trasversioni quali GC→AT, errori di lettura sulle basi adiacenti.

La 8oxodGuo escreta in urina ha origine nel DNA ossidato, si ipotizza ci sia una relazione diretta tra stress ossidativo cellulare ed escrezione in urina, motivo per cui l'8oxodGuo è stata utilizzata come potenziale biomarcatore in moltissimi studi di esposizione ambientale e occupazionale ed anche in questo studio le sue differenze sono indagate per studiare il potenziale ossidativo degli inquinanti e della patologia asmatica.

L'applicazione del GLM eliminando i fattori confondenti è essenziale per valutare i reali effetti dell'inquinamento sulle diverse popolazioni in quanto i meccanismi di riparazione del DNA ed RNA sono generalmente regolati da enzimi, originando una variabilità inter-individuale legata alla presenza di forme polimorfiche degli enzimi stessi, ma soprattutto l'escrezione

giornaliera è essere influenzata da diverse variabili e fattori di confondimento come il fumo attivo o passivo e lo stato di salute.

Nella popolazione adulta asmatica si evidenzia una escrezione di basi non modificate, Gua/Guo/dGuo significativamente maggiore rispetto alla popolazione adulta sana; tale andamento non si osserva per le rispettive forme ossidate, 8oxoGua/8oxoGuo/8oxodGuo (vedi tabella 23), dove effettivamente si perde la significatività. La quantificazione in urina delle basi ossidate rappresenta il danno ossidativo subito dagli acidi nucleici e riparato, motivo per cui una differenza non significativa nelle concentrazioni delle forme ossidate escrete in forma libera nelle urine dei soggetti sani e nei soggetti asmatici potrebbe rappresentare sia che le due popolazioni subiscono lo stesso danno e hanno la stessa capacità di riparo o che nei soggetti asmatici c'è una minor o ridotta capacità di riparo.

L'elevata concentrazione urinaria delle forme non modificate di Gua/Guo e dGuo nei soggetti asmatici potrebbe essere la conseguenza di un aumento del turnover cellulare a carico sia del DNA che del RNA, indice di una ridotta capacità di riparo del danno ossidativo. Tale andamento necessita di ulteriori studi per poter essere interpretato correttamente.

L'andamento da noi rilevato va a conferma dei dati presente in letteratura dove questo stesso andamento è visto nei biomarkers di stress ossidativo a carico dei lipidi (Ammar et al, 2021; Rahman et al 2002)<sup>74,75</sup>.

Analizzando i processi metilativi si può notare come non ci siano differenze a anche per quanto riguarda la Citidina, la deossicitidina e le forme metilate tra i soggetti adulti sani e quelli asmatici. In particolare i soggetti asmatici eliminano concentrazioni significativamente superiori di Cyt ( $p < 0,0001$ ), 5MeCyt ( $p < 0,001$ ), 5MedCyt ( $p = 0,02$ ), e 5oxoMedCyt ( $p = 0,003$ ). carico del danno al DNA, ma si nota un danno maggiore a carico del RNA che risulta più suscettibile soprattutto a carico della citidina (Cyt) che è significativamente sia nella sua forma nativa (Cyt) che nella forma metilata (5MeCyt) che nella sua forma ossidata e metilata (5oxoMeCyt) con valori di p-value  $< 0,001$  per le prime due e 0,003 per la forma ossidata; andamento che permane anche guardando la sua legata allo zucchero dove la significatività è presente nella forma metilata.

Non è invece significativo il danno metilativo, metilazione a carico della guanina e della guanosina, in nessuna delle due popolazioni analizzate, ma anche in questo caso si osserva presente una leggera tendenza ad eliminare prodotti metilati nei a favore dell'aumento di

danno metilativo nei soggetti asmatici, tendenza che è supportata da studi di letteratura inerenti a test in vitro sul tessuto bronchiale (Clifford et al., 2017)<sup>76</sup>.

Andando a considerare gli indicatori di esposizione a inquinanti ambientali è interessante osservare che, al netto dei fattori di confondimento, le concentrazioni urinarie di tutti i metaboliti degli inquinanti analizzati sono significativamente più elevate nei soggetti asmatici rispetto ai soggetti sani. Quanto osservato potrebbe essere spiegato considerando che la Un dato molto interessante da sottolineare è la differenza significativa su tutti i metaboliti degli inquinanti ambientali presente nella popolazione adulta; questo dato è legato al fatto che la parete polmonare degli dei soggetti asmatici è più permeabile di quella dei soggetti sani. Questo aspetto favorisce il passaggio degli inquinanti dal polmone al circolo sanguigno, porta a una maggior produzione e successiva eliminazione di metaboliti nonostante i soggetti asmatici e i soggetti sani siano esposti alla stessa quantità di inquinanti ambientali

#### *4.1.2.1 Trasformazione di Blom's*

Al fine di studiare la distribuzione relativa dei dati e la persistenza delle differenze anche normalizzando i dati e rapportandoli in termini di Z score si è applicata la formula di Blom's ed una volta ottenuti i dati normalizzati si è applicata la GLM settata come in precedenza tenendo conto dei fattori che potrebbero fungere da confondenti.

Prima però di applicare questo test sui dati trasformati si è verificato che la distribuzione risultate fosse normale per ciascun composto analizzato.

Di seguito si riporta a titolo esemplificativo il grafico della Gua dove è possibile notare come i dati si adattano perfettamente alla distribuzione Gaussiana (Figura 32 adulti).

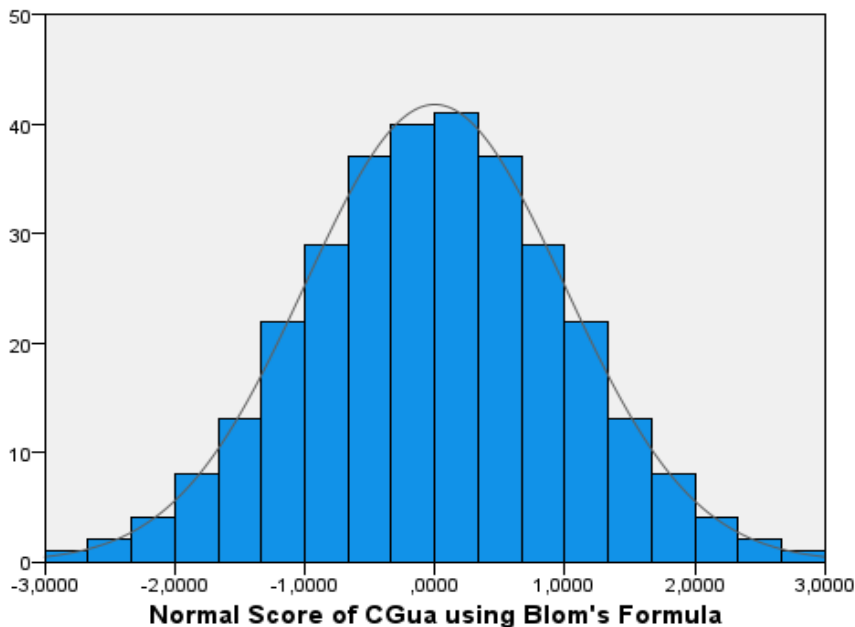


Figura 27 distribuzione normale dopo normalizzazione di Blom's Adulti.

I dati ottenuti dalla GLM sui valori Normal score di ogni analita sono poi stati utilizzati per costruire lo score plot centrato sullo zero, dove e possibile vedere come per ogni analita la distanza tra le barre delle due sottopopolazioni sia proporzionale alla significatività.

Si riporta in figura il Bplot risultate dei soggetti adulti (Figura 29).

Dal Bplot seguenti possiamo vedere come anche a seguito della normalizzazione per Blom si le differenze permangono significative a conferma del fatto che l'andamento è legato alla patologia asmatica e non ai vari fattori confondenti.

In figura 33 si riporta il Bplot risultante dall'analisi delle concentrazioni degli analiti d'interesse quantificate dei soggetti adulti e stratificati per stato di salute (Figura 28).

Dal Bplot si evince che, anche a seguito della normalizzazione per Blom, le differenze permangono significative per i vari analiti. Questo risultato conferma che tali differenze nelle concentrazioni urinarie degli indicatori di esposizione e di effetto sono legate alla patologia asmatica e non ai vari fattori confondenti.

Dal Bplot si può anche valutare l'andamento globale dei biomarkers in relazione tra di loro visto che la trasformazione li centra tutti sullo z score e quindi diventano confrontabili fra loro.

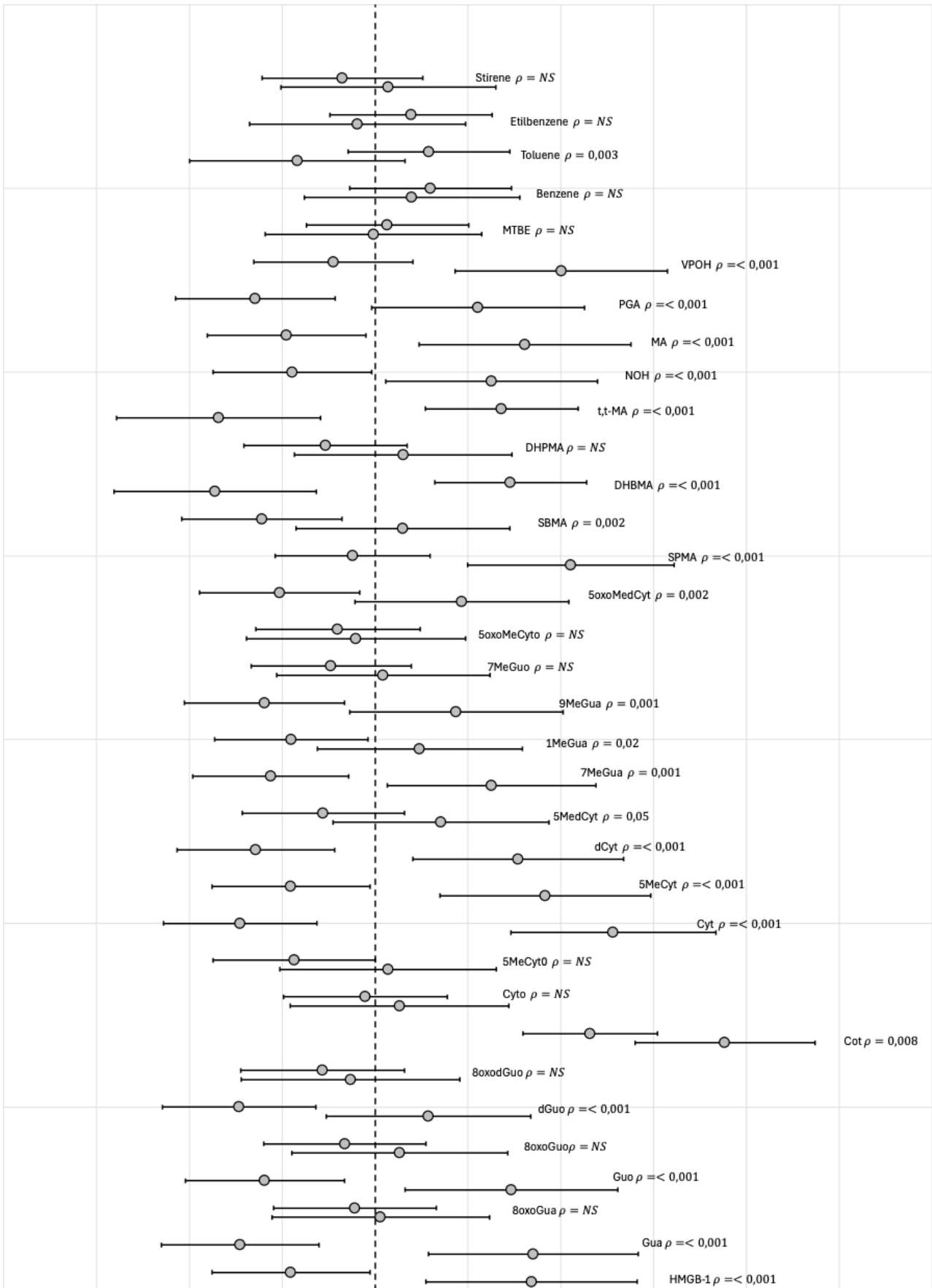


Figura 28 Bplot adulti

Il Bplot, in figura 28 mostra non solo la significatività, in termini di differenza tra sano e asmatico, ma anche l'andamento relativo tra le variabili essendo queste tutte rapportate allo Z score ed è interessante notare come la basi del DNA ed RNA, nella loro forma nativa (Gua, Guo, dGuo, Cyt e dCyt) ove sono significative, nei soggetti asmatici si spostano dallo zero tutte in modo analogo, stessa cosa succede nelle forme metilate seppur con una significatività e quindi uno scostamento minore che, rappresenta un differenza minore, rispetto alle forme ossidate, di escrezione tra sani ed asmatici; differenza spiegata dal fatto che l'ossidazione è alimentata dallo stato infiammatorio mentre la metilazione non è direttamente collegata ad esso.

Per quanto riguarda i metaboliti, è interessante come anche nel loro caso, ove c'è la significatività lo scostamento è confrontabile.

#### *4.1.2.2 Analisi dei residui*

Oltre all'analisi dei dati in termini di valore medio e di differenze dopo aver applicato la GLM su dati trasformati è importante controllare anche la distribuzione dei residui.

Quando si realizza un modello di questo tipo, una delle prime cose da fare è l'analisi dei residui, poiché, la retta di regressione è una semplificazione della realtà e non coglie tutta la variabilità presente in un insieme di dati; il residuo rappresenta proprio la parte di variabilità che non è spiegata dal modello.

Affinché il modello di regressione riesca ad avere un buon potere predittivo, questo errore deve essere una variazione imprevedibile nella variabile risposta, per questo i valori residui rappresentano proprio la parte di errore di previsione del modello e devono avere un andamento normale.

I residui, detti anche scarti, rappresentano infatti le differenze tra i valori osservati nel dataset e i valori stimati calcolati con l'equazione di regressione, indicano la variabilità dei dati attorno alla retta di regressione.

La normalità della distribuzione dei residui conferma il potere predittivo del nostro modello e quindi l'affidabilità dei risultati ottenuti.

Si riporta di seguito a titolo esemplificativo l'andamento del residuo grezzo del HMGB-1, a titolo di esempio, dove si vede la distribuzione normale (Figura 30).

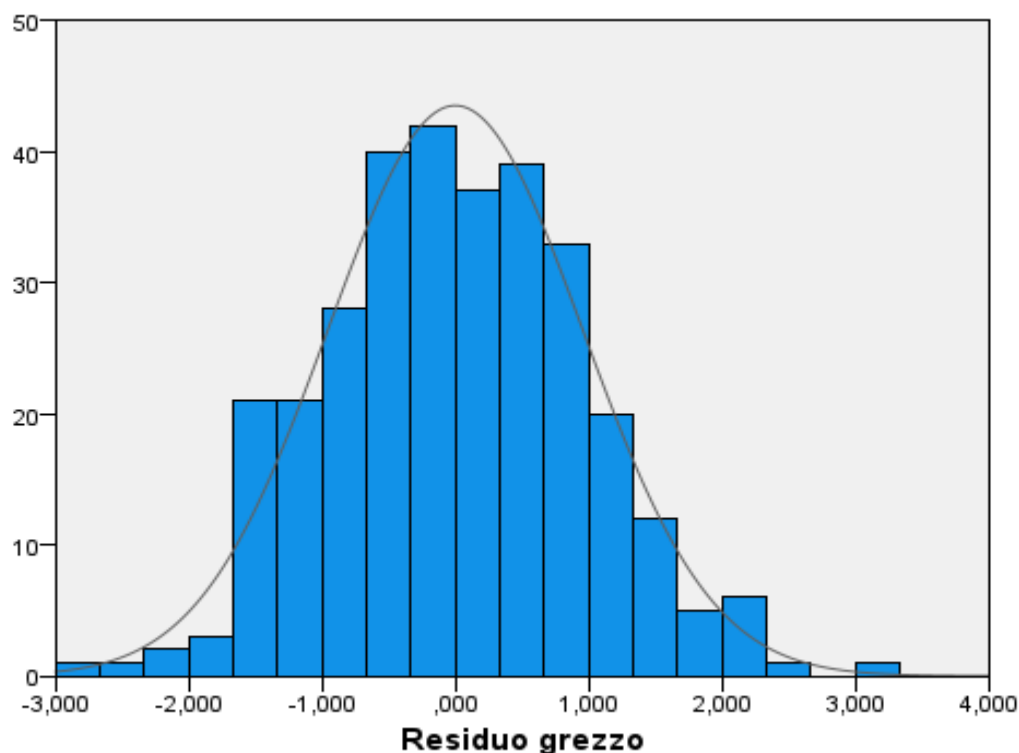


Figura 29 distribuzione normale dei residui

#### 4.1.3 Analisi delle componenti principali PCA

Visto che il valore ottenuto dal test KMO ha un valore numerico superiore/uguale a 0,8 si può procedere con l'analisi delle componenti principali (PCA) per gli adulti ed i valori risultanti sono riportati nella statistica descrittiva. Tale analisi statistica; PCA che è utile per fornire informazioni aggiuntive sulle correlazioni tra le variabili, massimizzando la varianza ed aiutando ad assegnare il peso corretto ad ognuna di esse (Ricci et al 2019)<sup>77</sup>.

L'analisi delle componenti principali permette di sintetizzare l'informazione fornita dalle variabili in pochi fattori esplicativi, minimizzando il più possibile la perdita di informazione e la ridondanza delle stesse.

Il primo step della PCA è quello di massimizzare la varianza di tali componenti, calcolando appropriatamente i pesi da attribuire alle variabili di partenza, per ridurre le colonne del dataset di partenza.

Al fine di massimizzare la varianza prima di procedere con la PCA degli adulti si è calcolata e valutata la matrice di varianza e covarianza dalla quale si evince che i fattori significativi, con un valore di  $r$  compreso tra  $-0,3$  e  $0,3$ , sono le prime 7, ma si è scelto di lavorare solo sulle prime tre visto che il primo fattore è responsabile del 40% della varianza, in figura 30 si riporta lo Scree plot risultante.

Avendo un valore di varianza spiegata tra 50% e il 70% si valuta l'analisi delle componenti principali nel suo complesso e solo come andamento.



Figura 30 Scree plot per PCA adulti

Per fare ciò dalla matrice delle componenti ruotate, riportata in tabella 24 si estrapolano i primi tre fattori e si lavora sui rapporti tra questi al fine di costruire i plot.

Nei plot seguenti sono rappresentati in blu i soggetti asmatici ed in arancione i sani, si rappresenta con un punto di dimensioni maggiori il valore medio della popolazione.

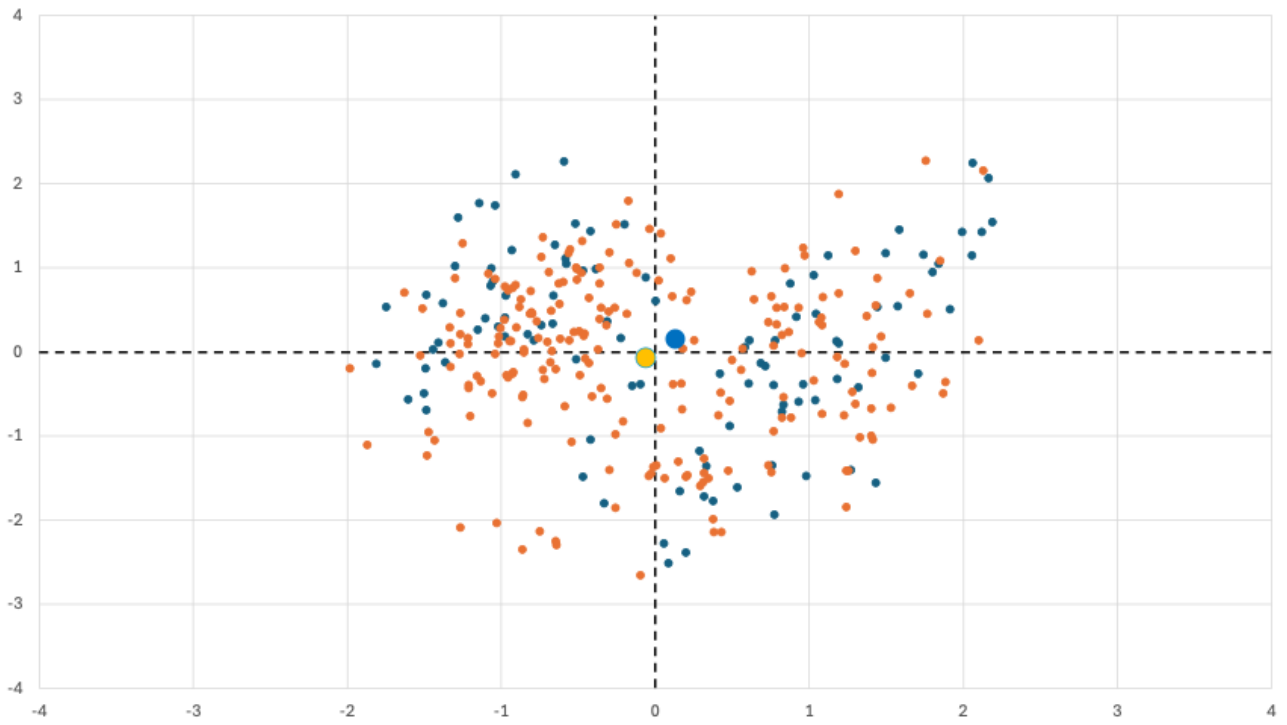


Figura 31 Plot PCA rapporto dei fattori 1 e 2, in blu i soggetti asmatici e in arancio i soggetti sani

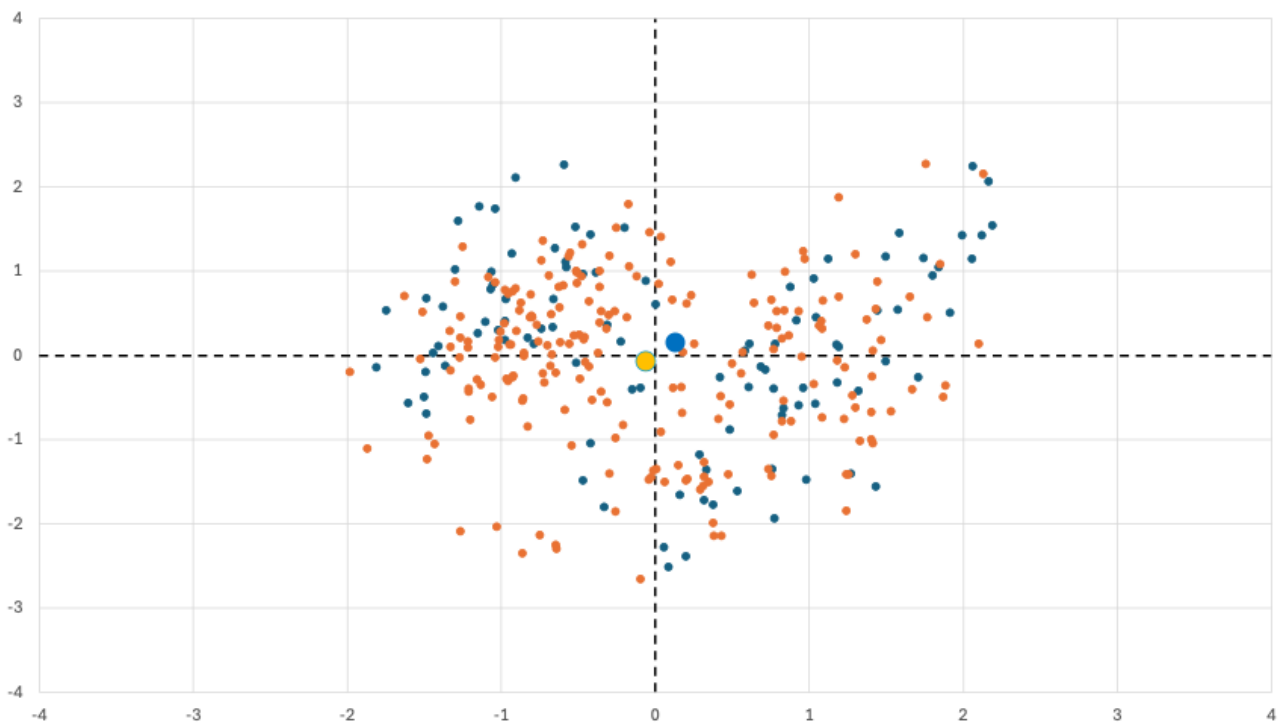


Figura 32 Plot PCA rapporto dei fattori 1 e 3, in blu i soggetti asmatici e in arancio i soggetti sani

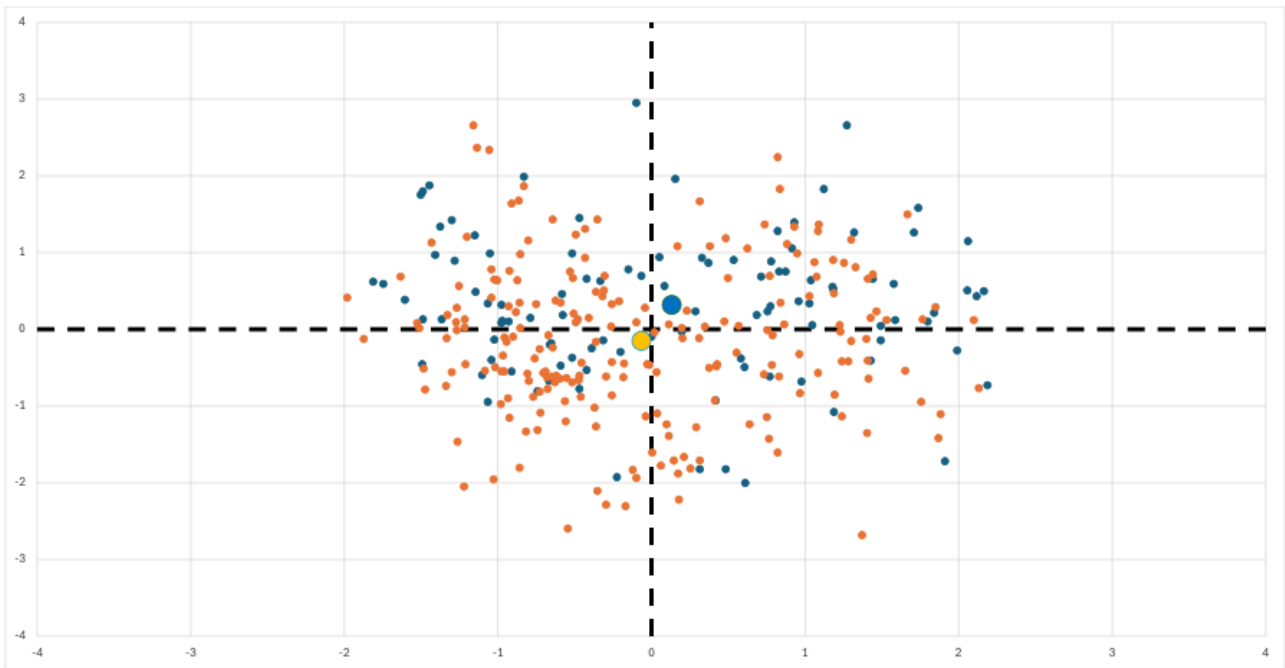


Figura 33 Plot PCA rapporto dei fattori 2 e 3, in blu i soggetti asmatici e in arancio i soggetti sani

Dall'analisi delle componenti principali si conferma la differenza tra le popolazioni (AS e AA ripetitivamente in arancio e blu) che permane su tutti e tre i fattori con un andamento coerente, confermando così che non esiste una netta distinzione tra i due gruppi, ma che sono comunque presenti delle differenze che si confermano a più livelli.

Di seguito si riporta anche la tabella delle componenti ruotate utilizzata per costruire i plot dove si può vedere che le prime 3 componenti sono quelle più significative e con maggior potere esplicativo, inoltre, mostra come biomarkers associati tra di loro si collocano sullo stesso fattore, confermando così il loro coinvolgimento nello stesso processo metabolico e l'interazione della patologia i processi coinvolti sia nella metabolizzazione degli inquinanti, sia nei processi infiammatori e sia anche nello stress ossidativo.

Matrici dei Componenti ruotati							
	Componente						
	1	2	3	4	5	6	7
Normal Score of HMGB1 using Blom's Formula	0,035	0,030	0,081	0,114	0,091	-0,120	0,789
Normal Score of Gua using Blom's Formula	0,412	0,323	0,290	0,104	0,136	-0,036	0,597
Normal Score of 8oxoGua using Blom's Formula	-0,136	0,310	-0,141	0,238	0,553	0,031	0,325
Normal Score of Guo using Blom's Formula	0,503	0,109	0,481	-0,097	0,258	0,131	0,176
Normal Score of 8oxoGuo using Blom's Formula	-0,082	0,165	0,354	0,169	0,730	0,159	0,089
Normal Score of dGuo using Blom's Formula	0,504	0,081	0,281	-0,046	0,470	0,059	0,215
Normal Score of 8oxodGuo using Blom's Formula	0,132	-0,053	0,191	0,130	0,791	0,115	0,020
Normal Score Cof ot using Blom's Formula	-0,093	0,402	0,104	0,397	-0,059	0,294	0,202
Normal Score of Cyto using Blom's Formula	0,148	0,680	-0,029	0,095	0,446	0,180	-0,027
Normal Score of 5MeCyto using Blom's Formula	0,435	0,310	0,121	0,127	0,570	0,262	0,025
Normal Score of Cyt using Blom's Formula	0,308	-0,023	0,647	0,155	0,502	-0,044	0,034
Normal Score of 5MeCyt using Blom's Formula	0,147	0,137	0,873	0,039	0,058	0,125	0,031
Normal Score of dCyt using Blom's Formula	0,327	0,159	0,697	-0,019	0,240	0,075	0,106
Normal Score of 5Medyt using Blom's Formula	0,089	0,221	0,793	0,048	0,049	0,099	0,074
Normal Score of 7MeGua using Blom's Formula	0,693	0,115	0,140	0,051	0,152	0,262	0,418
Normal Score of 1MeGua using Blom's Formula	0,606	0,206	0,049	0,005	0,096	0,235	0,568
Normal Score of 9MeGua using Blom's Formula	0,699	0,293	0,083	-0,028	-0,175	-0,013	0,055
Normal Score of 7MeGuo using Blom's Formula	0,746	-0,048	0,230	-0,122	0,114	0,214	-0,036
Normal Score of 5oxoMeCyto using Blom's Formula	-0,129	0,809	0,107	0,157	0,030	-0,011	0,141
Normal Score of 5oxoMedCyt using Blom's Formula	0,692	0,212	0,474	-0,068	0,155	0,159	0,034
Normal Score of SPMA using Blom's Formula	0,384	0,710	0,117	0,159	0,070	-0,005	0,005
Normal Score of SBMA using Blom's Formula	0,608	0,516	0,249	-0,067	-0,174	-0,077	0,071
Normal Score of DHBMA using Blom's Formula	0,079	0,111	0,200	0,003	0,096	0,894	0,022
Normal Score of DHPMA using Blom's Formula	0,135	0,453	0,429	0,023	0,369	0,003	0,093
Normal Score of t,t-MA using Blom's Formula	0,211	-0,124	0,045	-0,010	0,215	0,854	-0,115
Normal Score of NOH_tot using Blom's Formula	0,235	0,694	0,286	-0,007	0,080	-0,083	0,083
Normal Score of MA using Blom's Formula	0,623	0,112	0,181	0,044	0,345	0,062	0,033
Normal Score of PGA using Blom's Formula	0,428	0,340	0,267	0,139	0,337	-0,116	0,046
Normal Score of VPOH_tot using Blom's Formula	0,481	0,490	0,271	0,058	0,151	0,088	0,130
Normal Score of MTBE using Blom's Formula	0,003	-0,016	-0,021	0,838	0,192	-0,038	0,104
Normal Score of benzene using Blom's Formula	0,089	0,222	0,073	0,732	0,030	-0,068	0,012
Normal Score of Toluene using Blom's Formula	-0,131	0,125	-0,001	0,908	0,157	0,041	0,032
Normal Score of Etilbenzene using Blom's Formula	0,136	-0,008	0,033	0,908	0,059	0,044	0,027
Normal Score of stireni using Blom's Formula	0,786	-0,121	-0,057	0,206	-0,043	-0,085	-0,038

Metodo di estrazione: Analisi dei Componenti principali.  
a. Convergenza per la rotazione eseguita in 7 iterazioni.

Tabella 24 matrice delle componenti per la popolazione adulta

#### 4.1.4 Correlazioni

Passando all'analisi delle correlazioni tra i vari biomarkers la popolazione è stata analizzata sempre stratificata per patologia, con l'obiettivo di studiare ed individuare le correlazioni esistenti tra i biomarkers d'effetto e quelli di esposizione nei soggetti sani e nei soggetti

asmatici, per poi in secondo luogo confrontare le popolazioni e valutare un eventuale effetto della patologia.

Nei soggetti adulti sani sono presenti molte correlazioni tra i biomarkers d'effetto ed i biomarkers d'esposizione, infatti ci sono svariate correlazioni (riportate in tabella) sia positive che negative tra gli acidi nucleici ed i principali metaboliti degli inquinanti; mentre se analizziamo la popolazione asmatica molte di queste correlazioni si vanno a perdere o perdono di significatività questo dato è in accordo con quanto visto in precedenza dove le differenze più grosse tra le due popolazioni erano legate alla metabolizzazione degli inquinanti stessi.

A titolo d'esempio si mostra il grafico della correlazione tra 5MedCyt e il DHBMA che nella popolazione sana ha un valore di 0.416\*\* mentre nella popolazione asmatica scende a 0.268\*\*, per lo stesso metabolita si mostra la correlazione positiva con la base ossidata 8oxodGuo che nei soggetti sani ha un valore di 0.380\*\* mentre nella popolazione asmatica scende a 0.338\*\*.

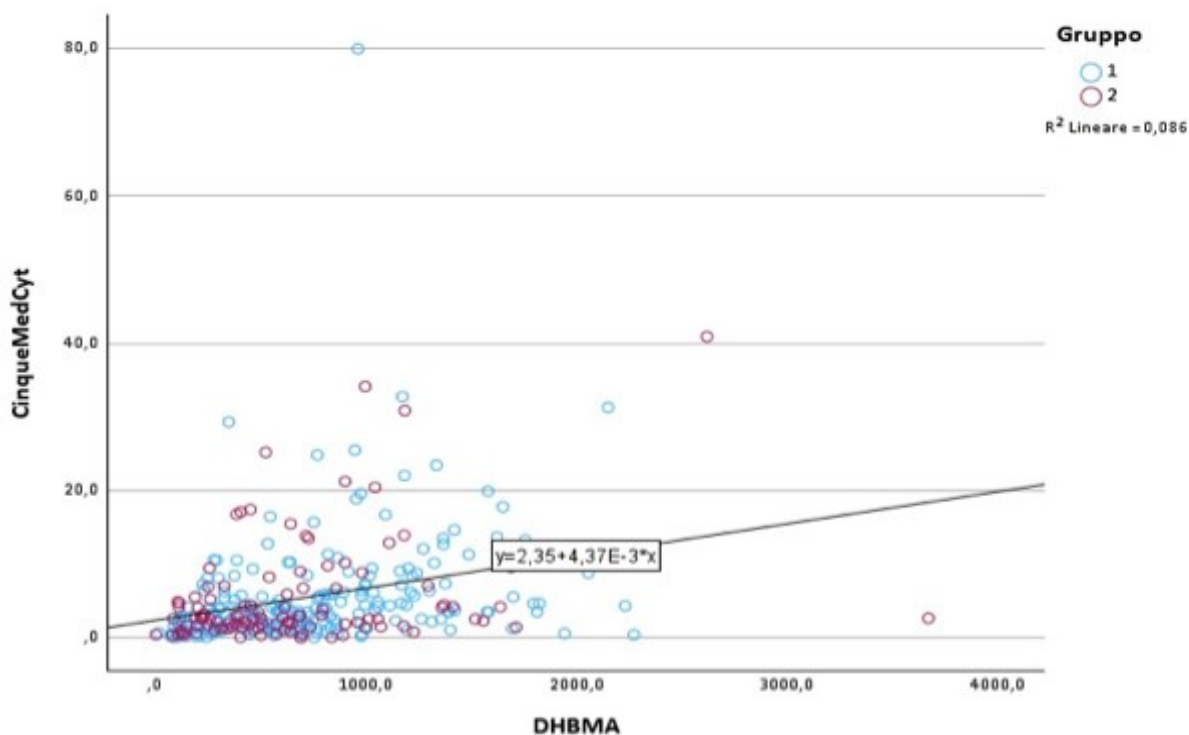


Figura 34 correlazione 5MedCyt/DHBMA; Gruppo 1= AS-adulti sani e Gruppo 2=AA-adulti asmatici

Queste correlazioni sottolineano come lo stato patologico intervenga su vari processi sia a livello di turnover cellulare sia in processi di tipo metabolico che di tipo riparativo, rendendo così le due popolazioni diverse e con una reazione diversa alla stessa esposizione.



In tabella 25, si mostrano le correlazioni tra i vari biomarkers e si riportano in rosso nella diagonale bassa i valori per gli asmatici ed in blu nella diagonale alta quelli dei sani, inoltre sono state evidenziate tutte quelle correlazioni che sono presenti sia nella popolazione sana che nella popolazione asmatica.

Dall'analisi delle correlazioni si nota che gli inquinanti tali e quali correlano tra di solo in entrambe le popolazioni, questo andamento potrebbe significare che le due popolazioni assorbono e assimilano in maniera differente in termini di concentrazioni ma poi i processi metabolici sono gli stessi e quindi i rapporti relativi tra le sostanze rimangono invariati; inoltre, questo dato può anche derivare dal fatto che l'esposizione è omogenea in termini di rapporto tra gli inquinanti.

Molte delle correlazioni tra biomarkers evidenziate sono riferibili al fatto che gli stessi fanno parte del medesimo processo metabolico o si collocano su processi collegati tra di loro, vedi ossidazione e metabolizzazione.

L'analisi delle correlazioni, infine, è stata confrontata con la matrice delle componenti ruotate, risultante dalla PCA, ed è risultato che le sostanze che correlano si collocano sullo stesso fattore della matrice a conferma dell'interazione tra i vari processi metabolici ed i vari markers; interessante notare come gli inquinanti tq articolati prima si collocano tutti sul fattore 4 ad eccezione dello stirene che infatti è l'unico che non correla con gli altri.

Per avere un quadro attendibile di esposizione ad inquinanti aerodispersi è necessario tenere in considerazione il modificarsi di diversi parametri che devono variare insieme e in modo coerente fra loro, capita spesso di incontrare significatività statistiche non associabili ad un quadro espositivo più ampio, come nel caso della tabella 25, questo può essere dovuto alla precisione del metodo analitico che è spesso in grado di rilevare variazioni fini nel profilo degli inquinanti urinari dovute a fonti espositive diverse dalla combustione ma presenti nella vita quotidiana dei soggetti indagati ma non sempre rilevabili e quantificabili con analoga precisione.

Come ipotizzato in partenza, lo stile di vita e l'ambiente confermano la loro forte influenza sulle concentrazioni urinarie di inquinanti e rappresentano importanti cause di confondimento nella ricerca di relazioni tra questi e la patologia asmatica.

A titolo d'esempio si mostra il grafico della correlazione tra DHBMA, metabolita dell'1,3-butadiene e 5MedCyt; nella popolazione sana la correlazione ha un valore di  $r=0.416^{**}$  mentre nella popolazione asmatica, pur rimanendo significativa, scende a  $r=0.268^{**}$ . DHBMA correla positivamente anche con la base ossidata 8oxodGuo sia nei soggetti sani ( $r=0.380^{**}$ ) che nella popolazione asmatica ( $r=0.338^{**}$ ).

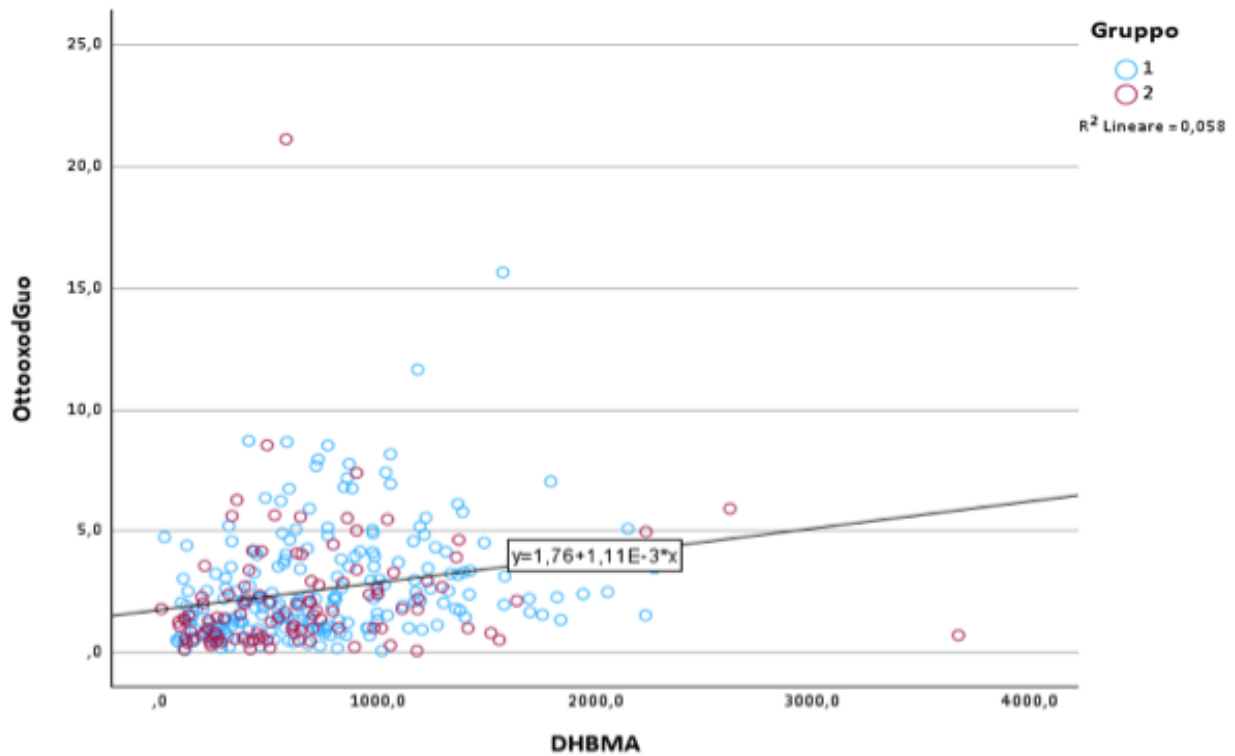


Figura 35 correlazione 8oxodGuo/DHBMA; Gruppo 1= AS-adulti sani e Gruppo 2=AA-adulti asmatici

## 4.2 Soggetti bambini

In questa sezione ci si sofferma sulla sola popolazione bambini e si valutano i risultati ottenuti stratificando per patologia.

### 4.2.1 T di studenti

In tabella 28 si riportano, per ogni biomarker urinario, il valore medio con il suo errore standard stratificando la popolazione in base allo stato di salute (sano e asmatico); le concentrazioni sono riportati in ug/g di creatinina.

Biomarkers	BS	BA	p-Value
HMGB-1	717 ± 159	1936 ± 465	0,016
Gua	291 ± 16,5	578 ± 66,2	<0,001
8oxoGua	26,9 ± 2,57	24,8 ± 4,52	NS
Guo	183 ± 9,06	194 ± 21,5	NS
8oxoGuo	8,42 ± 0,37	8,39 ± 0,67	NS
dGuo	7,50 ± 0,68	6,39 ± 0,68	NS
8oxodGuo	5,18 ± 0,25	5,08 ± 0,41	NS
Cot	2,03 ± 0,91	1,79 ± 0,31	NS
Cyto	564 ± 35,5	494 ± 83	NS
5MeCyto	47,7 ± 2,71	40,1 ± 4,22	NS
Cyt	345 ± 18,3	338 ± 70,7	NS
5MeCyt	10,3 ± 1,53	13,8 ± 2,42	NS
dCyt	8,24 ± 1,91	5,88 ± 0,88	NS
5MedCyt	14,9 ± 1,41	17,4 ± 2,63	NS
7MeGua	2967 ± 106	2787 ± 219	NS
1MeGua	211 ± 10,2	218 ± 22,4	NS
9MeGua	93,4 ± 59,1	49,5 ± 6,8	NS
7MeGuo	66,3 ± 3,11	41,3 ± 4,8	<0,001
5oxoMeCyto	5,85 ± 0,86	3,81 ± 0,90	NS
5oxoMedCyt	12,5 ± 0,51	9,73 ± 0,86	0,008

SPMA	1,09 ± 0,07	0,98 ± 0,11	NS
SBMA	15,3 ± 1,14	10,7 ± 1,7	0,037
DHBMA	255 ± 10,3	199 ± 19,3	0,015
DHPMA	1120 ± 35,3	986 ± 94	NS
t,t-MA	372 ± 32,1	285 ± 46,6	NS
NOH_tot	78,4 ± 7,33	43,4 ± 7,56	0,001
MA	943 ± 53,1	1259 ± 232	NS
VPOH_tot	346 ± 76,3	338 ± 73,6	NS
MTBE	1,88 ± 0,15	1,97 ± 0,28	NS
Benzene	0,01 ± 0,001	0,01 ± 0,001	NS
Toluene	0,67 ± 0,03	0,53 ± 0,04	0,026
Etilbenzene	25,23 ± 3,22	5,42 ± 0,04	<0,001
Stirene	0,91 ± 0,05	0,78 ± 0,06	0,002

Tabella 26 descrittiva concentrazioni bambini espresse in **ug/g creatinina**; ; Indicatori di effetto o di infiammazione: HMGB-1, DA COMPLETARE LA LEGENDA Basi OX Legenda: 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; Gua: Guanina; 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina; Guo: Guanosina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina; dGuo: 2'-deossiGuanosina; 8-oxodGuo: 8-idrossi-2'-deossiguanosina; dGuo: 2'-deossiGuanosina; Ado: Adenosina; dAdo: 2'-deossiAdenosina; Cyt: Citosina; 5-MeCyt: 5-Metil-Citosina; MeCyt: Citosina; Cyt: Citidina; 5-MeCyt: 5-Metil-Citidina; Cyt: Citidina; dCyt: 2'-deossiCitidina; 5-MedCyt: 5-Metil-2'-deossi-Citidina; dCyt: 2'-deossiCitidina; 1-MeGua: 1-Metil-Guanina; 7-MeGua: 7-Metil-Guanina; 1-MeGua: 1-Metil-Guanina; 9-MeGua: 9-Metil-Guanina; 7-MeGuo: 7-Metil-Guanosina; 5-oxoMeCyt: 5-Idrossi-Metil-Citosina; 5-oxoMedCyt: 5-Idrossi-Metil-2'-deossi-Citidina; 5-oxoMeCyt: 5-Idrossi-Metil-Citosina; Indicatori di esposizione: cot, cotinina; Metaboliti Legenda: S-PMA, acido S-fenilmercapturico; SBMA, Acido benzilmercapturico; DHBMA, acido 1,2-diidrossibutilmercapturico; DHPMA, acido 2,3 diidropropil mercapturico; t,t-AMMA, acido trans,trans-muconico; NOH\_tot, naftoli totali; MAAM, acido Mandelico; PGA, Acido fenilgliossilico; DHBMA, acido 1,2-diidrossibutilmercapturico; DHPMA, acido 2,3 diidropropil mercapturico; NOH\_tot, naftoli totali; VPOH\_tot, fenilnaftolivinilfenolintotali; MTBE: metil-terzbutiletere

Come nella popolazione adulta, anche nei bambini si osserva che le concentrazioni urinarie di HMGB-1 e Gua sono significativamente superiori nei soggetti asmatici rispetto a quelli sani, rispettivamente  $p=0,016$  e  $p<0,001$ , e quelle di DHBMA mostrano un andamento opposto ( $297,35 \pm 19,99$  vs  $275,27 \pm 49,25$ ;  $p=0,015$ ). A differenza della popolazione adulta, nei

bambini si osserva che, rispetto ai soggetti sani, i soggetti asmatici eliminano concentrazioni significativamente inferiori di 7MeGuo ( $p < 0,001$ ), 5oxoMedCyt ( $p = 0,008$ ), NOH tot ( $p = 0,001$ ), Toluene ( $p = 0,026$ ) e Stirene ( $p = 0,002$ ) e concentrazioni significativamente superiori di Etilbenzene ( $p < 0,001$ ).

Rispetto agli adulti nei bambini, tra sani e asmatici, sono molto poche le differenze significative, ma guardando i valori medi si nota una tendenza che fa ipotizzare che l'organismo, in età precoce, è ancora in grado di riparare in modo efficiente il danno subito a questo si può aggiungere il fatto che la popolazione pediatrica ha subito una minor esposizione, legata all'età più bassa ed il numero minore di anni passati dall'insorgenza della patologia, e quindi i livelli di esposizione non hanno ancora raggiunto livelli tali da mostrare delle differenze rilevabili.

L'andamento da noi riscontrato tra adulti e bambini può essere assimilato a quanto riportato in letteratura riguardo il confronto da soggetti a stadi diversi della patologia, dove si mostra anche un effetto da parte dei livelli di stress ossidativo sulla progressione patologica (michaeloudes et al 2022)<sup>78</sup>.

#### 4.2.2 GLM – modello lineare generalizzato

Anche nella popolazione dei bambini, per valutare le differenze reali tra la i due sottogruppi di soggetti sani e di soggetti asmatici, si è impostato un GLM inserendo come fattori i parametri che potevano operare come confondenti, tipo sesso, età e numero di conviventi fumatori. Infatti, trattandosi di bambini di 6-11 anni, è stata esclusa la variabile fumo attivo ma è stato preso in considerazione l'effetto del fumo di tabacco come esposizione passiva.

L'analisi è stata fatta applicando un modello lineare generalizzato (GLM) configurata per i confondenti selezionati ed il test è stato ripetuto per ogni singolo biomarkers; in tabella si riportano per ogni analita il valore medio con il valore minimo e massimo dell'intervallo di confidenza rispettivamente per il sottogruppo dei sani e degli asmatici.

Biomarkers	BS	BA	p-value
HMGB-1	945 [507-1384]	2208 [1424-2992]	0,006

Gua	362 [286-437]	660 [526-795]	<0,001
8oxoGua	40,51 (24,66, 56,36)	30,1 [1,75-58,4]	NS
Guo	206 [163-250]	307 [229-385]	0,027
8oxoGuo	10,3 [7,79-12,8]	12,9 [8,49-17,4]	NS
dGuo	8,18 [6,30-10,0]	10,9 [7,62-14,2]	NS
8oxodGuo	6,21 [4,93-7,49]	8,12 [5,83-10,4]	NS
Cot	2,54 [0,89-4,19]	2,53 [0,42-5,48]	NS
Cyto	661 [467-853]	841 [496-1186]	NS
5MeCyto	56,5 [47,9-65,2]	47,8 [32,3-63,3]	NS
Cyt	381 [327-436]	440 [343-537]	NS
5MeCyt	10,1 [7,22-12,9]	16,2 [11,1-21,3]	NS
dCyt	8,64 [5,38-11,9]	6,91 [1,08-12,7]	NS
5MedCyt	15,8 [12,718,9]	15,8 [12,7-18,9]	NS
7MeGua	3590 [3002-4179]	3737 [2684-4789]	NS
1MeGua	262 [217-308]	270 [188-351]	NS
9MeGua	103 [0,55-206]	76,29 (57-260)	NS
7MeGuo	74,8 [64,4-85,3]	59,6 [40,9-78,3]	NS
5oxoMeCyto	6,32 [3,81-8,84]	8,78 [4,29-13,3]	NS
5oxoMedCyt	14,0 [12,3-15,8]	10,9 [7,82-14,0]	NS
SPMA	1,29 [1,09-1,50]	1,13 [0,76-1,50]	NS
SBMA	16,5 [9,4-23,5]	25,3 [12,7-37,8]	NS
DHBMA	1303 [1137-1469]	1255 [958-1552]	NS
DHPMA	297 [252-340]	274 [196-353]	NS

t,t-MA	405 [333-477]	339 [210-467]	NS
NOH_tot	104 [80,3-129]	50,4 [7,14-93,7]	0,03
MA	1028 [856-1200]	1464 [1156-1772]	0,02
VPOH_tot	416 [269-563]	356 [93,2-619]	NS
MTBE	3,13 [1,67-4,60]	3,49 [1,74-5,24]	NS
Benzene	0,02 [0,01-0,03]	0,01 [0,00-0,03]	NS
Toluene	0,93 [0,52-1,34]	0,72 [0,23-1,21]	NS
Etilbenzene	34,0 [13,9-54,1]	8,37 [5,7-32,5]	0,006
Stirene	1,56[0,86-2,26]	1,29 [0,46-2,13]	NS

Tabella 27 differenze tra sani ed asmatici; Indicatori di effetto o di infiammazione: HMGB-1, Basi OX Legenda: 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; Gua: Guanina; 8-oxoGua: 8-idrossi-7,8-diidroguanina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina; Guo: Guanosina; 8-oxoGuo: 8-idrossi-7,8-diidroguanosina; dGuo: 2'-deossiGuanosina; 8-oxodGuo: 8-idrossi-2'-deossiguanosina; dGuo: 2'-deossiGuanosina; Ado: Adenosina; dAdo: 2'-deossiAdenosina; Cyt: Citosina; 5-MeCyt: 5-Metil-Citosina; MeCyt: Citosina; Cyt: Citidina; 5-MeCyt: 5-Metil-Citidina; Cyt: Citidina; dCyt: 2'-deossiCitidina; 5-MeCyt: 5-Metil-2'-deossi-Citidina; dCyt: 2'-deossiCitidina; 1-MeGua: 1-Metil-Guanina; 7-MeGua: 7-Metil-Guanina; 1-MeGua: 1-Metil-Guanina; 9-MeGua: 9-Metil-Guanina; 7-MeGuo: 7-Metil-Guanosina; 5-oxoMeCyt: 5-Idrossi-Metil-Citosina; 5-oxoMedCyt: 5-Idrossi-Metil-2'-deossi-Citidina; 5-oxoMeCyt: 5-Idrossi-Metil-Citosina; Indicatori di esposizione: cot, cotinina; Metaboliti Legenda: S-PMA, acido S-fenilmercapturico; SBMA, Acido benzilmercapturico; DHBMA, acido 1,2-diidrossibutilmercapturico; DHPMA, acido 2,3 diidropropil mercapturico; t,t-AMMA, acido trans,trans-muconico; NOH\_tot, naftoli totali; MAAM, acido Mandelico; PGA, Acido fenilgliossilico; DHBMA, acido 1,2-diidrossibutilmercapturico; DHPMA, acido 2,3 diidropropil mercapturico; NOH\_tot, naftoli totali; VPOH\_tot, fenilnaftolivinilfenolintotali; MTBE: metil-terzbutiletere.

Considerando i fattori di confondimento, come per gli adulti si conferma che i soggetti asmatici eliminano concentrazioni significativamente superiori rispetto ai soggetti sani di HMGB-1 ( $p=0,006$ ), Gua ( $p<0,001$ ) e Guo ( $p=0,027$ ) e, tra gli indicatori di esposizione, di MA ( $p=0,02$ ). Un andamento differente si osserva per NOH tot; infatti, nei soggetti asmatici bambini si osserva un calo significativo della concentrazione urinaria dei metaboliti del naftalene rispetto ai soggetti sani.

È importante osservare che Come si può vedere dalle tabelle 29 e 25 i livelli urinari di HMGB-1 urinari, come per gli adulti, nei soggetti asmatici, sia adulti che bambini, sono significativamente superiori a quelli dei soggetti sani, rispettivamente con p-value di 0,004 e

0,006, a conferma del fatto che la popolazione asmatica presenta uno stato infiammatorio cronico non solo a livello polmonare ma anche a livello sistemico.

Si può ipotizzare che la differenza fra soggetti sani e soggetti asmatici sia meno marcata nei minori nella popolazione dei minori la differenza è meno marcata in quanto lo stato infiammatorio è cronicizzato da meno tempo e quindi esplica con entità minore il suo effetto sistemico, tale ipotesi è supportata anche dai valori medi di HGMB1 urinari nei soggetti sani (945,21 [506,68, 1383,75] vs 1947,57 [985,45, 2909,68] ug/g creatinina, bambini vs adulti) e nei soggetti asmatici (2208,09 [1424,12, 2992,06] vs 4010,63 [2725,89, 5295,37] ug/g creatinina, bambini vs adulti).

#### 4.2.2.1 Trasformazione di Blom's

Al fine di studiare la distribuzione relativa dei dati e la persistenza delle differenze anche normalizzando i dati e rapportandoli in termini di Z score, anche nella popolazione dei bambini, si è applicata la formula di Blom's ed una volta ottenuti i dati normalizzati si è applicata la GLM settata come in precedenza.

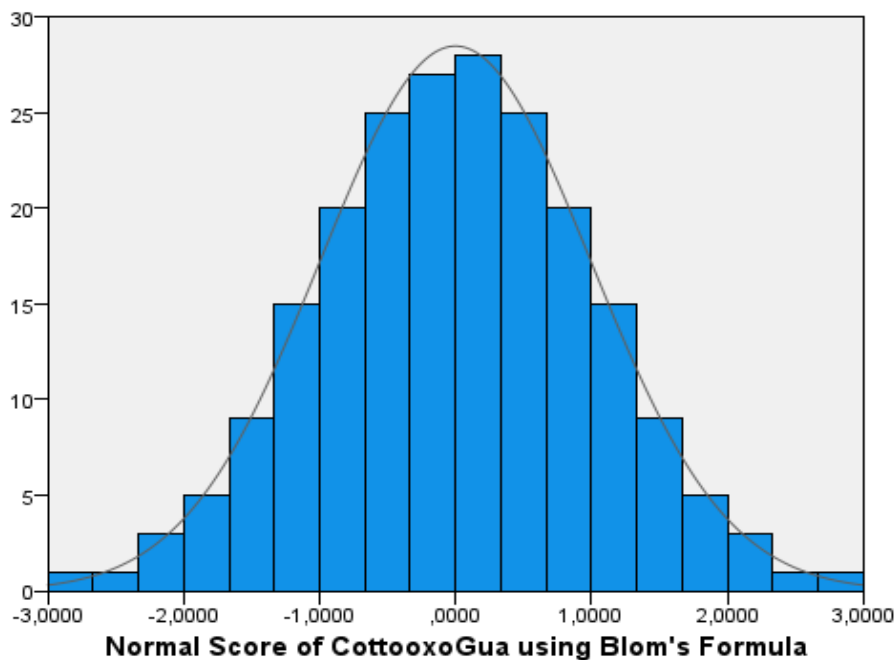


Figura 36 distribuzione normale dopo normalizzazione di Blom's Bambini

Anche per i bambini si è effettuata, analogamente agli adulti l'analisi dei residui a seguito della trasformazione per Blom e dell'applicazione della GLM in modo da verificare la distribuzione normale di quest'ultimi per ogni sostanza e si conferma quanto visto negli adulti potendo così procedere alla creazione del BPlot riportato in figura 49.

Prima però di applicare questo test sui dati trasformati si è verificato che la distribuzione risultate fosse normale, di seguito si riporta a titolo esemplificativo il grafico della 8oxoGua dove è possibile vedere come i dati si adattano perfettamente alla distribuzione Gaussiana (Figura 48).

I dati ottenuti dalla GLM sui valori Normal score di ogni analita sono poi stati utilizzati, come per gli adulti, per costruire lo score plot centrato sullo zero, dove è possibile vedere come per ogni analita la distanza tra le barre delle due sottopopolazioni sia proporzionale alla significatività.

Si riporta in figura il Bplot risultate dei bambini (Figura 49), dove a differenza degli adulti si nota un andamento molto più omogeneo, essendoci molte meno differenze significative, però guardando per ogni analita non solo lo scostamento delle due barre, ma anche il pallino rappresentante il valore medio si nota nettamente l'andamento appena illustrato.

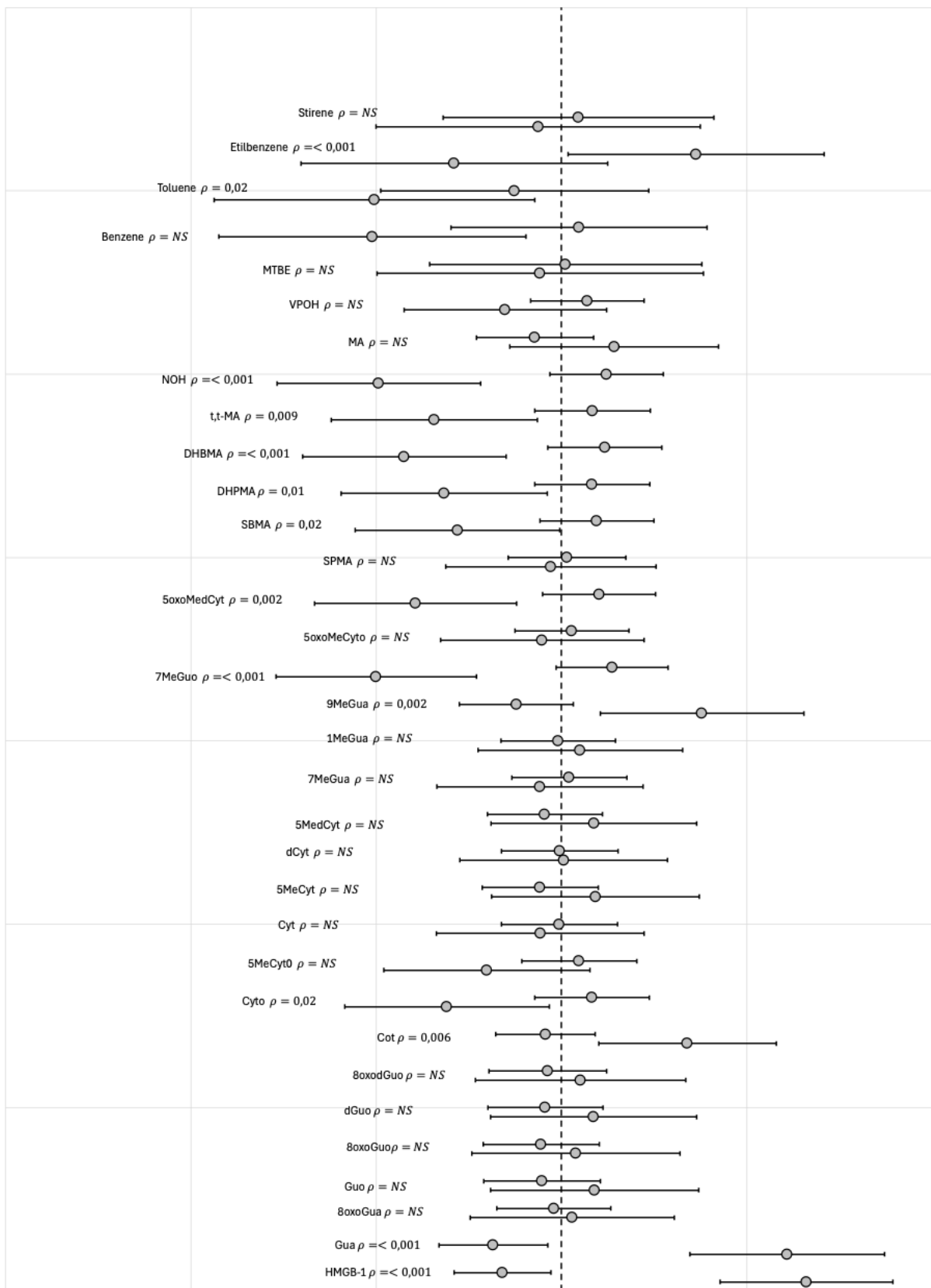


Figura 37 BPlot bambini

### 4.2.3 PCA

Visto che il valore ottenuto dal test KMO ha un valore numerico superiore/uguale a 0,8 si può procedere con l'analisi delle componenti principali (PCA) sia per gli adulti che per i bambini, i valori sono riportati nella statistica descrittiva. Tale analisi statistica è utile per fornire informazioni aggiuntive sulle correlazioni tra le variabili, massimizzando la varianza ed aiutando ad assegnare il peso corretto ad ognuna di esse (Ricci et al 2019)<sup>74</sup>.

Analogamente alla popolazione adulta, anche per i bambini, prima di procedere con la PCA si è calcolata e valutata la matrice di varianza e covarianza dalla quale si evince che i fattori significativi, con un valore di  $r$  compreso tra -0,3 e 0,3, sono le prime 5, ma come per gli adulti si lavora solo sulle prime tre visto che il primo fattore è responsabile del 40% della varianza, in figura 38 si riporta lo Scree plot risultante.

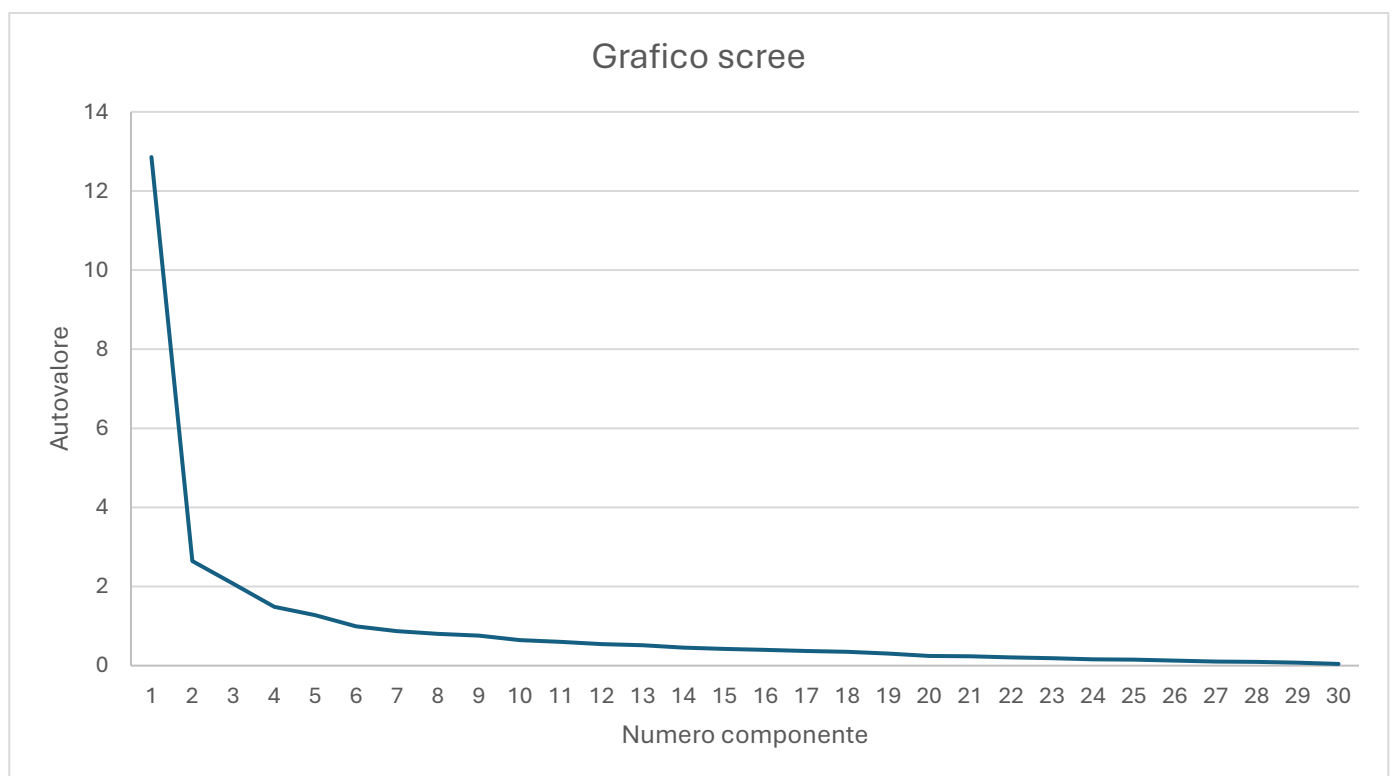


Figura 38 Scree plot per PCA bambini

Come per gli adulti avendo un valore di varianza spiegata tra 50% e il 70% e quindi si osserva la l'analisi delle componenti principali nel suo complesso e solo come andamento.

Per fare ciò dalla matrice delle componenti ruotate, riportata in tabella 25 si estrapolano i primi tre fattori e si lavora sui rapporti tra questi al fine di costruire i plot.

Nei plot seguenti sono rappresentati in blu i soggetti asmatici ed in arancione i sani, si rappresenta con un punto di dimensioni maggiori il valore medio della popolazione.

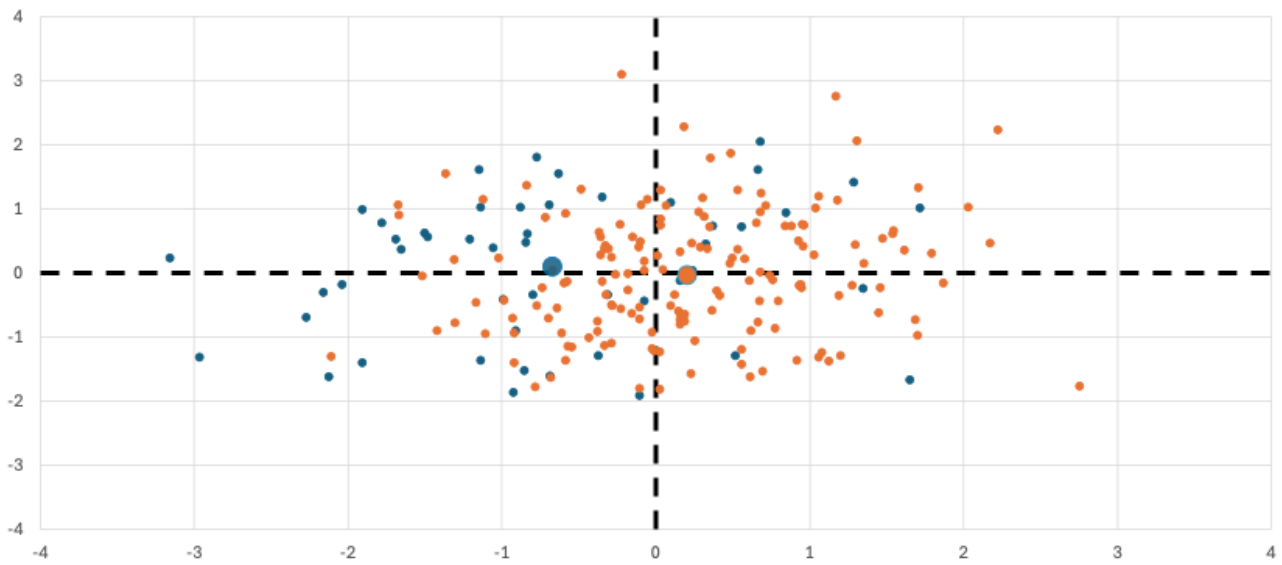


Figura 39 Plot PCA, rapporto dei fattori 1 e 2, in blu i soggetti asmatici e in arancio i soggetti sani

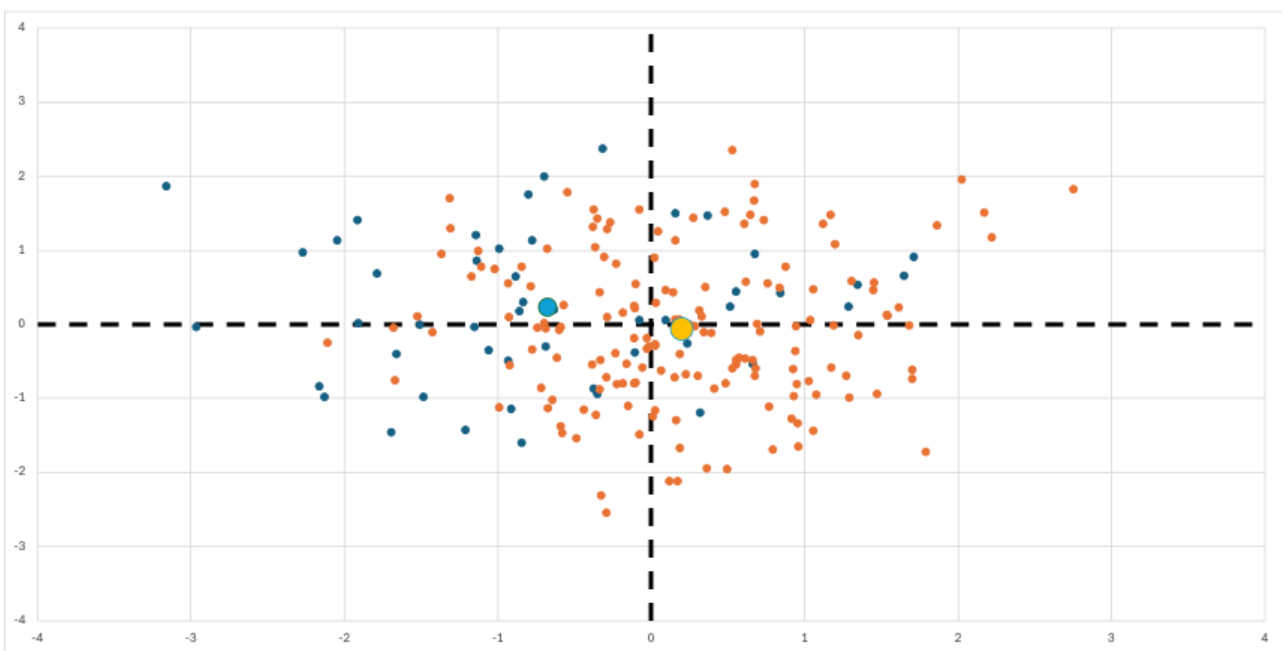


Figura 40 Plot PCA, rapporto dei fattori 1 e 3, in blu i soggetti asmatici e in arancio i soggetti sani

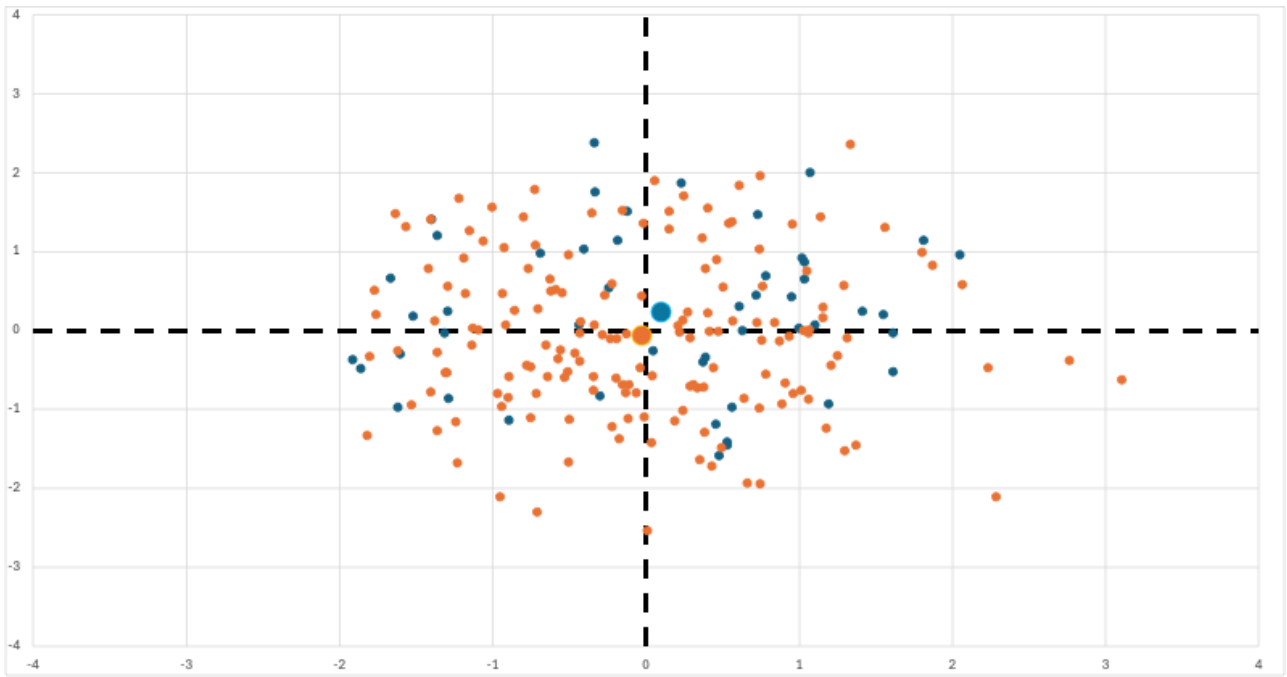


Figura 41 Plot PCA rapporto dei fattori 2 e 3, in blu i soggetti asmatici e in arancio i soggetti sani

<b>Matrice dei componenti ruotati<sup>a</sup></b>					
	Componente				
	1	2	3	4	5
Normal Score of HMGB1 using Blom's Formula	0,022	0,023	0,221	0,250	0,739
Normal Score of Gua using Blom's Formula	-0,003	0,115	0,784	0,317	0,284
Normal Score of 8oxoGua using Blom's Formula	0,220	0,007	0,801	0,000	0,160
Normal Score of guo using Blom's Formula	0,207	0,273	0,207	0,781	0,046
Normal Score of 8oxoGuo using Blom's Formula	0,471	0,177	0,477	0,356	0,340
Normal Score of dGuo using Blom's Formula	0,142	0,224	0,300	0,707	0,049
Normal Score of 8oxodGuo using Blom's Formula	0,504	0,222	0,400	0,342	0,223
Normal Score of Cot using Blom's Formula	0,263	0,044	0,208	0,131	0,791
Normal Score of Cyto using Blom's Formula	0,735	0,191	0,245	-0,087	0,156
Normal Score of 5MeCyto using Blom's Formula	0,710	0,323	0,205	-0,032	0,328
Normal Score of Cyt using Blom's Formula	0,391	0,678	0,161	0,241	0,112
Normal Score of 5MeCyt using Blom's Formula	0,062	0,883	-0,048	0,130	0,062
Normal Score of dCyt using Blom's Formula	0,235	0,823	0,192	0,158	0,039
Normal Score of 5MedCyt using Blom's Formula	0,094	0,905	0,022	0,145	0,101
Normal Score of 7MeGua using Blom's Formula	0,486	0,084	0,655	0,370	0,233
Normal Score of 1MeGua using Blom's Formula	0,335	0,073	0,773	0,254	0,284
Normal Score of 9MeGua using Blom's Formula	0,148	0,139	0,348	0,021	0,668
Normal Score of 7MeGuo using Blom's Formula	0,646	0,127	0,113	0,362	0,044
Normal Score of 5oxoMeCyto using Blom's Formula	0,367	0,186	0,061	0,033	0,399
Normal Score of 5oxoMedCyt using Blom's Formula	0,481	0,568	0,091	0,366	0,138
Normal Score of SPMA using Blom's Formula	0,659	0,091	0,161	0,032	0,352
Normal Score of SBMA using Blom's Formula	0,589	0,101	0,101	0,203	0,080
Normal Score of DHPMA using Blom's Formula	0,734	0,213	0,189	0,377	0,089
Normal Score of DHBMA using Blom's Formula	0,820	0,101	0,087	0,329	0,229
Normal Score of ttMA using Blom's Formula	0,647	-0,004	-0,018	0,175	0,168
Normal Score of NOH using Blom's Formula	0,554	0,153	0,294	0,204	-0,332
Normal Score of MA using Blom's Formula	0,449	0,139	0,112	0,297	0,276
Normal Score of VPOH using Blom's Formula	0,576	0,159	0,203	0,043	-0,072
<b>Metodo di estrazione: Analisi dei componenti principali.</b>					
<b>a. Convergenza per la rotazione eseguita in 6 iterazioni.</b>					

Tabella 28 matrice delle componenti ruotate, risultante dalla PCA in rosso i valori >0,35

L'analisi PCA va nella stessa direzione di quella degli adulti e conferma quanto visto in precedenza rafforzando ancora di più la distribuzione dei biomarkers sulle componenti in base al processo metabolico in cui sono coinvolti, inoltre l'analisi conferma che sia l'asma

che l'inquinamento sono estremamente eterogenei e multifattoriali, quindi una netta suddivisione risulta difficile, ma già la conferma di un andamento è importante per descrivere meglio la relazione tra i due.

#### 4.2.4 Correlazione

Le stesse analisi delle correlazioni condotte nella popolazione adulta sono state applicate anche ai bambini ed in questa popolazione è possibile riscontrare lo stesso andamento in cui le correlazioni sono maggiori nella popolazione sana e, passando a quella asmatica, si riducono di numero e di significatività.

Inoltre, nei bambini asmatici si vanno a perdere molte delle correlazioni con i metaboliti e anche con gli inquinanti tal quali, questo andamento è in accordo con quanto visto nelle differenze tra sano ed asmatici come mostrato nell'analisi GLM.

In tabella 29 si riportano le correlazioni tra i vari biomarkers e si riportano in rosso nella diagonale bassa i valori per gli asmatici ed in blu nella diagonale alta quelli dei sani, inoltre sono state evidenziate tutte quelle correlazioni che sono presenti sia nella popolazione sana che nella popolazione asmatica.

Anche nel caso dei bambini le correlazioni individuate sono coerenti la matrice dei fattori ruotati e le correlazioni permanenti nelle due popolazioni si collocano sugli stessi fattori della matrice.

Nel caso dei bambini sono state osservate meno correlazioni, rispetto a quelle riscontrate negli adulti.

È noto che il corpo umano non raggiunge la sua piena maturazione prima dei 18 anni e questo potrebbe influenzare i processi metabolici e di riapporto degli acidi nucleici, le cinetiche di eliminazione di sostanze esogene ed endogene con una conseguente alterazione delle correlazioni riscontrate in una popolazione che ha raggiunto il completo sviluppo.

Questa ipotesi potrebbe supportare quanto riscontrato in questo studio in termini di differenti correlazioni tra indicatori di esposizione e di effetto tra popolazione dei soggetti adulti e quella dei bambini.



Stesse correlazioni positive si possono vedere nella popolazione dei bambini

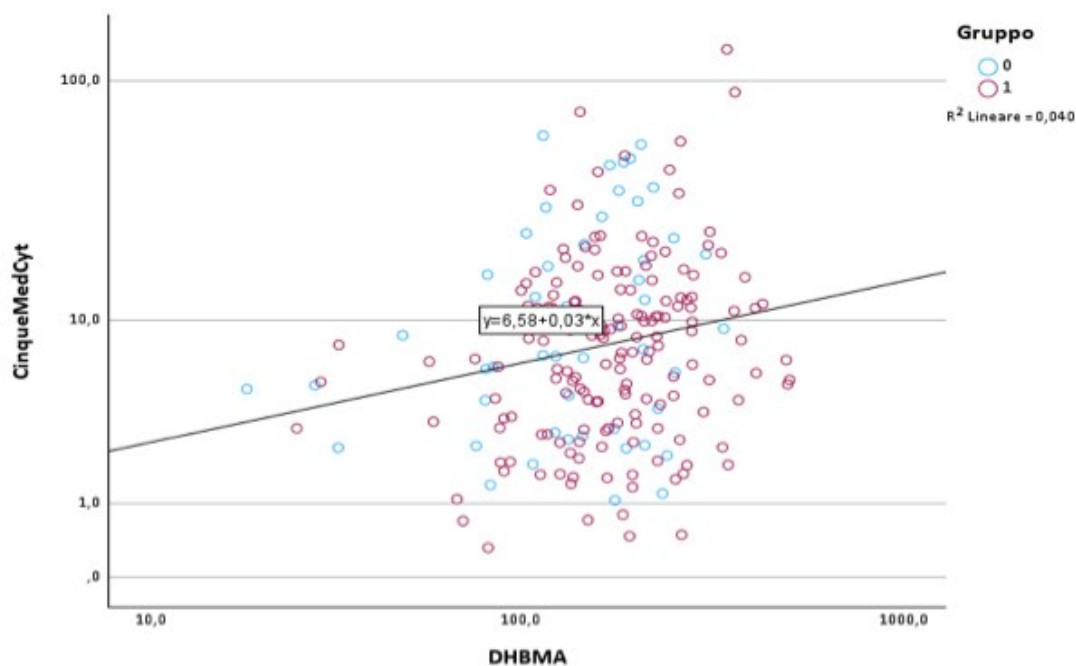


Figura 42 Bambini correlazione 5MedCyt/DHBM; Gruppo 0= BA-bambini asmatici e Gruppo 1=BS- bambini sani

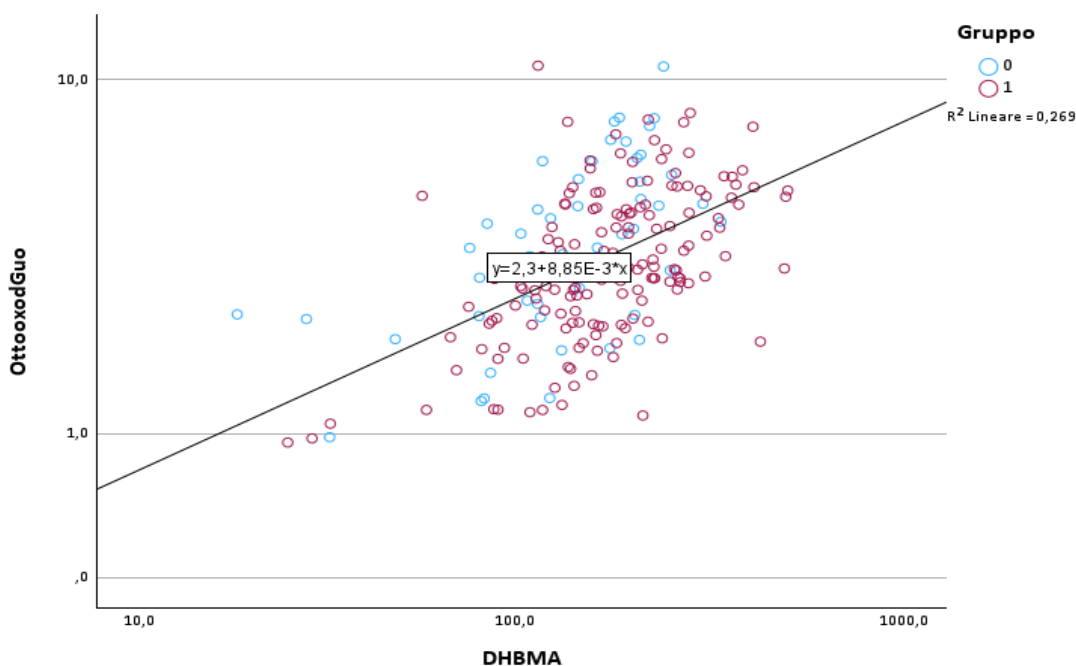


Figura 43 Bambini correlazione 8oxodGuo/DHBMA; Gruppo 0= BA-bambini asmatici e Gruppo 1=BS- bambini sani

Come visto per gli adulti, anche per la popolazione dei bambini, si riscontrano correlazioni positive tra indicatori di esposizione e indicatori di danno ossidativo e di metilazione.

Nei due grafici riportati (figura 47 e 48) si mostrano le correlazioni in scala logaritmica del DHBMA, metabolita dell'1,3-butadiene e 5MedCyt, indicatore di metilazione del DNA, e 8oxodGuo, indicatore di danno ossidativo agli acidi nucleici. L'andamento che si osserva è

analogo a quanto già riportato per gli adulti, dove rispettivamente le correlazioni sono di 0,300\*\* solamente nei soggetti sani e 0,591\*\* per i soggetti sani e 0,607\*\* per i soggetti asmatici.

### 4.3 Fattori confondenti

Il fenomeno dell'inquinamento è un fenomeno eterogeneo e multifattoriale, le sostanze che lo compongono spesso sono presenti anche in abitudini voluttuarie (fumo), nel cibo, nei materiali che utilizziamo nella quotidianità (solventi) e gli effetti che l'inquinamento stesso causa sulle persone spesso sono comuni anche a patologie e/o stili di vita (stress ossidativo). Per questo motivo, in una prima analisi era molto importante neutralizzare l'effetto di questi fattori di confondimento per valutare se sono presenti differenze tra le due popolazioni di sani ed asmatici, ma in uno step successivo è importante anche valutare se questi stessi fattori hanno un ruolo attivo nell'escrezione degli indicatori oggetto di questo studio.

Ogni fattore confondente è stato analizzato separatamente con l'obiettivo di valutare la sua interazione con l'escrezione dei biomarkers considerati.

#### 4.3.1 Asma allergica

La patologia asmatica è generalmente classificata in base alla eziologia in asma allergica e non allergica.

In letteratura si riporta che elevati livelli di inquinamento aumentano i livelli di escrezione di indicatori di infiammazione, come le interleuchine, in soggetti con allergie dell'apparato respiratorio rispetto a soggetti non allergici<sup>79-81</sup>.

Alla luce di questi risultati abbiamo provato a stratificare la popolazione asmatica oggetto dello studio, in base all'allergia e vedere se sussistessero differenze tra i gruppi in termini di escrezione dei biomarkers d'effetto e di esposizione.

Andando a confrontare i valori medi delle concentrazioni dei biomarkers analizzati, non sono emerse differenze statisticamente significative, né negli adulti né nei bambini, né per gli indicatori di esposizione né per quelli di effetto, oggetto di questo studio.

Il fatto che non sono state rilevate differenze tra i sottogruppi può essere attribuito al fatto che i soggetti asmatici, sia adulti che bambini, oggetto dello studio erano in controllo terapeutico e nessuno ha presentato episodi di riacutizzazione per tutta la durata dello studio.

Inoltre poiché obbiettivo primario dello studio era indagare le differenze tra sano ed asmatico e non studiare le differenze legate all'allergia, la discordanza con i dati riportati in letteratura, potrebbe essere attribuibile alla bassa numerosità dei sottogruppi ottenuti tenendo conto sia della variabile asma che della variabile allergia e la potenza statistica non era adeguata a valutare eventuali differenze tra i vari sottogruppi.

Per confermare questi dati, per valutare l'influenza dell'allergia e per valutare gli effetti dell'inquinamento su questi soggetti in futuro sarebbe interessante indagare questi biomarkers in una popolazione asmatica più ampia e analizzare anche eventuali differenze legate alla natura dell'allergia.

#### 4.3.2 Sesso ed età

Per quanto riguarda il sesso, le due popolazioni sono perfettamente confrontabili, sia sani che asmatici e sia adulti che bambini, in termini di numerosità, infatti, non esistono differenze significative tra maschi e femmine né stratificando per adulti e bambini né per stato di salute.

Si è comunque fatta l'analisi delle significatività per verificare se il genere potesse influenzare il profilo di escrezione degli indicatori di esposizione e di effetto, si è applicato il T di student sulle medie delle concentrazioni urinarie di adulti e di bambini, sani e asmatici stratificando per sesso. Si è poi proceduto a stratificare anche per abitudine al fumo gli adulti e per presenza di conviventi fumatori per i bambini, per valutare che non ci fossero differenze in termini di escrezione tra maschi e femmine; dall'analisi si evince che se ci sono delle differenze significative di norma sono le poche differenze significative riscontrate nelle donne che hanno concentrazioni urinarie maggiori rispetto agli uomini. Tali differenze, oltre a non essere associate ad uno specifico indicatore o ad una specifica casistica non hanno un andamento coerente all'interno delle diverse popolazioni (sani/, asmatici, adulti/, bambini, fumatori e /non fumatori) e sono da attribuire principalmente al fatto che le femmine hanno livelli di creatinina significativamente più bassi degli uomini e, per rendere confrontabili fra loro i sottogruppi, abbiamo espresso i dati in funzione della creatinina.

A conferma di questa interpretazione si sono applicati gli stessi test sui dati non espressi per creatinina ed infatti, le poche significatività riscontrate si vengono a perdere.

Per quanto riguarda l'età si sono osservate differenze di concentrazione tra la popolazione adulta e quella dei bambini per alcuni indicatori ma che non è dipendente dallo stato di salute

Per quanto riguarda i bambini non è stato possibile vedere se è presente una correlazione con gli indicatori urinari poiché il range di anni è molto limitato (6-11 anni).

Rispetto all'età la nostra popolazione adulta è affetta da bias, inquanto la popolazione sana è più giovane di quella asmatica, questa differenza è dovuta al fatto che nella popolazione asmatica si sono riscontrate difficoltà in fase di arruolamento nel trovare soggetti con età più bassa che lavorassero a Parma e non fuori sede, per questo motivo non è stato possibile reclutare due popolazioni speculari in termini d'età.

Per questo motivo per un'analisi più approfondita del fattore età sarebbe necessario avere due popolazioni confrontabili e stratificabili in modo da valutare l'andamento dei markers in relazione all'età

### 4.3.3 BMI

Il BMI, invece, gioca un ruolo più attivo in questa interazione per svariati motivi, sia perché è esso stesso induttore di stress ossidativo sia perché la percentuale di grasso corporeo interagisce sia con la metabolizzazione sia con la capacità riparativa e corpo.

La popolazione adulta oggetto di questo studio ha una numerosità campionaria che permette di coprire un ampio range di BMI e di classificare gli adulti in quattro classi di peso: sottopeso per BMI <18,5, normopeso per 18,5<BMI<24,9, sovrappeso per 25<BMI<29,9 e obeso per BMI>30.

Applicando il test dell'ANOVA ad una via seguito dal test di Duncan sulla popolazione degli adulti stratificata per stato di salute, si è osservato che l'unico analita che è risultato dipendente dal BMI è l'8oxoGuo nei soli soggetti sani. In particolare, come riportato nella Figura 45 la concentrazione urinaria di 8oxoGuo, indicatore di danno ossidativo all'RNA, è significativamente superiore nei soggetti obesi rispetto ai soggetti sottopeso, normopeso e sovrappeso. Per quanto riguarda la popolazione dei soggetti asmatici è importante osservare

che la popolazione dei soggetti sottopeso è composta da un solo soggetto per cui non è stato possibile applicare il test. Ripetuto il test dell'ANOVA dopo aver accorpato i sottopeso con i normopeso, il risultato non è comunque risultato significativo.

In figura 45 si riporta il valore medio dell'escrezione urinaria di 8oxoGuo stratificando la popolazione, divisa per patologia, per BMI.

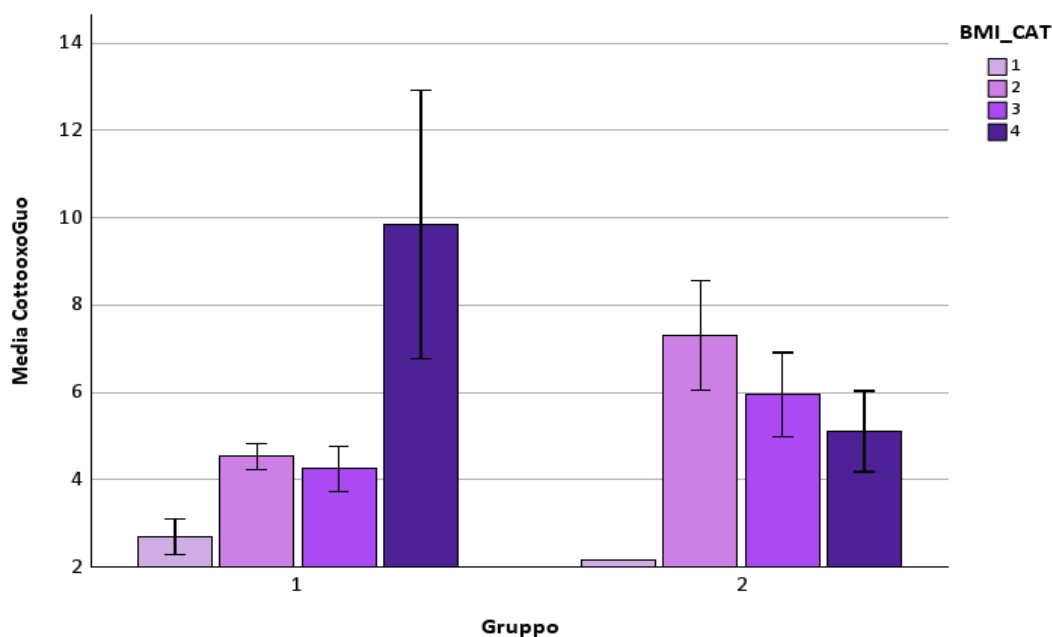


Figura 44 andamento 8oxoGuo in relazione del BMI (1=sottopeso, 2=normopeso, 3=sovrappeso e 4= obeso)

Nei bambini il BMI può essere calcolato con la normale formula, peso (in kg)/quadrato dell'altezza (in metri), ma poi la classificazione non può essere fatta con gli stessi parametri utilizzati con per gli adulti, Infatti, il BMI da 2 a 18 anni necessita me necessità di ulteriori parametri che per motivi di privacy non sono stati raccolti.

Per questo motivo il test dell'ANOVA a due vie non è stato applicato e non si è ripetuta l'analisi sulla popolazione pediatrica, considerando anche il fatto che nella popolazione adulta ci sono veramente poche correlazioni tra il BMI ed i livelli urinari dei makers in questione. Inoltre, dato il ristretto range di anni (6-11 anni) non sono state trovate correlazioni fra età e indicatori di esposizione e di effetto.

#### 4.3.4 Fumo

Il fumo merita una trattazione specifica in quanto è una fonte di esposizione vera e propria a diverse sostanze presenti anche nell'inquinamento ambientale sia in termini di fumo attivo che di fumo passivo; inoltre sono ormai ampiamente documentati i suoi effetti sulla salute e produzione di agenti ossidanti che causano stress ossidativo.

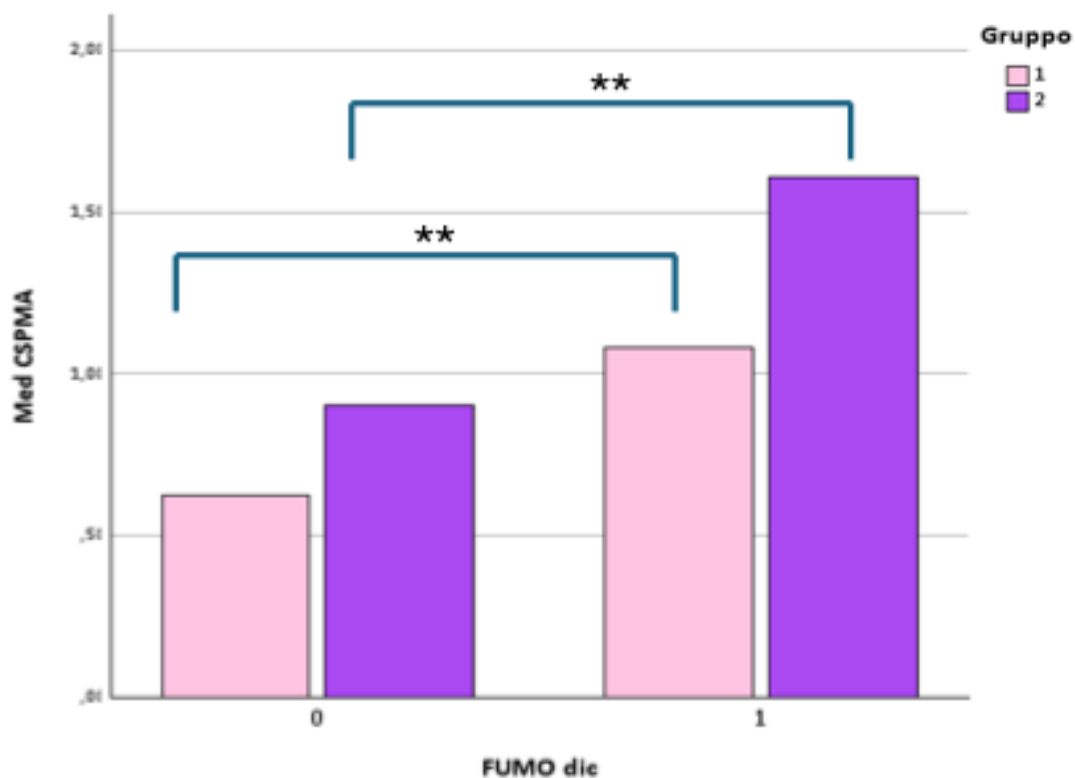


Figura 45 andamento SPMA stratificando per abitudine al fumo e Gruppo 1 soggetti sani, gruppo 2 soggetti asmatici; Fumo dic=0: Non fumatori o ex fumatori; Fumo dic=1: fumatori

Prima di iniziare l'analisi statistica, la popolazione adulta è stata stratificata per abitudine al fumo, valutando così gli effetti del fumo attivo, mentre i bambini sono stati stratificati in base alla presenza o meno nella loro abitazione di conviventi fumatori, permettendoci così di valutare gli effetti del fumo passivo.

I valori di cotinina urinaria dei soggetti fumatori sani sono sovrapponibili a quelli dei soggetti fumatori asmatici indicando un consumo di sigarette analogo dei due sottogruppi (rispettivamente cotinina media = 137 – 106 ug/g Creat).

Questo andamento, mostrato nei grafici 45 e 46, conferma l'ipotesi che a parità di esposizione, i soggetti asmatici assorbono una maggior quantità di inquinanti e una conseguente maggior escrezione dei loro metaboliti.

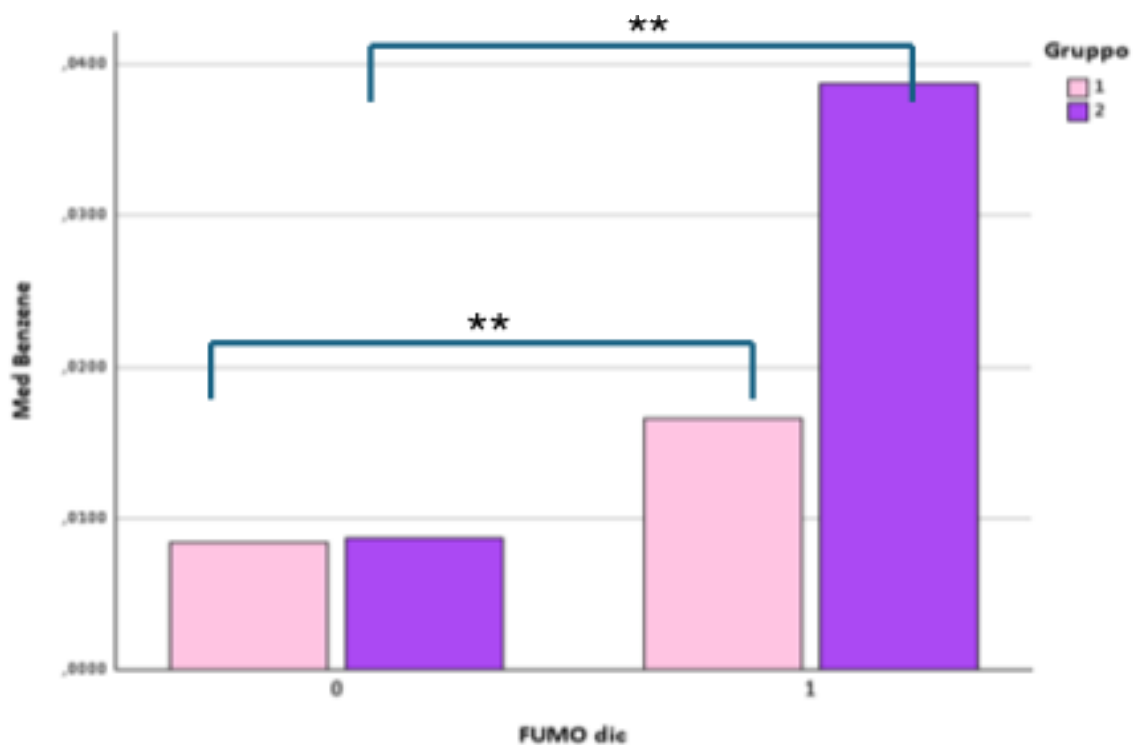


Figura 46 concentrazioni urinarie Benzene e Gruppo 1 soggetti sani, gruppo 2 soggetti asmatici; Fumo dic=0: Non fumatori o ex fumatori; Fumo dic=1: fumatori

In figura 46 si riporta la concentrazione urinaria dell'SPMA di soggetti adulti non fumatori o ex fumatori (Fumo dic 0) e di soggetti adulti Fumatori (Fumo Dic=1) suddivisi per soggetti sani (gruppo 1 in rosa) e soggetti asmatici (gruppo 2 viola). Quello che si osserva è che i soggetti non fumatori o ex fumatori hanno concentrazioni urinarie di SPMA confrontabili e indipendenti dallo stato di malattia. I soggetti fumatori sani hanno livelli di SPMA significativamente superiori dei soggetti sani non fumatori o Ex Fumatori e i soggetti asmatici fumatori hanno concentrazioni urinarie di SPMA significativamente maggiori dei soggetti asmatici non fumatori e dei soggetti sani fumatori.

Analogamente in Figura 47 si osserva per il benzene lo stesso andamento riscontrato per l'SPMA.

Poiché l'SPMA è un metabolita del Benzene e il Benzene è contenuto sia nell'inquinamento che nel fumo di sigaretta si osserva un aumento della concentrazione di entrambi gli analiti passando dai soggetti adulti non fumatori sani e asmatici ai soggetti adulti sani e fumatori e ai soggetti asmatici fumatori che risultano essere i soggetti con le concentrazioni urinarie più alte di tutti.

E' interessante notare che la condizione di "fumatore" è stata ottenuta sia dal questionario auto compilato al momento del reclutamento ma anche dalla quantificazione del contenuto urinario di cotinina, principale metabolita della nicotina contenuta nel fumo di tabacco.

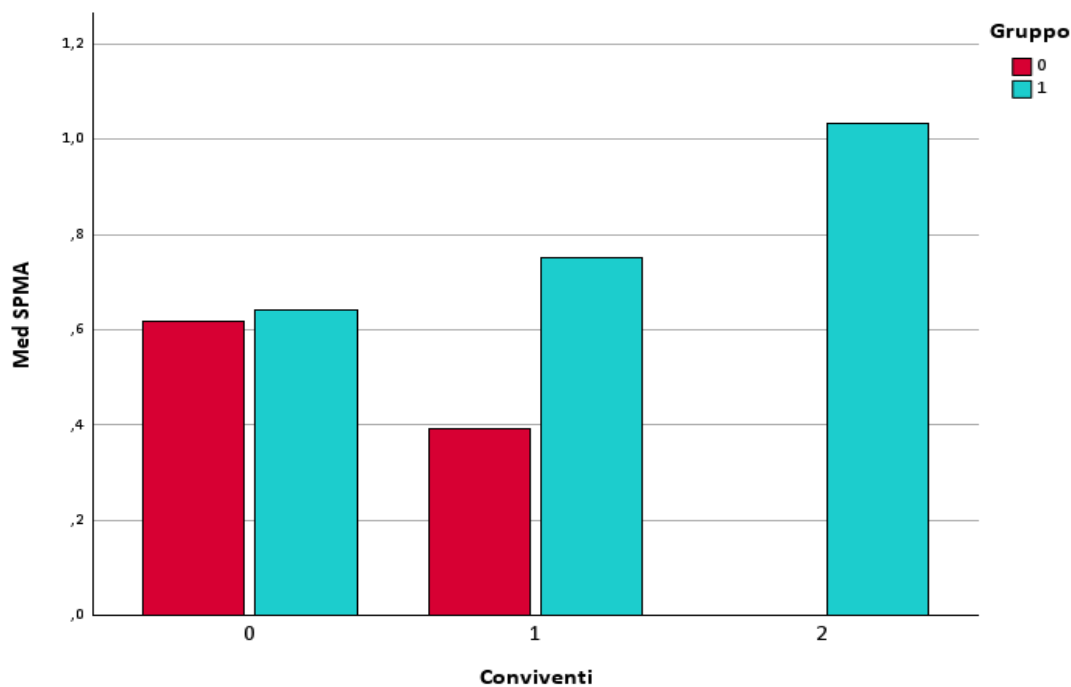


Figura 47 andamento SPMA stratificando per abitudine al fumo e Gruppo 1 soggetti sani, gruppo 2 soggetti asmatici; Fumo dic=0: Non fumatori o ex fumatori; Fumo dic=1: fumatori

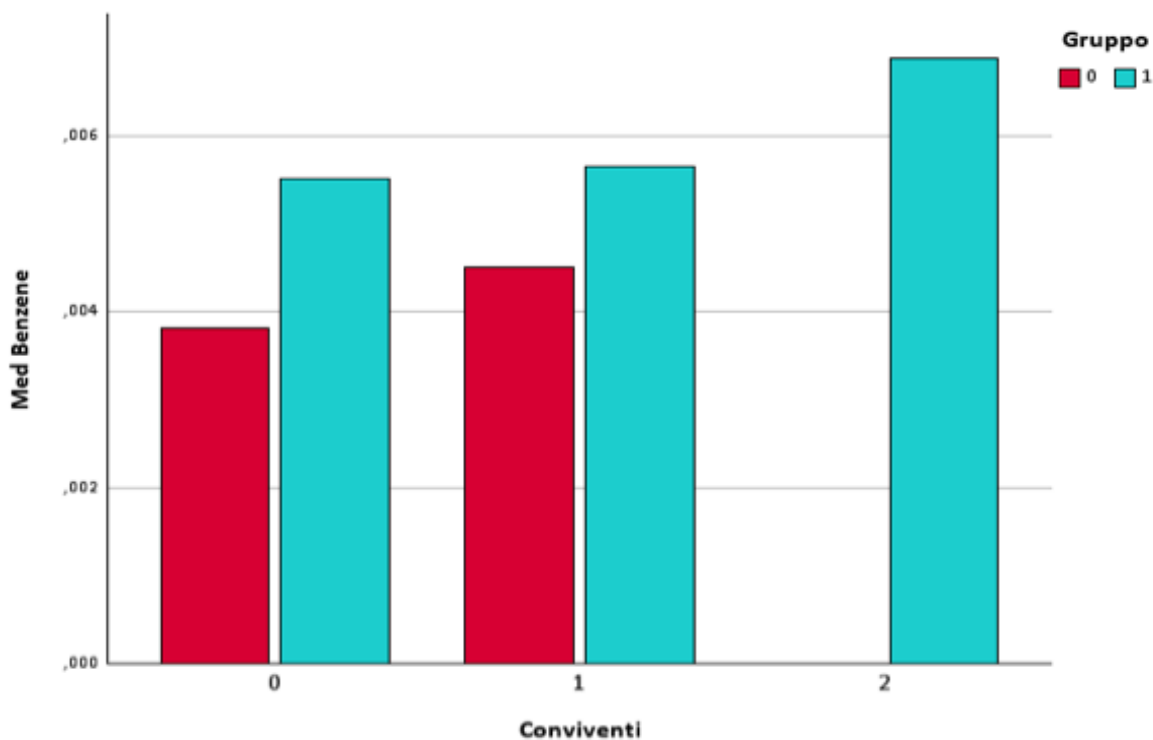


Figura 48 concentrazioni urinarie Benzene e Gruppo 1 soggetti sani, gruppo 2 soggetti asmatici; Fumo dic=0: Non fumatori o ex fumatori; Fumo dic=1: fumatori

Volendo analizzare l'escrezione del benzene e del suo metabolita SPMA nella popolazione pediatrica e non avendo all'interno dei soggetti reclutati dei fumatori attivi, per verificare l'influenza del fumo sui minori non essendo fumatori attivi questi sono stati stratificati, oltre che per stato di salute, anche per dobbiamo usare come discriminando la variabile abbiamo stratificato la popolazione per numero di conviventi fumatori (Figura 47).

Come riportato nei due grafici che riportano le concentrazioni urinarie di SPMA (Figura 47) e di benzene (Figura 48) nella popolazione pediatrica, stratificando per la variabile conviventi fumatori, l'andamento che si osserva è analogo a quello evidenziato nella popolazione adulta stratificando per fumo; essendo fumo passivo e non fumo attivo i livelli di esposizione sono minori e di conseguenza anche le differenze sono meno marcate.

Nella popolazione bambini asmatici non sono presenti soggetti con 2 o più conviventi fumatori, ma l'andamento può essere studiato nella popolazione dei bambini sani che risulta essere più numerosa e quindi anche con sottogruppi statisticamente più significativi.

#### 4.4 Effetto dei polimorfismi

Dopo aver indagato la relazione tra i biomarkers d'effetto, di esposizione e di infiammazione si è passati a studiare l'effetto dei biomarkers di suscettibilità, indagando andando a valutare se è presente un l'effetto delle mutazioni genetiche di alcuni enzimi (GSTT1, GSTM1 e NQO1) coinvolti nella biotrasformazione degli inquinanti sull'escrezione dei metaboliti o degli indicatori di effetto oggetto di questo studio degli inquinanti ambientali.

Questo argomento è molto studiato ed è in grande evoluzione poiché ancora non è stata individuata una chiara correlazione tra le mutazioni, la patologia e gli inquinanti, è comunemente nota la relazione tra mutazioni a carico delle GST di classe M1 e T1 con la patologia asmatica, ma ancora non è stata descritta l'azione sugli inquinanti (Lee et al, 2004)<sup>49</sup>.

Le nostre popolazioni hanno percentuali di mutati confrontabili con la letteratura (vedi tabella 20 e 22 in statistica descrittiva). È importante sottolineare che le percentuali di mutazioni osservate nella popolazione reclutata in questo studio sono diverse tra adulti e bambini. Infatti, la popolazione adulta è tutta di razza caucasica, mentre la popolazione dei bambini confermando quanto riportato dalla letteratura anche per quanto riguarda i bambini dove le

percentuali sono diverse da quelle degli adulti poiché all'interno della popolazione adulta i soggetti reclutati sono tutti di razza caucasica mentre nei bambini non lo è.

L'effetto delle mutazioni agisce all'interno di un sistema già molto complesso ed articolato, quindi non esiste una relazione diretta, ma sono affette da svariati fattori confondenti e quello predominante sembra essere il fumo sia attivo che passivo; in quanto l'esposizione nel caso del fumo è così elevata da coprire gli effetti di un'eventuale mutazione.

Con l'obiettivo di vedere gli effetti delle mutazioni eliminando il bias del fumo la popolazione è stata stratificata per abitudine al fumo, nel caso dei soggetti adulti e per conviventi fumatori nel caso dei bambini (Li et al, 2009)<sup>82</sup>.

Tutte le analisi effettuate non hanno evidenziato differenze significative in base alla caratterizzazione delle mutazioni dei polimorfismi considerati (GSTT1-GSTM1-NQO1), infatti non sussistono differenze in termini di escrezione dei biomarkers tra soggetti mutati e soggetti etero; questa non differenza può essere attribuita al fatto che i polimorfismi considerati sono parte di un sistema metabolico più complesso, con forti interazioni tra i vari enzimi, che potrebbe compensare, in modo più o meno efficiente, la delezione.

Sia l'asma che l'inquinamento sono due fenomeni estremamente eterogeni e l'esposizione a cui siamo sottoposti non è ad una singola sostanza ma ad una miscela di sostanze che possono interagire tra di loro; a questo si aggiungono la complessità metabolica e la varietà polimorfica motivo per cui si pensa che per descrivere al meglio l'effetto delle mutazioni, in futuro, sarebbe opportuno fare un'analisi più globale, sia in termini di mutazioni che in termini di esposizione, e non solo l'indagine della relazione diretta sostanza-polimorfismo.

Ci si riserva quindi in futuro di approfondire questo aspetto per poter fornire una risposta più esaustiva riguardo al meccanismo di questo genere di interazioni.

## 5 Conclusioni

Il peggiorare della qualità dell'aria ha ripercussioni sull'ambiente (eventi metereologici di forte intensità), sul mondo del lavoro e sul costo della vita (agricoltura, qualità e costi dei cibi), ma anche sulla salute della popolazione generale. Le associazioni qualità dell'aria-effetti sulla salute, si basano principalmente su studi osservazionali e di mortalità, andando ad evidenziare un aumento di effetti avversi sulla salute (intesi come riacutizzazioni di patologie croniche, decessi, incidenza di particolari patologie) in relazione ai livelli di inquinamento ottenuti da dati ambientali (come le centraline fisse). A questo tipo di approccio, mancano studi che quantifichino i livelli di inquinamento realmente assorbiti, attraverso la determinazione di indicatori di esposizione, da associare ad indicatori di effetto, intesi come alterazioni biologiche reversibili, in grado di rivelare un potenziale rischio per la salute o una malattia.

L'obiettivo principale di questo studio era la caratterizzazione dei livelli di alcuni indicatori di esposizione a contaminanti ambientali ubiquitari in campioni di urina di soggetti asmatici ed in soggetti sani residenti a Parma.

L'obiettivo secondario era la determinazione, nella stessa popolazione, di indicatori di danno ossidativo e di metilazione agli acidi nucleici, di infiammazione e di suscettibilità, tenendo conto di fattori di confondimento come sesso, età, BMI ed abitudine al fumo.

Poiché la patologia asmatica coinvolge tutte le fasce d'età e la determinazione dei composti oggetto dello studio effettuata in matrici accessibili, come urina e brush boccale, è stato possibile condurre lo studio sia su bambini in età scolare che su adulti in età lavorativa.

Un primo risultato di questo studio è che alcuni indicatori di esposizione ad inquinanti ambientali correlano positivamente con indicatori di danno ossidativo e di metilazione agli acidi nucleici, indipendentemente dallo stato di salute e dall'età.

Un secondo risultato è che i soggetti adulti asmatici eliminano concentrazioni urinarie di indicatori di esposizione ad inquinanti ambientali, indicatori di infiammazione e di danno agli acidi nucleici maggiori rispetto ai soggetti adulti sani, andamento meno evidente nella popolazione dei bambini.

Un terzo risultato rilevante riguarda gli effetti del fumo sugli indicatori di esposizione e di effetto, in particolare è stato osservato che nella popolazione adulta la concentrazione di indicatori di esposizione a benzene è significativamente diversa stratificando la popolazione per patologia e per abitudine al fumo.

I soggetti adulti asmatici fumatori eliminano concentrazioni maggiori di benzene e del suo metabolita rispetto agli adulti sani fumatori e agli adulti non fumatori.

Andamento analogo è stato riscontrato nei bambini stratificando per patologia e numero di conviventi fumatori, per cui è stato osservato che i bambini asmatici con conviventi fumatori eliminano concentrazioni maggiori di benzene ed il suo metabolita rispetto ai bambini sani che non vivono con coabitanti fumatori a dimostrazione che è possibile caratterizzare anche l'esposizione a fumo passivo.

Per quanto i livelli di inquinanti ambientali siano dannosi per la salute si tratta comunque di esposizione cronica a basse dosi motivo per cui con la casistica reclutata non sono stati osservati effetti dei polimorfismi sul profilo di escrezione dei metaboliti.

Studi futuri su patologie differenti o su livelli di inquinamento differenti potrebbero essere utili per descrivere meglio gli effetti delle mutazioni polimorfiche sull'escrezione dei metaboliti degli inquinanti stessi e per caratterizzare meglio le correlazioni tra indicatori di esposizione e di danno ossidativo e metilazione agli acidi nucleici.

## 6 Bibliografia

- (1) Traina, G.; Barbalace, A.; Betti, F.; Bolzacchini, E.; Bonini, M.; Contini, D.; Felice, G.; Foti, T.; Mantecca, P. What Impact of Air Pollution in Pediatric Respiratory Allergic Diseases. *Pediatric Allergy and Immunology* **2020**, *31* (S26).  
<https://doi.org/10.1111/pai.13362>.
- (2) *PARTE PRIMA ((DISPOSIZIONI COMUNI E PRINCIPI GENERALI)) IL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA*.
- (3) Enweasor, C.; Flayer, C. H.; Haczku, A. Ozone-Induced Oxidative Stress, Neutrophilic Airway Inflammation, and Glucocorticoid Resistance in Asthma. *Frontiers in Immunology*. 2021. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.631092>.
- (4) D'Amato, G.; Pawankar, R.; Vitale, C.; Lanza, M.; Molino, A.; Stanziola, A.; Sanduzzi, A.; Vatrella, A.; D'Amato, M. Climate Change and Air Pollution: Effects on Respiratory Allergy. *Allergy, Asthma and Immunology Research*. 2016.  
<https://doi.org/10.4168/aair.2016.8.5.391>.
- (5) Pilger, A.; Rüdiger, H. W. 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine as a Marker of Oxidative DNA Damage Related to Occupational and Environmental Exposures. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 2006. <https://doi.org/10.1007/s00420-006-0106-7>.
- (6) Chatterjee, N.; Walker, G. C. Mechanisms of DNA Damage, Repair, and Mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 2017. <https://doi.org/10.1002/em.22087>.
- (7) Andreoli, R.; Mutti, A.; Goldoni, M.; Manini, P.; Apostoli, P.; De Palma, G. Reference Ranges of Urinary Biomarkers of Oxidized Guanine in (2'-Deoxy)Ribonucleotides and Nucleic Acids. *Free Radic Biol Med* **2011**, *50* (2).  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.11.009>.
- (8) Nakajima, K.; Nakano, T.; Tanaka, A. The Oxidative Modification Hypothesis of Atherosclerosis: The Comparison of Atherogenic Effects on Oxidized LDL and Remnant Lipoproteins in Plasma. *Clinica Chimica Acta*. 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.12.013>.
- (9) Murphy, M. P. How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. *Biochemical Journal*. 2009. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.

- (10) Rowe, L. A.; Degtyareva, N.; Doetsch, P. W. DNA Damage-Induced Reactive Oxygen Species (ROS) Stress Response in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Free Radic Biol Med* **2008**, *45* (8). <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.018>.
- (11) Zou, Z.; Chang, H.; Li, H.; Wang, S. Induction of Reactive Oxygen Species: An Emerging Approach for Cancer Therapy. *Apoptosis*. 2017. <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1424-9>.
- (12) Halliwell, B.; Aruoma, O. I. DNA Damage by Oxygen-Derived Species Its Mechanism and Measurement in Mammalian Systems. *FEBS Letters*. 1991. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80347-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80347-6).
- (13) Grundy, S. M. Oxidized LDL and Atherogenesis: Relation to Risk Factors for Coronary Heart Disease. *Clin Cardiol* **1993**, *16* (1 S). <https://doi.org/10.1002/clc.4960161303>.
- (14) Steinberg, D. Low Density Lipoprotein Oxidation and Its Pathobiological Significance. *Journal of Biological Chemistry*. 1997. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.34.20963>.
- (15) Davies, K. J.; Goldberg, A. L. Proteins Damaged by Oxygen Radicals Are Rapidly Degraded in Extracts of Red Blood Cells. *Journal of Biological Chemistry* **1987**, *262* (17). [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)47553-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)47553-9).
- (16) Cooper, C. E.; Vollaard, N. B.; Choueiri, T.; Wilson, M. T. Exercise, Free Radicals and Oxidative Stress. *Biochemical Society transactions*. 2002. <https://doi.org/10.1042/bst0300280>.
- (17) Stadtman, E. R. Protein Oxidation and Aging. *Free Radic Res* **2006**, *40* (12). <https://doi.org/10.1080/10715760600918142>.
- (18) Levine, R. L.; Oliver, C. N.; Fulks, R. M.; Stadtman, E. R. Turnover of Bacterial Glutamine Synthetase: Oxidative Inactivation Precedes Proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1981**, *78* (4). <https://doi.org/10.1073/pnas.78.4.2120>.
- (19) Fulks, R. M.; Stadtman, E. R. Regulation of Glutamine Synthetase, Aspartokinase, and Total Protein Turnover in *Klebsiella Aerogenes*. *BBA - General Subjects* **1985**, *843* (3). [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(85\)90142-4](https://doi.org/10.1016/0304-4165(85)90142-4).
- (20) Fang, F. C.; Frawley, E. R.; Tapscott, T.; Vázquez-Torres, A. Bacterial Stress Responses during Host Infection. *Cell Host and Microbe*. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.009>.
- (21) Huang, J.; Yu, H.; Guan, X.; Wang, G.; Guo, R. Accelerated Dryland Expansion under Climate Change. *Nat Clim Chang* **2016**, *6* (2). <https://doi.org/10.1038/nclimate2837>.
- (22) Chirizzi, D.; Cesari, D.; Guascito, M. R.; Dinoi, A.; Giotta, L.; Donateo, A.; Contini, D. Influence of Saharan Dust Outbreaks and Carbon Content on Oxidative Potential of Water-Soluble Fractions of PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>. *Atmos Environ* **2017**, *163*. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2017.05.021>.

- (23) Gabassi, P.; Garzitto, M.; Sist, P.; Urbani, R. *Valutazione Della Qualità Della Vita e Stress Ossidativo in Ambiente Urbano Limitrofo a Insediamenti Industriali*; 2016.
- (24) Ibrahim, M. F.; Chung, S. W. Quality of Life of Residents Living near Industrial Estates in Singapore. *Soc Indic Res* **2003**, 61 (2). <https://doi.org/10.1023/A:1021305620042>.
- (25) Sopsuk, J.; Chongsuvivatwong, V.; Sornsrivichai, V.; Hasuwanakit, S. Development and Application of Environmental Quality of Life Scale Among People Residing Near Three Types of Industrial Areas, Southern Thailand. *Soc Indic Res* **2013**, 110 (3). <https://doi.org/10.1007/s11205-011-9961-z>.
- (26) GINA committee. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2023 Update. *Global Initiative for Asthma*. 2023.
- (27) GINA, C. científico de l. Global Strategy for Asthma Management and Prevention ( 2016 Update ). *Guía Gina actualización* **2016**.
- (28) Dharmage, S. C.; Perret, J. L.; Custovic, A. Epidemiology of Asthma in Children and Adults. *Frontiers in Pediatrics*. 2019. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00246>.
- (29) Murray, C.; Wang, H.; Naghavi, M.; Allen, C.; Barber, R.; Bhutta, Z.; Carter, D. Global, Regional, and National Life Expectancy, All-Cause Mortality, and Cause-Specific Mortality for 249 Causes of Death, 1980–2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet* **2016**, 388 (10053).
- (30) Stern, J.; Pier, J.; Litonjua, A. A. Asthma Epidemiology and Risk Factors. *Seminars in Immunopathology*. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00281-020-00785-1>.
- (31) Conrad, L. A.; Cabana, M. D.; Rastogi, D. Defining Pediatric Asthma: Phenotypes to Endotypes and Beyond. *Pediatric Research*. 2021. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-01231-6>.
- (32) Bel, E. H. Clinical Phenotypes of Asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2004. <https://doi.org/10.1097/00063198-200401000-00008>.
- (33) Mims, J. W. Asthma: Definitions and Pathophysiology. *Int Forum Allergy Rhinol* **2015**, 5. <https://doi.org/10.1002/alr.21609>.
- (34) Ober, C.; Yao, T. C. The Genetics of Asthma and Allergic Disease: A 21st Century Perspective. *Immunol Rev* **2011**, 242 (1). <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01029.x>.
- (35) Harb, H.; Renz, H. Update on Epigenetics in Allergic Disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.11.009>.
- (36) Jackson, D. J.; Gangnon, R. E.; Evans, M. D.; Roberg, K. A.; Anderson, E. L.; Pappas, T. E.; Printz, M. C.; Lee, W. M.; Shult, P. A.; Reisdorf, E.; Carlson-Dakes, K. T.; Salazar, L. P.; DaSilva, D. F.; Tisler, C. J.; Gern, J. E.; Lemanske, R. F. Wheezing Rhinovirus Illnesses in

Early Life Predict Asthma Development in High-Risk Children. *Am J Respir Crit Care Med* **2008**, 178 (7). <https://doi.org/10.1164/rccm.200802-309OC>.

- (37) Castro-Rodriguez, J. A.; Forno, E.; Rodriguez-Martinez, C. E.; Celedón, J. C. Risk and Protective Factors for Childhood Asthma: What Is the Evidence? *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice* **2016**, 4 (6). <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2016.05.003>.
- (38) Skorge, T. D.; Eagan, T. M. L.; Eide, G. E.; Gulsvik, A.; Bakke, P. S. The Adult Incidence of Asthma and Respiratory Symptoms by Passive Smoking in Utero or in Childhood. *Am J Respir Crit Care Med* **2005**, 172 (1), 61–66. <https://doi.org/10.1164/rccm.200409-1158OC>.
- (39) Vozoris, N. T.; Stanbrook, M. B. Smoking Prevalence, Behaviours, and Cessation among Individuals with COPD or Asthma. *Respir Med* **2011**, 105 (3). <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2010.08.011>.
- (40) Jung, K. H.; Hsu, S. I.; Yan, B.; Moors, K.; Chillrud, S. N.; Ross, J.; Wang, S.; Perzanowski, M. S.; Kinney, P. L.; Whyatt, R. M.; Perera, F. P.; Miller, R. L. Childhood Exposure to Fine Particulate Matter and Black Carbon and the Development of New Wheeze between Ages 5 and 7 in an Urban Prospective Cohort. *Environ Int* **2012**, 45 (1). <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.03.012>.
- (41) Karvala, K.; Toskala, E.; Luukkonen, R.; Uitti, J.; Lappalainen, S.; Nordman, H. Prolonged Exposure to Damp and Moldy Workplaces and New-Onset Asthma. *Int Arch Occup Environ Health* **2011**, 84 (7). <https://doi.org/10.1007/s00420-011-0677-9>.
- (42) Weiss, S. T. Obesity: Insight into the Origins of Asthma. *Nature Immunology*. 2005. <https://doi.org/10.1038/ni0605-537>.
- (43) Holt, P. G.; Sly, P. D. Viral Infections and Atopy in Asthma Pathogenesis: New Rationales for Asthma Prevention and Treatment. *Nature Medicine*. 2012. <https://doi.org/10.1038/nm.2768>.
- (44) Prokopakis, E.; Vardouniotis, A.; Kawauchi, H.; Scadding, G.; Georgalas, C.; Hellings, P.; Velegarakis, G.; Kalogjera, L. The Pathophysiology of the Hygiene Hypothesis. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2013.04.036>.
- (45) Rosenberg, S. L.; Miller, G. E.; Brehm, J. M.; Celedón, J. C. Stress and Asthma: Novel Insights on Genetic, Epigenetic, and Immunologic Mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.005>.
- (46) Ye, G.; Baldwin, D. S.; Hou, R. Anxiety in Asthma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Psychological Medicine*. 2021. <https://doi.org/10.1017/S0033291720005097>.
- (47) Russell, R. J.; Brightling, C. E. Pathogenesis of Asthma: Implications for Precision Medicine. *Clinical Science*. 2017. <https://doi.org/10.1042/CS20160253>.

- (48) Levy, M. L.; Stephenson, P.; Griffiths, C.; McKinley, R.; Sheikh, A.; Onno van Schayck, C. P.; Bryant, P.; Smith, A.; Holmes, S. Primary Care Respiratory Journal Is Awarded Full Medline/Index Medicus Listing. *Primary Care Respiratory Journal*. 2006.  
<https://doi.org/10.1016/j.pcrj.2006.04.003>.
- (49) Tuomisto, L. E.; Ilmarinen, P.; Kankaanranta, H. Prognosis of New-Onset Asthma Diagnosed at Adult Age. *Respiratory Medicine*. 2015.  
<https://doi.org/10.1016/j.rmed.2015.05.001>.
- (50) Wiencke, J. K.; Pemble, S.; Ketterer, B.; Kelsey, K. T. Gene Deletion of Glutathione S-Transferase  $\Theta$ : Correlation with Induced Genetic Damage and Potential Role in Endogenous Mutagenesis. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* **1995**, 4 (3).
- (51) Anders, M. W.; Dekant, W. Glutathione-Dependent Bioactivation of Haloalkenes. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1998.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.38.1.501>.
- (52) Puga, A.; Nebert, D. W.; McKinnon, R. A.; Menon, A. G. Genetic Polymorphisms in Human Drug-Metabolizing Enzymes: Potential Uses of Reverse Genetics to Identify Genes of Toxicological Relevance. *Critical Reviews in Toxicology*. 1997.  
<https://doi.org/10.3109/10408449709021619>.
- (53) Monks, T. J.; Hanzlik, R. P.; Cohen, G. M.; Ross, D.; Graham, D. G. Quinone Chemistry and Toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* **1992**, 112 (1). [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(92\)90273-U](https://doi.org/10.1016/0041-008X(92)90273-U).
- (54) Bianchi, M. E. Prokaryotic HU and Eukaryotic HMG1: A Kinked Relationship. *Mol Microbiol* **1994**, 14 (1). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb01261.x>.
- (55) Stemmer, C.; Ritt, C.; Igloi, G. L.; Grimm, R.; Grasser, K. D. Variability of Arabidopsis Thaliana Chromosomal High-Mobility-Group-1-like Proteins. *Eur J Biochem* **1997**, 250 (3). <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00646.x>.
- (56) Wittmeyer, J.; Formosa, T. The *Saccharomyces Cerevisiae* DNA Polymerase  $\alpha$  Catalytic Subunit Interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a Protein Similar to an HMG1-Like Protein. *Mol Cell Biol* **1997**, 17 (7). <https://doi.org/10.1128/mcb.17.7.4178>.
- (57) Lotze, M. T.; Tracey, K. J. High-Mobility Group Box 1 Protein (HMGB1): Nuclear Weapon in the Immune Arsenal. *Nature Reviews Immunology*. 2005.  
<https://doi.org/10.1038/nri1594>.
- (58) Bianchi, M. E.; Manfredi, A. A. High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) Protein at the Crossroads between Innate and Adaptive Immunity. *Immunological Reviews*. 2007.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2007.00574.x>.
- (59) Scaffidi, P.; Misteli, T.; Bianchi, M. E. Release of Chromatin Protein HMGB1 by Necrotic Cells Triggers Inflammation. *Nature* **2002**, 418 (6894).  
<https://doi.org/10.1038/nature00858>.

- (60) Phair, R. D.; Scaffidi, P.; Elbi, C.; Vecerová, J.; Dey, A.; Ozato, K.; Brown, D. T.; Hager, G.; Bustin, M.; Misteli, T. Global Nature of Dynamic Protein-Chromatin Interactions In Vivo: Three-Dimensional Genome Scanning and Dynamic Interaction Networks of Chromatin Proteins. *Mol Cell Biol* **2004**, *24* (14). <https://doi.org/10.1128/mcb.24.14.6393-6402.2004>.
- (61) Gardella, S.; Andrei, C.; Ferrera, D.; Lotti, L. V.; Torrisi, M. R.; Bianchi, M. E.; Rubartelli, A. The Nuclear Protein HMGB1 Is Secreted by Monocytes via a Non-Classical, Vesicle-Mediated Secretory Pathway. *EMBO Rep* **2002**, *3* (10). <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf198>.
- (62) Roe, J. S.; Youn, H. D. The Positive Regulation of P53 by the Tumor Suppressor VHL. *Cell Cycle*. 2006. <https://doi.org/10.4161/cc.5.18.3247>.
- (63) Kang, H. J.; Lee, H.; Choi, H. J.; Youn, J. H.; Shin, J. S.; Ahn, Y. H.; Yoo, J. S.; Paik, Y. K.; Kim, H. Non-Histone Nuclear Factor HMGB1 Is Phosphorylated and Secreted in Colon Cancers. *Laboratory Investigation* **2009**, *89* (8). <https://doi.org/10.1038/labinvest.2009.47>.
- (64) Bonaldi, T.; Talamo, F.; Scaffidi, P.; Ferrera, D.; Porto, A.; Bachi, A.; Rubartelli, A.; Agresti, A.; Bianchi, M. E. Monocytic Cells Hyperacetylate Chromatin Protein HMGB1 to Redirect It towards Secretion. *EMBO Journal* **2003**, *22* (20). <https://doi.org/10.1093/emboj/cdg516>.
- (65) Taniguchi, N.; Kawahara, K. ichi; Yone, K.; Hashiguchi, T.; Yamakuchi, M.; Goto, M.; Inoue, K.; Yamada, S.; Ijiri, K.; Matsunaga, S.; Nakajima, T.; Komiyama, S.; Maruyama, I. High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1 Plays a Role in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis as a Novel Cytokine. *Arthritis Rheum* **2003**, *48* (4). <https://doi.org/10.1002/art.10859>.
- (66) Kokkola, R.; Sundberg, E.; Ulfgren, A. K.; Palmblad, K.; Li, J.; Wang, H.; Ulloa, L.; Yang, H.; Yan, X. J.; Furie, R.; Chiorazzi, N.; Tracey, K. J.; Andersson, U.; Harris, H. E. High Mobility Group Box Chromosomal Protein 1: A Novel Proinflammatory Mediator in Synovitis. *Arthritis Rheum* **2002**, *46* (10). <https://doi.org/10.1002/art.10540>.
- (67) Andreoli, R.; Manini, P.; Alinovi, R.; Goldoni, M.; De Palma, G.; Mutti, A. Chronobiological Evaluation of Effect Biomarkers and Sampling. *G Ital Med Lav Ergon* **2005**, *27* (3).
- (68) Alessio, L.; Berlin, A.; Dell'Orto, A.; Toffoletto, F.; Ghezzi, I. Reliability of Urinary Creatinine as a Parameter Used to Adjust Values of Urinary Biological Indicators. *Int Arch Occup Environ Health* **1985**, *55* (2). <https://doi.org/10.1007/BF00378371>.
- (69) Carrieri, M.; Trevisan, A.; Bartolucci, G. B. Adjustment to Concentration-Dilution of Spot Urine Samples: Correlation between Specific Gravity and Creatinine. *Int Arch Occup Environ Health* **2000**, *74* (1). <https://doi.org/10.1007/s004200000190>.

- (70) Burbano, C.; Gómez-Puerta, J. A.; Muñoz-Vahos, C.; Vanegas-García, A.; Rojas, M.; Vásquez, G.; Castaño, D. HMGB1+ Microparticles Present in Urine Are Hallmarks of Nephritis in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Eur J Immunol* **2019**, *49* (2). <https://doi.org/10.1002/eji.201847747>.
- (71) Nakamura, T.; Yoshida, A.; Hatanaka, D.; Kusakari, M.; Takahashi, H.; Katsuragi, S.; Yamada, S.; Kamohara, T. Urinary and Serum Levels of High Mobility Group Box 1. *Pract Lab Med* **2023**, *36*. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2023.e00327>.
- (72) Bowatte, G.; Lodge, C. J.; Knibbs, L. D.; Lowe, A. J.; Erbas, B.; Dennekamp, M.; Marks, G. B.; Giles, G.; Morrison, S.; Thompson, B.; Thomas, P. S.; Hui, J.; Perret, J. L.; Abramson, M. J.; Walters, H.; Matheson, M. C.; Dharmage, S. C. Traffic-Related Air Pollution Exposure Is Associated with Allergic Sensitization, Asthma, and Poor Lung Function in Middle Age. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2017**, *139* (1). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.05.008>.
- (73) Bengalli, R.; Zerboni, A.; Marchetti, S.; Longhin, E.; Priola, M.; Camatini, M.; Mantecca, P. In Vitro Pulmonary and Vascular Effects Induced by Different Diesel Exhaust Particles. *Toxicol Lett* **2019**, *306*. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2019.01.017>.
- (74) Ammar, M.; Bahloul, N.; Amri, O.; Omri, R.; Ghazzi, H.; Kammoun, S.; Zeghal, K.; Ben Mahmoud, L. Oxidative Stress in Patients with Asthma and Its Relation to Uncontrolled Asthma. *J Clin Lab Anal* **2022**, *36* (5). <https://doi.org/10.1002/jcla.24345>.
- (75) Rahman, I. Oxidative Stress and Gene Transcription in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Antioxidant Therapeutic Targets. *Current drug targets. Inflammation and allergy*. 2002. <https://doi.org/10.2174/1568010023344607>.
- (76) Clifford, R. L.; Jones, M. J.; MacIsaac, J. L.; McEwen, L. M.; Goodman, S. J.; Mostafavi, S.; Kobor, M. S.; Carlsten, C. Inhalation of Diesel Exhaust and Allergen Alters Human Bronchial Epithelium DNA Methylation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **2017**, *139* (1). <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.03.046>.
- (77) Ricci, C.; Baumgartner, J.; Wentzel-Viljoen, E.; Smuts, C. M. Food or Nutrient Pattern Assessment Using the Principal Component Analysis Applied to Food Questionnaires. Pitfalls, Tips and Tricks. *Int J Food Sci Nutr* **2019**, *70* (6). <https://doi.org/10.1080/09637486.2019.1566445>.
- (78) Michaeloudes, C.; Abubakar-Waziri, H.; Lakhdar, R.; Raby, K.; Dixey, P.; Adcock, I. M.; Mumby, S.; Bhavsar, P. K.; Chung, K. F. Molecular Mechanisms of Oxidative Stress in Asthma. *Molecular Aspects of Medicine*. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2021.101026>.
- (79) D'Amato, G.; Isabella, A. M.; D'Amato, M. Outdoor Allergens: Pollens and Molds and Their Relationship to Climate Changes. In *Encyclopedia of Respiratory Medicine, Second Edition*; 2021; Vol. 6. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102723-3.00062-7>.

- (80) D'Amato, G.; Chong-Neto, H. J.; Monge Ortega, O. P.; Vitale, C.; Ansotegui, I.; Rosario, N.; Haahtela, T.; Galan, C.; Pawankar, R.; Murrieta-Aguttes, M.; Cecchi, L.; Bergmann, C.; Ridolo, E.; Ramon, G.; Gonzalez Diaz, S.; D'Amato, M.; Annesi-Maesano, I. The Effects of Climate Change on Respiratory Allergy and Asthma Induced by Pollen and Mold Allergens. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2020. <https://doi.org/10.1111/all.14476>.
- (81) Wypych-Ślusarska, A.; Grot, M.; Kujawińska, M.; Nigowski, M.; Krupa-Kotara, K.; Oleksiuk, K.; Głogowska-Ligus, J.; Grajek, M. Respiratory Symptoms, Allergies, and Environmental Exposures in Children with and without Asthma. *Int J Environ Res Public Health* **2022**, *19* (18). <https://doi.org/10.3390/ijerph191811180>.
- (82) Li, Y. F.; Tseng, P. J.; Lin, C. C.; Hung, C. L.; Lin, S. C.; Su, W. C.; Huang, Y. L.; Sung, F. C.; Tai, C. K. NAD(P)H: Quinone Oxidoreductase 1, Glutathione S-Transferase M1, Environmental Tobacco Smoke Exposure, and Childhood Asthma. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* **2009**, *678* (1). <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.06.008>.