

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA PREVENZIONE

XX CICLO (2005-2007)

**VALUTAZIONE NON INVASIVA DELLA DOSE AL
BERSAGLIO E DEGLI EFFETTI DI METALLI
PNEUMOTOSSICI**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Tutor:

Dr. Massimo Corradi

Dottorando:

Matteo Goldoni

A Marcella, l'Amore della mia vita

Alla mia Famiglia

Ad Elena

A Diana e Marzia, perché l'amicizia non ha prezzo

Riassunto

La raccolta e l'analisi del condensato dell'aria espirata (CAE) rappresentano al giorno d'oggi un approccio promettente per lo sviluppo di biomarcatori di esposizione ed effetto di elementi metallici pneumotossici inalati, poiché sono in grado di fornire informazioni complementari al monitoraggio biologico tradizionale effettuato nel sangue e nell'urina. In questo studio, il CAE è stato usato per caratterizzare l'esposizione a Cromo esavalente [Cr(VI)]. Il Cr nel CAE è stato validato come biomarcatore di esposizione, poiché correlava sia con le concentrazioni di Cr ambientali che con biomarcatori di stress ossidativo, come il perossido d'idrogeno e la malondialdeide, misurati nel CAE. Lo sviluppo di un metodo per monitorare Cr(VI) direttamente nel CAE e la sua cinetica di riduzione hanno mostrato una certa variabilità inter-individuale nel potenziale del lining fluid bronco-alveolare di catturare e ridurre elementi pneumotossici inalati a diversi stati di ossidazione. Sono riportati anche alcuni dati sull'esposizione a Nichel ed altri elementi pneumotossici derivanti dal fumo di sigaretta e da ambienti inquinati sono stati misurati nel CAE di soggetti di controllo, asmatici e con bronco-pneumopatia ostruttiva cronica.

PAROLE CHIAVE: condensate dell'aria espirata, Cromo, Nichel, Cadmio, Piombo, biomarcatori di esposizione ed effetto, monitoraggio biologico, dose al bersaglio.

Abstract

Collection and analysis of exhaled breath condensate (EBC) represent today a promising approach to develop biomarkers of exposure and effect of inhaled pneumotoxic metallic elements, thus providing complementary information to traditional biomonitoring performed in blood and urine. In this study, EBC was used to characterize exposure to hexavalent Chromium [Cr(VI)]. Chromium in EBC was validated as biomarker of exposure, owing to its correlation both with air concentrations and EBC biomarkers of oxidative stress, i.e., hydrogen peroxide and malondialdehyde. The development of a method to monitor Cr(VI) in EBC and its reduction kinetics allowed the demonstration of some inter-individual variability in scavenging and reduction potential of broncho-alveolar lining fluid after inhalation of pneumotoxic elements at different oxidation states. Some data are also reported about exposure to nickel and other pneumotoxic elements contained in either tobacco smoke or polluted environments and measured in EBC from controls, asthmatics and patients with chronic obstructive pulmonary disease.

KEYWORDS: exhaled breath condensate, Chromium, Nickel, Cadmium, Lead, biomarkers of exposure and effect, biomonitoring, target dose.

Sommario

| | |
|---|-----------|
| CAPITOLO 1: Introduzione..... | 1 |
| 1. La valutazione del rischio: monitoraggio ambientale e monitoraggio biologico..... | 1 |
| 1.1 I biomarcatori..... | 4 |
| 1.2 Valori di riferimento: limiti biologici per l'esposizione professionale..... | 5 |
| 1.3 Campioni biologici tradizionalmente analizzati..... | 6 |
| 1.3.1 Sangue intero/Siero..... | 6 |
| 1.3.2 Urina..... | 6 |
| 1.3.3 Altre matrici..... | 7 |
| 2. Monitoraggio biologico ed esposizione a metalli..... | 7 |
| 2.1 I metalli nel sangue..... | 8 |
| 2.2 I metalli nell'urina..... | 9 |
| | |
| CAPITOLO 2: Il Condensato dell'Aria Espirata (CAE)..... | 11 |
| 3. Il Condensato dell'Aria Esalata: una nuova prospettiva..... | 11 |
| 3.1 Il condensato dell'aria espirata: meccanismi di formazione..... | 12 |
| 3.2 Dose a livello dell'organo bersaglio delle sostanze pneumotossiche..... | 13 |
| 3.3 Il Condensato dell'Aria Espirata, l'esposizione ed il monitoraggio biologico: una rassegna della letteratura..... | 15 |
| 3.3.1 Elementi e composti non metallici..... | 15 |
| 3.3.1.1 Ozono..... | 15 |
| 3.3.1.2 Toluene..... | 15 |
| 3.3.1.3 Clorurati..... | 15 |
| 3.3.2 Miscele di inquinanti complesse..... | 16 |
| 3.3.2.1 Fumo di sigaretta..... | 16 |
| 3.3.2.2 Particolato ambientale derivante da incendi boschivi..... | 16 |
| 3.3.2.3 Fumo di Saldatura..... | 16 |
| 3.3.3 Elementi e composti metallici..... | 17 |
| 3.3.3.1 Cobalto (Co) e Tungsteno (W)..... | 17 |
| 3.3.3.2 Cromo..... | 17 |
| 3.3.3.3 Elementi metallici nel BAL..... | 18 |
| 3.3.4 Conclusioni..... | 18 |

| | |
|---|-----------|
| CAPITOLO 3: Metalli Pneumotossici | 19 |
| 4. Effetti pneumotossici dei metalli oggetto di questa tesi..... | 19 |
| 4.1 Cromo..... | 19 |
| 4.1.1 Cr(VI): principali impieghi industriali (OSHA, 2006b)..... | 19 |
| 4.1.2 Cr(VI): i valori limite professionali e il monitoraggio biologico tradizionale | 20 |
| 4.1.3 Cromo nel tessuto polmonare di lavoratori esposti e soggetti con tumore al polmone..... | 20 |
| 4.1.4 Speciazione del Cr..... | 21 |
| 4.2 Nichel..... | 21 |
| 4.2.1 Ni: i valori limite professionali e il monitoraggio biologico tradizionale | 22 |
| 4.2.2 Ni e fumo di sigaretta..... | 23 |
| 4.2.3 Ni nel tessuto polmonare..... | 23 |
| 4.3 Cadmio | 24 |
| 4.3.1 Cd: i valori limite professionali e il monitoraggio biologico tradizionale | 25 |
| 4.3.2 Cd e il fumo di sigaretta..... | 26 |
| 4.3.3 Cd nel tessuto polmonare | 26 |
| 4.4 Piombo | 26 |
| 4.4.1 Pb: i valori limite professionali e il monitoraggio biologico tradizionale..... | 27 |
| 4.4.2 Pb e il fumo di sigaretta | 28 |
| 4.4.3 Pb nel tessuto polmonare | 28 |
| | |
| CAPITOLO 4: Parte Sperimentale | 29 |
| 5. Dati Sperimentali: esposizione a Cromo..... | 29 |
| 5.1 L'azienda..... | 29 |
| 5.2 Effetto del Cromo inalato su diversi biomarcatori nel CAE – Allegato I (Caglieri et al., 2006) | 31 |
| 5.2.1 Scopi dello Studio | 31 |
| 5.2.2 Materiali e Metodi..... | 31 |
| 5.2.2.1 Soggetti Arruolati..... | 31 |
| 5.2.2.2 Lo studio | 31 |
| 5.2.2.3 Le misure ambientali..... | 32 |
| 5.2.2.4 Raccolta del CAE..... | 32 |
| 5.2.2.5 Misure di Cr nel CAE e nell'urina | 33 |
| 5.2.2.6 Misure del perossido di idrogeno (H ₂ O ₂) e della malondialdeide (MDA) nel CAE..... | 33 |
| 5.2.2.7 Analisi statistica | 33 |
| 5.2.3 Risultati | 34 |
| 5.3 Determinazione di Cr(VI) nel CAE – Allegato II (Goldoni et al., 2006)..... | 35 |

| | | |
|---------|---|----|
| 5.3.1 | Scopi dello studio..... | 35 |
| 5.3.2 | Materiali e Metodi..... | 35 |
| 5.3.2.1 | Soggetti e raccolta del CAE | 35 |
| 5.3.2.2 | Misure ambientali..... | 35 |
| 5.3.2.3 | Determinazione di Cr totale e di Cr(VI) nel CAE..... | 36 |
| 5.3.2.4 | Analisi statistica | 36 |
| 5.3.3 | Risultati | 36 |
| 5.3.3.1 | Determinazione di Cr(VI) nei campioni ambientali..... | 36 |
| 5.3.3.2 | Determinazione del Cr(VI) nel CAE..... | 37 |
| 5.4 | Un terzo studio confermativo nella stessa azienda (dati non pubblicati)..... | 38 |
| 5.4.1 | Scopo dello studio..... | 38 |
| 5.4.2 | Materiali e Metodi..... | 38 |
| 5.4.3 | Risultati | 38 |
| 5.5 | Cr nel tessuto polmonare e nel CAE di pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in fase precoce – Allegato III (Goldoni et al., 2008) | 40 |
| 5.5.1 | Scopi dello studio..... | 40 |
| 5.5.2 | Materiali e metodi | 40 |
| 5.5.2.1 | Soggetti | 40 |
| 5.5.2.2 | Lo studio | 40 |
| 5.5.2.3 | Misura del Cromo nel CAE e nelle urine..... | 41 |
| 5.5.2.4 | Misura di Cr nel tessuto polmonare | 41 |
| 5.5.2.5 | Misura del rilascio di Cr da parte degli strumenti chirurgici | 41 |
| 5.5.2.6 | Analisi statistica | 41 |
| 5.5.3 | Risultati | 41 |
| 6. | Dati sperimentali: Esposizione a Nichel, Cadmio e Piombo | 43 |
| 6.1 | Effetto del Nichel inalato su diversi biomarcatori nel CAE (Acampa, 2006)..... | 43 |
| 6.1.1 | L'azienda..... | 43 |
| 6.1.2 | Materiali e Metodi..... | 43 |
| 6.1.2.1 | Soggetti e Studio | 43 |
| 6.1.2.2 | Analisi statistica | 44 |
| 6.1.3 | Risultati | 44 |
| 6.2 | Nichel, Cadmio e Piombo esalati in fumatori e non-fumatori asintomatici, asmatici e soggetti affetti da BPCO – Allegato IV (Mutti et al., 2006) | 46 |
| 6.2.1 | Scopi dello studio..... | 46 |
| 6.2.2 | Materiali e metodi | 46 |
| 6.2.2.1 | Soggetti | 46 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 6.2.2.2 | Raccolta del CAE ed analisi..... | 46 |
| 6.2.2.3 | Analisi statistica | 46 |
| 6.2.3 | Risultati | 47 |
| CAPITOLO 5: Discussione | | 48 |
| 7. | Esposizione a Cromo | 48 |
| 7.1 | Il Cromo nel condensato dell'aria espirata e biomarcatori di effetto | 48 |
| 7.2 | Speciazione del Cromo nel condensato dell'aria esalata..... | 49 |
| 7.3 | Una simulazione sulla cinetica di esalazione del Cr sulla base dei nostri dati..... | 51 |
| 7.4 | Un modello che riassume i tre studi..... | 52 |
| 7.5 | Validazione del Cromo nel condensato dell'aria espirata come biomarcatore di esposizione – soggetti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule..... | 53 |
| 8. | Esposizione a Nichel..... | 55 |
| 8.1 | Il Nichel nel condensato dell'aria espirata e biomarcatori di effetto: dati preliminari.... | 55 |
| 9. | Esposizione a Cadmio e Piombo..... | 56 |
| 10. | Conclusioni | 57 |
| CAPITOLO 6: Le Prospettive | | 59 |
| 11. | Messa a punto di un sistema per lo studio on-line della cinetica respiratoria di particelle aerodisperse..... | 59 |
| 11.1 | I modelli con Aerosol..... | 59 |
| 11.2 | Deposizione di particelle ambientali..... | 60 |
| 11.3 | Fumo di sigaretta e gas di scarico delle auto..... | 60 |
| 11.4 | Studio on-line della cinetica respiratoria di particelle aerodisperse..... | 61 |
| 11.5 | Il punto di partenza: il sistema di Invernizzi et al., 2006 | 62 |
| 11.6 | Il nostro sistema | 62 |
| 11.7 | Prove preliminari..... | 63 |
| 11.8 | Conclusioni | 64 |
| 12. | Bibliografia | 65 |
| 13. | Tabelle..... | 86 |
| 14. | Figure | 99 |
| Appendice: altre attività del triennio 2005-2007..... | | 135 |
| Altre attività e pubblicazioni, Anno 2005 | | 135 |
| Pubblicazioni più rilevanti a livello internazionale..... | | 135 |
| Pubblicazioni scientifiche nazionali..... | | 136 |

| | |
|--|-----|
| Congressi Nazionali ed Internazionali: partecipazioni e posters..... | 136 |
| Altre attività e pubblicazioni, Anno 2006 | 138 |
| Pubblicazioni più rilevanti a livello internazionale..... | 138 |
| Partecipazioni a Congressi Nazionali ed Internazionali..... | 139 |
| Altre attività e pubblicazioni, Anno 2007 | 141 |
| Pubblicazioni più rilevanti a livello internazionale..... | 141 |
| Pubblicazioni nazionali | 142 |
| Congressi Nazionali ed Internazionali: partecipazioni e posters..... | 142 |
| | |
| Allegato I..... | I |
| Allegato II..... | II |
| Allegato III..... | III |
| Allegato IV..... | IV |

CAPITOLO 1: Introduzione

Noi tutti siamo esposti nella vita quotidiana a migliaia di sostanze chimiche, sia d'origine naturale che prodotte dall'uomo. Queste sostanze sono presenti nell'aria che respiriamo, nel cibo che mangiamo e nell'acqua che beviamo, e la loro concentrazione può essere particolarmente critica sul luogo di lavoro. L'esposizione a tali sostanze può essere piuttosto complessa, essendo numerose le possibili potenziali sorgenti. Tra queste sostanze, particolare rilievo hanno gli elementi metallici, ossia quei composti della tavola periodica che hanno gli orbitali esterni insaturi e tendono a formare ioni positivi. Essi comprendono i metalli alcalini (gruppo IA), i metalli alcalino-terrosi (gruppo IIA), gli elementi di transizione o metalli del blocco d (dal IIIB-VIIB/VII/IB-IIB), Lantanidi, Attinidi e alcuni elementi dei gruppi IIIA-VIA, detti anche metalloidi o metalli del blocco p con caratteristiche più ibride (**Figura 1**). Oltre al fatto che molti fra essi sono elementi essenziali per la vita sulla terra, alcuni sono stati oggetto di numerosissimi studi scientifici e rappresentano per la medicina occupazionale ed ambientale e per la tossicologia un campo di vasto interesse. Questo perché moltissime attività umane di tipo industriale e non solo liberano nell'aria, nell'acqua e quindi nel cibo quantità non trascurabili di metalli e l'esposizione professionale od occasionale ad alcuni di essi è stata associata a specifici sintomi e malattie, tra cui il cancro. Ecco quindi che lo studio dei meccanismi di tossicità dei metalli e della relazione esistente tra dose accumulata ed effetti rappresenta oggi un punto fermo della biologia e della medicina sperimentale. Ogni metallo ha, infatti, alta affinità per specifici siti di legame sulle macromolecole biologiche (proteine e DNA *in primis*) e per i metalli tossici la reattività nel formare tali legami e la conseguente capacità di indurre processi irreversibili a livello molecolare modulano la tossicità caratteristica di ognuno di essi. Di conseguenza, gli effetti indotti dai metalli tossici sono assai vari: possono essere effetti sistemici irritanti, acuti o cronici, effetti teratogeni, mutageni e cancerogeni e possono coinvolgere diversi organi e apparati, tra i quali spiccano le vie aeree e i polmoni, il sito bersaglio dei metalli introdotti nell'organismo per via inalatoria.

1. La valutazione del rischio: monitoraggio ambientale e monitoraggio biologico

Come recentemente ricordato nelle linee guida sul monitoraggio biologico della Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale (Mutti, 2006), la valutazione del

rischio consiste nel caratterizzare i potenziali effetti nocivi dell'esposizione umana a rischi ambientali attraverso quattro passaggi fondamentali:

- Identificazione degli agenti potenzialmente rischiosi, con successiva valutazione se essi possano essere causa di danno per la salute.
- Definizione della/e relazione/i dose-risposta, per studiare la relazione tra l'entità della dose o il livello di esposizione all'agente di rischio, e la prevalenza di un determinato effetto avverso nella popolazione esposta.
- Valutazione dell'esposizione, stimata in modo qualitativo o quantitativo (monitoraggio ambientale e biologico, rispettivamente).
- Caratterizzazione del rischio, ossia una stima della probabilità e della gravità di eventuali effetti nocivi in una popolazione esposta ad una determinata dose.

Senza approfondire tutti i passaggi della valutazione del rischio, ci soffermeremo in particolare sul terzo punto e sulla definizione di monitoraggio ambientale e biologico. In entrambe le attività, il termine "monitoraggio" mette in evidenza la periodicità delle misure effettuate, ossia la necessità di fare campionamenti in diversi momenti temporali per tenere conto dell'andamento dei livelli di esposizione in funzione di sopraggiunte variazioni nell'ambiente lavorativo o nei processi produttivi.

Per monitoraggio ambientale (MA) s'intende una misura periodica di un inquinante ambientale nell'ambiente di interesse, con lo scopo di confrontare i dati ottenuti con appropriati valori standard (Mutti, 2006). Tale misura rappresenta una concentrazione media pesata nel tempo (per esempio, durante 8 ore lavorative) di una sostanza chimica nell'aria o in altre matrici ambientali (acqua, cibo, terreno, ecc) ed è una fase necessaria per identificare le sorgenti di esposizione e per facilitare le misure utili per minimizzare le emissioni (Angerer et al., 2007).

Per quanto riguarda il monitoraggio biologico (MB), sarà utile riprendere le definizioni date da più autori in modo da comprenderne nel modo più completo possibile la complessità. Il MB tradizionalmente è definito come la misura periodica di un composto tossico o dei suoi metaboliti in matrici biologiche accessibili, allo scopo di confrontare i livelli misurati con opportuni standard di riferimento (Manini et al., 2007; Mutti, 2006). Allo stesso modo, il MB è visto come un'attività continua o ripetitiva ma sistematica di raccolta di campioni biologici, per l'analisi in essi di inquinanti, metaboliti o specifici parametri che descrivono effetti biologici avversi per un'applicazione immediata, allo

scopo di valutare l'esposizione e i rischi per la salute della popolazione esposta in esame, confrontando i dati ottenuti con appositi riferimenti e, se necessario, impostare azioni correttive (Angerer et al., 2007). Il MB, se condotto accuratamente, può fornire un'immagine nitida della quantità della sostanza tossica in esame realmente assorbita dall'organismo (dose interna). Grazie allo sviluppo tecnologico nel campo della chimica analitica, è oggi possibile arrivare a quantificare concentrazioni straordinariamente basse di sostanze tossiche nelle matrici biologiche, fino ad una parte per trilione/quadrilione (Paustenbach and Galbraith, 2006). Infine, il BM può essere propriamente diviso in tre categorie (Jakubowski and Trzcinka-Ochocka, 2005):

- Monitoraggio biologico dell'esposizione: semplicemente la determinazione di una sostanza o di suoi metaboliti in un campione biologico.
- Monitoraggio biologico degli effetti: quantificazione degli effetti biologici non avversi e reversibili.
- Monitoraggio biologico della dose effettiva: misura della quantità di una sostanza tossica che interagisce con uno specifico bersaglio ("target").

Quasi tutti gli autori concordano che MA ed MB siano attività complementari in quasi tutte le attività di valutazione del rischio. Il MB è in grado di fornire informazioni essenziali per una corretta definizione dell'esposizione a composti tossici e l'uso d'indicatori biologici deve essere considerato un elemento centrale nella valutazione del rischio (Mutti, 2006). Di fatto, le misure di MA e di MB servono a quantificare rispettivamente l'esposizione e la dose assorbita. Tuttavia, in certi casi il MB viene considerato solo secondario al MA per diversi motivi (Jakubowski and Trzcinka-Ochocka, 2005): si ritiene che MB sia più costoso di MA, e l'utilizzo di alcuni campioni biologici, come il sangue, può non essere accettato da tutti i lavoratori per ragioni etiche. Inoltre, la pianificazione del MB è più complessa del MA, in quanto bisogna tener conto della tossicocinetica e del metabolismo delle specifiche sostanze tossiche all'interno dell'organismo per decidere quali campioni biologici raccogliere e a che tempi. In alcuni paesi, poi, non è stato deciso se il MB sia una parte dell'igiene industriale o della medicina del lavoro, con ovvi conflitti di competenze. Infine, i valori di riferimento esistono al momento solo per un numero relativamente basso di sostanze, anche se i metalli sono ben coperti e i limiti di riferimento esistono per quasi tutti quelli più tossici.

1.1 I biomarcatori

Il termine “biomarcatore” è un termine generico che indica un composto legato all’interazione tra un sistema biologico ed un agente ambientale (Jakubowski and Trzcinka-Ochocka, 2005). In accordo con l’International Program of Chemical Safety (ICPS) (IPCS, 1993), possono essere identificate tre classi di biomarcatori:

- Biomarcatore di Esposizione: una sostanza esogena, od un suo metabolita, oppure il prodotto di un’interazione tra un agente xenobiotico e alcune molecole bersaglio a livello cellulare misurati in uno specifico comparto o campione biologico proveniente dall’organismo. I livelli di biomarcatori di esposizione tradizionalmente misurati, come vedremo nei paragrafi successivi, hanno il limite di rappresentare una dose sistemica e non danno informazioni sul sito da cui la sostanza tossica entra, come per esempio i polmoni per le sostanze che vengono inalate (Aitio, 2006).
- Biomarcatore di effetto: un’alterazione biochimica, fisiologica, comportamentale o altro che sia misurabile in un organismo e che, in base alla sua intensità, possa essere associata ad una determinata o possibile malattia o danno alla salute. Sebbene sia molto utile dosare tali marcatori per un corretto e completo MB, spesso alcuni di essi hanno il limite che non esistono standard di riferimento e anche le metodiche utilizzate non sono sufficientemente validate (Aitio, 2006). Infine, in alcuni casi essi non possiedono sufficiente specificità, in quanto fattori interferenti diversi dalla sostanza tossica in esame possono alterarne le concentrazioni nei campioni biologici.
- Biomarcatore di suscettibilità: un indicatore dell’abilità preesistente o acquisita di un organismo di rispondere allo stimolo derivante dall’esposizione ad una specifica sostanza xenobiotica.

Di solito, la determinazione dei primi due tipi di biomarcatori viene riconosciuta come parte delle attività svolte durante il MB. Tuttavia, l’utilizzo del terzo marcatore nella pratica è poco utilizzato, perché prevede lo screening genetico di ben determinati indicatori di suscettibilità spesso specifici per ogni sostanza e, oltre a creare problemi etici, ossia una possibile discriminazione in ambienti di lavoro a causa del proprio patrimonio genetico, al momento non possiede un valore predittivo sufficiente alto (Jakubowski and Trzcinka-Ochocka, 2005).

1.2 Valori di riferimento: limiti biologici per l'esposizione professionale

Tralasciamo in questo contesto il caso in cui siano note per una data sostanza tossica le relazioni dose-effetto e dose-risposta, in quanto il caso è riferibile ad oggi solo a poche sostanze. In tal caso, i valori limite biologici (BLV) sono estrapolati da tali relazioni e i dati sono interpretabili dal punto di vista probabilistico anche a livello individuale. Peraltro, l'argomento è stato ampiamente discusso negli ultimi anni (Manini et al., 2007; Mutti, 2006).

Nella maggior parte dei casi, la relazione dose-risposta è non nota o comunque, non è possibile interpretare i dati a livello individuale. Tuttavia, è nota in molti casi la relazione esposizione-dose interna e in alcuni casi la relazione esposizione-effetto. In questi casi, è possibile estrapolare da tali relazioni un livello "medio" per un dato indice biologico (per esempio, la dose interna) in un gruppo di soggetti esposti a concentrazioni ambientali corrispondenti al limite di esposizione occupazionale (OEL) (Manini et al., 2007; Mutti, 2006). In questo caso, dunque, i BLV sono ricavati dagli OEL. E' per esempio il caso dell'American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), che ricava i propri "Biological Exposure Indices" (BEI®) dai corrispondenti valori limiti di soglia (TLV®) di esposizione, con poche eccezioni (ACGIH, 2004). In tal caso, l'interpretazione dei dati derivanti dal monitoraggio biologico è possibile solo a livello di gruppo (Manini et al., 2007; Mutti, 2006). In questa logica, il gruppo di lavoratori deve essere omogeneo in termini di esposizione e mansioni lavorative e le misure ripetute per lo stesso individuo possono essere trattate come valori medi di dati collettivi. E' quindi possibile avere occasionalmente valori che superino il BEI®, mentre un intervento per ridurre l'esposizione è tendenzialmente necessario se il BEI® è superato per un periodo di tempo relativamente lungo o da un gruppo numeroso all'interno della popolazione esposta sotto esame. A causa della variabilità interindividuale, la corrispondenza tra BEI® e TLV® è fatta sulla base dei valori medi, pertanto il valore di BEI® protegge solo il 50% dei soggetti esposti (Manini et al., 2007; Mutti, 2006). Dal punto di vista statistico, sarebbe più corretto e sicuro estrapolare il limite inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% del BEI®, ma in pratica questo non è realizzabile per l'eccessiva variabilità dei dati a disposizione (Manini et al., 2007; Mutti, 2006).

Infine, ricordiamo anche i valori di tolleranza biologica per esposizione professionale tedeschi, detti BAT (Biologischer Arbeitsstoff-Toleranz WER) della Deutsche

Forschungsgemeinschaft (DFG, 2004). Essi sono una via di mezzo tra i BEI® e i BLV calcolati sulla base degli effetti osservati per la salute. Essi sono calcolati in relazione alle massime concentrazioni ammissibili sui luoghi di lavoro (MAK, dal Tedesco) e possono essere definiti come “la quantità massima permessa di una sostanza tossica o dei suoi metaboliti o la massima deviazione permessa dalla normalità di un parametro biologico indotte da tale sostanza nell’uomo”. I BAT possono perciò essere considerati dei valori di soglia per gl’individui sani e perciò dovrebbero essere superiori ai valori di BEI® (Manini et al., 2007; Mutti, 2006).

1.3 Campioni biologici tradizionalmente analizzati

Con lo sviluppo e il miglioramento dei sistemi d’analisi, oggi è possibile rilevare in tracce nei campioni biologici quasi tutti gli inquinanti ambientali conosciuti. Tuttavia, per questioni pratiche ed etiche le matrici biologiche tradizionalmente usate sono due: sangue e urina.

1.3.1 Sangue intero/Siero

Il sangue è largamente usato in quanto è facile da raccogliere senza provocare particolari disagi ai soggetti oggetto dello studio ed è inoltre una delle vie principali attraverso le quali le sostanze tossiche e i loro metaboliti vengono trasportati all’interno dell’organismo. Il prelievo però rappresenta alcuni limiti: eticamente può non essere accettato da tutti e, poiché la vita media dei globuli rossi è circa 90-120 giorni, l’esposizione pregressa ad alcune sostanze tossiche potrebbe essere sottostimata (Paustenbach and Galbraith, 2006). Aggiungerei che, come detto in precedenza, il sangue fornisce informazioni sulla dose sistemica e non sulla dose al bersaglio, ed inoltre il prelievo va effettuato tenendo conto della tossicocinetica e del metabolismo della sostanza tossica presa in esame.

1.3.2 Urina

La raccolta dell’urina è spesso il metodo preferito nei programmi di MB, ma in alcuni casi non fornisce risultati ripetibili ed affidabili su alcuni biomarcatori di esposizione. In particolare, spesso nell’urina è possibile dosare i metaboliti, ma non le sostanze tossiche tali e quali. Questo ovviamente vale per soprattutto per i composti tossici volatili, altamente reattivi e che vengono metabolizzati dall’organismo. Inoltre, sull’urina influiscono maggiormente diversi fattori: a) l’influenza di confondenti non derivanti

dall'esposizione, per esempio il fumo di sigaretta e le abitudini alimentari; b) la tossicocinetica d'escrezione per via urinaria, che è spesso la più lenta, ed in alcuni casi, per vedere un'esposizione è necessario raccogliere il campione urinario nelle 24 ore piuttosto che in un determinato istante; c) per l'urina è necessario un fattore di normalizzazione, che di solito è rappresentato dalla creatinina. Tuttavia, non tutti gli autori concordano con tale scelta e in alcuni casi si decide di normalizzare per altri fattori (per esempio, la densità) o di non normalizzare per nulla. La scelta o meno del fattore di normalizzazione può dipendere anche dalla tossicocinetica del composto in esame e/o dalle sue caratteristiche chimico/fisiche (per esempio, la volatilità). Di contro, la raccolta dell'urina è totalmente non invasiva ed è perciò adatta a studi su vasta scala (Paustenbach and Galbraith, 2006).

1.3.3 Altre matrici

Altre matrici che sono state sperimentate nel corso degli anni sono il tessuto adiposo, i capelli, il latte materno, la saliva e lo sputo, l'aria esalata. Sebbene alcune di queste matrici siano usate in alcuni casi (per esempio, i capelli nell'esposizione a Mercurio), al momento sono scarsamente utilizzate nella pratica del MB principalmente per problemi di standardizzazione e ripetibilità delle misure, oltre alla totale assenza di valori di riferimento (Paustenbach and Galbraith, 2006).

2. Monitoraggio biologico ed esposizione a metalli

La medicina occupazionale ed ambientale tradizionalmente si occupa di esposizione a metalli, tanto che alcuni autori fanno risalire all'inizio del secolo con il lavoro della dottoressa Alice Hamilton su minatori intossicati da Piombo la moderna medicina occupazionale negli USA (Krantz and Dorevitch, 2004). Inoltre, l'utilizzo di vari metalli in attività industriali e artigianali è cominciato migliaia di anni fa. Tale attenzione per i metalli è giustificata dai tantissimi casi di esposizione negli ambienti di lavoro e nell'ambiente in generale e dall'evidenza di effetti biologici e tossici di alcuni di essi, tra cui ricordiamo: Piombo (Pb), Berillio (Be), Manganese (Mn), Arsenico (As), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Mercurio (Hg), Cobalto (Co) e Nichel (Ni). Inoltre, la loro determinazione in matrici biologiche umane (sangue e urina su tutte) e il loro conseguente utilizzo come biomarcatori di esposizione ed indicatori di dose interna è uno dei pilastri del tradizionale MB, grazie all'utilizzo di una strumentazione scientifica adeguata per quantificare i metalli in tracce, partendo dall'assorbimento atomico

elettrotermico (ETAAS) fino ad arrivare alla moderna “Inductively coupled plasma mass spectrometry” (ICP-MS). Per molti metalli, infatti, esistono protocolli specifici e circuiti di qualità che garantiscono la totale affidabilità delle misure effettuate (Apostoli, 2002).

2.1 I metalli nel sangue

In generale, le vie preferenziali di esposizione a metalli sono per inalazione e per ingestione, mentre l’assorbimento cutaneo è più raro. In **Figura 2** è rappresentato uno schema generale dell’esposizione e delle possibili vie metaboliche per gli elementi. Si tenga presente che le vie aeree sono a diretto contatto con le particelle inalate dall’ambiente, e sono probabilmente il bersaglio primario di molti metalli. Come vedremo più approfonditamente in seguito, infatti, l’esposizione a diversi metalli è associata ad un aumentato rischio di sviluppare il cancro al polmone, tanto più che alcuni di essi (Piombo, Nichel, Cadmio, tanto per citare i più importanti) sono presenti anche nel fumo di sigaretta (Chiba and Masironi, 1992; Kalcher et al., 1993; Stavrides, 2006; Torjussen et al., 2003).

I campioni biologici più usati per misure puntiformi o ripetute sono sicuramente sangue ed urina, nei quali sono riportati in letteratura diversi riferimenti standard (Mutti, 2006). Altri campioni sono stati usati (capelli, peli, denti, ossa, pezzi di tessuto di diversi organi, in particolare i polmoni), ma in genere con scopi ben precisi ed intenti più sperimentali che legati ad analisi di routine (Apostoli, 2002).

I livelli di metalli nel sangue sono in genere influenzati dall’ultima esposizione con conseguente assorbimento, dalla loro tossicocinetica e distribuzione e dalla loro velocità d’escrezione. L’assorbimento dei metalli o dei composti contenenti metalli inalati dipende da molti processi, quali la deposizione, che varia a seconda delle dimensioni delle particelle inalate, la clearance muco-ciliare ed alveolare, la solubilizzazione, e la reattività chimica. Dopo la deposizione in vari tratti delle vie aeree, parte dei metalli è trasportata dall’azione muco-ciliare nel tubo gastro-enterico. Le particelle contenenti metalli possono però anche essere fagocitate dai macrofagi e accumulate nell’epitelio tracheo-bronchiale e alveolare, dove possono perdurare per lungo tempo, o essere trasportate nell’interstizio. La velocità e la ripartizione di tali fenomeni varia notevolmente da metallo a metallo e il passaggio nel sangue può essere relativamente breve (per esempio, vapori di Mercurio o ossido di Piombo) o relativamente lungo (per

esempio, ossido di Cadmio) (citati da Apostoli, 2002). Senza soffermarci sull'assorbimento gastro-enterico dei metalli, ricordiamo che nel sangue i metalli sono in genere legati ai globuli rossi (Piombo e Cadmio, per esempio) o alle proteine del plasma, tra le quali sicuramente la più importante è l'albumina. Esistono però molte altre proteine specifiche di trasporto che variano a seconda del metallo (Apostoli, 2002). La frazione di metalli legata alle proteine del plasma è sicuramente quella che viene trasportata con più facilità fuori e dentro dagli organi vitali, ma la frazione diffusibile (metalli in forma ionica e non legata a nulla) è quella che tende ad avere una distribuzione più uniforme e a seguire il gradiente di concentrazione nei diversi compartimenti (Apostoli, 2002). L'affinità tra i metalli e bersagli specifici nelle cellule del tessuto determina la concentrazione di ogni dato metallo a livello dell'organo bersaglio o nei tessuti molli, determinando quindi l'effetto tossico *in situ*. Teniamo però conto che in certi casi i siti di legame possono essere importanti per il motivo opposto, ossia per neutralizzare gli effetti tossici del metallo.

La frazione metallica legata alle proteine del plasma può persistere molto a lungo, per cui la concentrazione di alcuni metalli può diminuire nel plasma molto lentamente.

2.2 I metalli nell'urina

L'urina è sicuramente la matrice biologica più usata per caratterizzare l'esposizione a metalli. Pur essendo l'urina un liquido d'escrezione, bisogna dire che eventuali danni renali provocati dall'esposizione stessa possono provocare fluttuazioni nelle concentrazioni urinarie di metalli, come nel caso del Cadmio e del Mercurio, la cui escrezione aumenta a causa di danni all'epitelio tubulare (citato da Apostoli, 2002; Bernard, 2004). I meccanismi che determinano la presenza di metalli nell'urina sono legati alla filtrazione dei glomeruli e alla clearance renale. Tali meccanismi sono noti per diversi metalli.

La frazione diffusibile di metalli plasmatica e quella legata a proteine e/o peptidi di massa sufficientemente piccola per superare la membrana glomerulare sono escrete nell'urina. I metalli filtrati possono poi essere direttamente escreti o riassorbiti a livello del tubulo prossimale, come nel caso del Piombo. In casi specifici (Cadmio, Mercurio), l'escrezione avviene per esfoliazione delle cellule epiteliali (citato da Apostoli, 2002).

E' possibile studiare la cinetica d'escrezione dei metalli in modo accurato, se i campioni di urina sono raccolti per tempi ragionevolmente lunghi (da 6 a 24 ore). Tuttavia, per chiare ragioni pratiche, in genere la determinazione dei metalli urinari è fatta su campioni estemporanei raccolti in determinati momenti del ciclo lavorativo (spesso il venerdì ad inizio turno e alla fine del turno). L'esposizione è poi valutata in base al confronto con valori di riferimento standard, che esistono per molti metalli (Mutti, 2006).

Bisogna infine ricordare che la variabilità della concentrazione urinaria dei metalli, dovuta allo stato fisiologico, è in genere ridotta attraverso una normalizzazione per la creatinina urinaria (pratica standard) (Mutti, 2006) e in certi casi per la gravità specifica, anche se manca ancora una standardizzazione definitiva (Barr et al., 2005; Mason et al., 1998).

CAPITOLO 2: Il Condensato dell'Aria Espirata (CAE)

3. Il Condensato dell'Aria Esalata: una nuova prospettiva

Gli eventi patofisiologici che avvengono a livello polmonare sono tradizionalmente studiati attraverso tecniche a media o alta invasività, come la raccolta dello sputo indotto o la broncoscopia, con la raccolta del fluido bronco-alveolare (BAL) (Caramori et al., 2005; McGarvey et al., 2002; Metso et al., 2002; Vatrella et al., 2007). Tuttavia, la loro invasività rappresenta un limite per un uso di routine nella pratica clinica. Inoltre, la reazione infiammatoria che esse stesse inducono può avere un effetto significativo nella raccolta di campioni ripetuti nel tempo, riducendo notevolmente la loro applicabilità nel campo del monitoraggio biologico (Antczak et al., 2005).

L'analisi dell'aria esalata ha fornito risultati interessanti nell'identificazione di nuovi biomarcatori di processi patofisiologici e infiammatori polmonari, sia utilizzando l'aria esalata in fase di vapore che condensandola a basse temperature, ottenendo un condensato dell'aria esalata (CAE) (Corradi and Mutti, 2005; Kharitonov and Barnes, 2006; Rahman and Kelly, 2003). Tale analisi ha il vantaggio che la raccolta dell'aria esalata in entrambe le fasi (vapore-liquido) è estremamente facile da fare, non è invasiva, soprattutto per soggetti con malattie polmonari, e permette la raccolta di campioni ripetuti nel tempo, non provocando fenomeni infiammatori secondari (Horvath et al., 2005; Poli et al., 2005). Infine, essa non necessita di stimolazioni preventive o l'utilizzo di liquidi di lavaggio, come nel caso dello sputo indotto e del BAL, rispettivamente.

Se da un lato l'aria esalata è stata utilizzata per la valutazione delle concentrazioni di composti organici volatili in soggetti esposti ad inquinanti ambientali (Amorim and de Cardeal, 2007; Chen et al., 2002; Egeghy et al., 2002; Ghittori et al., 2004; Maniscalco et al., 2006; Ong et al., 1991; Periago et al., 1992; Prado et al., 1997; Thrall et al., 2001; Wilson and Monster, 1999), il CAE dall'altro è un fluido ancora relativamente poco studiato in campo ambientale ed occupazionale (Mutti and Corradi, 2006). La tecnica di raccolta del CAE ha infatti il grosso vantaggio di essere totalmente non invasiva e di essere perfettamente tollerata senza disagi dai soggetti in esame (Corradi and Mutti, 2005).

Tra le molecole dosate con maggior frequenza nel CAE ricordiamo il perossido d'idrogeno, alcuni prodotti della perossidazione lipidica (malondialdeide e sostanze reattive dell'acido tiobarbiturico, TBARS), le prostaglandine, l'8-isoprostano, i leucotrieni e diverse citochine (Horvath et al., 2005). Grazie alle sue caratteristiche, il CAE è particolarmente adatto allo studio della valutazione del rischio, dove la maggior parte degli studi vengono effettuati su pazienti asintomatici (Mutti and Corradi, 2006). In più, poiché le sostanze tossiche inalabili possono agire a livello locale sui polmoni, il CAE, che contiene molecole derivanti dalle vie aeree, può essere estremamente utile per caratterizzare la dose al bersaglio a livello polmonare, oltre che relazionare le concentrazioni di biomarcatori di esposizione locale e diversi biomarcatori di effetto (Mutti and Corradi, 2006). Questi ultimi, infatti, possono fornire un quadro di alcuni dei cambiamenti biochimici che interessano le vie aeree dopo esposizione acuta e/o cronica anche in assenza di sintomi o effetti sui parametri respiratori normalmente monitorati (FEV1 e FVC su tutti) (Horvath et al., 2005).

Per le sue caratteristiche e per il basso effetto-matrice, il CAE è il fluido ideale per la misurazione di elementi in tracce, in particolare degli elementi di transizione. Per questo motivo, il CAE può essere utile nella valutazione dei livelli di metalli pneumotossici ed essenziali a livello dell'organo bersaglio.

3.1 Il condensato dell'aria espirata: meccanismi di formazione

Il CAE, che si ottiene raffreddando l'aria esalata a temperature al di sotto di 0 °C, è composto fondamentalmente da acqua, nella quale sono dissolte sostanze semi-volatili e non volatili. Se le sostanze volatili e semi-volatili sono esalate sotto forma di vapore a causa della loro relativamente alta pressione di vapore alla temperatura fisiologica, le sostanze non volatili presenti nel CAE, come i sali e le proteine, sono probabilmente esalate a causa di processi convettivi all'interno di piccole goccioline di "lining fluid" provenienti dalle vie aeree (Dwyer, 2004; Edwards et al., 2004; Effros et al., 2003; Effros et al., 2004).

Da un punto di vista clinico, come accennato anche nel paragrafo precedente, il CAE può essere raccolto in modo semplice e non invasivo in soggetti d'ogni età affetti da ogni tipo di malattia, per cui è un fluido che è stato ampiamente usato negli ultimi anni per studiare le patologie polmonari (Mutlu et al., 2001) e diversi biomarcatori di infiammazione e stress ossidativo sono risultati aumentati rispetto ai controlli in

malattie infiammatorie delle vie aeree (Carpagnano et al., 2004; Carpagnano et al., 2003; Corradi et al., 2003; Kharitonov and Barnes, 2006; Mondino et al., 2004; Rysz et al., 2007; Tzortzaki et al., 2007).

Tuttavia, l'utilizzo del CAE nella pratica clinica è ancora poco impiegato a causa di alcune limitazioni di tipo metodologico. In primo luogo, non è chiaro se sia o meno necessario trovare un fattore di normalizzazione che tenga conto della diluizione delle goccioline di "lining fluid" nel CAE (Dwyer, 2004; Edwards et al., 2004; Effros et al., 2003; Effros et al., 2004; Effros et al., 2002; Goldoni et al., 2005). In secondo luogo, manca ancora una standardizzazione nella raccolta e in commercio sono disponibili diversi sistemi con caratteristiche in parte diverse fra loro (Goldoni et al., 2005; Horvath et al., 2005; Soyer et al., 2006). Diversi metodi di raccolta con diversi sistemi, anche nei materiali di costruzione, sono stati confrontati (Prieto et al., 2007; Rosias et al., 2006; Soyer et al., 2006). Infine, per alcuni biomarcatori presenti in tracce nel CAE è necessario l'utilizzo di tecniche di misura piuttosto sofisticate, a causa delle basse concentrazioni (Corradi et al., 2003; Montuschi et al., 2005; Schettgen et al., 2007), mentre su altri si discute ancora sulla variabilità e ripetibilità nelle misure (Bloemen et al., 2007; Brooks et al., 2006; Goldoni et al., 2005; Olin et al., 2006).

Per studiare le proprietà chimico-fisiche di alcuni biomarcatori presenti nel CAE, alcuni lavori eseguiti dal nostro laboratorio hanno mostrato la necessità della raccolta del CAE ad una temperatura di condensazione fissa e che perossido di idrogeno (H_2O_2) e malondialdeide (MDA), due tradizionali biomarcatori di infiammazione e stress ossidativo, sono sostanze semivolatili, con la possibilità che H_2O_2 si possa formare on-line durante la raccolta a causa di reazioni tra radicali liberi (Corradi et al., 2007; Goldoni et al., 2005).

3.2 Dose a livello dell'organo bersaglio delle sostanze pneumotossiche

Il tradizionale monitoraggio biologico, che prevede il dosaggio della sostanza tossica d'interesse e/o dei suoi metaboliti nel sangue e nell'urina, non può fornire informazioni specifiche sull'esposizione a quella sostanza tossica a livello del sito di contatto. Si pensi in particolare ad alcune sostanze, quali per esempio gl'idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e ad alcuni elementi metallici, per le quali è stata vista un'associazione tra l'esposizione per via inalatoria e lo sviluppo di pneumopatologie (cancro al polmone, bronchite ostruttiva cronica, fibrosi polmonare, asma, sarcoidosi). In tali

circostanze, sarebbe più appropriata una valutazione della dose assorbita dalle vie respiratorie attraverso il monitoraggio di specifici biomarcatori di esposizione locale. Tale dose non corrisponde necessariamente alla dose complessiva assorbita, monitorata attraverso biomarcatori “sistemici” misurati nel sangue e nell’urina (Mutti and Corradi, 2006).

Parlando nello specifico degli elementi metallici, la dose assorbita per vie diverse dall’inalazione, per esempio quella cutanea o attraverso il tubo gastro-enterico, che può contribuire in maniera rilevante ai livelli misurati in sangue e urina, è in molti casi non rilevante per valutare il rischio a livello polmonare. Inoltre, il tradizionale monitoraggio biologico non fornisce informazioni dettagliate sulle caratteristiche dei composti metallici che vengono inalati. Per esempio, per alcuni metalli le specie poco solubili, responsabili di effetti locali a livello delle vie aeree (dall’inflammatione fino allo sviluppo di neoplasie), tendono a depositarsi con un’emi-vita assai lunga nel tessuto a livello dell’organo bersaglio, mentre solo i composti solubili sono escreti attraverso le vie urinarie. Inoltre, esso può fornire informazioni solo parziali sulla speciazione di alcuni elementi metallici, per esempio Cromo e Arsenico, presenti in diversi possibili stati di ossidazione a diversa tossicità (Mutti and Corradi, 2006).

Ecco quindi il vantaggio di effettuare studi su fluidi biologici, come il CAE, raccolti in modo non invasivo ma contenenti molecole provenienti dalle vie aeree, che possono essere sia biomarcatori di esposizione e quindi di dose locale, che di effetto e di suscettibilità.

Di seguito, riportiamo una rassegna della letteratura in cui il CAE è stato utilizzato per monitorare gli effetti di sostanze o miscele di sostanze tossiche e per affiancare il tradizionale monitoraggio biologico in studi su popolazioni esposte, con particolare riferimento ai lavori pubblicati in letteratura prima del 2005, anno d’inizio del mio dottorato.

3.3 Il Condensato dell'Aria Espirata, l'esposizione ed il monitoraggio biologico: una rassegna della letteratura

3.3.1 Elementi e composti non metallici

3.3.1.1 Ozono

Lo studio di Nightingale et al. (Nightingale et al., 1999) si è concentrato prevalentemente sull'esalazione di ossido nitrico e le variazioni di parametri di infiammazione nello sputo indotto dopo esposizione ad ozono, limitandosi a non trovare differenze nei livelli di nitriti nel CAE. D'altra parte, Corradi et al. (Corradi et al., 2002) hanno trovato aumenti in diversi biomarcatori di stress ossidativo nel CAE (8-isoprostano, TBARS e leucotriene B4) dopo esposizione a breve termine ad ozono 0.1 ppm, mettendo in luce un'aumentata suscettibilità nei soggetti NQO1 wild-type e GSTM1 nullo (polimorfismi della NAD(P)H: chinone ossidoreduttasi e glutathione-S-trasferasi, rispettivamente). Un risultato simile sull'8-isoprostano nel CAE è stato osservato anche da Montuschi et al. (Montuschi et al., 2002). Infine, risultati consistenti sono stati trovati anche da Alfaro et al. (Alfaro et al., 2007). Dopo esposizione ad ozono, quindi, si osservava un generale aumento di biomarcatori di effetto, in particolare riferibili ad induzione di stress ossidativo.

3.3.1.2 Toluene

In un gruppo di soggetti sani esposti a toluene, si è osservato un aumento significativo dei livelli di toluene nel CAE dopo l'esposizione rispetto a prima dell'esposizione. Tali livelli correlavano significativamente con i livelli di toluene ambientali e i livelli urinari di acido ippurico (metabolita del toluene) (Maniscalco et al., 2006). In tal caso, il CAE è stato usato per monitorare un biomarcatore di esposizione a livello polmonare.

3.3.1.3 Clorurati

Alcuni bambini esposti a clorurati in una piscina, molti dei quali accusavano sintomi da intossicazione, oltre ad una ridotta funzione polmonare e diminuzione di ossido nitrico esalato, mostravano un aumento significativo di leucotriene B4 nel CAE immediatamente dopo l'esposizione (fino a 8 giorni), con un aumento significativo nel sangue della Clara Cell Protein 16 (CC16), una proteina prodotta a livello polmonare che diffonde nel sangue a concentrazioni maggiori dopo infiammazione dell'apparato che la produce (Bonetto et al., 2006).

3.3.2 Miscela di inquinanti complesse

3.3.2.1 Fumo di sigaretta

Gli studi sui fumatori e relativi biomarcatori d'effetto nel CAE sono numerosi, per cui ci limiteremo ai più significativi. Infatti, spesso un gruppo di fumatori è selezionato come gruppo di "controllo" distinto da un gruppo di non fumatori, essendo il fumo associato a malattie polmonari quali per esempio la bronco-pneumopatia ostruttiva cronica (BPCO) e il cancro al polmone. I soggetti fumatori mostravano livelli di 8-isoprostano nel CAE intermedi tra i controlli non fumatori e i malati di BPCO (Montuschi et al., 2000). D'altra parte, anche perossido d'idrogeno e TBARS risultavano aumentati nei fumatori rispetto ai non fumatori (Nowak et al., 1996; Nowak et al., 2001), risultati confermati da studi sulla MDA, prodotta dalla perossidazione lipidica, e altre aldeidi lineari (Andreoli et al., 2003). Ancora, nel CAE di pazienti fumatori è stato osservato un aumento di metaboliti dell'ossido nitrico (Balint et al., 2001), proteine totali, nitriti e attività chemotattica neutrofilica (Garey et al., 2004). Anche il profilo elettroforetico delle proteine nel CAE risultava alterato nei fumatori, con possibile aumento di cheratina (Gianazza et al., 2004). Infine, il fumo passivo non sembrava indurre un aumento di perossido di idrogeno in bambini esposti (Doniec et al., 2005). Diversi biomarcatori nel CAE risultavano anche aumentati in lavoratori costretti in ambienti chiusi su navi militari, dove era permesso fumare (Barreto et al., 2006).

Anche in questo caso, tutti gli studi si sono sostanzialmente concentrati sui biomarcatori di effetto piuttosto che di esposizione.

3.3.2.2 Particolato ambientale derivante da incendi boschivi

Dopo esposizione a fumo derivante da un incendio boschivo, è stato osservato un aumento di MDA nel CAE di soggetti esposti dopo tre ore dall'esposizione, con parallelo aumento di ossido nitrico esalato e CC16 nel sangue (Barregard et al., 2007).

3.3.2.3 Fumo di Saldatura

In tal caso, è stato ipotizzato che le particelle contenenti anche metalli del fumo di saldatura potessero essere associate ad un aumento acuto del pH del CAE (Boyce et al., 2006).

3.3.3 Elementi e composti metallici

3.3.3.1 Cobalto (Co) e Tungsteno (W)

Il lavoro di Goldoni et al. (Goldoni et al., 2004) condotto nel nostro laboratorio rappresenta di fatto il primo tentativo di integrare il tradizionale monitoraggio biologico con la misura di biomarcatori di esposizione a livello polmonare e di effetto nel CAE. In alcune aziende di produzione di manufatti diamantati o parti meccaniche in metallo duro, in cui l'esposizione a Co variava da 0.1 a 37.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e a W da 0 a 4.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (il mg riportato nel testo è un errore di battitura), è stato trovato che entrambi i metalli sono misurabili nel CAE (nell'ordine dei nmol/L), mentre non lo sono nella maggior parte dei controlli. Le misure del Co nel CAE sono state validate mediante analisi degli stessi campioni in due laboratori diversi e con tecniche diverse (ETAAS e ICP-MS). Inoltre, Co e W nel CAE correlavano con i rispettivi valori urinari e con un biomarcatore specifico di stress ossidativo sempre nel CAE, la MDA, mentre la correlazione tra MDA nel CAE e Co,W urinari non era significativa. Questi dati indicherebbero quindi che l'induzione di stress ossidativo a livello polmonare dipenda dalla frazione di Co (e W) effettivamente depositata sul tessuto dopo inalazione, quindi dalla dose a livello dell'organo bersaglio. Inoltre, la cinetica di assorbimento polmonare e il conseguente rilascio nel sangue relativamente veloce rende conto della correlazione tra le concentrazioni dei due metalli nel CAE e nell'urina.

Infine, i soggetti contemporaneamente esposti a Co e W mostravano livelli di MDA maggiori rispetto ai soggetti esposti a solo Co, confermando l'effetto sinergicamente tossico dei due metalli nell'induzione di stress ossidativo (Lison et al., 1995; Lison et al., 2001).

3.3.3.2 Cromo

Murgia et al. (Murgia et al., 2006) ha studiato diversi biomarcatori di dose ed effetto nello sputo indotto, CAE e fluido di lavaggio nasale di lavoratori esposti a Cromo. Come premessa, bisogna notare che buona parte dei risultati presentati in questo lavoro sono successivi a quelli che verranno presentati in questa tesi. Il Cromo non è stato misurato nel CAE, ma nello sputo indotto, e nei lavoratori esposti risultava aumentata la concentrazione di nitriti nel CAE, ma non di alcune interleuchine. Il Cromo nello sputo indotto correlava con i livelli di nitriti nel CAE.

3.3.3.3 Elementi metallici nel BAL

In uno studio di qualche anno fa, si è cercato di dare dei valori di riferimento per Ferro, Manganese, Piombo e Cromo in soggetti non esposti, ed è stato osservato un aumento di Ferro e Manganese in 11 saldatori (Romeo et al., 1992)

3.3.4 Conclusioni

Prima del 2005, sono stati pubblicati solo lavori in cui nel CAE sono stati misurati biomarcatori d'effetto dopo esposizione controllata ad ozono e fumo di sigaretta, ma non lavori in cui sono stati misurati biomarcatori d'esposizione. L'articolo su Co e W del 2004, basato su studi del nostro laboratorio, rappresenta perciò un punto di partenza per lo studio delle dosi al bersaglio e degli effetti di sostanze pneumotossiche, metalli in particolare, dopo esposizione lavorativa, dimostrando chiaramente la complementarità di tale studio e del tradizionale monitoraggio biologico. Ad oggi, solo il lavoro di Murgia et al. (Murgia et al., 2006), sebbene con molte differenze, risulta complementare a quello da noi svolto e presentato in questa tesi.

CAPITOLO 3: Metalli Pneumotossici

4. Effetti pneumotossici dei metalli oggetto di questa tesi

4.1 Cromo

Il Cromo (Cr) è un elemento di transizione presente in natura prevalentemente in due differenti stati di ossidazione: trivalente [Cr(III)] ed esavalente [Cr(VI)], ed ha un ampio impiego industriale (ATSDR, 2000). Mentre Cr(III) è caratterizzato da una tossicità relativamente bassa, in quanto non in grado di attraversare le membrane cellulari (De Flora et al., 1990; IARC, 1990) ed è considerato un elemento essenziale (Anderson, 1981), il Cr(VI), prevalentemente sottoforma di ione cromato (CrO_4^{2-}), viene attivamente trasportato all'interno delle cellule da canali anionici. La sua riduzione per opera di diversi componenti cellulari (glutazione, ascorbato e cisteina, per esempio) porta alla formazione di intermedi instabili [Cr(V) e Cr(IV)] e stabili [Cr(III)] in grado di formare complessi con DNA, peptidi e generare stress ossidativo (Bagchi et al., 2002; Levina and Lay, 2005; O'Brien et al., 2003; Zhitkovich, 2005). Uno schema generale della tossicità di Cr(VI) è presentata in **Figura 3**. Sulla base di queste considerazioni e di evidenze sperimentali ed epidemiologiche Cr(VI) è stato classificato dalla IARC come cancerogeno per l'uomo (Birk et al., 2006; Crump et al., 2003; IARC, 1990).

L'apparato respiratorio rappresenta il principale bersaglio dell'azione tossica e cancerogena di Cr(VI), in quanto l'esposizione ambientale e professionale avviene soprattutto per inalazione (De Flora, 2000). Se da un lato è nota l'associazione tra esposizione a Cr(VI) e il cancro al polmone (Gibb et al., 2000; Luippold et al., 2005), l'esposizione acuta a Cr(VI) può provocare diversi sintomi respiratori, oltre che ulcere e perforazioni del setto nasale (Bradshaw et al., 1998; Sobaszek et al., 2000). L'ingestione sarebbe invece meno critica, in quanto stomaco ed intestino possiedono un'alta capacità riducente (De Flora, 2000).

4.1.1 Cr(VI): principali impieghi industriali (OSHA, 2006b)

Cr(VI) è presente sottoforma di diversi composti (**Tabella 1**) e ha diversi impieghi industriali, di cui ricordiamo i due più importanti:

- Cromatura galvanica, che prevede l'utilizzo di composti di Cr(VI) per proteggere dalla corrosione, migliorare l'estetica ed indurire pezzi meccanici in ferro o acciaio o per riportarli a spessore dopo rettifica (per esempio, gli inserti mobili degli stampi per l'estrusione dell'industria laterizia).
- Produzione e tintura con colori ed inchiostri contenenti pigmenti a base di cromato. Elettropittura.

E' inoltre possibile un'esposizione a composti del Cr(VI) durante l'applicazione e la fabbricazione di pesticidi, di cemento portland ed in alcuni rami industriali minori.

4.1.2 Cr(VI): i valori limite professionali e il monitoraggio biologico tradizionale

Come recentemente riassunto nelle linee guida del SIMLII (Mutti, 2006), il TLV fissato dall'ACGIH è 0.05 mg/m^3 nell'aria, portato a 0.01 mg/m^3 per i composti insolubili di Cr(VI). Anche il TRK tedesco è lo stesso. L'Occupational Safety & Health Administration (OSHA) ha posto recentemente i seguenti limiti per esposizione industriale: 0.0025 mg/m^3 come "action level" e 0.005 mg/m^3 come "permissible exposure limit" (PEL), calcolati come concentrazioni medie pesate in un turno lavorativo di 8 ore (OSHA, 2006a).

Il monitoraggio biologico viene usualmente effettuato mediante dosaggio di Cr urinario. I livelli di riferimento per una popolazione non esposta sono usualmente $<0.2 \text{ } \mu\text{g/g}$ creatinina. A fine turno e fine settimana lavorativa è fissato un valore limite biologico (BLV) di $15 \text{ } \mu\text{g/g}$ creatinina ($\text{BEI}^{\circledast} = 30 \text{ } \mu\text{g/g}$ creatinina), con una differenza massima tra inizio turno e fine turno lavorativo di $5 \text{ } \mu\text{g/g}$ creatinina (Mutti, 2006). Poiché il Cr escreto nelle urine è completamente ridotto a Cr(III), per valutare un'esposizione esclusiva a Cr(VI) sarebbe necessario dosare il Cr solo nei globuli rossi (Coogan et al., 1991).

4.1.3 Cromo nel tessuto polmonare di lavoratori esposti e soggetti con tumore al polmone

A causa della pneumotossicità di Cr(VI), per avere un'idea della dose a livello dell'organo bersaglio, i livelli di Cr sono stati direttamente misurati nel tessuto polmonare di soggetti esposti oppure con tumore polmonare in genere su campioni autoptici. Se in generale i soggetti esposti a Cr(VI) durante la loro vita lavorativa

mostravano livelli di Cr nel tessuto polmonare più alto rispetto a soggetti controllo (Tsuneta et al., 1980), i risultati sono contrastanti per quanto riguarda i livelli di Cr nel tessuto polmonare in soggetti con tumore polmonare non professionalmente esposti e la possibile provenienza di Cr dal fumo di sigaretta. Molti dei risultati presenti in letteratura saranno discussi in seguito, nella discussione dei risultati.

4.1.4 Speciazione del Cr

Se in letteratura sono riportate numerose metodiche standard per misurare la frazione di Cr(VI) sul totale in campioni ambientali (Adria-Cerezo et al., 2000; Borai et al., 2002; Chwastowska et al., 2005; Hazelwood et al., 2004; Wang et al., 1999; Wang and Chiu, 2004), il Cr non è mai stato dosato nel CAE prima del 2005 e di conseguenza non è mai stata provata alcuna speciazione del Cr nel CAE. Nell'urina, il Cr è tutto ridotto a Cr(III), per cui usualmente non viene fatta alcuna speciazione.

4.2 Nichel

Il nichel (Ni), presente sia in composti solubili che insolubili in acqua, è rilasciato nell'atmosfera durante numerosi processi industriali, come l'elettropittura, la saldatura, la produzione di leghe metalliche e produzione di batterie Ni-Cd, la nichelatura, in genere impiegata nell'industria meccanica per nobilitare i pezzi in ferro ed acciaio sia dal punto di vista decorativo che anticorrosivo (IARC, 1990). Inoltre, è rilasciato Ni nell'industria petrolifera e durante la combustione di combustibili fossili.

Come per il Cr, per il Ni la principale via di assorbimento è quella inalatoria, ma riveste un'importanza non trascurabile anche l'assorbimento cutaneo per contatto con utensili contenenti Ni. Infine, Ni può anche essere assunto con il cibo (Lu et al., 2005). L'esposizione a Ni è particolarmente alta tra i lavoratori addetti alla metallurgia e alla raffinazione e circa il 2% di lavoratori impiegati in industrie che utilizzano composti del Ni sono esposti a particelle aerodisperse contenenti nichel in un range tra 0.1 e 1 mg/m³ (Denkhaus and Salnikow, 2002; IARC, 1990). Gli studi epidemiologici e sperimentali su popolazioni esposte hanno mostrato una sufficiente evidenza che l'esposizione sia ai composti del Ni solubili in acqua che a quelli non solubili sono associati al cancro al naso e al polmone (ATSDR, 2005; Doll, 1990; Grimsrud et al., 2003; Grimsrud and Peto, 2006), anche controllando gli effetti di possibili confondenti (fumo di sigaretta, altre esposizioni) (Grimsrud et al., 2005). La IARC ha perciò classificato i composti del Ni come carcinogeni per l'uomo nel 1990 (IARC, 1990).

Molti studi *in vivo* e *in vitro* hanno dimostrato che i composti del Ni provocano mutazioni genetiche e danno al DNA, stress ossidativo, effetti epigenetici e regolazioni anomale dell'espressione genica per attivazione di specifici fattori di trascrizione collegati alle corrispondenti vie di trasduzione del segnale (Lu et al., 2005). Il Ni come ione (Ni^{2+}) è in grado di superare con una certa difficoltà la membrana cellulare ed è trasportato al nucleo da proteine di trasporto specifiche, mentre le particelle di Ni insolubili entrano nella cellula tramite fagocitosi con successiva dissoluzione nello ione fondamentale (**Figura 4**) (Oller, 2002). Per questo, i composti più cancerogeni del Ni devono avere le seguenti caratteristiche:

- Essere sufficientemente insolubili per arrivare al polmone come particelle.
- Entrare nelle cellule tramite fagocitosi.
- Una volta dentro i fagosomi, rilasciare Ni^{2+} .

Un esempio è il solfato di Ni (Oller, 2002).

Se dopo esposizione il più frequente affetto avverso è la dermatite da contatto, molti sintomi e malattie polmonari, tra cui bronchite cronica e asma, sono riportati in letteratura (ATSDR, 2005; Brera and Nicolini, 2005; Estlander et al., 1993), anche se ad onor del vero bisogna ricordare che spesso l'esposizione a Ni a livello occupazionale è concomitante a quella ad altri metalli e non sempre è facile distinguere esattamente quali sintomi e malattie derivino solo dal Ni (Antonini et al., 2004).

4.2.1 Ni: i valori limite professionali e il monitoraggio biologico tradizionale

Come recentemente riassunto nelle linee guida del SIMLII (Mutti, 2006), il TLV fissato dall'ACGIH è 1.5 mg/m^3 nell'aria come elemento metallico, ma è assai più basso per i composti insolubili (0.2 mg/m^3) e per i composti solubili, compreso il Ni solfato (0.1 mg/m^3). Il TRK è 0.5 mg/m^3 per tutti i composti solubili e insolubili.

Il monitoraggio biologico viene usualmente effettuato mediante dosaggio di Ni urinario. I livelli di riferimento per una popolazione non esposta sono usualmente $<4 \text{ } \mu\text{g/g}$ creatinina. A fine turno e fine settimana lavorativa è fissato un valore limite biologico (BLV) di $30 \text{ } \mu\text{g/g}$ creatinina (EKA = $40\text{-}45 \text{ } \mu\text{g/L}$ corrispondenti mediamente a $26.7\text{-}30 \text{ } \mu\text{g/g}$ creatinina a seconda dei composti), mentre non sono stati assegnati valori limite biologici per sangue e siero (Mutti, 2006). Ricordiamo infine che attraverso l'urina sono

monitorabili solo i composti solubili e che le metodiche per misurare il Ni nell'urina e nel siero mediante assorbimento atomico sono dibattute a causa delle interferenze al segnale del metallo da parte della matrice (Todorovska et al., 2002).

4.2.2 Ni e fumo di sigaretta

E' noto che le piante di tabacco assorbono dal suolo Ni, che si accumula sulle foglie, con concentrazioni intorno a 0.5/1.5 $\mu\text{g/g}$. Durante la fumata, circa 70 ng di Ni vengono rilasciati nel fumo (Chiba and Masironi, 1992). Altri autori però hanno osservato concentrazioni nelle sigarette fino a 30 $\mu\text{g/g}$ nella cenere (Chiba and Masironi, 1992). Il Ni tende a formare un composto carbonilico cancerogeno (tetracarbonile di Ni) per reazione col monossido di carbonio liberato durante la combustione della sigaretta (Chiba and Masironi, 1992). E' stato poi stimato che il Ni proveniente dal fumo di sigaretta possa pesare da 0.01 fino a 3.5 $\mu\text{g/g}$ nel tessuto nel polmone, a seconda della % di Ni insolubile presente nella sigaretta, del tempo di permanenza del Ni nel polmone, del numero di pacchetti fumati al giorno, della quantità di Ni presente nella sigaretta e del numero di anni di fumo (Edelman and Roggli, 1989). Uno studio più recente ha dimostrato che circa l'1.1% di Ni presente nella sigaretta (circa 1.5-1.8 $\mu\text{g/g}$) è in grado di passare nel fumo, ma che le concentrazioni di Ni nel plasma e nell'urina di lavoratori esposti non sono influenzate significativamente dalle abitudini tabagiche (Torjussen et al., 2003).

4.2.3 Ni nel tessuto polmonare

Come nel caso del Cr, anche il Ni è stato dosato nel tessuto polmonare di lavoratori esposti e soggetti non professionalmente esposti. Il primo lavoro sull'argomento ha mostrato su alcune autopsie come la concentrazione di Ni sia abbastanza disomogenea, con un accumulo nella parte superiore del polmone (Raithel et al., 1987). E' stato poi dimostrato che le concentrazioni polmonari di Ni erano assai alte in lavoratori esposti: fino a diversi centinaia di $\mu\text{g/g}$ tessuto umido contro al massimo 3.5 $\mu\text{g/g}$ tessuto umido presente in soggetti non professionalmente esposti (Edelman and Roggli, 1989), risultati confermati da uno studio successivo dove si confermava anche la grande variabilità delle concentrazioni di Ni (Svenes and Andersen, 1998). E' stato anche proposto un modello per la deposizione e la clearance di composti del Ni nel polmone umano partendo da quello di ratto (Hsieh et al., 1999). Infine, non è stato osservato un accumulo di Ni in caso di tumore polmonare (Raithel et al., 1989b), nè una differenza

tra tessuto sano e malato (Raithel et al., 1989a). Al contrario, un accumulo di Ni è stato osservato nel tessuto polmonare di pazienti con tumore polmonare a Taiwan (Kuo et al., 2006).

In conclusione, ci si attende che il fumo di sigaretta aumenti i livelli di Ni polmonari, anche se almeno di un ordine di grandezza meno rispetto alle esposizioni professionali.

4.3 Cadmio

Il Cadmio (Cd) è un metallo di transizione noto per la sua alta tossicità. Evidenze sperimentali ed epidemiologiche su modelli in vitro, animali e sull'uomo hanno portato la IARC a classificarlo come cancerogeno per l'uomo (gruppo I) (IARC, 1993), in quanto l'esposizione a Cd è stata associata ai tumori al polmone, prostata, reni, fegato, testicoli e al sistema ematopoietico sia negli animali che nell'uomo (Waalkes, 2003; Waisberg et al., 2003). Il Cd è altamente utilizzato a livello industriale, ma diverse possono essere le sorgenti di esposizione ambientali: fumo di sigaretta, cibo contaminato, acqua potabile e suolo.

Le più importanti caratteristiche del Cd sono la grande resistenza alla corrosione, la sua bassa temperatura di fusione e la sua eccellente conducibilità elettrica. I composti di Cd mostrano un'eccellente resistenza agli agenti chimici e alle alte temperature. Essi sono quindi intensamente usati nell'industria dei metalli non ferrosi per la creazione di leghe speciali, rivestimenti, stabilizzatori e soprattutto (più del 70% del suo uso) nella produzione di batterie Ni-Cd. Infine, i pigmenti del Cd hanno colori estremamente brillanti (giallo, arancio, rosso) e sono altamente usati nell'industria plastica e ceramica e nella lavorazione del vetro e degli smalti.

Dal punto di vista tossicologico, i meccanismi di carcinogenicità del Cd sono ancora largamente sconosciuti, nonostante i tanti studi fatti in tal senso. Il Cd si lega debolmente al DNA e non è neppure un metallo attivo dal punto di vista delle reazioni redox, indicando che non è in grado di indurre direttamente stress ossidativo (Waalkes, 2003). Cd potrebbe agire come cancerogeno epigenetico o come cancerogeno indirettamente genotossico, in quanto di per sé è scarsamente mutageno (Waalkes, 2003). Alcuni dei meccanismi proposti per la sua tossicità sono l'attivazione aberrante di geni, aumentata proliferazione cellulare, la soppressione dell'apoptosi e alterazioni nella capacità di riparo del DNA (Giaginis et al., 2006; Waalkes, 2003). Inoltre, il Cd

può competere con lo zinco (Zn) in molti importanti siti sulle biomolecole, includendo potenziali siti importanti per la regolazione genetica e l'attività enzimatica (Waalkes, 2003). Sembra quindi evidente che il meccanismo di carcinogenesi e tossicità del Cd sia multifattoriale e non attribuibile ad un evento singolo.

Dalla letteratura, sembra abbastanza chiaro che i polmoni siano il più importante sito bersaglio della tossicità del Cd (Waalkes, 2003). L'assorbimento del Cd da parte dei polmoni è molto alto (circa 90%). Una volta assorbito, il sangue lo trasporta rapidamente ad altri organi e tessuti, e lì si accumula, in particolare a livello di fegato e reni. Pare che questo accumulo sia dovuto alla produzione da parte di questi organi di Metallothioneina (MT), una proteina che lega Cd con alta affinità ed è in grado di ridurre la tossicità del Cd (Klaassen et al., 1999; Waalkes, 2003). La lunga persistenza del Cd nel corpo umano è probabilmente dovuta a questo legame (citato da Waalkes, 2003). La MT nell'urina è stata talvolta usata come biomarcatore di effetto dopo esposizione a Cd (Chen et al., 2006).

Per quanto riguarda sintomi e malattie associati ad esposizione a Cd dal punto di vista polmonare, escludendo il cancro al polmone, la letteratura è assai ricca di riferimenti, riassunti con efficacia nel profilo tossicologico del Cd pubblicato dall'ATSDR (ATSDR, 1999). Infine, ricordiamo che il Cd è anche altamente nefrotossico, e parte di tale tossicità è dovuta proprio al complesso Cd-MT (Bernard, 2004; Shaikh et al., 1999).

4.3.1 Cd: i valori limite professionali e il monitoraggio biologico tradizionale

Come recentemente riassunto nelle linee guida del SIMLII (Mutti, 2006), il TLV fissato dall'ACGIH è 0.01 mg/m^3 nella frazione inalabile dell'aria, ma è assai più basso per la frazione respirabile: 0.002 mg/m^3 . Il TRK è fissato a 0.03 mg/m^3 .

Il monitoraggio biologico viene usualmente effettuato mediante dosaggio di Cd urinario, ma è pratica comune misurare anche Cd nel sangue. I livelli di riferimento nell'urina per una popolazione non esposta sono usualmente $<4 \text{ } \mu\text{g/L}$ (circa $2.7 \text{ } \mu\text{g/g}$ creatinina). E' poi fissato un valore limite biologico (BLV) per l'urina di $5 \text{ } \mu\text{g/g}$ creatinina (BEI® = $5 \text{ } \mu\text{g/g}$ creatinina, BAT= $15 \text{ } \mu\text{g/L}$, ossia circa $10 \text{ } \mu\text{g/g}$ creatinina), ma il BEI® e il BAT sono definiti anche per il Cd nel sangue ($5 \text{ } \mu\text{g/L}$ e $15 \text{ } \mu\text{g/L}$, rispettivamente) (Mutti, 2006).

4.3.2 Cd e il fumo di sigaretta

Le piante di tabacco hanno una particolare abilità nell'assorbire Cd, che si accumula a concentrazioni relativamente alte nelle foglie (fino a 7 µg/g). Questo si riflette sulle concentrazioni di Cd nelle sigarette (fino a 3.5 µg/g) e sul fumo di sigaretta, in cui il Cd passa in percentuali alte, fino al 70%, e anche il filtro è poco efficace nel prevenire il passaggio dalle sigarette al fumo (Chiba and Masironi, 1992; Kalcher et al., 1993). Per queste ragioni, i fumatori hanno livelli di Cd più alti sia nel sangue che in tessuti di diversi organi (Chiba and Masironi, 1992) e il fumo di sigaretta è un tradizionale confondente nello studio dell'esposizione a Cd. Come nel caso dell'esposizione professionale, chiaramente il principale organo bersaglio dell'esposizione a Cd attraverso il fumo di sigaretta è rappresentato dai polmoni (Stavrides, 2006).

4.3.3 Cd nel tessuto polmonare

I livelli di Cd nel tessuto polmonare sono altamente influenzati sia dall'esposizione professionale che dall'effetto del fumo di sigaretta. I livelli di Cd misurati nel tessuto polmonare in campioni autoptici di soggetti non esposti erano intorno a 1.5 µg/g tessuto secco, con un leggero effetto di sesso ed età. I livelli erano aumentati in soggetti con tumore polmonare (Kollmeier et al., 1990a). Risultati simili, con un chiaro effetto del fumo di sigaretta, sono stati trovati da Paakko et al. (Paakko et al., 1989) e da Baumgardt et al. (Baumgardt et al., 1986). Un aumento significativo di Cd polmonare è stato trovato anche in lavoratori di una fonderia morti per cancro polmonare (Gerhardsson et al., 1986).

4.4 Piombo

Il Piombo (Pb) è sicuramente uno dei metalli tossici noti da più tempo ed è tradizionalmente usato in moltissimi rami dell'industria, oltre ad essere un noto inquinante ambientale. Molti dati sulle possibili sorgenti di esposizione a Pb sulla sua tossicità e sul possibile trattamento sono riportati in letteratura (Patrick, 2006b) e di recente l'ATSDR ha modificato il suo profilo tossicologico (ATSDR, 2007). Nonostante diversi studi epidemiologici su lavoratori esposti a Pb siano discordanti sull'associazione tra esposizione a Pb e incidenza di cancro, in particolare quello al polmone (Lundstrom et al., 2006; Lundstrom et al., 1997), la IARC ha di recente incluso il Pb nella sua forma inorganica nel gruppo 2A (probabile cancerogeno per l'uomo), mentre il piombo organico, oggi assai poco usato a livello industriale,

appartiene al gruppo 3 (non classificabile come cancerogeno per l'uomo) (IARC, 2006). Il Pb viene introdotto nell'organismo prevalentemente per via inalatoria o attraverso il tubo gastro-enterico e, una volta assorbito, si lega al 99% agli eritrociti nel sangue per circa 30-35 giorni. Una buona parte di esso si deposita nelle ossa, con un'emivita che raggiunge i 20-30 anni (Patrick, 2006b).

I meccanismi di tossicità del Pb sono legati alla sua capacità di legarsi al glutatione e ai gruppi sulfidrilici delle proteine, interferendo con i processi di sintesi dell'eme (in specifico sull'enzima delta-acido aminolevulinico deidratasi delta-ALAD) e di indurre stress ossidativo (Patrick, 2006a, b). Esistono poi moltissimi studi sugli effetti del Pb, soprattutto come neurotossico, nefrotossico e ipertensivo (ATSDR, 2007; Gidlow, 2004). Tuttavia, gli effetti pneumotossici di Pb sono scarsamente noti e pochi dati sono riportati in letteratura, anche per la difficoltà di associare l'esposizione professionale a Pb con sintomi respiratori specifici, escludendo altri possibili pneumotossici (ATSDR, 2007; Bener et al., 2001; Masjedi et al., 1989).

4.4.1 Pb: i valori limite professionali e il monitoraggio biologico tradizionale

Come recentemente riassunto nelle linee guida del SIMLII (Mutti, 2006), il valore limite professionale è stato fissato dal DL 25/2002 è 0.15 mg/m^3 (TLV della ACGIH è 0.05 mg/m^3).

Il monitoraggio biologico viene usualmente effettuato mediante dosaggio di Pb nel sangue, in quanto il Pb urinario campionato in campioni estemporanei non è considerato affidabile. I livelli di riferimento per una popolazione non esposta sono usualmente $<16 \text{ } \mu\text{g/dL}$, ma negli ultimi anni l'utilizzo di benzine senza Pb ha ridotto drasticamente anche i livelli di Pb della popolazione non esposta professionalmente e i confondenti sono molteplici (età, alcool, fumo, zona geografica, ecc.) (ATSDR, 2007). E' poi fissato un valore limite biologico (BLV) nel sangue di $60 \text{ } \mu\text{g/dL}$, ridotto a $40 \text{ } \mu\text{g/dL}$ per le donne in età fertile (Mutti, 2006). Il Scientific Committee on Occupational Exposure Limits (SCOEL) raccomanda un BLV di $30 \text{ } \mu\text{g/dL}$, che coincide col BEI®. Il BAT è $40 \text{ } \mu\text{g/dL}$.

E' infine di uso comune valutare l'esposizione a Pb misurando nel sangue la concentrazione di Zincoprotoporfirina (ZPP) come biomarcatore di effetto, la cui aumentata produzione è associata all'aumento del Pb nel sangue, in quanto Pb influisce

sulla sintesi dell'eme. I valori di riferimento nella popolazione non esposta sono usualmente $< 4 \mu\text{g/g}$ emoglobina(Hb), mentre viene considerato come valore limite di intervento $12 \mu\text{g/g}$ Hb (Mutti, 2006).

4.4.2 Pb e il fumo di sigaretta

La concentrazione di Pb nelle sigarette si aggira sui $0.6-2.5 \mu\text{g/g}$, di cui circa il 6% passa nel fumo di sigaretta (Chiba and Masironi, 1992). Un modello per spiegare i livelli di Pb inalati col fumo è stato inoltre proposto (Kalcher et al., 1993). In letteratura, inoltre, è stato osservato che i fumatori e gli ex-fumatori hanno livelli più alti di Pb nel sangue dei non-fumatori e il fumo è stato anche associato ad una diminuzione dell'attività dell'ALAD (Chiba and Masironi, 1992). Il fumo passivo sembra poi avere un effetto sui livelli di Pb nei bambini, particolarmente sensibili alla neurotossicità del metallo (Chiba and Masironi, 1992). Per concludere, quindi, il fumo di sigaretta sembra incidere sulla dose interna di Pb assorbita.

4.4.3 Pb nel tessuto polmonare

Il Pb è stato misurato in diversi studi su campioni autoptici di soggetti esposti e non e con tumore polmonare. In soggetti esposti a Pb, i livelli misurati nel tessuto superavano di 1-2 ordini di grandezza quelli misurati in soggetti non esposti professionalmente ($0.1-3 \mu\text{g/g}$ tessuto secco) (Baumgardt et al., 1986). Inoltre, i livelli di Pb sembravano dipendere debolmente dall'età e da sesso, ma non dal tipo di patologia che aveva causato la morte dei soggetti (Takemoto et al., 1991). Se in uno studio i soggetti con tumore polmonare non mostravano livelli di Pb nel tessuto più alti rispetto agli altri casi (Adachi et al., 1991), si osservava però una netta diminuzione di Pb nel tessuto canceroso rispetto a quello indenne (Drake II and Sky-Peck, 1989). Gli studi in letteratura sono però ancora pochi e i dati andrebbero confermati, tenendo conto soprattutto dell'effetto del fumo di sigaretta.

CAPITOLO 4: Parte Sperimentale

5. Dati Sperimentali: esposizione a Cromo

In questa sezione, saranno proposti i risultati ottenuti durante tre cicli di raccolta di matrici ambientali e biologiche in un'azienda addetta alla cromatura galvanica a spessore, con particolare riferimento all'utilizzo del CAE nello studio delle relazioni tra biomarcatori di esposizione ed effetto da affiancare al tradizionale monitoraggio biologico. Inoltre, saranno presentati anche dati sui livelli di Cr nel CAE e nel tessuto polmonare di soggetti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC).

5.1 L'azienda

L'azienda monitorata effettua cromatura a spessore su parti metalliche, in genere di ferro. La maggior parte della produzione è incentrata su manufatti cromati (eliche di miscelazione e stampi) per la realizzazione di laterizi in fornace. Ricordiamo brevemente le fasi di lavorazione dell'azienda:

- Il materiale ricevuto da rettificare viene decromato da precedenti cromature e pareggiato come in origine, eliminando le irregolarità di superficie.
- Pulitura, sabbiatura e smerigliatura. La smerigliatura delle eliche cromate viene fatta in ambienti isolati dotati di aspirazione forzata e i lavoratori indossano dispositivi di protezione delle vie respiratorie.
- Montaggio degli elettrodi nel bagno di cromatura: il pezzo da cromare è il catodo e gli anodi sono rappresentati da barre metalliche contenenti Pb, sagomate secondo la forma del pezzo da cromare.
- Cromatura in vasca: la cromatura avviene a circa 50 °C e nel bagno è dissolta anidride cromica (CrO_3) e acido solforico in un rapporto 100/200:1, più possibili altri additivi che servono per migliorare la qualità dello strato depositato. Inoltre, per evitare il deposito di Cr(III), i bagni sono rigenerati periodicamente. Durante il processo, nell'ambiente vengono immesse nebbie di anidride cromica che sono parzialmente rimosse da appositi sistemi di aspirazione forzata e dalla deposizione sul bagno di cromatura di numerose sfere di plastica (palline da ping-pong), per aumentare la superficie di deposizione delle nebbie (**Figure 5A e 5B**).

- Smontaggio, pulitura e deposito nel magazzino.

I lavoratori reclutati nello studio lavorano a rotazione in tutti i cicli produttivi dell'azienda.

5.2 Effetto del Cromo inalato su diversi biomarcatori nel CAE – Allegato I (Caglieri et al., 2006)

5.2.1 Scopi dello Studio

- Misura del livello di Cr nel CAE di lavoratori esposti a Cr(VI) come biomarcatore di esposizione ed indicatore di dose locale.
- Studio delle variazioni biochimiche precoci nelle vie aeree misurando alcuni marcatori di stress ossidativo, come H₂O₂ e MDA, come biomarcatori di effetto dell'esposizione a Cr(VI).

5.2.2 Materiali e Metodi

5.2.2.1 Soggetti Arruolati

La **tabella 2** mostra le caratteristiche demografiche e cliniche dei 24 soggetti arruolati. Tra questi, solo 4 erano leggeri fumatori o ex-fumatori (<10 pacchi/anno). Tutti i soggetti erano asintomatici, con indici spirometrici normali e presumibilmente sani e hanno accettato volontariamente di partecipare allo studio. Inoltre, è stato reclutato anche un gruppo di 25 soggetti sani senza malattie polmonari pregresse non esposti a Cr a livello professionale.

5.2.2.2 Lo studio

Prima dello studio, tutti i lavoratori hanno compilato un breve questionario sul loro stato di salute pregresso e del momento e hanno effettuato una spirometria (FEV1, FVC). Il CAE e l'urina dei lavoratori sono stati raccolti in tre momenti diversi:

- Prima del turno di lavoro al venerdì (IT1).
- A fine turno dello stesso venerdì, dopo otto ore di lavoro (FT).
- Prima del turno di lavoro il lunedì successivo (IT2).

Le stesse matrici biologiche sono state raccolte per i controlli nel nostro laboratorio, ma un gruppo di 10 soggetti ha ripetuto la raccolta del CAE all'interno dell'ufficio dove è stato raccolto il CAE dei lavoratori.

5.2.2.3 *Le misure ambientali*

Le misure ambientali sono state fatte con campionatori personali. Il particolato ambientale è stato raccolto su appositi filtri ad un flusso costante di 3 L/min per 90-150 minuti durante il turno di lavoro del venerdì (mattina e pomeriggio). Le membrane sono state pesate e dissolte in acido nitrico al 70%, e le opportune diluizioni sono state fatte con acqua ultrapura. Il Cr totale è stato misurato in ETAAS ed espresso infine come $\mu\text{g}/\text{m}^3$. E' stato anche misurato Cr(VI) usando il protocollo NIOSH 7703 (NIOSH, 2003) dopo campionamento dell'aria in postazioni fisse.

Esprimendo i dati come media geometrica (deviazione standard geometrica), le concentrazioni di Cr erano quel venerdì di $8.8 (2.6) \mu\text{g}/\text{m}^3$ al mattino e $5.0 (2.5) \mu\text{g}/\text{m}^3$, con una media pesata durante il turno di lavoro di $7.8 (2.3) \mu\text{g}/\text{m}^3$. Cr(VI) era circa il 70% del Cr totale monitorato negli ambienti di lavoro ed era in prevalenza (>90%) solubile, per cui i limiti erano inferiori rispetto a quelli riportati dall'ACGIH (Mutti, 2006).

5.2.2.4 *Raccolta del CAE*

Il CAE è stato raccolto con un sistema di raccolta denominato TURBO-DECCS (Transportable Unit for Research on Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection Systems) messo a punto e commercializzato dalla Italchill di Parma. Il sistema è trasportabile e particolarmente adatto a studi occupazionali sul campo (**figura 6A**). Secondo le raccomandazioni dell' American Thoracic Society/European Respiratory Society Task Force on EBC (Horvath et al., 2005), la temperatura di raccolta è controllata da un sistema Peltier, regolata in questo studio a -5°C . La parte del sistema denominata DECCS, ossia quella in cui i soggetti espirano l'aria e dove il CAE viene di fatto raccolto, è monouso e ha una trappola per la saliva per evitare contaminazioni (**figura 6B**).

Il CAE è stato raccolto in 15 minuti, nei quali i soggetti inspiravano ed espiravano normalmente all'interno del sistema di raccolta con una resa di circa 1-2 ml di CAE. Per i lavoratori ed i controlli, la raccolta è stata fatta in un ufficio dove i livelli di Cr ambientali erano $<0.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e all'interno dei nostri laboratori, rispettivamente. Per tutte le precauzioni prese durante la raccolta si veda per esempio Goldoni et al., 2004. Alla fine della raccolta, è stato misurato il volume totale e la contaminazione salivare è stata

esclusa misurando nei campioni l'alfa-amilasi. Infine il CAE è stato aliquotato e conservato a -80 °C fino al momento dell'analisi.

5.2.2.5 Misure di Cr nel CAE e nell'urina

Il Cr urinario (Cr-U) è stato misurato in ETAAS e normalizzato come da prassi per la creatinina. Il limite di rivelazione (LOD) era 0.05 µg/L. Cr nel CAE (Cr-CAE) è stato misurato nello stesso modo e il LOD era sempre 0.05 µg/L. Non è stato utilizzato nessun fattore di normalizzazione nel CAE. I risultati sono stati confermati da misure sugli stessi campioni in ICP-MS in un altro laboratorio (Coefficiente di regressione inter-laboratorio $r=0.95$, deviazione tra i dati dei due laboratori entro il 10%).

5.2.2.6 Misure del perossido di idrogeno (H_2O_2) e della malondialdeide (MDA) nel CAE

H_2O_2 -CAE è stata misurata utilizzando un kit commerciale (Amplex Red kit, Molecular Probes, Eugene, USA) come precedentemente descritto (Corradi et al., 2002; Goldoni et al., 2005). Il LOD era 0.01 µM.

MDA-CAE è stata misurata in tandem cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS/MS) come descritto da Andreoli et al. 2003 (Andreoli et al., 2003). Il LOD era 1 nM.

5.2.2.7 Analisi statistica

A causa della distribuzione log-normale, tutti i dati sono stati analizzati con statistica parametrica sui logaritmi e i risultati sono espressi come media geometrica (deviazione standard geometrica). Sono però riportati anche mediana (intervallo interquartile). Per il confronto tra i tre tempi di raccolta, è stata utilizzata un'ANOVA per misure ripetute seguita dal test *post-hoc* di Tukey. Se venivano confrontati due gruppi, è stato utilizzato un t-student per misure dipendenti. Nel caso del confronto con il gruppo di controllo, è stata utilizzata un'ANOVA ad una via seguita dal test *post-hoc* di Dunnett. Per quanto riguarda studi di associazione tra variabili, è stato utilizzato il metodo dei minimi quadrati sui logaritmi, riportando anche il coefficiente di correlazione lineare di Pearson (r). In tutti i casi, la soglia di significatività del p era 0.05.

5.2.3 Risultati

I livelli di Cr misurati nell'aria correlavano sia con Cr-U ($r=0.48$, $p<0.05$) sia con Cr-CAE ($r=0.47$, $p<0.05$) a FT (grafici in allegato 1).

In **tabella 3** sono riportati i livelli di Cr-U, Cr-CAE, H₂O₂-CAE e MDA-CAE nei controlli e nei lavoratori ai tre tempi. Per quanto riguarda i lavoratori, i livelli di Cr-CAE e Cr-U risultavano sempre significativamente più alti nei lavoratori a tutti i tempi rispetto ai controlli ($p<0.01$). Inoltre, a IT2 i livelli di Cr-U erano più bassi rispetto a rispetto a IT1 e FT ($p<0.01$), e a FT Cr-U era comunque più alto anche di IT1 ($p<0.05$). I dati su Cr-CAE confermavano quelli urinari, con la differenza che non c'era differenza significativa tra IT1 e FT.

Per quanto riguarda H₂O₂-CAE, i livelli erano significativamente più alti a FT e IT1 sia rispetto ai controlli ($p<0.05$ e $p<0.01$, rispettivamente) che rispetto a IT2 (entrambi <0.05). La MDA-CAE era assai meno influenzata dall'esposizione: l'unica differenza significativa era tra FT e IT2, e in generale i livelli non differivano significativamente dai controlli, sebbene 12 dei 24 lavoratori avessero valori di MDA superiori a 10 nM, il limite superiore dell'intervallo di confidenza al 95% (95% CI) nei controlli.

Cr-U e Cr-CAE correlavano modestamente tra loro ($r=0.25$, $p<0.05$) (**Figura 7**), mentre Cr-CAE correlava positivamente con discreti valori di r sia con H₂O₂-CAE ($r=0.54$, $p<0.01$) (**figura 8A**) che con MDA-CAE ($r=0.59$, $p<0.01$) (**figura 8B**). Inoltre, i due biomarcatori di effetto nel CAE correlavano tra loro ($r=0.49$, $p<0.01$, vedi allegato 1). Vi era infine una più debole correlazione tra Cr-U e H₂O₂-CAE ($r=0.41$, $p<0.01$) mentre non era significativa la correlazione tra Cr-U e MDA-CAE (vedi allegato 1).

5.3 Determinazione di Cr(VI) nel CAE – Allegato II (Goldoni et al., 2006)

5.3.1 Scopi dello studio

Sulla base dei risultati ottenuti nel precedente lavoro, è stata fatta una seconda raccolta di campioni nella stessa azienda con i seguenti scopi:

- Sviluppare un sistema di estrazione liquido/liquido con conseguente determinazione colorimetrica di monitoraggio del Cr(VI) solubile in campioni ambientali.
- Misurare i livelli di Cr(VI) nel CAE di lavoratori esposti tramite un metodo di estrazione ionica seguito da misure in assorbimento atomico elettrotermico (ETAAS).
- Seguire le cinetiche di esalazione del Cr(VI).

5.3.2 Materiali e Metodi

5.3.2.1 Soggetti e raccolta del CAE

Sono stati reclutati 10 lavoratori della stessa azienda dello studio precedente. Essi presentavano normali indici spirometrici e non avevano nessuna storia di presenti o passate malattie respiratorie. La **tabella 4** riassume i loro dati demografici e clinici.

Sono stati raccolti due campioni di CAE: uno subito dopo la fine del turno lavorativo del martedì e uno all'inizio del turno di lavoro del giorno successivo, mercoledì, circa 15 ore dopo l'ultima esposizione a Cr. Il CAE è stato raccolto usando il TURBO-DECCS (Italchill, Parma) come descritto in precedenza (Sottoparagrafo 5.2.2.4).

5.3.2.2 Misure ambientali

I campioni ambientali sono stati raccolti tramite campionatori personali, equipaggiati con filtri di PVC a porosità 5 μ M (Supelco, USA) ad un flusso costante di 3 l/min per 90-150 minuti sia nella mattina che nel pomeriggio del turno lavorativo del martedì.

Per determinare il Cr(VI) nei campioni ambientali, sono state fatte opportune modifiche al protocollo NIOSH 7703 (NIOSH, 2003). In particolare, anziché estrarre Cr(VI) mediante un'estrazione in fase solida (SPE) e successiva determinazione colorimetrica (540 nm) nell'estratto del complesso Cr(VI)/1,5-difenilcarbazide (DPC) in soluzione acida, ad un ml di estratto di membrana è stato aggiunto un ml di una soluzione 2 mM

di DPC in 1-butanolo e 100 µl di HCl al 37%. La determinazione del complesso è stata fatta misurando l'assorbanza a 545 nm nella fase organica.

5.3.2.3 Determinazione di Cr totale e di Cr(VI) nel CAE

E' stato utilizzato il metodo di Noroozifar et al. (Noroozifar and Khorasani-Motlagh, 2003) con opportune modifiche dovute ai piccoli volumi e all'utilizzo dell'assorbimento atomico. Brevemente, Cr(VI) è stato inizialmente estratto dai campioni di CAE in fase organica (4-metil-2-pentanone) in quanto in grado di formare una coppia ionica con lo ione tetrabuttilammonio (TBA) a pH acido. Successivamente, mescolando uguali volumi (circa 1 ml) di tale fase organica contenente la coppia ionica e acqua, e con l'aggiunta di 50 µl di una soluzione concentrata di DPC (20 mM) in 60% di alcool etilico e 7% di acido nitrico, è stato possibile estrarre il complesso Cr(VI)-DPC nella fase acquosa e determinare le concentrazioni di Cr(VI) mediante ETAAS. Questo metodo è circa 2.5 volte più sensibile del metodo colorimetrico. Il Cr totale è stato misurato direttamente nei campioni di CAE mediante ETAAS (sottoparagrafo 5.2.2.5).

5.3.2.4 Analisi statistica

Sono stati fatti test parametrici (t-student o ANOVA seguito dalla comparazione post hoc di Tukey per misure ripetute) sui logaritmi delle variabili considerate, e nelle tabelle e grafici sono sempre riportati media geometrica [deviazione standard geometrica] e l'intervallo complessivo dei valori.

5.3.3 Risultati

5.3.3.1 Determinazione di Cr(VI) nei campioni ambientali

In **figura 9**, dove a 9 ml di soluzioni standard di Cr(VI) sono stati aggiunti rispettivamente 3 ml di DPC in acetonitrile (NIOSH standard method) e 3 ml di DPC in 1-butanolo, risulta evidente come il complesso Cr(VI)-DPC si concentri in 1-butanolo, avendo un netto guadagno nei valori di assorbanza (rappresentato dalla differenza delle pendenze delle due rette) e nel limite di rivelazione (LOD), che passa da 1.5 µg/L a 0.5 µg/L circa.

In relazione ai lavoratori selezionati, facendo la media pesata tra i valori misurati al mattino e al pomeriggio durante il turno di lavoro del martedì, i livelli ambientali di Cr(VI) erano 2.9 [2.6] (intervallo 0.8-13.8) µg/m³ contro livelli di Cr totale di 4.3 [2.6]

(intervallo 1.2-18.6) $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Considerando le percentuali, in totale il 67.5% [1.1] (intervallo 49.9-78.3%) del Cr misurato nell'aria era Cr(VI) solubile.

5.3.3.2 Determinazione del Cr(VI) nel CAE

Varie misure sono state fatte per validare il metodo di misura del Cr(VI) nel CAE. Qui riporto solo le più significative:

- a) Mentre in acqua circa il 90% di Cr(VI) presente in soluzione veniva estratto come coppia ionica, in CAE la resa era leggermente inferiore (85% circa). Facendo invece prove con il Cr(III), <2% veniva estratto, per cui sia in acqua che in CAE la contaminazione dovuta a Cr(III) era trascurabile fino a livelli di Cr(III) intorno a 50 $\mu\text{g}/\text{L}$.
- b) Non sono state osservate contaminazioni dovute alla presenza di altri metalli o ioni negativi in acqua.
- c) Come si vede dalla **figura 10**, la retta di calibrazione di Cr(VI) in acqua e CAE nell'intervallo 0-5 $\mu\text{g}/\text{L}$ era lineare, con una diminuzione di circa il 10% nella pendenza della retta in CAE rispetto all'acqua.
- d) Il LOD era di circa 0.2 $\mu\text{g}/\text{L}$ e il coefficiente di variazione (CV) per misure di standard era inferiore al 10% per concentrazioni ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{L}$ e di circa il 30% per concentrazioni comprese tra 0.5 e 1 $\mu\text{g}/\text{L}$.

La **figura 11A** mostra i livelli di Cr totale nel CAE, con le corrispondenti concentrazioni di Cr(VI). A fine turno (t_0), il Cr totale era significativamente più alto rispetto all'inizio turno del giorno dopo (t_1) ($p < 0.05$), così come il Cr(VI) ($p < 0.01$). A t_0 , solo un soggetto presentava un livello di Cr(VI) al di sotto del LOD, mentre a t_1 ben 6 su 10. In questi casi, era assegnato un valore pari alla metà del LOD.

Guardando le percentuali di Cr(VI) sul totale (**figura 11B**), a t_0 si ha già un dimezzamento significativo rispetto ai dati ambientali, ed un ulteriore dimezzamento si osserva a t_1 .

5.4 Un terzo studio confermativo nella stessa azienda (dati non pubblicati)

5.4.1 Scopo dello studio

Confermare i risultati precedentemente ottenuti ed ottenere alcune informazioni sul Cr nel plasma e nei globuli rossi, per integrare i dati già pubblicati.

5.4.2 Materiali e Metodi

In questo studio, sono stati arruolati 16 dei 24 soggetti arruolati nello studio di paragrafo 5.2, ed è stato fatto un campionamento a soli due tempi: fine turno del venerdì (FT) ed inizio turno del lunedì successivo (IT). Non sono state fatte misure ambientali.

Nel CAE, è stato Cr, Cr(VI), H₂O₂ e MDA come descritto in precedenza.

Nell'urina è stato misurato Cr totale come descritto in precedenza.

Per quanto riguarda il sangue, tutti i 16 soggetti hanno accettato di fare un prelievo a IT. Per confronto, con tutti i limiti del caso, 10 dei 16 soggetti avevano raccolto il sangue a FT durante lo studio di Goldoni et al., 2006. Dal sangue, è stato estratto il plasma, che dovrebbe contenere prevalentemente Cr(III), e i globuli rossi (RC), che dovrebbero essere rappresentativi della frazione di Cr(VI) che raggiunge il sangue in forma non ridotta (Coogan et al., 1991). Il Cr nei compartimenti di sangue è stato misurato in ICP-MS.

5.4.3 Risultati

In **tabella 5** sono riportati i dati di Cr-U, Cr-CAE totale ed esavalente, H₂O₂-CAE e MDA-CAE di questo studio confrontati con i due precedenti studi pubblicati. Sia per Cr-U che Cr-CAE si osservava una differenza significativa tra IT e FT, e i livelli urinari indicavano una minor esposizione rispetto allo studio 1 (stessi tempi di campionamento), anche se la differenza era meno evidente considerando Cr-CAE. Anche H₂O₂-CAE e MDA-CAE risultavano più basse rispetto allo studio 1, anche se per H₂O₂-CAE la differenza tra IT e FT rimaneva significativa.

Per quanto riguarda le correlazioni, si confermava una debole correlazione positiva tra Cr-U e Cr-CAE (in questo caso, $r=0.35$, $p<0.05$, **figura 12**) e le correlazioni tra Cr-CAE e i due biomarcatori di effetto ($r=0.47$, $p<0.01$ per H₂O₂-CAE e $r=0.59$, $p<0.01$ per MDA-CAE, dati non mostrati). Allo stesso modo, anche i dati su Cr(VI)-CAE venivano confermati (dati non mostrati).

Per quanto riguarda i dati sul sangue (**tabella 6**), a parte la correlazione positiva tra Cr-plasma e Cr-RC sia ad IT che FT (dati non mostrati), si osservava che sia per plasma che per RC vi era un calo significativo di Cr ad IT. Inoltre, se a FT Cr-U non correlava significativamente con Cr-RC ($r=0.49$, $p=ns$) (**figura 13**) ma con Cr-plasma ($r=0.81$, $p<0.01$, non mostrata), ad IT si osservava il contrario: Cr-U correlava positivamente con Cr-RC ($r=0.77$, $p<0.01$, **figura 13**) ma non con Cr-plasma ($r=0.32$, $p=ns$, non mostrata).

Cr-CAE correlava significativamente con Cr-RC a FT ($r=0.64$, $p<0.5$, **figura 14**) e le correlazioni rimanevano positive anche considerando Cr(VI)-CAE e Cr-plasma (non mostrate), ma venivano completamente perse a IT.

5.5 Cr nel tessuto polmonare e nel CAE di pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC) in fase precoce – Allegato III (Goldoni et al., 2008)

5.5.1 Scopi dello studio

Lo scopo primario dello studio era quello di misurare Cr nel CAE e nelle urine di pazienti con NSCLC in fase precoce non occupazionalmente esposti a Cr prima e dopo l'intervento chirurgico, per testare la sensibilità di Cr-CAE come biomarcatore di esposizione. In secondo luogo, lo studio ci ha dato l'opportunità di studiare la correlazione tra Cr-CAE e le concentrazioni di Cr nel tessuto polmonare (Cr-Tessuto).

5.5.2 Materiali e metodi

5.5.2.1 Soggetti

Abbiamo reclutato 20 pazienti con tumore polmonare non a piccole cellule presso il dipartimento di chirurgia toracica dell'Università di Parma, e tutti i pazienti sono stati classificati negli stadi Ia, Ib o IIa. Nessun paziente ha ricevuto cure specifiche prima dell'intervento. Come controllo, sono stati reclutati 20 controlli non fumatori con spirometria normale e senza patologie polmonari pregresse. La **tabella 7** riporta le caratteristiche dei soggetti in studio.

5.5.2.2 Lo studio

I soggetti hanno completato un questionario sulla loro storia medica presente e passata. Sono stati raccolti campioni di CAE e urina sia prima che immediatamente dopo l'intervento chirurgico (l'urina solo in 15 su 20 pazienti). Infine, sono state raccolte porzioni di tessuto polmonare durante l'intervento, mantenuti a -80 °C fino all'analisi. CAE e urina sono stati raccolti anche per i soggetti di controllo.

Il CAE è stato raccolto con il condensatore TURBO-DECCS (Italchill, Parma, Italy) come già descritto nei precedenti studi ad una temperatura di condensazione di -5 °C per 10 minuti.

E' stata esclusa contaminazione salivare, utilizzando uno specifico test per l'amilasi (Infinity amylase reagent; Sigma, Milan, Italy).

5.5.2.3 Misura del Cromo nel CAE e nelle urine

Il cromo urinario (Cr-U) è stato misurato in ETAAS. Il limite di rilevazione era 0.05 µg/L. Il cromo è stato espresso come µg/g creatinina.

Il cromo nel CAE (Cr-CAE) è stato misurato con la stessa tecnica come precedentemente descritto, con il limite che non è stata fatta alcuna speciazione per i bassi valori di Cr-CAE, in particolare prima dell'intervento. Il limite di rilevazione era 0.05 µg/L.

5.5.2.4 Misura di Cr nel tessuto polmonare

Tre diversi pezzi di tessuto non infiltrato dal tumore nei soggetti malati e non a diretto contatto con gli strumenti chirurgici sono stati riscaldati a 90°C per una notte per seccarli. Il tessuto secco è stato pesato e digerito con acido nitrico al 34.5% a 65 °C per 3 ore. Cr è stato misurato in ETAAS dopo opportune diluizioni della soluzione madre. Il limite di rilevazione era 0.05 µg/L. Le concentrazioni sono state espresse come µg/g di tessuto secco. La stessa misura è stata effettuata anche su un pezzo di tessuto canceroso.

5.5.2.5 Misura del rilascio di Cr da parte degli strumenti chirurgici

Le clips sono state incubate per 3 ore in acqua, così come il cutter lineare standard e la testa della macchina endochirurgica. Cr è stato misurato nel liquido di lavaggio ed espresso come ng/clip per le clips e µg/g per gli altri strumenti chirurgici.

5.5.2.6 Analisi statistica

I dati non erano distribuiti normalmente, per cui sono espressi come mediana (range interquartile). I campioni appaiati sono stati analizzati con il test di Wilcoxon per misure ripetute e il test di Mann-Whitney qualora i campioni fossero indipendenti. Per le regressioni, è stata usata il coefficiente di correlazione di Pearson su scala log-log. Un valore di $p < 0.05$ è stato considerato significativo.

5.5.3 Risultati

Tabella 8 mostra Cr-CAE e Cr-U. Non c'erano differenze significative tra i controlli e i pazienti al tempo 1 (prima dell'operazione), mentre Cr-CAE aumentava significativamente nei pazienti al tempo 2 (dopo l'operazione) sia rispetto al tempo 1 ($p < 0.05$) che ai controlli ($p < 0.05$). Tale aumento era evidente anche nell'urina ($p < 0.01$ vs tempo 1 e controlli).

I livelli di Cromo erano 0.14 (0.04-0.24) µg/g nel tessuto polmonare non canceroso e 0.14 (0.06-0.3) µg/g nel tessuto polmonare canceroso (p=n.s.).

Figura 15 mostra la correlazione significativa tra Cr-CAE al tempo 1 e Cr nel tessuto normale ($r=0.55$, $p=0.01$). Non c'era correlazione significativa tra Cr-CAE e Cr-U ad entrambi i tempi (**figure 16A-B**) nei pazienti, e neppure tra Cr-Tessuto e Cr-U al tempo 1 (**figura 17**).

Infine, le clips rilasciavano piccola quantità di Cromo (0.03 [0.02-0.04] ng/clip), ma il cutter lineare e la testa della macchina endochirurgica rilasciavano quantità di Cr maggiori (rispettivamente 0.4 µg/g e 3.2 µg/g). Perciò, tenendo che circa il 10-20% del Cr misurato in acqua liberato dagli strumenti possa essere rilasciato da 10 g di strumenti chirurgici (circa il peso della parte a contatto col tessuto polmonare) e da 10-20 clips durante l'intervento, la dose assorbita di Cr dovrebbe durante l'intervento dovrebbe aggirarsi su 3-6 µg, da 6 a più di 10 volte più bassa della dose assorbita osservata per lavoratori moderatamente esposti (paragrafi 5.2-5.4 e sottoparagrafi).

6. Dati sperimentali: Esposizione a Nichel, Cadmio e Piombo

Uno studio simile a quello effettuato col Cr (paragrafo 5.2 e sottoparagrafi) è stato tentato anche col Ni, mentre tutti e tre i metalli tossici sono stati dosati nel CAE di soggetti con Bronchite ostruttiva cronica (BPCO) e confrontati con i livelli degli stessi metalli nel CAE di diversi gruppi di controllo.

6.1 Effetto del Nichel inalato su diversi biomarcatori nel CAE (Acampa, 2006)

6.1.1 L'azienda

L'azienda considerata si occupa di riporto metallico di Ni su stampi in ghisa per vetriere. Brevemente, il ciclo lavorativo è così strutturato:

- Gli stampi semilavorati che arrivano vengono sottoposti a sabbiatura per la rimozione delle impurezze.
- Gli stampi sono poi posizionati all'interno di particolari box di saldatura aperti e aspirati frontalmente, dove viene applicato un primo strato di Ni metallico con una pistola a spray per metallizzazione a caldo e cannelli per riporti a caldo con fiamma ossiacetilenica.
- I pezzi così trattati vengono riscaldati fino a 400-500 °C in appositi forni, per la stabilizzazione del riporto.
- Vengono applicati successivi riporti metallici all'interno del box di saldatura. Il carico delle pistole a spray è fatto manualmente dai lavoratori in specifiche aree dell'azienda.

6.1.2 Materiali e Metodi

6.1.2.1 Soggetti e Studio

In totale, 7 lavoratori dell'azienda sopracitata hanno partecipato allo studio, e le loro caratteristiche demografiche e cliniche sono presentate in **tabella 9**. I soggetti presentavano normali funzioni respiratorie e non avevano avuto pregresse malattie respiratorie.

Per questi lavoratori, sono state fatte le seguenti operazioni:

- Monitoraggio ambientale: è stato realizzato con campionatori personali ed il campionamento è stato effettuato per 4 ore durante il turno del lunedì mattina. La frazione inalabile delle polveri ambientali è stata raccolta su appositi filtri (porosità 0.8 µm) a flusso di circa 3-10 L/min. Oltre a pesare le polveri totali, il Ni è stato misurato in ICP-MS dopo estrazione con acqua bi distillata in bagno ultrasonico.
- L'urina è stata raccolta il lunedì ed il venerdì a FT e il Ni è stato determinato in ETAAS con un LOD di 0.5 µg/L ed espresso in funzione della creatinina.
- Agli stessi tempi, è stato raccolto anche il CAE come precedentemente descritto. Sono state fatte tre misure: a) Ni-CAE in ETAAS. Il LOD era 0.5 µg/L; H₂O₂-CAE come precedentemente descritto; c) MDA-CAE come precedentemente descritto.

6.1.2.2 Analisi statistica

I dati sono espressi come mediana (intervallo interquartile) e tutti i confronti sono stati fatti con metodi non parametrici. Le correlazioni riportano l'R di Spearman. Un p di 0.05 è stato considerato significativo.

6.1.3 Risultati

In **tabella 10** sono riportati i valori di Ni ambientale, Ni-U, Ni-CAE, H₂O₂-CAE e MDA-CAE.

Se in un gruppo di 10 controlli i valori di Ni-U erano tutti inferiori a 0.5 µg/g Creat., i lavoratori presentavano livelli decisamente più alti sia il lunedì a FT che venerdì a FT. Il lunedì, addirittura, la mediana superava il limite biologico proposto (30 µg/g Creat.) e diversi valori erano sopra tale limite anche il venerdì a FT. Allo stesso modo, se per i controlli Ni-CAE è costantemente sotto 0.5 µg/L, i lavoratori presentavano livelli decisamente superiori al LOD ad entrambi i tempi, con una differenza significativa tra lunedì FT e venerdì FT (p<0.05). E' interessante notare come, mentre per i livelli urinari ci fosse addirittura un calo, anche se non significativo, tra lunedì FT e venerdì FT, per Ni-CAE accadeva il contrario.

Infine, i lavoratori mostravano ad entrambi i tempi un aumento di H₂O₂-CAE rispetto ai controlli, mentre MDA-CAE non subiva variazioni di rilievo. Tuttavia, i livelli di H₂O₂-

CAE (**figura 18**) e di MDA-CAE (dati non mostrati) non correlavano significativamente con i livelli di Ni-CAE. Non c'era correlazione significativa neppure tra Ni-CAE e Ni-U (**figura 19**).

6.2 Nichel, Cadmio e Piombo esalati in fumatori e non-fumatori asintomatici, asmatici e soggetti affetti da BPCO – Allegato IV (Mutti et al., 2006)

6.2.1 Scopi dello studio

Caratterizzazione e quantificazione di diversi elementi di transizione diversificabili in biomarcatori di esposizione (tra i quali Cd, Pb e Ni) e di suscettibilità (per esempio Fe, Se, Cu e Mn) nel CAE di soggetti controlli fumatori e non fumatori, asmatici e pazienti con BPCO. Nei paragrafi successivi, ci occuperemo solo dei metalli pneumotossici, mentre per quanto riguarda i biomarcatori di suscettibilità si rimanda all'allegato IV.

6.2.2 Materiali e metodi

6.2.2.1 Soggetti

Le caratteristiche dei soggetti selezionati sono riportate in **tabella 11**. I processi statistici che hanno portato alla selezione del numero di pazienti in studio e i parametri clinici utilizzati per la classificazione dei soggetti sono riportati in dettaglio in Allegato IV.

6.2.2.2 Raccolta del CAE ed analisi

Il CAE è stato raccolto mediante TURBO-DECCS come precedentemente descritto, e all'interno del sistema di raccolta possibili contaminazioni da elementi metallici sono state attentamente valutate. In tutti i casi, il DECCS non rilasciava tracce di metalli valutabili (ossia, erano tutte sotto il LOD). I soggetti hanno raccolto il CAE per 15 minuti a -5 °C come precedentemente descritto, e la contaminazione salivare è stata esclusa attraverso il dosaggio nel CAE dell'alfa-amilasi e da misurazioni degli elementi metallici in esame nella saliva (maggiori dettagli in Allegato IV). Le misure, seppur effettuate in ICP-MS, sono state validate in altro laboratorio attraverso misure in ETAAS. Il LOD per i metalli considerati in questo studio erano al di sotto di 0.01 µg/L.

6.2.2.3 Analisi statistica

A causa di distribuzioni non normali e non log-normali, per studiare le differenze significative tra gruppi per quanto riguarda Ni, Cd e Pb è stato usato il test di Kruskal-Wallis seguito dal test *post-hoc* di Dunn. Per le correlazioni, è stato usato il test di Spearman. Ulteriori dettagli su analisi più sofisticate e su gli altri elementi metallici sono presentati in Allegato IV.

6.2.3 Risultati

Le concentrazioni di metalli tossici (Ni, Cd, Pb) nei quattro gruppi di soggetti sono mostrati in **figura 20A-B-C** e in **figura 21A-B-C** sono mostrati gli stessi metalli, distinguendo i pazienti con BPCO in fumatori, ex-fumatori e non fumatori (uniti ai controlli non fumatori). Per quanto riguarda il Ni, si osservavano livelli più alti negli asmatici, con una differenza significativa tra asmatici e controlli fumatori ($p < 0.05$) (**figura 20A**). Non si osservavano effetti del fumo sui livelli di Ni-CAE nei pazienti con BPCO (**figura 21A**). Considerando invece Cd-CAE e Pb-CAE, si osservavano risultati simili: entrambi erano più alti nei BPCO e nei fumatori rispetto ai controlli non fumatori (**figure 20B-C**) e i livelli di Cd e Pb nel CAE erano significativamente più alti nei BPCO fumatori rispetto ad ex-fumatori e non fumatori (**figure 21B-C**). Inoltre, Cd-CAE correlava positivamente con i pacchi-anno ($r=0.5$, $p < 0.01$, dati non mostrati) e non si osservavano correlazioni significative tra indici spirometrici e concentrazioni di metalli tossici nel CAE (dati non mostrati).

CAPITOLO 5: Discussione

7. Esposizione a Cromo

7.1 Il Cromo nel condensato dell'aria espirata e biomarcatori di effetto

Come già ampiamente illustrato, il monitoraggio biologico del Cr in sangue e urine, pur rappresentando un “gold standard” nel campo della medicina occupazionale (Franchini and Mutti, 1988; Mutti et al., 1984), fornisce informazioni limitate sull'esposizione polmonare e sugli effetti locali di tale esposizione, non necessariamente legati all'esposizione sistemica. I risultati del nostro studio dimostrano che il CAE è un fluido biologico estremamente promettente per studiare la dose interna polmonare assorbita durante esposizione a Cr(VI) e conseguentemente associarla a specifici biomarcatori di effetto. Ulteriore lavoro è comunque necessario per una definitiva validazione dell'uso del CAE nel monitoraggio biologico.

Il nostro studio iniziale, descritto nel paragrafo 5.2 e sottoparagrafi, è stato impostato per poter monitorare i lavoratori a tre tempi diversi, in modo da studiare le conseguenze dell'esposizione polmonare giornaliera e a più lungo termine (fino a circa 48 ore dopo l'ultima esposizione). I livelli di Cr-U e di Cr-CAE erano chiaramente più alti nei lavoratori esposti rispetto ai controlli di almeno un ordine di grandezza (**tabella 3**). Tuttavia, le due variabili correlavano solo debolmente tra loro (**figura 7**), e questo potrebbe essere legato alla cinetica relativamente lenta di escrezione del Cr e dalla presenza di vie di esposizione diverse da quella per inalazione (per esempio, per via dermica).

Per via della correlazione tra Cr-CAE e Cr-U con il Cr ambientale, entrambi possono essere considerati validi biomarcatori di esposizione, anche se ulteriori validazioni sono chiaramente necessarie.

Se da un lato Cr-U correlava solo debolmente con i biomarcatori di stress ossidativo nel CAE considerati in questo studio, tali correlazioni risultavano assai più significative per Cr-CAE (**figura 8A-B**), indicando che quest'ultimo, più di Cr-U, è rappresentativo della dose polmonare responsabile della produzione di radicali liberi a livello locale. Tale studio mostra come i biomarcatori considerati siano sufficientemente sensibili per indicare modificazioni biologiche nelle vie aeree anche quando non si osservano variazioni nei tradizionali valori di spirometria, spesso alterati solo quando il polmone

ha subito danni ingenti e spesso irreversibili. L'uso di tali biomarcatori rappresenta perciò un punto di partenza importante per studiare i meccanismi attraverso i quali i metalli tossici agiscono a livello polmonare *in vivo*. Gli studi sperimentali indicano che lo stress ossidativo causato da un aumento di radicali liberi e i meccanismi di difesa conseguentemente attivati giocano un ruolo importante nelle risposte cellulari indotte dai metalli e nella carcinogenesi (Desoize, 2003).

Le variazioni durante l'esposizione di H₂O₂-CAE sembrano più evidenti di quelle di MDA-CAE, anche confrontando i dati coi controlli (**tabella 3**). Per questa ragione, H₂O₂ è probabilmente un marcatore più sensibile della produzione polmonare di radicali liberi in fase acuta ed in particolare nei lavoratori più esposti. Tuttavia, i due biomarcatori di effetto sono correlati tra loro, indicando che la produzione di H₂O₂ e MDA sono probabilmente due fenomeni concomitanti.

I dati sono stati confermati da un successivo studio nella stessa azienda (descritto nel paragrafo 5.4 e sottoparagrafi corrispondenti). Si confermava una differenza significativa tra IT e FT sia per quanto riguarda Cr-U che Cr-CAE (**tabella 5**), nonostante i livelli urinari indicassero un'esposizione minore rispetto allo studio di paragrafo 5.2. Sia H₂O₂-CAE che MDA-CAE rimanevano di conseguenza più bassi, anche se si confermava per H₂O₂-CAE la differenza significativa tra IT e FT. Come nel primo studio, la correlazione tra Cr-U e Cr-CAE rimaneva debole, seppur significativa (**figura 12**) e si confermava anche la correlazione significativa tra Cr-CAE e i due biomarcatori di effetto.

7.2 Speciazione del Cromo nel condensato dell'aria esalata

Per approfondire le conoscenze riguardanti lo stato di ossidazione del Cr nell'aria esalata dopo esposizione a Cr(VI) e valutare il potere riducente del lining fluid bronco alveolare, un secondo studio è stato condotto, considerando la stessa azienda (paragrafo 5.3 e corrispondenti sottoparagrafi).

Tale studio dimostra che è possibile determinare il Cr(VI) nel CAE, e che la sua concentrazione diminuisce nel tempo in percentuale rispetto al Cr totale, escludendo quindi che i livelli monitorati possano derivare da una contaminazione ambientale. Questa cinetica di decadimento dipende probabilmente dall'interazione tra Cr(VI) e lining fluid delle vie aeree, con conseguente riduzione a Cr(III). La persistenza del

Cr(VI) nel CAE rinforza l'ipotesi che le vie aeree siano il principale bersaglio della tossicità del Cr(VI).

In questo studio, è stato usato un nuovo sistema per misurare il Cr(VI) in campioni ambientali attraverso un'estrazione liquido/liquido in 1-butanolo del complesso Cr(VI)-DPC. L'utilizzo di questo solvente permette di amplificare notevolmente il segnale in assorbanza del complesso, e permette di ridurre il LOD di circa un fattore tre rispetto al metodo standard, quando si utilizza un rapporto butanolo/acqua di circa 1:3. Questo implica che circa il 75% delle molecole di Cr-DPC si concentrano nella fase organica della soluzione.

Per monitorare la concentrazione di Cr(VI) nel CAE, si è reso necessario lo sviluppo di un altro metodo, più sensibile di quello colorimetrico. In questo metodo, la concentrazione di Cr(VI) viene valutata in ETAAS dopo una doppia estrazione, sfruttando la capacità del TBA di formare una coppia ionica col cromato in solvente organico ed in ambiente acido (Kusakabe and Arai, 1996; Noroozifar and Khorasani-Motlagh, 2003). Il segnale del Cr(VI) in CAE risultava leggermente più basso rispetto a quello in acqua (circa il 10%), poiché l'efficienza della doppia estrazione in CAE è leggermente minore. Questo può essere spiegato dalla possibile interferenza di tracce di alcuni anioni nel CAE (sali e proteine). Questo leggero effetto suggerisce di preparare gli standard direttamente in un pool di CAE e trattarli esattamente come se fossero campioni.

I dati sull'EBC confermano che Cr(VI) viene ridotto a Cr(III) dal lining fluid delle vie aeree, ma non completamente. Infatti, circa il 33.5% di cromo era ancora esavalente nell'EBC immediatamente dopo l'esposizione (contro un 67% nei dati ambientali), mentre si riduceva significativamente della metà (16.5%) 15 ore dopo l'ultima esposizione. La persistenza della forma esavalente nelle vie aeree può giustificare l'aumento di diversi biomarkers di stress ossidativo nell'EBC, poiché Cr(VI) può essere assorbito a livello polmonare, rivelando la sua tossicità a livello cellulare.

Lo studio di paragrafo 5.4 confermava sostanzialmente anche i dati su Cr(VI)-CAE, anche se in questo studio l'esposizione era meno omogenea rispetto allo studio 2 per cui la cinetica di riduzione di Cr(VI) era un po' più difficile da vedere (dati non mostrati).

Infine, lo studio di paragrafo 5.4 forniva importanti indicazioni anche sulla distribuzione del Cr nel plasma (rappresentativo del Cr già ridotto a trivalente) e nei globuli rossi (RC - rappresentativo invece del Cr esavalente non ancora ridotto).

Si osservava infatti che sia per plasma che per RC vi era un calo significativo di Cr ad IT (**tabella 6**). Inoltre, se a FT Cr-U non correlava significativamente con Cr-RC (**figura 14**) ma con Cr-plasma, ad IT si osservava il contrario: Cr-U correlava positivamente con Cr-RC (**figura 14**) ma non con Cr-plasma. Questo indica chiaramente che Cr già ridotto ha una cinetica di escrezione più veloce del Cr che raggiunge il sangue in forma esavalente e si lega ai globuli rossi.

Cr-CAE correlava significativamente con Cr-RC a FT (**figura 15**) e le correlazioni rimanevano positive anche considerando Cr(VI)-CAE e Cr-plasma, ma venivano completamente perse a IT. Questo importante risultato, che andrebbe comunque confermato su un numero maggiore di punti, indica che a FT Cr-RC rifletteva più le concentrazioni di Cr-CAE che nell'urina, mentre ad IT, dopo decine di ore dall'ultima esposizione, accade il contrario, ossia Cr-RC correlava con Cr-U ma non con Cr-CAE. Il passaggio di Cr(VI) dai polmoni al sangue è quindi già monitorabile a FT, quando Cr escreto per via urinaria è prevalentemente quello già ridotto presente anche nel plasma, mentre col passare delle ore, quando viene escreto per via urinaria anche Cr presente nei globuli rossi, il sangue non riflette più la concentrazione di Cr a livello polmonare, ossia della frazione che persiste nelle vie aeree.

7.3 Una simulazione sulla cinetica di esalazione del Cr sulla base dei nostri dati

Supponendo un'esposizione media di $4.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ a Cr (per distinguere Cr(VI) dalle altre forme basterebbe applicare le % presentate nello studio appena presentato) e supponendo che un soggetto inali circa 1 m^3 di aria all'ora, la dose di Cr assorbita sarebbe:

$$\text{Cr}_{\text{inalato}} = 4.5 * 1 * 8 = 36 \mu\text{g}$$

Sulla base dei dati sperimentali, supponiamo che il soggetto esali un valor medio di circa $10 \mu\text{g}/\text{L}$ in 2 ml di CAE raccolti per 15 minuti per 36 ore filate a partire dall'inizio dell'esposizione, quindi fino a 28 ore dopo l'ultima esposizione. Ogni 15 minuti, quindi, il soggetto esala mediamente 20 ng di Cr, ossia 80 ng/ora. In 36 ore, quindi, ci aspetteremmo che vengano esalati $0.08 * 36 = 2.9 \mu\text{g}$.

Quindi, per esalazione viene eliminato circa l'8% ($2.9/36 * 100$) del Cr inalato nelle prime 36 ore.

Se nell'urina viene escreta una media di 5 µg/L di Cr in 36 ore e il volume totale di urina nello stesso tempo è 2 litri, per via urinaria vengono in tutto escreti 10 µg di Cr, ossia il 27.8% della dose assorbita.

Quindi, $100 - 8 - 27.8 = 64.2\%$ del Cr inalato persiste all'interno del corpo.

L'efficienza dell'esalazione rispetto all'escrezione per via urinaria sarebbe $2.9/10 = 29\%$, chiaramente più bassa di circa 3.5 volte ma non trascurabile.

7.4 Un modello che riassume i tre studi

Alla luce dei due studi presentati, è possibile formulare un modello che tenga conto dei dati raccolti *in vivo* sui lavoratori esposti (**Figura 22**).

Quando il Cr(VI) arriva a contatto con il lining fluid bronco-alveolare, tre fenomeni chimici competitivi tra loro a livello cinetico si attivano:

- La riduzione: Cr(VI) viene ridotto a Cr(III) direttamente nel lining fluid, ma con un'efficienza relativamente bassa (circa il 50% a fine turno, con persistenza di Cr(VI) anche 48 ore dopo l'esposizione).
- L'assorbimento: Cr(VI) non ridotto viene quindi assorbito a livello della mucosa e può quindi superare le membrane cellulari delle cellule epiteliali del polmone, provocando effetti tossici ed infiammatori (come mostrato dai due biomarcatori di stress ossidativo considerati: H₂O₂ e MDA).
- L'esalazione: Cr(VI) e Cr(III) derivanti dal lining fluid bronco-alveolare possono essere esalati. L'esalazione può quindi rappresentare una via di escrezione non trascurabile di Cr dal corpo umano, in particolare dalle vie aeree (vedi paragrafo precedente). Da questo punto di vista, dunque, Cr nel CAE può essere visto come un buon indicatore di dose interna polmonare e rappresentare quindi un biomarcatore di esposizione a livello locale, aggiungendo quindi informazioni fondamentali a quelle fornite dal tradizionale monitoraggio biologico in sangue e urina.

7.5 Validazione del Cromo nel condensato dell'aria espirata come biomarcatore di esposizione – soggetti affetti da tumore polmonare non a piccole cellule

Lo studio presentato nel paragrafo 5.5 e sottoparagrafi mostrava che i pazienti con NSCLC non esposti a livello professionale non avevano livelli di Cr-CAE e Cr-U diversi da controlli non fumatori prima dell'intervento. Tuttavia, entrambi i livelli aumentavano significativamente dopo l'intervento. Infine, Cr-CAE correlava con Cr-tessuto, ma Cr-U non correlava con nessuna delle altre due variabili. Questi risultati sono fondamentali in quanto permettono di stabilire che vi è correlazione tra Cr-CAE e Cr nel tessuto anche nel caso di soggetti non esposti, dove i livelli di Cr in entrambe le matrici sono presumibilmente bassi, e che è possibile monitorare con Cr-CAE anche livelli di esposizione di un ordine di grandezza inferiori a quelli trattati nei precedenti paragrafi, dimostrando come Cr-CAE sia un biomarcatore di esposizione con buona sensibilità.

Un dato interessante è che il fumo non sembrava avere effetto sui livelli di Cr-CAE. Allo stesso tempo, i livelli di Cr-U dei pazienti affetti da NSCLC erano in linea con i valori di riferimento riportati per la popolazione italiana [0.08 µg/L, con limite superiore del 95% CI di 0.24 µg/L (Apostoli et al., 1997) e 0.5 µg/L in Nord Italia (Minoia et al., 1988)] anche senza considerare la normalizzazione per la creatinina.

D'altra parte, non esistono riferimenti univoci in letteratura sui livelli polmonari di Cr in soggetti non esposti e molti fattori, come l'esposizione ambientale, l'età, il sesso e l'origine possono influire sui livelli di Cr nel tessuto (Kollmeier et al., 1990b; Takemoto et al., 1991). Tuttavia, i nostri valori di Cr nel tessuto sono in linea con quelli riportati in diversi valori in letteratura (Al-Saleh and Al-Doush, 1996; Raithel et al., 1987; Raithel et al., 1993; Tsuneta et al., 1980), in particolare con l'intervallo di normalità definito da (Vanoeteren et al., 1986) (0.01-2.5 µg/g tessuto secco). Come già osservato, inoltre, Cr non si accumula nel tessuto canceroso rispetto a quello indenne (Raithel et al., 1989a; Raithel et al., 1989b).

Alcuni autori hanno osservato un aumento di Cr nel tessuto polmonare di soggetti con tumore polmonare non di origine occupazionale probabilmente per effetto del fumo di sigaretta (Akslen et al., 1990; Paakko et al., 1989; Raithel et al., 1989b), ma studi recenti hanno mostrato che Cr è costantemente sotto il limite di rilevabilità nel fumo di

sigaretta (Rustemeier et al., 2002; Wagner et al., 2001), mentre Cd e Pb, tradizionalmente associati a fumo di sigaretta (Chiba and Masironi, 1992; Kalcher et al., 1993), sono sempre presenti. Quindi, è possibile che negli ultimi anni il tabacco contenga meno Cr per via di controlli più puntuali rispetto a fine anni '80.

L'aumento di Cr-U e Cr-CAE dopo l'intervento suggerisce che gli strumenti chirurgici possano essere una fonte di contaminazione, seppur modesta, di Cr, come già ipotizzato (Raithel et al., 1989a). Questo ovviamente non esclude la possibilità che possano esserci altre fonti di contaminazione (fluidi fisiologici, medicine, etc.). Poiché, come già accennato, l'esposizione è circa un ordine di grandezza minore rispetto a quella dei lavoratori moderatamente esposti presentati precedentemente, osservando anche l'aumento nei valori di Cr-CAE e Cr-U dopo l'intervento, Cr-CAE può essere considerato un biomarcatore di esposizione locale con ottima sensibilità.

Se dalla letteratura è noto che i lavoratori esposti a Cr abbiano livelli di Cr-tessuto più alti rispetto a soggetti non esposti (Ishikawa et al., 1994; Raithel et al., 1993; Tsuneta et al., 1980), il nostro studio mostra per la prima volta in letteratura una correlazione tra Cr-tessuto e Cr-CAE anche in soggetti non professionalmente esposti, mettendo in luce come Cr-CAE possa essere considerato rappresentativo dell'esposizione locale a livello dell'organo bersaglio.

Poiché Cr-U non correlava né con Cr-EBC né con Cr-tessuto, si confermava per l'ennesima volta che Cr-CAE e Cr-U possono fornire informazioni parallele ma diverse tra di loro, probabilmente a causa della cinetica di escrezione relativamente lenta del Cr all'interno del corpo umano e dalla possibile presenza di vie di esposizione. Per il fatto che sia Cr-CAE e Cr-U aumentassero dopo l'intervento, è probabile che Cr-CAE sia più rappresentativo della contaminazione polmonare, mentre Cr-U della contaminazione del sangue. Ricordiamo infine che comunque la correlazione tra Cr-CAE e Cr-tessuto è relativamente modesta, un po' perché i livelli sono bassi e maggiormente influenzabili da variabilità inter- e intra-individuale, un po' perché è noto che Cr non tende ad accumularsi in modo omogeneo nei polmoni, prediligendo le aree più alte dei polmoni e i bronchi (Ishikawa et al., 1994; Kondo et al., 2003; Raithel et al., 1987; Vanoeteren et al., 1986).

8. Esposizione a Nichel

8.1 Il Nichel nel condensato dell'aria espirata e biomarcatori di effetto: dati preliminari

Lo studio presentato nel paragrafo 6.1 e corrispondenti sottoparagrafi è da considerare preliminare, in quanto il numero di soggetti arruolati è piccolo.

Per quanto riguarda Ni ambientale (**tabella 10**), per un paio di soggetti il valore superava 0.1 mg/m^3 (TLV per composti del Ni solubili, vedi paragrafo 4.2.1). Tuttavia, non è stato determinato se i composti del Ni presenti nell'aria fossero solubili o insolubili. I soggetti vanno comunque considerati moderatamente esposti.

Se in un gruppo di 10 controlli i valori di Ni-U erano tutti inferiori a $0.5 \text{ } \mu\text{g/g Creat.}$, i lavoratori presentavano livelli decisamente più alti sia il lunedì a FT che venerdì a FT. Il lunedì, addirittura, la mediana superava il limite biologico proposto nel paragrafo 4.2.1 ($30 \text{ } \mu\text{g/g Creat.}$) e diversi valori erano sopra tale limite anche il venerdì a FT. Allo stesso modo, se per i controlli Ni-CAE era costantemente sotto $0.5 \text{ } \mu\text{g/L}$, i lavoratori presentavano livelli decisamente superiori al LOD ad entrambi i tempi, con una differenza significativa tra lunedì FT e venerdì FT. E' interessante notare come, mentre per i livelli urinari ci fosse addirittura un calo, anche se non significativo, tra lunedì FT e venerdì FT, per Ni-CAE accadeva il contrario, con un probabile leggero accumulo di Ni a livello polmonare. Questo dato conferma il fatto che urina e CAE possano dare informazioni parallele ma diverse.

Infine, i lavoratori mostravano ad entrambi i tempi un aumento di H_2O_2 -CAE rispetto ai controlli, mentre MDA-CAE non subiva variazioni di rilievo. Tuttavia, i livelli di H_2O_2 -CAE (**figura 19**) e di MDA-CAE non correlavano significativamente con i livelli di Ni-CAE. Non c'era correlazione significativa neppure tra Ni-CAE e Ni-U (**figura 20**). Anche se questi dati andrebbero confermati su un numero maggiore di soggetti, questo starebbe ad indicare che una variazione significativa delle concentrazioni dei biomarcatori di effetto (H_2O_2 -CAE in particolare) è probabilmente da imputare ad una esposizione multifattoriale piuttosto che ad esposizione specifica a Ni, e altre sostanze andrebbero considerate, per esempio altri metalli, per avere un quadro complessivo dell'esposizione dei soggetti presi in esame. Il Ni sembra quindi meno efficace del

Cr(VI) nell'indurre risposte correlate all'esposizione, monitorando i biomarcatori di effetto considerati in questo studio.

Infine, osservando i valori di Ni riportati nello studio di paragrafo 6.2 e sottoparagrafi corrispondenti, si osserva che per i gruppi presi in esame (controlli fumatori e non fumatori, asmatici e BPCO) i livelli erano più bassi di quelli osservati nei lavoratori e, nonostante Ni sia in genere associato ad esposizione a fumo di tabacco, l'unica differenza significativa che si osservava era tra controlli fumatori e asmatici (**figura 20A**), mentre la BPCO e l'abitudine al fumo non sembravano influire sui livelli di Ni-CAE (**figura 21A**).

9. Esposizione a Cadmio e Piombo

Contrariamente ai dati che possediamo su esposizione lavorativa a Cr e Ni, per quanto riguarda l'esposizione a Cd e Pb al momento sono presenti solo dati provenienti da soggetti di controllo fumatori e non fumatori, asmatici e con BPCO. In tal caso, quindi, non essendo riportata una specifica esposizione lavorativa a questi metalli, l'effetto osservato sui livelli di Cd e Pb nel CAE era dovuto probabilmente ad esposizione a fumo di sigaretta.

Innanzitutto, i risultati dello studio presentato nel paragrafo 6.2 e sottoparagrafi mostrano che tracce di metalli tossici sono misurabili nel CAE sia di soggetti sani fumatori/non fumatori, sia di pazienti con asma e BPCO, e questo è il primo studio in letteratura che si occupa di monitorare tali metalli nel CAE di soggetti con pneumopatologie.

Per quanto riguarda specifici biomarcatori di esposizione, Cd, Pb (**figura 20 B-C e 21 B-C**) e Al (discusso in Allegato IV) erano significativamente più alti nel CAE dei pazienti con BPCO che nei soggetti di controllo. Poichè è noto che Cd e Pb sono contenuti nel fumo di tabacco (Chiba and Masironi, 1992; Rustemeier et al., 2002), i livelli dei due metalli nel CAE possono essere considerati biomarcatori di esposizione da fumo di tabacco. Questo risultato è rafforzato dal fatto che i BPCO fumatori correnti sono i soggetti aventi i livelli più alti di entrambi i metalli. Ulteriori studi sono necessari per mettere in relazione le concentrazioni di metalli tossici nel CAE con il grado di severità della BPCO.

Le concentrazioni di metalli tossici nel CAE possono anche essere visti come marcatori di dose, in quanto la loro tossicità dipende dalla loro concentrazione polmonare. E' per esempio noto che l'esposizione a Cd è in relazione con lo sviluppo dell'enfisema (Hendrick, 2004), probabilmente perché Cd è in grado di inibire la produzione delle proteine del tessuto connettivo (Tatrai et al., 2001). D'altra parte, diversi sintomi e malattie polmonari sono state messe in relazione all'esposizione a Cd (paragrafo 5.3).

Anche se gli effetti pneumotossici del Pb sono relativamente poco studiati (paragrafo 5.4), è possibile che il Pb, che ha alta affinità per i gruppi sulfidrilici e causa quindi una riduzione del glutathione cellulare, possa avere un'azione sinergica con altri metalli tossici a livello polmonare, aggravandone gli effetti.

E' importante notare come lo studio dei metalli tossici nel CAE possa essere usato per studiare la relazione tra pneumotossicità ed esposizione a particolato ambientale, poiché gli elementi metallici possono modulare gli effetti tossici di PM_{2.5} (cioè, particelle con diametro inferiore a 2.5 micron) e PM₁₀ (cioè, particelle con diametro inferiore a 10 micron) soprattutto per quanto riguarda lo stress ossidativo (MacNee and Donaldson, 2003) e sembra esistere una relazione tra l'esposizione a particolato ambientale e la mortalità dovuta a malattie respiratorie (Donaldson and MacNee, 2001; Lagorio et al., 2006; MacNee and Donaldson, 2000).

10. Conclusioni

Per la prima volta in letteratura, il CAE è stato usato per investigare l'esposizione acuta e a lungo termine a Cr(VI) e per fare ipotesi sulla dose interna assorbita a livello dell'organo bersaglio. Il Cr-CAE come biomarcatore di esposizione correlava poi coi livelli di due biomarcatori di stress ossidativo misurati sempre nel CAE, evidenziando come il CAE possa essere utilizzato per studiare le interazioni tra il tessuto polmonare e i metalli pneumotossici in lavoratori esposti, rafforzando i dati pubblicati su Co e W (Goldoni et al., 2004).

Inoltre, lo sviluppo di un metodo per misurare il Cr(VI) nel CAE e lo studio della sua cinetica di riduzione mette in evidenza la grandissima potenzialità di questo fluido nel monitoraggio delle dosi al bersaglio e nel possibile studio degli effetti di elementi di transizione pneumotossici inalabili anche con diversi stati di ossidazione. Studi sui livelli di Cr in diversi compartimenti del sangue ci ha poi permesso di fare ipotesi anche

sul passaggio di Cr nei due stati di ossidazione nei diversi compartimenti del sangue e di mostrare come il Cr(VI) che raggiunge il sangue persista in circolo per più tempo rispetto al Cr che raggiunge il sangue già ridotto.

Infine, è possibile utilizzare Cr-CAE come biomarcatore di esposizione anche quando l'esposizione è di circa un ordine di grandezza minore rispetto a quella di lavoratori moderatamente esposti, indicando che la sensibilità di Cr-CAE come biomarcatore di esposizione locale è alta. La correlazione positiva tra Cr-CAE e Cr-tessuto conferma poi la validità di Cr-CAE come indicatore di dose locale a livello dell'organo bersaglio.

I dati sul Ni sono preliminari e andrebbero confermati su un numero maggiore di soggetti. Tuttavia, sebbene il Ni nel CAE sia significativamente diverso in lavoratori esposti rispetto ai controlli, in questo caso non è stata possibile trovare una relazione significativa coi biomarcatori d'effetto provenienti dalle vie aeree. Per quanto riguarda la correlazione Ni-U e Ni-CAE, per poter trarre conclusioni definitive occorrerebbe ampliare la finestra di concentrazioni di Ni nelle due esposizioni, raccogliendo magari anche campioni di IT. Ulteriori studi sono tuttora in corso per meglio caratterizzare l'esposizione dei soggetti in esame.

Per quanto riguarda Cd e Pb, non possediamo dati su una specifica esposizione lavorativa. Tuttavia, Lo studio della concentrazione nel CAE di metalli pneumotossici in gruppi di soggetti di controllo fumatori e non fumatori, asmatici e con BPCO fornisce informazioni interessanti per quanto riguarda la dose a livello dell'organo bersaglio per i metalli pneumotossici e cancerogeni derivanti dal fumo di sigaretta ed ambientali. Inoltre, è da approfondire anche la relazione tra i livelli di tali biomarcatori di esposizione nel CAE e diversi altri metalli considerati come biomarcatori di suscettibilità (discussione vedi Allegato IV). E' però innegabile che le concentrazioni di elementi pneumotossici nel CAE abbiano quindi anche la grande potenzialità di poter essere messi in relazione a patologie presumibilmente legate all'esposizione ai medesimi, come la BPCO.

CAPITOLO 6: Le Prospettive

11. Messa a punto di un sistema per lo studio on-line della cinetica respiratoria di particelle aerodisperse

Sulla base delle conclusioni tratte nei precedenti paragrafi, diventa a questo punto fondamentale elaborare un sistema che possa permettere di ricavare la frazione di particelle aerodisperse con diametro aerodinamico <10 micron in grado di depositarsi nelle vie aeree. Questo è chiaramente basilare in ambienti di lavoro polverosi, dove composti di metalli pneumotossici sono presenti all'interno sia di nanoparticelle (con diametro tra 0.01 e 0.1 micron) e di microparticelle (tra 0.1 e 10 micron). Un sistema di questo tipo, oltre che essere utilizzato per la medicina occupazionale, può avere altri campi di applicazione:

- Studi sul fumo di sigaretta.
- Studio della deposizione polmonare delle particelle ambientali in diverse pneumopatologie.
- Studio della deposizione polmonare di farmaci sottoforma di aerosol o polveri.

11.1 I modelli con Aerosol

Dagli anni '60 la deposizione di nano e micro particelle è stata largamente studiata soprattutto per valutare la deposizione di farmaci somministrati sottoforma di polveri e aerosol per la cura di specifiche malattie polmonari, come l'asma, e solo nell'ultima decade è aumentato l'interesse per lo studio della deposizione polmonare di particelle ambientali o derivanti dal fumo di sigaretta. Studi su particelle sferiche derivanti da aerosol modello hanno permesso di costruire delle curve standard di deposizione polmonare delle particelle in base al loro diametro (**figura 23**) (Heyder, 2004). In particolare, al di sotto di 0.1 micron la deposizione avviene per diffusione, mentre da 0.1 e 1 micron, dove la deposizione teorica attesa non supera mai il 10-20%, possono subentrare anche fenomeni di sedimentazione. Infine, da 1 a 10 micron, vi sono anche fenomeni di impatto. E' stato poi dimostrato che le curve di deposizione dipendono dal flusso respiratorio e dal volume tidale, ossia dalla meccanica del ciclo respiratorio (**figura 24**) (Kim, 2000). Osservando la deposizione delle particelle nei vari tratti delle vie aeree, si può osservare come particelle con diametro superiore a 5 micron tendano a

depositarsi ad alte concentrazioni nelle alte vie aeree, mentre le particelle con diametro compreso tra 0.01 e 5 micron sempre più in profondità a livello polmonare, con punte di massimo per quelle particelle con diametro intorno a 0.03-0.05 micron e 2-5 micron (**figura 25**) (Heyder, 2004). Inoltre, la maggior parte delle particelle con diametro tra 0.1 e 1 micron si depositano sempre a livello polmonare (**figura 25**) (Heyder, 2004).

E' stato infine osservato come i soggetti con patologie polmonari, in particolare SAD (malattia delle piccole vie aeree) asma e BPCO tendano ad avere una deposizione polmonare aumentata rispetto a soggetti controllo fino al 100% (Kim, 2000).

11.2 Deposizione di particelle ambientali

Con un modello sperimentale, è stato dimostrato che le particelle ambientali tendono a depositarsi nelle vie aeree con deviazioni rispetto alle curve teoriche. In particolare, le particelle tra 0.3 e 1 micron hanno deposizioni di circa il doppio più alte rispetto a quelle attese (tra il 30 e il 60%, con un valore teorico atteso del 15-25%), e questo fenomeno è particolarmente evidente per le donne (**figura 26**) (Montoya et al., 2004). Mentre la deposizione di particelle fini e ultrafini fino circa a 1.5 micron è alta sia a livello polmonare che extratoracico, la deposizione di particelle di diametro più grande è prevalentemente extratoracica (Salma et al., 2002).

11.3 Fumo di sigaretta e gas di scarico delle auto

Come mostrato in **figura 27**, le particelle derivanti dal fumo di sigaretta disperso nell'ambiente (FSA), dello scarico delle auto diesel e a benzina sono molto diversi tra loro. FSA è il più grossolano (diametro medio delle particelle 0.3/0.4 micron), mentre più fini sono le particelle emesse dalle auto diesel (diametro medio 0.1-0.2 micron circa) e dalle auto a benzina (diametro medio 0.07-0.08 micron) (Morawska et al., 2005). La deposizione totale delle particelle è maggiore di quella attesa dai modelli teorici, in particolare per FSA (40% contro un atteso intorno al 15%) nell'intervallo 0.1-0.7 micron, **figura 28** (Morawska et al., 2005). Altri studi hanno trovato deposizioni del fumo di sigaretta anche più alte, intorno al 50% (Hofmann et al., 2001). Le ragioni di tali discrepanze sono state attribuite alle caratteristiche diverse delle particelle ambientali e in particolare di quelle del fumo di sigaretta rispetto a quelle degli aerosol modello: forma delle particelle non sferica, crescita igroscopica del diametro delle particelle per il contatto delle particelle stesse col vapore acqueo all'interno delle vie aeree, meccanismi particolari che descrivono l'interazione tessuto-

particelle: nucleazione, condensazione, coagulazione, effetti di carica, effetto idrofobico (Cohen et al., 1998; Hofmann et al., 2001). Infine, anche il sistema di monitoraggio delle particelle depositate può influire sulla sulla percentuale di deposizione stessa.

11.4 Studio on-line della cinetica respiratoria di particelle aerodisperse

Un sistema per studiare la deposizione polmonare deve possibilmente possedere le seguenti caratteristiche:

- Possibilità di monitorare la variazione di concentrazione delle particelle a diversi diametri (ossia su diversi canali di raccolta) in singole espirazioni nel tempo.
- Possibilità di utilizzare modelli matematici adeguati per il calcolo della deposizione polmonare.
- Costi relativamente contenuti, con la possibilità di utilizzare contaparticelle normalmente disponibili sul mercato.
- Possibilità di ridurre l'umidità relativa dell'aria espirata al di sotto del 95%, per non creare problemi di affidabilità e di funzionamento ai contaparticelle.
- Facile trasportabilità e utilizzo di materiali monouso.

E' chiaro che il problema principale di un sistema che lavori on-line rimane la standardizzazione del segnale, in quanto esso può variare a seconda della meccanica del sistema di misurazione.

In **figura 29** sono mostrati i modelli matematici proposti da Kim (Kim, 2000), per cui sia il numero di particelle inalate che esalate dipendono dall'integrale del prodotto tra le funzioni concentrazione di particelle $[c(t)]$, ossia il segnale rilevato dal contaparticelle, e il flusso $[f(t)]$.

Se il flusso di esalazione è costante, i calcoli si semplificano notevolmente:

$$\int_0^{t-\text{inspirazione}} c_{\text{inspirazione}}(t) * f_{\text{inspirazione}}(t) dt = c_{\text{ambientali}} * \text{Volume}_{\text{inalato}} \approx c_{\text{ambientali}} * \text{Volume}_{\text{esalato}}$$

$$\int_0^{t-\text{espirazione}} c_{\text{espirazione}}(t) * f_{\text{espirazione}}(t) dt = f_{\text{espirazione}} * \int_0^{t-\text{espirazione}} c_{\text{espirazione}}(t) dt$$

Poiché il volume esalato non è altro che il prodotto tra il flusso costante di espirazione e l'intervallo di tempo di espirazione, di fatto:

$$deposizione = 1 - \frac{\int c_{espirazione}(t) dt}{c_{ambientali} \Delta t_{espirazione}}$$

Ossia basterà calcolare 1- il rapporto tra l'area sottesa il grafico sperimentale misurato con il contaparticelle e il prodotto tra la concentrazione di particelle presenti nell'ambiente e il tempo di espirazione. Se il flusso di esalazione non è costante, come è probabile che capiti nella maggior parte dei casi,

$$deposizione = 1 - \frac{\int c_{espirazione}(t) * f_{esalazione}(t) dt}{c_{ambientali} V_{espirato}}$$

Che richiede ovviamente calcoli un po' più complessi. E' perciò fondamentale avere accanto ad un contatore di particelle anche un misuratore di flusso nel tempo.

11.5 Il punto di partenza: il sistema di Invernizzi et al., 2006

Il sistema di Invernizzi et al. ha tutte le caratteristiche elencate nel precedente paragrafo, tranne la portabilità, che è fondamentale per studi sul campo in ambienti di lavoro. Uno schema del sistema è riportato in **figura 30**. Per ridurre l'umidità relativa dell'aria esalata, è stato usato un sistema che riscalda l'aria esalata a circa 40 °C. A flusso costante di esalazione (circa 10 L/minuto), il rapporto tra l'area sotto la curva sperimentale e il prodotto tra la concentrazione di particelle ambientali e il tempo di esalazione fornisce la frazione di particelle esalate, e 1-tale frazione ci consente di calcolare la frazione e quindi la percentuale di particelle depositate (**figura 31**). Con questo sistema, è stata calcolata una deposizione polmonare tra il 45 e il 65% per particelle di diametro 0.3-1 micron in 10 soggetti sani, ossia più del doppio di quanto atteso dai modelli teorici.

11.6 Il nostro sistema

Il nostro sistema (**figura 32**), al momento in discussione per il brevetto presso l'ISPESL (Istituto Superiore di Prevenzione e Sicurezza del Lavoro), utilizza il sistema TURBO già utilizzato per il CAE, solo che il Peltier è invertito per riscaldare anziché raffreddare. L'aria passa prima attraverso uno pneumotacografo, che misura il flusso nel tempo. Poi passa attraverso un normale sistema DECCS a temperatura ambiente,

collegato con un tubo ad U ad una seconda Falcon posizionata nel TURBO e riscaldata a 50 °C con sfogo pressorio. Tale Falcon al di sotto è aperta, ed ad essa è collegato un contaparticelle multicanale, che lavora a flusso costante di 2.83 L/min, in cui l'aria entra intorno a 35 °C e con umidità <90%. Per eseguire la misura, il soggetto farà una lenta esalazione (0.15-0.3 L/s) e il contaparticelle seguirà la variazione di concentrazione nel tempo. Il sistema di raccolta, tra tubi e 2 Falcon, non supera i 150 ml di volume, per cui lo sfasamento tra segnale di flusso e segnale nel contaparticelle non supera il secondo. Il sistema, così congegnato, influisce per meno del 10-15% sul segnale ambientale misurato dal contaparticelle. In **figura 33** è riportato il segnale misurato su due canali (0.3-0.5 micron e 0.5-1.0 micron) sincronizzato con il flusso di esalazione (negativo per convenzione) per un soggetto sano sottoposto a semplice aria ambientale. La deposizione polmonare calcolata è tra il 50% e il 60%, ma essa può variare a seconda dell'aria con cui è a contatto il soggetto, assai variabile in composizione durante le stagioni. Facendo 10 misure ripetute sullo stesso soggetto, la variabilità dell'area sottesa alla curva è del 7.1%, per cui l'errore relativo complessivo dovuto alla variabilità intra-individuale sulla deposizione è di circa il 10% (ossia, per esempio, $50\pm 5\%$).

11.7 Prove preliminari

- Dopo un singolo tiro ad una sigaretta da parte di un soggetto non fumatore, sul canale 0.3-0.5 micron alla terza espirazione successiva le particelle erano oltre 10 volte più alte rispetto al normale controllo, e le particelle rimanevano più alte anche alla quarta espirazione (**figura 34**). Per quanto riguarda il canale 0.5-1 micron, si osservava lo stesso fenomeno alla terza espirazione ma alla quarta il segnale si sovrapponeva di nuovo col controllo, indicando una maggior deposizione.
- Utilizzando un farmaco per l'asma in polvere (SERETIDE®), la cui composizione particellare era assai più grossolana rispetto all'aria ambientale (**tabella 12**), nell'espirazione successiva ad una singola inalazione le particelle esalate nel canale 1-2.5 micron risultavano circa il doppio rispetto al controllo (**figura 35**), mentre non si osservavano differenze su canali a cutoff maggiore, indicando una deposizione pressoché totale.

11.8 Conclusioni

Il sistema appare l'ideale per studi sul campo nei luoghi di lavoro, che sono attualmente in corso. Allo stesso modo, sono in corso misure di standardizzazione del segnale attraverso piccole modifiche del sistema di raccolta e modifiche di flusso e volume totale di espirazione, oltre alla raccolta della percentuale di deposizione polmonare in un numero adeguato di soggetti controllo. In un futuro prossimo, il sistema sarà impiegato all'interno di luoghi di lavoro in cui sarà possibile determinare la concentrazione di metalli pneumotossici nell'ambiente e in diverse frazioni particellari, in modo da avere informazioni su quali sono le % di deposizione di micro particelle contenenti metalli nelle vie aeree. In secondo luogo, è previsto l'utilizzo di un contaparticelle di nuova generazione, con cutoff 0.01-1 micron, in grado di misurare l'area di esposizione a livello polmonare e bronchiale alle particelle, anziché la concentrazione. Questo permetterà di avere anche informazioni parziali sulla deposizione delle nanoparticelle.

12. Bibliografia

Acampa, O., 2006. Valutazione comparativa degli indicatori di dose ed effetto in lavoratori esposti a Nichel - Dati preliminari. Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, vol. Specializzazione in Medicina del Lavoro. University of Parma, Parma, I, p. 86.

ACGIH, 2004. Threshold Limit Values (TLVs) for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposures Indices (BEIs). American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, OH, USA.

Adachi, S., Takemoto, K., Ohshima, S., Shimizu, Y., Takahama, M., 1991. Metal concentrations in lung tissue of subjects suffering from lung cancer. *Int Arch Occup Environ Health* 63, 193-197.

Adria-Cerezo, D.M., Llobat-Estelles, M., Mauri-Aucejo, A.R., 2000. Preconcentration and speciation of chromium in waters using solid-phase extraction and atomic absorption spectrometry. *Talanta* 51, 531-536.

Aitio, A., 2006. Guidance values for the biomonitoring of occupational exposure. *State of the art. Med Lav* 97, 324-331.

Akslen, L.A., Myking, A.O., Morkve, O., Gulsvik, A., Raithel, H.J., Schaller, K.H., 1990. Increased content of chromium and nickel in lung tissues from patients with bronchial carcinoma. *Pathol Res Pract* 186, 717-722.

Al-Saleh, I.A., Al-Doush, I., 1996. Sequential multielement analysis of Cd, Cr, Ni, and Pb in human tissues by inductively coupled plasma spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol* 57, 511-516.

Alfaro, M.F., Walby, W.F., Adams, W.C., Schelegle, E.S., 2007. Breath condensate levels of 8-isoprostane and leukotriene B4 after ozone inhalation are greater in sensitive versus nonsensitive subjects. *Exp Lung Res* 33, 115-133.

Amorim, L.C., de Cardeal, L.Z., 2007. Breath air analysis and its use as a biomarker in biological monitoring of occupational and environmental exposure to chemical agents. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 853, 1-9.

Anderson, R.A., 1981. Nutritional role of chromium. *Sci Total Environ* 17, 13-29.

Andreoli, R., Manini, P., Corradi, M., Mutti, A., Niessen, W.M., 2003. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17, 637-645.

Angerer, J., Ewers, U., Wilhelm, M., 2007. Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health* 210, 201-228.

Antczak, A., Kharitonov, S.A., Montuschi, P., Gorski, P., Barnes, P.J., 2005. Inflammatory response to sputum induction measured by exhaled markers. *Respiration* 72, 594-599.

Antonini, J.M., Taylor, M.D., Zimmer, A.T., Roberts, J.R., 2004. Pulmonary responses to welding fumes: role of metal constituents. *J Toxicol Environ Health A* 67, 233-249.

Apostoli, P., 2002. Elements in environmental and occupational medicine. *J Chromatogr B* 778, 63-97.

Apostoli, P., Maranelli, G., Duca, P.G., Bavazzano, P., Bortoli, A., Cruciatti, A., Elia, G., Minoia, C., Piccinini, R., Sabbioni, E., Sciarra, G., Soave, C., 1997. Reference values of urinary chromium in Italy. *Int Arch Occup Environ Health* 70, 173-179.

ATSDR, 1999. Toxicological Profile for Cadmium. Agency for toxic substances and disease registry, Atlanta, USA, pp. 439.

ATSDR, 2000. Final Report of toxicological profile for chromium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, USA.

ATSDR, 2005. Toxicological Profile for Nickel. Agency for toxic substances and disease registry, Atlanta, USA, pp. 397.

ATSDR, 2007. Toxicological Profile for Lead. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, USA, pp. 632.

Bagchi, D., Stohs, S.J., Downs, B.W., Bagchi, M., Preuss, H.G., 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 180, 5-22.

Balint, B., Donnelly, L.E., Hanazawa, T., Kharitonov, S.A., Barnes, P.J., 2001. Increased nitric oxide metabolites in exhaled breath condensate after exposure to tobacco smoke. *Thorax* 56, 456-461.

Barr, D.B., Wilder, L.C., Caudill, S.P., Gonzalez, A.J., Needham, L.L., Pirkle, J.L., 2005. Urinary creatinine concentrations in the U.S. population: implications for urinary biologic monitoring measurements. *Environ Health Perspect* 113, 192-200.

Barregard, L., Sallsten, G., Andersson, L., Almstrand, A.C., Gustafson, P., Andersson, M., Olin, A.C., 2007. Experimental exposure to wood smoke: Effects on airway inflammation and oxidative stress. *Occup Environ Med*.

Barreto, M., Villa, M.P., Corradi, M., Barberi, S., Monaco, G., Martella, S., Bohmerova, Z., Sabatino, G., Ronchetti, R., 2006. Non-invasive assessment of airway inflammation in ship-engine workers. *Int J Immunopathol Pharmacol* 19, 601-608.

Baumgardt, B., Jackwerth, E., Otto, H., Tolg, G., 1986. Trace analysis to determine heavy metal load in lung tissue. A contribution to substantiation of occupational hazards. *Int Arch Occup Environ Health* 58, 27-34.

Bener, A., Almehti, A.M., Alwash, R., Al-Neamy, F.R., 2001. A pilot survey of blood lead levels in various types of workers in the United Arab Emirates. *Environ Int* 27, 311-314.

- Bernard, A., 2004. Renal dysfunction induced by cadmium: biomarkers of critical effects. *Biomaterials* 17, 519-523.
- Birk, T., Mundt, K.A., Dell, L.D., Luippold, R.S., Miksche, L., Steinmann-Steiner-Haldenstaett, W., Mundt, D.J., 2006. Lung cancer mortality in the German chromate industry, 1958 to 1998. *J Occup Environ Med* 48, 426-433.
- Bloemen, K., Lissens, G., Desager, K., Schoeters, G., 2007. Determinants of variability of protein content, volume and pH of exhaled breath condensate. *Respir Med* 101, 1331-1337.
- Bonetto, G., Corradi, M., Carraro, S., Zanconato, S., Alinovi, R., Folesani, G., Da Dalt, L., Mutti, A., Baraldi, E., 2006. Longitudinal monitoring of lung injury in children after acute chlorine exposure in a swimming pool. *Am J Respir Crit Care Med* 174, 545-549.
- Borai, E.H., El-Sofany, E.A., Abdel-Halim, A.S., Soliman, A.A., 2002. Speciation of hexavalent chromium in atmospheric particulate samples by selective extraction and ion chromatographic determination. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21, 741-745.
- Boyce, P.D., Kim, J.Y., Weissman, D.N., Hunt, J., Christiani, D.C., 2006. pH increase observed in exhaled breath condensate from welding fume exposure. *J Occup Environ Med* 48, 353-356.
- Bradshaw, L.M., Fishwick, D., Slater, T., Pearce, N., 1998. Chronic bronchitis, work related respiratory symptoms, and pulmonary function in welders in New Zealand. *Occup Environ Med* 55, 150-154.
- Brera, S., Nicolini, A., 2005. Respiratory manifestations due to nickel. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 25, 113-115.
- Brooks, W.M., Lash, H., Kettle, A.J., Epton, M.J., 2006. Optimising hydrogen peroxide measurement in exhaled breath condensate. *Redox Rep* 11, 78-84.

Cagliari, A., Goldoni, M., Acampa, O., Andreoli, R., Vettori, M.V., Corradi, M., Apostoli, P., Mutti, A., 2006. The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environ Health Perspect* 114, 542-546.

Caramori, G., Pandit, A., Papi, A., 2005. Is there a difference between chronic airway inflammation in chronic severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease? *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 5, s77-s83.

Carpagnano, G.E., Foschino-Barbaro, M.P., Resta, O., Gramiccioni, E., Carpagnano, F., 2004. Endothelin-1 is increased in the breath condensate of patients with non-small-cell lung cancer. *Oncology* 66, 180-184.

Carpagnano, G.E., Kharitonov, S.A., Wells, A.U., Pantelidis, P., Du Bois, R.M., Barnes, P.J., 2003. Increased vitronectin and endothelin-1 in the breath condensate of patients with fibrosing lung disease. *Respiration* 70, 154-160.

Chen, L., Jin, T., Huang, B., Nordberg, G., Nordberg, M., 2006. Critical exposure level of cadmium for elevated urinary metallothionein - an occupational population study in China. *Toxicol Appl Pharmacol* 215, 93-99.

Chen, M.L., Chen, S.H., Guo, B.R., Mao, I.F., 2002. Relationship between environmental exposure to toluene, xylene and ethylbenzene and the expired breath concentrations for gasoline service workers. *J Environ Monit* 4, 562-566.

Chiba, M., Masironi, R., 1992. Toxic and trace elements in tobacco and tobacco smoke. *Bull World Health Organ* 70, 269-275.

Chwastowska, J., Skwara, W., Sterlinska, E., Pszonicki, L., 2005. Speciation of chromium in mineral waters and salinas by solid-phase extraction and graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* 66, 1345-1349.

Cohen, B.S., Xiong, J.Q., Fang, C.P., Li, W., 1998. Deposition of charged particles on lung airways. *Health Phys* 74, 554-560.

Coogan, T.P., Squibb, K.S., Motz, J., Kinney, P.L., Costa, M., 1991. Distribution of chromium within cells of the blood. *Toxicol Appl Pharmacol* 108, 157-166.

Corradi, M., Alinovi, R., Goldoni, M., Vettori, M., Folesani, G., Mozzoni, P., Cavazzini, S., Bergamaschi, E., Rossi, L., Mutti, A., 2002. Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone. *Toxicol Lett* 134, 219-225.

Corradi, M., Goldoni, M., Caglieri, A., Folesani, G., Poli, D., Corti, M., Mutti, A., 2007. Collecting exhaled breath condensate (EBC) with two condensers in series: a promising technique for studying the mechanisms of EBC formation, and the volatility of selected biomarkers. *J Aerosol Med*, In press.

Corradi, M., Mutti, A., 2005. Exhaled Breath Analysis: from occupational to respiratory medicine. *Acta Biomed Ateneo Parmense* 76, s20-s29.

Corradi, M., Rubinstein, I., Andreoli, R., Manini, P., Caglieri, A., Poli, D., Alinovi, R., Mutti, A., 2003. Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1380-1386.

Crump, C., Crump, K., Hack, E., Luippold, R., Mundt, K., Liebig, E., Panko, J., Paustenbach, D., Proctor, D., 2003. Dose-response and risk assessment of airborne hexavalent chromium and lung cancer mortality. *Risk Anal* 23, 1147-1163.

De Flora, S., 2000. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 533-541.

De Flora, S., Bagnasco, M., Serra, D., Znacchi, P., 1990. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res* 238, 99-172.

Denkhaus, E., Salnikow, K., 2002. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. *Crit Rev Oncol Hematol* 42, 35-56.

Desoize, B., 2003. Metals and metal compounds in carcinogenesis. *In Vivo* 17, 529-539.

DFG, 2004. List of MAK and BAT values. Wiley -VCH Verlag, Weinheim, Germany.

Doll, R., 1990. Reports of the international committee on Nickel carcinogenesis in man. *Scand J Work Environ Health* 16, 9-82.

Donaldson, K., MacNee, W., 2001. Potential mechanisms of adverse pulmonary and cardiovascular effects of particulate air pollution (PM10). *Int J Hyg Environ Health* 203, 411-415.

Doniec, Z., Nowak, D., Tomalak, W., Pisiewicz, K., Kurzawa, R., 2005. Passive smoking does not increase hydrogen peroxide (H₂O₂) levels in exhaled breath condensate in 9-year-old healthy children. *Pediatr Pulmonol* 39, 41-45.

Drake II, E.N., Sky-Peck, H.H., 1989. Discriminant analysis of trace element distribution in normal and malignant human tissues. *Cancer Res* 49, 4210-4215.

Dwyer, T.M., 2004. Sampling airway surface liquid: non-volatiles in the exhaled breath condensate. *Lung* 182, 241-250.

Edelman, D.A., Roggli, V.L., 1989. The accumulation of nickel in human lungs. *Environ Health Perspect* 81, 221-224.

Edwards, D.A., Man, J.C., Brand, P., Katstra, J.P., Sommerer, K., Stone, H.A., Nardell, E., Scheuch, G., 2004. Inhaling to mitigate exhaled bioaerosols. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 17383-17388.

Effros, R.M., Biller, J., Foss, B., Hoagland, K., Dunning, M.B., Castillo, D., Bosbous, M., Sun, F., Shaker, R., 2003. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 1500-1505.

Effros, R.M., Dunning, M.B., 3rd, Biller, J., Shaker, R., 2004. The promise and perils of exhaled breath condensates. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287, L1073-1080.

Effros, R.M., Hoagland, K.W., Bosbous, M., Castillo, D., Foss, B., Dunning, M., Gare, M., Lin, W., Sun, F., 2002. Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 663-669.

Egeghy, P.P., Nylander-French, L., Gwin, K.K., Hertz-Picciotto, I., Rappaport, S.M., 2002. Self-collected breath sampling for monitoring low-level benzene exposures among automobile mechanics. *Ann Occup Hyg* 46, 489-500.

Estlander, T., Kanerva, L., Tupasela, O., Keskinen, H., Jolanki, R., 1993. Immediate and delayed allergy to nickel with contact urticaria, rhinitis, asthma and contact dermatitis. *Clin Exp Allergy* 23, 306-310.

Franchini, I., Mutti, A., 1988. Selected toxicological aspects of chromium(VI) compounds. *Sci Total Environ* 71, 379-387.

Garey, K.W., Neuhauser, M.M., Robbins, R.A., Danziger, L.H., Rubinstein, I., 2004. Markers of inflammation in exhaled breath condensate of young healthy smokers. *Chest* 125, 22-26.

Gerhardsson, L., Brune, D., Nordberg, G.F., Wester, P.O., 1986. Distribution of cadmium, lead and zinc in lung, liver and kidney in long-term exposed smelter workers. *Sci Total Environ* 50, 65-85.

Ghittori, S., Alessio, A., Negri, S., Maestri, L., Zadra, P., Imbriani, M., 2004. A field method for sampling toluene in end-exhaled air, as a biomarker of occupational exposure: correlation with other exposure indices. *Ind Health* 42, 226-234.

Giaginis, C., Gatzidou, E., Theocharis, S., 2006. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 213, 282-290.

Gianazza, E., Allegra, L., Bucchioni, E., Eberini, I., Puglisi, L., Blasi, F., Terzano, C., Wait, R., Sirtori, C.R., 2004. Increased keratin content detected by proteomic analysis of exhaled breath condensate from healthy persons who smoke. *Am J Med* 117, 51-54.

Gibb, H.J., Lees, P.S., Pinsky, P.F., Rooney, B.C., 2000. Lung cancer among workers in chromium chemical production. *Am J Ind Med* 38, 115-126.

Gidlow, D.A., 2004. Lead toxicity. *Occup Med (Lond)* 54, 76-81.

Goldoni, M., Caglieri, A., Andreoli, R., Poli, D., Manini, P., Vettori, M.V., Corradi, M., Mutti, A., 2005. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm Med* 5, 10.

Goldoni, M., Caglieri, A., Corradi, M., Poli, D., Rusca, M., Carbognani, P., Mutti, A., 2008. Chromium in exhaled breath condensate and pulmonary tissue of non-small cell lung cancer patients. *Int Arch Occup Environ Health* 81, 487-493.

Goldoni, M., Caglieri, A., Poli, D., Vettori, M.V., Corradi, M., Apostoli, P., Mutti, A., 2006. Determination of hexavalent chromium in exhaled breath condensate and environmental air among chrome plating workers. *Anal Chim Acta* 562, 229-235.

Goldoni, M., Catalani, S., De Palma, G., Manini, P., Acampa, O., Corradi, M., Bergonzi, R., Apostoli, P., Mutti, A., 2004. Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten. *Environ Health Perspect* 112, 1293-1298.

Grimsrud, T.K., Berge, S.R., Haldorsen, T., Andersen, A., 2005. Can Lung Cancer Risk Among Nickel Refinery Workers Be Explained by Occupational Exposures Other Than Nickel? *Epidemiology* 16, 146-154.

Grimsrud, T.K., Berge, S.R., Martinsen, J.I., Andersen, A., 2003. Lung cancer incidence among Norwegian nickel-refinery workers. *J Environ Monit* 5, 190-197.

Grimsrud, T.K., Peto, J., 2006. Persisting risk of nickel related lung cancer and nasal cancer among Clydach refiners. *Occup Environ Med* 63, 365-366.

Hazelwood, K.J., Drake, P.L., Ashley, K., Marcy, D., 2004. Field method for the determination of insoluble or total hexavalent chromium in workplace air. *J Occup Environ Hyg* 1, 613-619.

Hendrick, D.J., 2004. Smoking, Cadmium and emphysema. *Thorax* 59, 184-185.

Heyder, J., 2004. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. *Proc Am Thorac Soc* 1, 315-320.

Hofmann, W., Morawska, L., Bergmann, R., 2001. Environmental tobacco smoke deposition in the human respiratory tract: differences between experimental and theoretical approaches. *J Aerosol Med* 14, 317-326.

Horvath, I., Hunt, J., Barnes, P.J., Alving, K., Antczak, A., Baraldi, E., Becher, G., van Beurden, W.J., Corradi, M., Dekhuijzen, R., Dweik, R.A., Dwyer, T., Effros, R., Erzurum, S., Gaston, B., Gessner, C., Greening, A., Ho, L.P., Hohlfeld, J., Jobsis, Q., Laskowski, D., Loukides, S., Marlin, D., Montuschi, P., Olin, A.C., Redington, A.E., Reinhold, P., van Rensen, E.L., Rubinstein, I., Silkoff, P., Toren, K., Vass, G., Vogelberg, C., Wirtz, H., 2005. Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 26, 523-548.

Hsieh, T.H., Yu, C.P., Oberdorster, G., 1999. Modeling of deposition and clearance of inhaled Ni compounds in the human lung. *Regul Toxicol Pharmacol* 30, 18-28.

IARC, 1990. Chromium, Nickel and welding. International Agency for Research on Cancer Monog Eval Carcinog Risk Hum 49, 1-677.

IARC, 2006. Inorganic and Organic Lead Compounds. International Agency for Research on Cancer Monog Eval Carcinog Risk Hum 87, 1-519.

IARC, I.A.f.R.o.C., 1993. Beryllium, Cadmium, Mercury and exposures in the glass manufacturing Industry. IARC, Lyon, France.

Invernizzi, G., Boffi, R., Ruprecht, A.A., Barnes, P.J., Kharitonov, S.A., Paredi, P., 2006. Real-time measurement of particulate matter deposition in the lung. *Biomarkers* 11, 221-232.

IPCS, 1993. *Biomarkers and Risk Assessment: concepts and principles*. World Health Organization, Geneva, CH.

Ishikawa, Y., Nakagawa, K., Satoh, Y., Kitagawa, T., Sugano, H., Hirano, T., Tsuchiya, E., 1994. "Hot spots" of chromium accumulation at bifurcations of chromate workers' bronchi. *Cancer Res* 54, 2342-2346.

Jakubowski, M., Trzcinka-Ochocka, M., 2005. Biological monitoring of exposure: trends and key developments. *J Occup Health* 47, 22-48.

Kalcher, K., Kern, W., Pietsch, R., 1993. Cadmium and lead in the smoke of a filter cigarette. *Sci Total Environ* 128, 21-35.

Kharitonov, S.A., Barnes, P.J., 2006. Exhaled biomarkers. *Chest* 130, 1541-1546.

Kim, C.S., 2000. Methods of calculating lung delivery and deposition of aerosol particles. *Respir Care* 45, 695-711.

Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 267-294.

Kollmeier, H., Seemann, J., Wittig, P., Rothe, G., Muller, K.M., 1990a. Cadmium in human lung tissue. *Int Arch Occup Environ Health* 62, 373-377.

Kollmeier, H., Seemann, J.W., Rothe, G., Muller, K.M., Wittig, P., 1990b. Age, sex, and region adjusted concentrations of chromium and nickel in lung tissue. *Br J Ind Med* 47, 682-687.

Kondo, K., Takahashi, Y., Ishikawa, S., Uchihara, H., Hirose, Y., Yoshizawa, K., Tsuyuguchi, M., Takizawa, H., Miyoshi, T., Sakiyama, S., Monden, Y., 2003.

Microscopic analysis of chromium accumulation in the bronchi and lung of chromate workers. *Cancer* 98, 2420-2429.

Krantz, A., Dorevitch, S., 2004. Metal exposure and common chronic diseases: a guide for the clinician. *Dis Mon* 50, 215-262.

Kuo, C.Y., Wong, R.H., Lin, J.Y., Lai, J.C., Lee, H., 2006. Accumulation of chromium and nickel metals in lung tumors from lung cancer patients in Taiwan. *J Toxicol Environ Health A* 69, 1337-1344.

Kusakabe, M., Arai, M., 1996. Solvent Extraction of Several Anions with Tetrabutylammonium Ion into 1,2-Dichloroethane and Hydration of Anions in the Organic Phase *Bull Chem Soc Jpn* 69, 581-588.

Lagorio, S., Forastiere, F., Pistelli, R., Iavarone, I., Michelozzi, P., Fano, V., Marconi, A., Ziemacki, G., Ostro, B.D., 2006. Air pollution and lung function among susceptible adult subjects: a panel study. *Environ Health* 5, 11.

Levina, A., Lay, P.A., 2005. Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium. *Coord Chem Rev* 249, 281-298.

Lison, D., Carbonelle, P., Mollo, L., Lauwerys, R., Fubini, B., 1995. Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species. *Chem Res Toxicol* 8, 600-606.

Lison, D., De Boeck, M., Verougstraete, V., Kirsch-Volders, M., 2001. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup Environ Med* 58, 619-625.

Lu, H., Shi, X., Costa, M., Huang, C., 2005. Carcinogenic effect of nickel compounds. *Mol Cell Biochem* 279, 45-67.

Luippold, R.S., Mundt, K.A., Dell, L.D., Birk, T., 2005. Low-level hexavalent chromium exposure and rate of mortality among US chromate production employees. *J Occup Environ Med* 47, 381-385.

Lundstrom, N.G., Englyst, V., Gerhardsson, L., Jin, T., Nordberg, G., 2006. Lung cancer development in primary smelter workers: a nested case-referent study. *J Occup Environ Med* 48, 376-380.

Lundstrom, N.G., Nordberg, G., Englyst, V., Gerhardsson, L., Hagmar, L., Jin, T., Rylander, L., Wall, 1997. Cumulative lead exposure in relation to mortality and lung cancer morbidity in a cohort of primary smelter workers. *Scand J Work Environ Health* 23, 24-30.

MacNee, W., Donaldson, K., 2000. How can ultrafine particles be responsible for increased mortality? *Monaldi Arch Chest Dis* 55, 135-139.

MacNee, W., Donaldson, K., 2003. Mechanism of lung injury caused by PM10 and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur Respir J Suppl* 40, 47s-51s.

Manini, P., De Palma, G., Mutti, A., 2007. Exposure assessment at the workplace: implications of biological variability. *Toxicol Lett* 168, 210-218.

Maniscalco, M., De Laurentiis, G., Pentella, C., Mormile, M., Sanduzzi, A., Carratu, P., Sofia, M., 2006. Exhaled breath condensate as matrix for toluene detection: a preliminary study. *Biomarkers* 11, 233-240.

Masjedi, M.R., Estineh, N., Bahadori, M., Alavi, M., Sprince, N.L., 1989. Pulmonary complications in lead miners. *Chest* 96, 18-21.

Mason, H.J., Williams, N.R., Morgan, M.G., Stevenson, A.J., Armitage, S., 1998. Influence of biological and analytical variation on urine measurements for monitoring exposure to cadmium. *Occup Environ Med* 55, 132-137.

McGarvey, L.P., Dunbar, K., Martin, S.L., Brown, V., Macmahon, J., Ennis, M., Elborn, J.S., 2002. Cytokine concentrations and neutrophil elastase activity in bronchoalveolar lavage and induced sputum from patients with cystic fibrosis, mild asthma and healthy volunteers. *J Cyst Fibros* 1, 269-275.

Metso, T., Haahtela, T., Seveus, L., 2002. Identification of intracellular markers in induced sputum and bronchoalveolar lavage samples in patients with respiratory disorders and healthy persons. *Respir Med* 96, 918-926.

Minoia, C., Apostoli, P., Maranelli, G., Baldi, C., Pozzoli, L., Capodaglio, E., 1988. Urinary chromium levels in subjects living in two north Italy regions. *Sci Total Environ* 71, 527-531.

Mondino, C., Ciabattoni, G., Koch, P., Pistelli, R., Trove, A., Barnes, P.J., Montuschi, P., 2004. Effects of inhaled corticosteroids on exhaled leukotrienes and prostanoids in asthmatic children. *J Allergy Clin Immunol* 114, 761-767.

Montoya, L.D., Lawrence, J., Murthy, G.G.K., Sarnat, J.A., Godleski, J.J., Koutrakis, P., 2004. Continuous measurements of ambient particle deposition in human subjects. *Aerosol Sci Tech* 38, 980-990.

Montuschi, P., Collins, J.V., Ciabattoni, G., Lazzeri, N., Corradi, M., Kharitonov, S.A., Barnes, P.J., 2000. Exhaled 8-isoprostane as an in vivo biomarker of lung oxidative stress in patients with COPD and healthy smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 1175-1177.

Montuschi, P., Martello, S., Felli, M., Mondino, C., Barnes, P.J., Chiarotti, M., 2005. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of exhaled leukotriene B4 in asthmatic children. *Respir Res* 6, 119.

Montuschi, P., Nightingale, J.A., Kharitonov, S.A., Barnes, P.J., 2002. Ozone-induced increase in exhaled 8-isoprostane in healthy subjects is resistant to inhaled budesonide. *Free Radic Biol Med* 33, 1403-1408.

Morawska, L., Hofmann, W., Hitchins-Loveday, J., Swanson, C., Mengersen, K., 2005. Experimental study of the deposition of combustion aerosols in the human respiratory tract. *Journal of Aerosol Science* 36, 939-957.

Murgia, N., Muzi, G., Dell' Omo, M., Montuschi, P., Melchiorri, D., Ciabattoni, G., Abbritti, E.P., Orazi, N., Sapia, I.E., Abbritti, G., 2006. Induced sputum, exhaled breath condensate and nasal lavage fluid in electroplating workers exposed to chromium. *Int J Immunopathol Pharmacol* 19, 67-71.

Mutlu, G.M., Garey, K.W., Robbins, R.A., Danziger, L.H., Rubinstein, I., 2001. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 164, 731-737.

Mutti, A., Corradi, M., 2006. Recent developments in human biomonitoring: non-invasive assessment of target tissue dose and effects of pneumotoxic metals. *Med Lav* 97, 199-206.

Mutti, A., Corradi, M., Goldoni, M., Vettori, M.V., Bernard, A., Apostoli, P., 2006. Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with COPD or asthma. *Chest* 129, 1288-1297.

Mutti, A., Pedroni, C., Arfini, G., Franchini, I., Minoia, C., Micoli, G., Baldi, C., 1984. Biological monitoring of occupational exposure to different chromium compounds at various valency states. *Int J Environ Anal Chem* 17, 35-41.

Mutti, A.c., 2006. *Linee guida per il Monitoraggio Biologico*. PI-ME Editrice, Pavia, Italy, pp. 128.

Nightingale, J.A., Rogers, D.F., Barnes, P.J., 1999. Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax* 54, 1061-1069.

NIOSH, 2003. NIOSH Method 7703: Hexavalent chromium by field-portable spectrophotometry National Institute of Occupational Safety and Health, Washington, USA.

Noroozifar, M., Khorasani-Motlagh, M., 2003. Specific extraction of chromium as tetrabutylammonium-chromate and spectrophotometric determination by diphenylcarbazide: speciation of chromium in effluent streams. *Anal Sci* 19, 705-708.

Nowak, D., Antczak, A., Krol, M., Pietras, T., Shariati, B., Bialasiewicz, P., Jeczowski, K., Kula, P., 1996. Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers. *Eur Respir J* 9, 652-657.

Nowak, D., Kalucka, S., Bialasiewicz, P., Krol, M., 2001. Exhalation of H₂O₂ and thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) by healthy subjects. *Free Radic Biol Med* 30, 178-186.

O'Brien, T.J., Ceryak, S., Patierno, S.R., 2003. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 533, 3-36.

Olin, A.C., Svensson, S., Ljungkvist, G., Larstad, M., Slabanja, V., Bake, B., Toren, K., 2006. Factors influencing level of hydrogen peroxide in exhaled breath condensate *Microchem J* 82, 17-21.

Oller, A.R., 2002. Respiratory carcinogenicity assessment of soluble nickel compounds. *Environ Health Perspect* 110 Suppl 5, 841-844.

Ong, C.N., Chia, S.E., Phoon, W.H., Tan, K.T., Kok, P.W., 1991. Monitoring of exposure to cyclohexanone through the analysis of breath and urine. *Scand J Work Environ Health* 17, 430-435.

OSHA, O.S.H.A., 2006a. Chromium (VI). Standard n° 1910.1026. OSHA, Washington, USA.

OSHA, O.S.H.A., 2006b. Small Entity Compliance Guide for the Hexavalent Chromium Standards. OSHA, Washington, USA.

Paakko, P., Kokkonen, P., Anttila, S., Kalliomaki, P.L., 1989. Cadmium and chromium as markers of smoking in human lung tissue. *Environ Res* 49, 197-207.

Patrick, L., 2006a. Lead toxicity part II: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev* 11, 114-127.

Patrick, L., 2006b. Lead toxicity, a review of the literature. Part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev* 11, 2-22.

Paustenbach, D., Galbraith, D., 2006. Biomonitoring and biomarkers: exposure assessment will never be the same. *Environ Health Perspect* 114, 1143-1149.

Periago, J.F., Luna, A., Morente, A., Zambudio, A., 1992. Design and evaluation of an exhaled breath sampler for biological monitoring of organic solvents. *J Appl Toxicol* 12, 91-96.

Poli, D., Carbognani, P., Corradi, M., Goldoni, M., Acampa, O., Balbi, B., Bianchi, L., Rusca, M., Mutti, A., 2005. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. *Respir Res* 6, 71.

Prado, C., Tortosa, J.A., Ibarra, I., Luna, A., Periago, J.F., 1997. Biological monitoring of occupational exposure to isoflurane by measurement of isoflurane exhaled breath. *J Appl Toxicol* 17, 179-183.

Prieto, L., Ferrer, A., Palop, J., Domenech, J., Llusar, R., Rojas, R., 2007. Differences in exhaled breath condensate pH measurements between samples obtained with two commercial devices. *Respir Med* 101, 1715-1720.

Rahman, I., Kelly, F., 2003. Biomarkers in breath condensate: a promising new non-invasive technique in free radical research. *Free Radic Res* 37, 1253-1266.

Raithel, H.J., Ebner, G., Schaller, K.H., Schellmann, B., Valentin, H., 1987. Problems in establishing norm values for nickel and chromium concentrations in human pulmonary tissue. *Am J Ind Med* 12, 55-70.

Raithel, H.J., Hennig, F., Schaller, K.H., 1989a. Quantitative determination of chromium and nickel in tumour and tumour-free human tissue. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 9, 115-126.

Raithel, H.J., Schaller, K.H., Akslen, L.A., Myking, A.O., Morkve, O., Gulsvik, A., 1989b. Analyses of chromium and nickel in human pulmonary tissue. Investigations in lung cancer patients and a control population under special consideration of medical expertise aspects. *Int Arch Occup Environ Health* 61, 507-512.

Raithel, H.J., Schaller, K.H., Kraus, T., Lehnert, G., 1993. Biomonitoring of nickel and chromium in human pulmonary tissue. *Int Arch Occup Environ Health* 65, S197-200.

Romeo, L., Maranelli, G., Malesani, F., Tommasi, I., Cazzadori, A., Graziani, M.S., 1992. Tentative reference values for some elements in broncho-alveolar lavage fluid. *The Science of The Total Environment* 120, 103-110.

Rosias, P.P., Robroeks, C.M., Niemarkt, H.J., Kester, A.D., Vernooy, J.H., Suykerbuyk, J., Teunissen, J., Heynens, J., Hendriks, H.J., Jobsis, Q., Dompeling, E., 2006. Breath condenser coatings affect measurement of biomarkers in exhaled breath condensate. *Eur Respir J* 28, 1036-1041.

Rustemeier, K., Stabbert, R., Haussmann, H.J., Roemer, E., Carmines, E.L., 2002. Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 2: Chemical composition of mainstream smoke. *Food and Chemical Toxicology* 40, 93-104.

Rysz, J., Stolarek, R.A., Luczynski, R., Sarniak, A., Wlodarczyk, A., Kasielski, M., Nowak, D., 2007. Increased hydrogen peroxide concentration in the exhaled breath

condensate of stable COPD patients after nebulized N-acetylcysteine. *Pulm Pharmacol Ther* 20, 281-289.

Salma, I., Balashazy, I., Winkler-Heil, R., Hofmann, W., Zaray, G., 2002. Effect of particle mass size distribution on the deposition of aerosols in the human respiratory system. *Journal of Aerosol Science* 33, 119-132.

Schettgen, T., Tings, A., Brodowsky, C., Muller-Lux, A., Musiol, A., Kraus, T., 2007. Simultaneous determination of the advanced glycation end product N (varepsilon)-carboxymethyllysine and its precursor, lysine, in exhaled breath condensate using isotope-dilution-hydrophilic-interaction liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 387, 2783-2791.

Shaikh, Z.A., Northup, J.B., Vestergaard, P., 1999. Dependence of cadmium-metallothionein nephrotoxicity on glutathione. *J Toxicol Environ Health A* 57, 211-222.

Sobaszek, A., Boulenguez, C., Frimat, P., Robin, H., Haguenoer, J.M., Edme, J.L., 2000. Acute respiratory effects of exposure to stainless steel and mild steel welding fumes. *J Occup Environ Med* 42, 923-931.

Soyer, O.U., Dizdar, E.A., Keskin, O., Lilly, C., Kalayci, O., 2006. Comparison of two methods for exhaled breath condensate collection. *Allergy* 61, 1016-1018.

Stavrides, J.C., 2006. Lung carcinogenesis: pivotal role of metals in tobacco smoke. *Free Radic Biol Med* 41, 1017-1030.

Svenes, K.B., Andersen, I., 1998. Distribution of nickel in lungs from former nickel workers. *Int Arch Occup Environ Health* 71, 424-428.

Takemoto, K., Kawai, H., Kuwahara, T., Nishina, M., Adachi, S., 1991. Metal concentrations in human lung tissue, with special reference to age, sex, cause of death, emphysema and contamination of lung tissue. *Int Arch Occup Environ Health* 62, 579-586.

Tatrai, E., Kovacikova, Z., Hudak, A., al, e., 2001. Comparative in vitro toxicity of Cadmium and Lead on redox cycling in type II pneumocytes. *J Appl Toxicol* 21, 479-483.

Thrall, K.D., Callahan, P.J., Weitz, K.K., Edwards, J.A., Brinkman, M.C., Kenny, D.V., 2001. Design and evaluation of a breath-analysis system for biological monitoring of volatile compound. *AIHAJ* 62, 28-35.

Todorovska, N., Karadjova, I., Stafilov, T., 2002. ETAAS determination of nickel in serum and urine. *Anal Bioanal Chem* 373, 310-313.

Torjussen, W., Zachariassen, H., Andersen, I., 2003. Cigarette smoking and nickel exposure. *J Environ Monit* 5, 198-201.

Tsuneta, Y., Ohsaki, Y., Kimura, K., Mikami, H., Abe, S., Murao, M., 1980. Chromium content of lungs of chromate workers with lung cancer. *Thorax* 35, 294-297.

Tzortzaki, E.G., Lambiri, I., Vlachaki, E., Siafakas, N.M., 2007. Biomarkers in COPD. *Curr Med Chem* 14, 1037-1048.

Vanoeteren, C., Cornelis, R., Versieck, J., 1986. Evaluation of trace elements in human lung tissue I. Concentration and distribution. *The Science of The Total Environment* 54, 217-230.

Vatrella, A., Bocchino, M., Perna, F., Scarpa, R., Galati, D., Spina, S., Pelaia, G., Cazzola, M., Sanduzzi, A., 2007. Induced sputum as a tool for early detection of airway inflammation in connective diseases-related lung involvement. *Respir Med* 101, 1383-1389.

Waalkes, M.P., 2003. Cadmium Carcinogenesis. *Mutat Res* 533, 107-120.

Wagner, K.A., McDaniel, R., Self, D., 2001. Collection and preparation of sidestream cigarette smoke for trace elemental determinations by graphite furnace atomic

absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J AOAC Int* 84, 1934-1940.

Waisberg, M., Pius, J., Hale, B., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanism of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95-117.

Wang, J., Ashley, K., Marlow, D., England, E.C., Carlton, G., 1999. Field method for the determination of hexavalent chromium by ultrasonication and strong anion-exchange solid-phase extraction. *Anal Chem* 71, 1027-1032.

Wang, J.S., Chiu, K., 2004. Simultaneous extraction of Cr(III) and Cr(VI) with a dithiocarbamate reagent followed by HPLC separation for chromium speciation. *Anal Sci* 20, 841-846.

Wilson, H.K., Monster, A.C., 1999. New technologies in the use of exhaled breath analysis for biological monitoring. *Occup Environ Med* 56, 753-757.

Zhitkovich, A., 2005. Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI). *Chem Res Toxicol* 18, 3-11.

13. Tabelle

| Composti Contendenti Cr(VI) |
|---|
| Dicromato di Ammonio – $(\text{NH}_4)_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ |
| Cromato di Calcio - CaCrO_4 |
| Triossido di Cromo o Acido Cromico – CrO_3 |
| Cromato di Piombo – PbCrO_4 |
| Cromato di Potassio – K_2CrO_4 |
| Dicromato di Potassio - $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ |
| Cromato di Sodio - Na_2CrO_4 |
| Cromato di Stronzio - SrCrO_4 |
| Cromato di Zinco - ZnCrO_4 |

Tabella 1: Principali composti di Cr(VI) con impieghi industriali.

| | Controlli | Lavoratori |
|---------------------------------|------------------|-------------------|
| N° soggetti | 25 | 24 |
| Sesso (M/F) | 13/12 | 24/0 |
| Età, anni | 31.0 ± 6.7 | 37.7 ± 6.3 |
| Fumatori/Ex/Non fumatori | 0/5/20 | 4/2/18 |
| FVC, % predetto | 108 ± 10.4 | 89.8 ± 10.7 |
| FEV1, % predetto | 103.7 ± 11.4 | 91.8 ± 12.0 |
| FEV1/FVC, % | 81.9 ± 6.3 | 83.1 ± 7.5 |

Tabella 2: Dati demografici e clinici dei soggetti che hanno partecipato allo studio. Sono riportati i valori medi ± deviazione standard (DS).

| | Cr-U ($\mu\text{g/g creat.}$) | Cr-CAE ($\mu\text{g/l}$) | H₂O₂-CAE (μM) | MDA-CAE (nM) |
|-----------------------|---|--------------------------------------|--|---------------------------------|
| Controlli | | | | |
| MG [DSG] | 0.25 [2.3] | 0.28 [2.6] | 0.09 [1.6] | 6.0 [1.5] |
| MEDIANA (I.I.) | 0.24 (0.09-0.45) | 0.25 (0.1-0.44) | 0.12 (0.05-0.2) | 6.5 (5.0-8.2) |
| Lavoratori IT1 | | | | |
| MG [DSG] | 8.2 [2.1]** | 5.3 [2.9]** | 0.36 [2.4]* | 8.2 [1.5] |
| MEDIANA (I.I.) | 7.9 (6.2-10.8) | 7.3 (2.3-9.2) | 0.44(0.22-0.61) | 7.7 (6.6-11.5) |
| Lavoratori FT | | | | |
| MG [DSG] | 9.4 [2.1]**, § | 6.4 [3.4]** | 0.59 [2.0]** | 9.7 [1.7] |
| MEDIANA (I.I.) | 9.0 (5.6-13.4) | 7.8 (2.1-15.2) | 0.69 (0.42-0.86) | 10.7 (6.9-13.4) |
| Lavoratori IT2 | | | | |
| MG [DSG] | 5.7 [2.2]**, §§, # | 2.8 [3.2]**, §, # | 0.19 [2.6]§, # | 6.6 [1.5] [#] |
| MEDIANA (I.I.) | 5.6 (3.1-6.7) | 4.0 (1.1-6.6) | 0.21 (0.09-0.35) | 6.8 (5.3-8.0) |

Tabella 3: Livelli di Cr-U, Cr-CAE, H₂O₂-CAE e MDA-CAE nei controlli e nei lavoratori ai diversi tempi. MG = media geometrica; DSG = deviazione standard geometrica; I.I. = intervallo interquartile. *p<0.05 confrontati coi controlli; **p<0.01 confrontati coi controlli; §p<0.05 confrontati con IT1; §§p<0.01 confrontati con IT1; #p<0.01 confrontati con FT.

| | Lavoratori esposti |
|---------------------------------|---------------------------|
| N° soggetti | 10 |
| Sesso (M/F) | 10/0 |
| Età, anni | 39.3 ± 7.3 |
| Fumatori/ex/non fumatori | 1/0/9 |
| FVC, % predetto | 91.2 ± 8.3 |
| FEV1, % predetto | 92.5 ± 9.1 |
| FEV1/FVC, % | 83.4 ± 9.2 |

Tabella 4: Dati demografici e clinici dei soggetti considerati. Sono riportate medie e deviazioni standard.

| | | Cagliari et al, 2006 | Goldoni et al, 2006 | Questo studio |
|---|-----------|-----------------------------|----------------------------|----------------------|
| Cr-U (µg / g creat.) | FT | 9.4 [2.1] | 2.6 [1.6] | 3.1 [2.0] |
| | IT | 5.7 [2.2]** (IT2) | 2.7 [2.8] | 1.8 [2.0]** |
| Cr tot-CAE (µg/L) | FT | 6.4 [3.4] | 2.6 [1.5] | 4.2 [3.6] |
| | IT | 2.8 [3.2]** (IT2) | 1.5 [2.0]* | 2.6 [2.8]* |
| Cr(VI)-CAE (µg/ L) | FT | ND | 0.9 [3.4] (0.2-2.0) | 0.85 (0.1-6.5) |
| | IT | | 0.2 [3.6] (0.1-0.7)* | 0.70 (0.1-1.7)* |
| H₂O₂-CAE(µM) | FT | 0.59 [2.0] | ND | 0.17 [1.5] |
| | IT | 0.19 [2.6]** (IT2) | | 0.08 [1.8]** |
| MDA-CAE (nM) | FT | 9.7 [1.7] | ND | 7.0 [1.1] |
| | IT | 6.6 [1.5]* (IT2) | | 6.8 [1.2] |

Tabella 5: confronto tra i valori dei biomarcatori misurati in urina e CAE nei tre studi considerati. Per uniformità, per lo studio di Cagliari et al., 2006 sono riportati solo i valori di IT del lunedì mattina (IT2). *= $p < 0.05$ rispetto a FT. **= $p < 0.01$ rispetto a FT. ND=Non Determinato.

| | Cr-Plasma ($\mu\text{g/L}$) | Cr-RC ($\text{ng}/10^9$ cellule) |
|----------------------|---|--|
| Lavoratori IT | 1.0 (0.2-1.6) | 0.26 (0.17-0.47) |
| Lavoratori FT | 2.9 (2.0-4.9)** | 0.64 (0.39-0.75)** |

Tabella 6: Livelli di Cr nel plasma e nei globuli rossi (RC) nei lavoratori ad IT e FT.

**= $p < 0.05$ se confrontato con IT.

| | NSCLC | Controlli |
|----------------------------|--------------|------------------|
| Soggetti (No.) | 20 | 20 |
| Età (mediana, anni) | 68.5 | 62.5 |
| Sesso (m/f) | 17/3 | 14/6 |
| Fumatori | 10 | 0 |
| Ex-fumatori | 9 | 0 |
| Non fumatori | 1 | 20 |

Tabella 7: Caratteristiche dei soggetti in studio. Gli ex- fumatori dovevano aver smesso di fumare da almeno un anno; in caso contrario, sono stati considerati fumatori.

| | Controlli | NSCLC tempo 1 | NSCLC tempo 2 |
|---------------------------|------------------|----------------------|-----------------------|
| Cr-CAE (µg/L) | 0.18 (ND-0.43) | 0.22 (0.08-0.35) | 0.40 (0.10-1.73)*.# |
| Cr-U (µg/g creat.) | 0.19 (0.12-0.25) | 0.20 (0.08-0.30) | 0.60 (0.40-0.84) **.# |

Tabella 8: Concentrazioni di Cr nel CAE e nell'urina dei controlli e dei pazienti con tumore polmonare prima (tempo 1) e dopo l'operazione (tempo 2). ND = non determinabile (<0.05 µg/l), *=p<0.05 and **=p<0.01 vs controlli (Mann-Whitney test), and #=p<0.05 and ##=p<0.01 vs pazienti al tempo 1 (Wilcoxon test).

| | Lavoratori |
|---------------------------------|-------------------|
| N° soggetti | 7 |
| Sesso (M/F) | 7/0 |
| Età, anni | 31.0 ± 8.8 |
| Fumatori/Ex/Non fumatori | 3/1/3 |
| FVC, % predetto | 97.7 ± 5.3 |
| FEV1, % predetto | 94.7± 9.5 |
| FEV1/FVC, % | 82.0± 7.5 |

Tabella 9: Dati demografici e clinici dei soggetti che hanno partecipato allo studio. Sono riportati i valori medi ± deviazione standard (DS).

| | Mediana | Intervallo Interquartile |
|--|---------|--------------------------|
| Ni-Aria Lunedì ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) | 69.0 | 31.5-105.0 |
| Ni-U Lunedì FT ($\mu\text{g}/\text{g creat.}$) | 35.9 | 26.1-47.3 |
| Ni-CAE Lunedì FT ($\mu\text{g}/\text{L}$) | 3.1 | 1.7-3.6 |
| H ₂ O ₂ -CAE Lunedì FT (μM) | 0.36 | 0.28-0.73 |
| MDA-CAE Lunedì FT (nM) | 2.34 | 2.26-6.94 |
| Ni-U Venerdì FT ($\mu\text{g}/\text{g creat.}$) | 24.2 | 13.6-41.6 |
| Ni-CAE Venerdì FT ($\mu\text{g}/\text{L}$) | 3.9 | 3.2-7.2* |
| H ₂ O ₂ -CAE Venerdì FT (μM) | 0.60 | 0.47-0.70 |
| MDA-CAE Venerdì FT (nM) | 3.47 | 2.69-5.03 |

Tabella 10: Livelli di Ni ambientale (solo il Lunedì), Ni-U, Ni-CAE, H₂O₂-CAE e MDA-CAE il lunedì e il venerdì a FT. *=p<0.05 rispetto al lunedì.

| | BPCO | Asma | Fumatori | Controlli |
|--|-------------|--------------|-----------------|------------------|
| N° di Soggetti | 50 | 30 | 30 | 50 |
| (N° di femmine) | (14 F) | (19 F) | (10 F) | (12 F) |
| Età, anni | 65.6 (14.0) | 44.6 (11.7) | 43.6 (10.4) | 54.9 (14.2) |
| Fumatori/Ex /Non | 16/28/6 | 0/4/26 | 30/0/0 | 0/6/44 |
| Pacchi/anno Fum | 28.9 (4.3) | 0 | 17.7 (11.0) | 0 |
| FVC, L | 4.5 (10.5) | 3.8 (0.9) | 4.5 (0.6) | 4.6 (0.7) |
| FVC, % del predetto | 83.3 (32.4) | 104.3 (16.5) | 109.5 (10.8) | 111.8 (14.6) |
| FEV₁, L | 1.7 (0.7) | 2.9 (0.9) | 3.5 (0.6) | 3.7 (0.7) |
| FEV₁, % del predetto | 60.3 (20.5) | 94.1 (17.5) | 103.6 (10.3) | 106.1 (8.3) |
| FEV₁/FVC | 0.5 (0.2) | 0.75 (0.06) | 0.8 (0.08) | 0.77 (0.08) |

Tabella 11: Caratteristiche dei soggetti che hanno partecipato allo studio. Le variabili continue sono riportate come media (DS).

| Composizione SERETIDE® | |
|-------------------------------|---------|
| 0.3-0.5 micron | 80.3% |
| 0.5-1.0 micron | 90.2% |
| 1.0-2.5 micron | 215.5% |
| 2.5-5.0 micron | 427.7% |
| 5.0-10.0 micron | 1123.4% |
| >10 micron | 2310.0% |

Tabella 12: Composizione in % rispetto all'aria ambientale del farmaco in polvere per l'asma SERETIDE®.

14. Figure

Tavola Periodica degli Elementi

1 IA **Nuovo Originale** **18** VIIA

1 H Idrogeno 1,00794 **2** He Elio 4,002602

3 Li Litio 6,941 **4** Be Berillio 9,012182

11 Na Sodio 22,989770 **12** Mg Magnesio 24,3050

19 K Potassio 39,0983 **20** Ca Calcio 40,078 **21** Sc Scandio 44,955910 **22** Ti Titanio 47,887 **23** V Vanadio 50,9418 **24** Cr Cromo 51,9961 **25** Mn Manganeso 54,938048 **26** Fe Ferro 55,847 **27** Co Cobalto 58,933200 **28** Ni Nichel 58,6934 **29** Cu Rame 63,546 **30** Zn Zinco 65,409 **31** Ga Gallio 69,723 **32** Ge Germanio 72,64 **33** As Arsenico 74,92160 **34** Se Selenio 78,96 **35** Br Bromo 79,904 **36** Kr Krypton 83,798

37 Rb Rubidio 85,4678 **38** Sr Stronzio 87,62 **39** Y Ittrio 88,90585 **40** Zr Zirconio 91,224 **41** Nb Niobio 92,90638 **42** Mo Molibdeno 95,94 **43** Tc Tecnecio (98) **44** Ru Rutenio 101,07 **45** Rh Rodio 102,90550 **46** Pd Palladio 106,42 **47** Ag Argento 107,8682 **48** Cd Cadmio 112,411 **49** In Indio 114,818 **50** Sn Stagno 118,710 **51** Sb Stibio 121,760 **52** Te Tellurio 127,60 **53** I Iodio 126,90447 **54** Xe Xenon 131,295

55 Cs Cesio 132,90545 **56** Ba Bario 137,327 **57 to 71** **57** La Lantanio 138,9055 **58** Ce Cerio 140,116 **59** Pr Praseodimio 140,90765 **60** Nd Neodimio 144,24 **61** Pm Prometio (145) **62** Sm Samario 150,36 **63** Eu Europio 151,964 **64** Gd Gadolinio 157,25 **65** Tb Terbio 158,92534 **66** Dy Disprosio 162,50 **67** Ho Holmio 164,93032 **68** Er Erbio 167,259 **69** Tm Tulio 168,93421 **70** Yb Itrio 173,04 **71** Lu Lutetio 174,967

72 Hf Hafnio 178,49 **73** Ta Tantalio 180,9479 **74** W Tungsteno 183,84 **75** Re Rhenio 186,207 **76** Os Osmio 190,23 **77** Ir Iridio 192,217 **78** Pt Platino 195,078 **79** Au Oro 196,96655 **80** Hg Mercurio 200,59 **81** Tl Talio 204,3833 **82** Pb Piombo 207,2 **83** Bi Bismuto 208,98038 **84** Po Polonio (209) **85** At Astatina (210) **86** Rn Radon (222)

87 Fr Francio (223) **88** Ra Radium (226) **89 to 103** **104** Rf Rutherfordio (261) **105** Db Dubnio (262) **106** Sg Seaborgio (266) **107** Bh Bohrio (264) **108** Hs Hassio (285) **109** Mt Meitnerio (268) **110** Ds Darmstadtio (271) **111** Rg Roentgenio (272) **112** Uub Ununbio (285) **113** Uut Ununtrio (284) **114** Uuq Ununquadio (289) **115** Uup Ununpentio (288) **116** Uuh Ununsextio (289) **117** Uus Ununseptium (289) **118** Uuo Ununoctium (294)

89 Ac Actinio (227) **90** Th Torio 232,0381 **91** Pa Protattinio 231,03688 **92** U Uranio 238,02891 **93** Np Neptunio (237) **94** Pu Plutonio (244) **95** Am Americio (243) **96** Cm Curcio (247) **97** Bk Berkelio (247) **98** Cf Californio (251) **99** Es Einstenio (252) **100** Fm Fermio (257) **101** Md Mendelievio (258) **102** No Nobelio (259) **103** Lr Laurencio (262)

Design Copyright © 1987 McGraw-Hill, Inc. <http://www.mh.com>

Figura 1: Tavola periodica degli elementi.

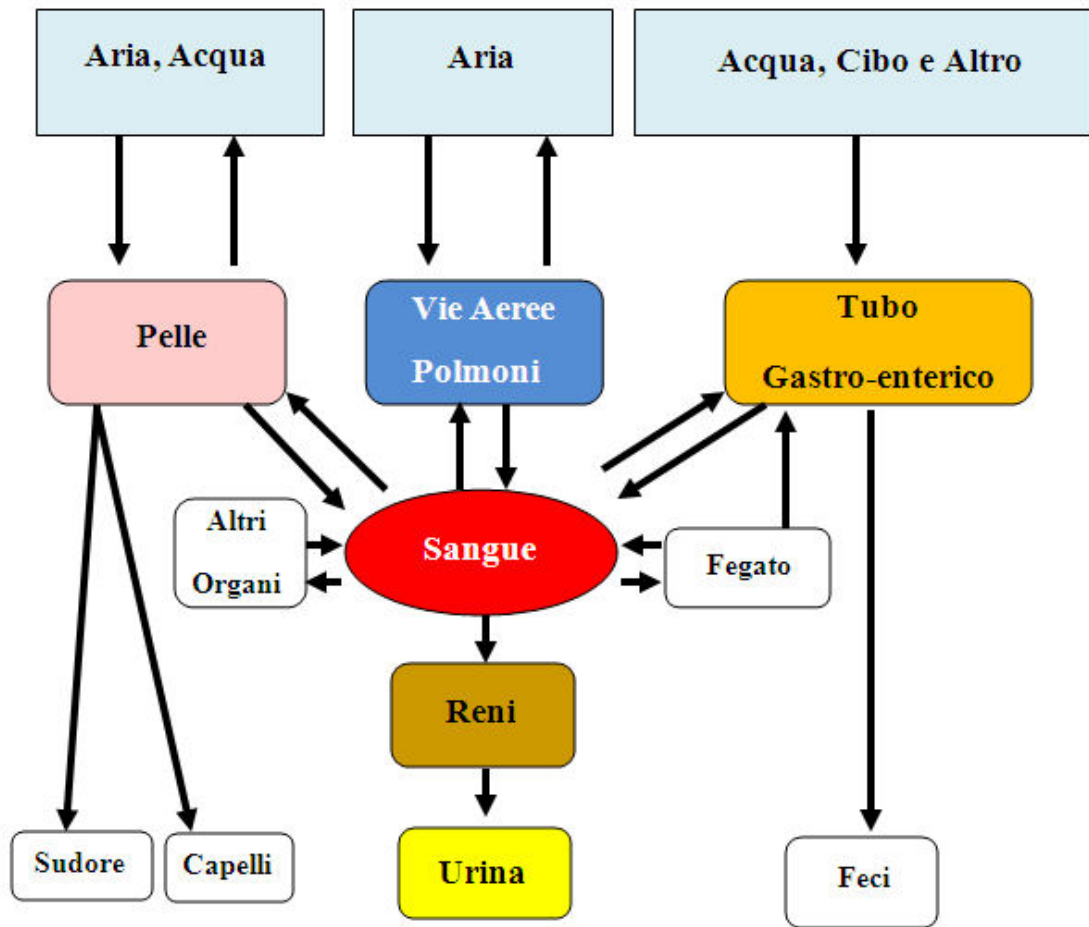


Figura 2: Esposizione e vie metaboliche per gli elementi (adattato da Apostoli, 2002).

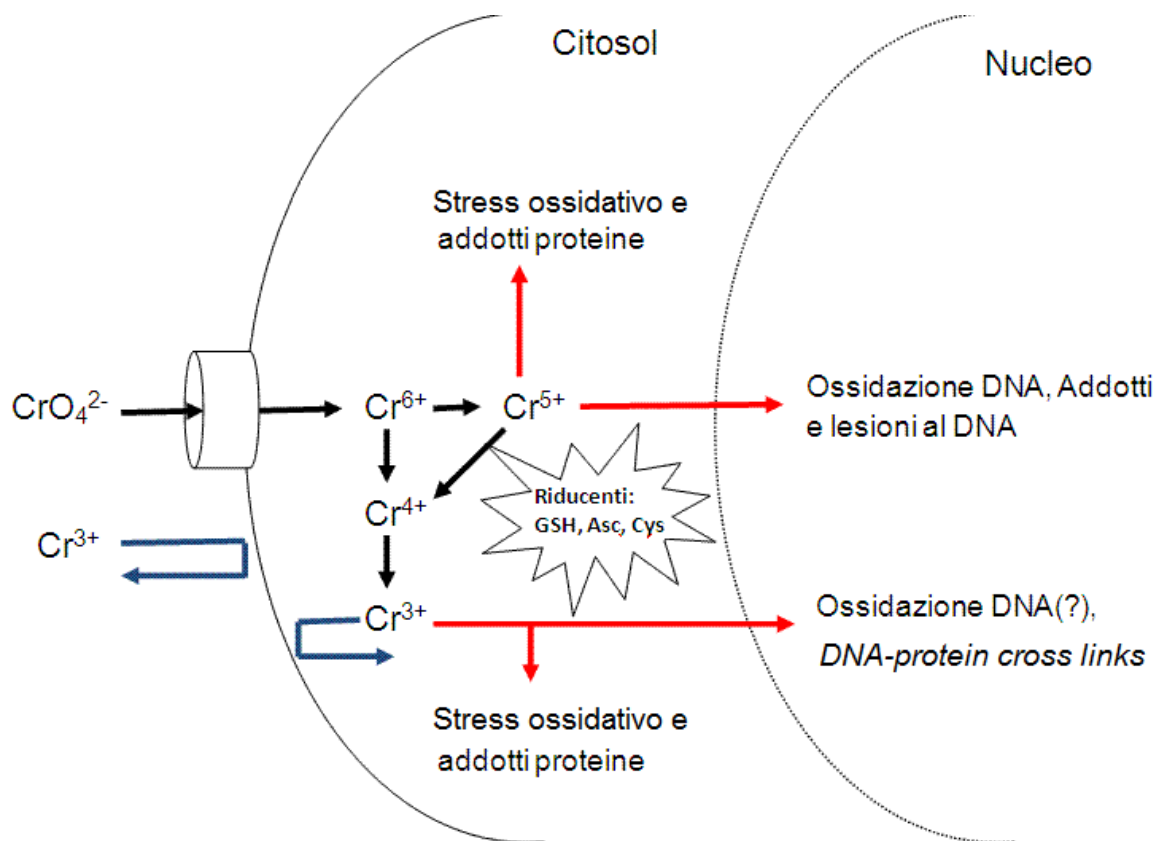


Figura 3. Meccanismi di tossicità di Cr(VI).

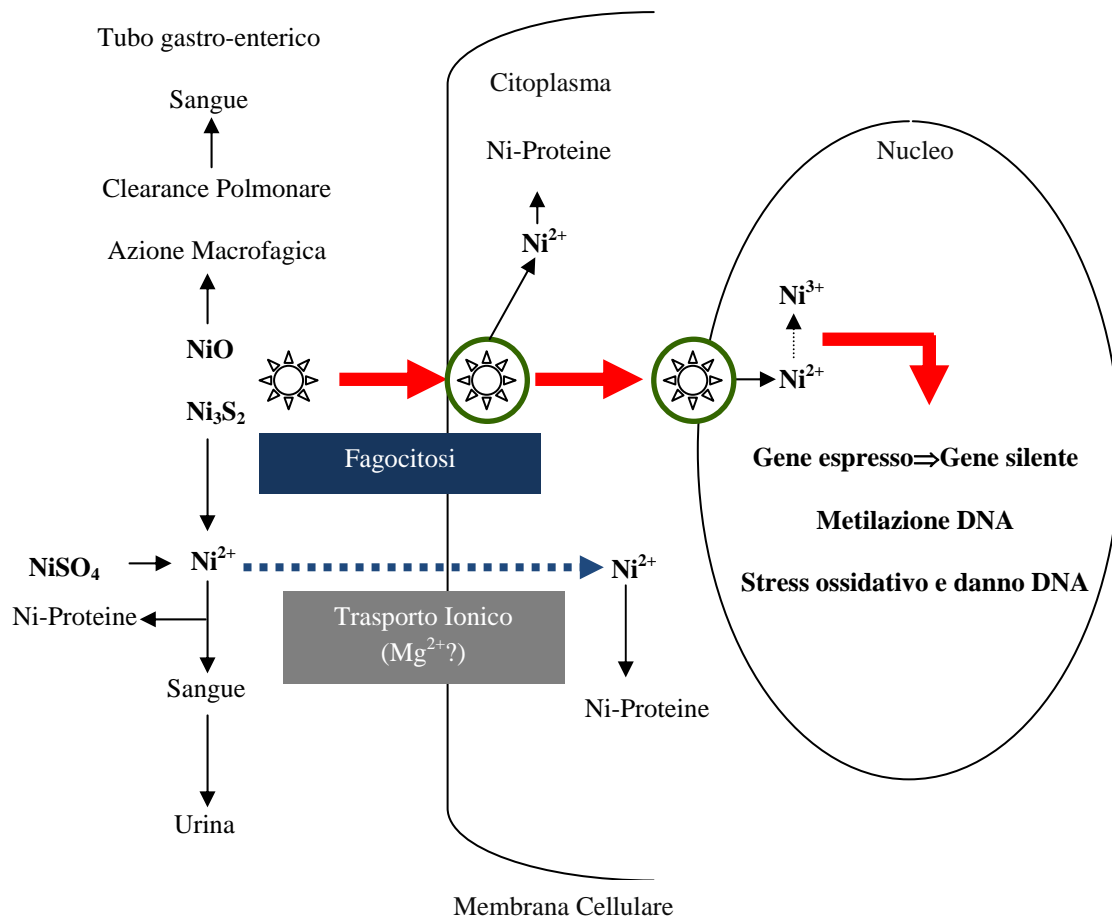


Figura 4. Meccanismi di tossicità di Ni (adattato da Oller, 2002).



Figura 5. (A) Cromatura Galvanica – palline da ping-pong posizionate sulla superficie del bagno di cromatura per aumentare la superficie adsorbente le nebbie di anidride carbonica. (B) Cromatura Galvanica – operai al lavoro alle vasche di cromatura.

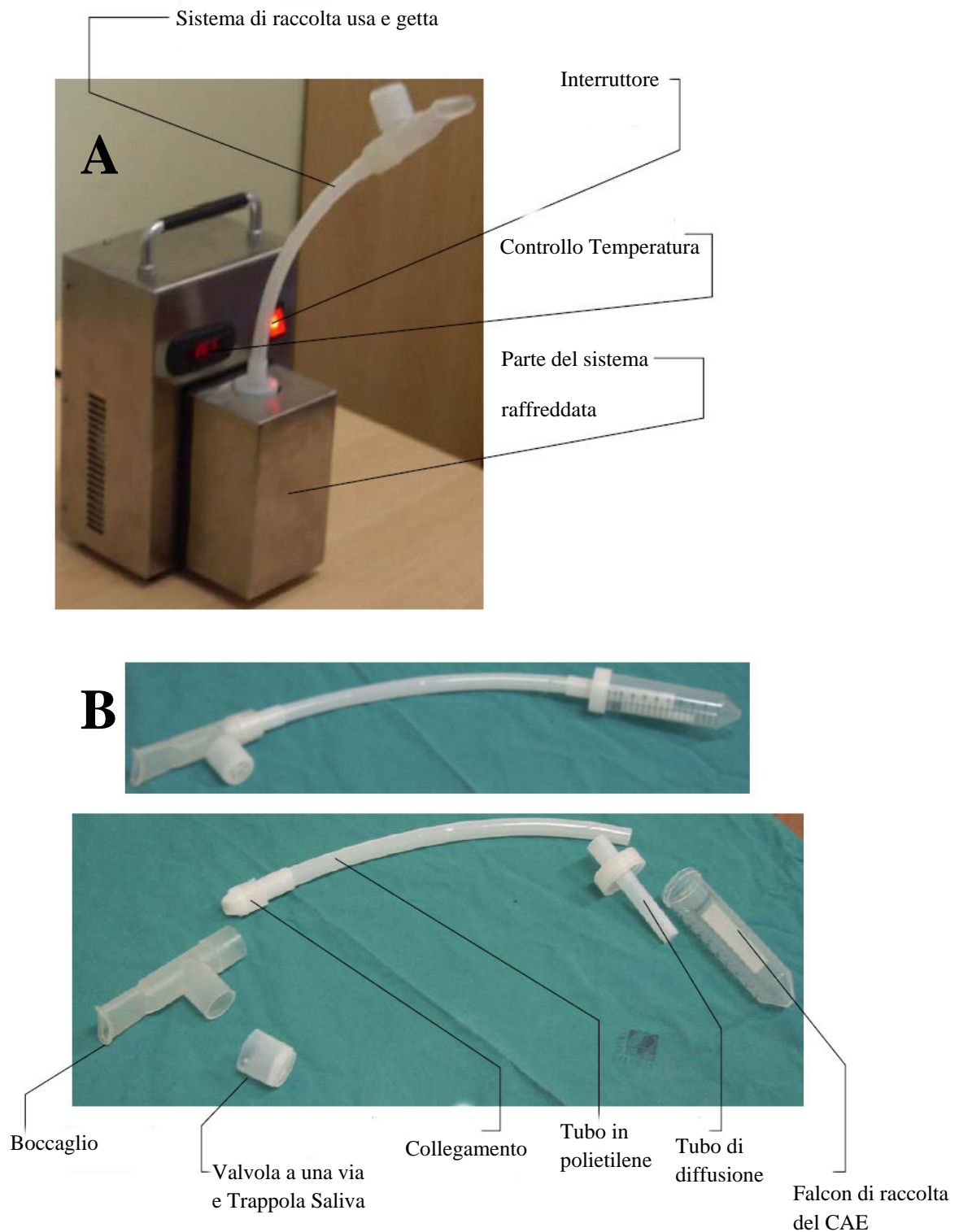


Figura 6: (A) Condensatore TURBO-DECCS con tutte le sue parti. (B) Dettaglio sulla parte usa e getta, denominata DECCS.

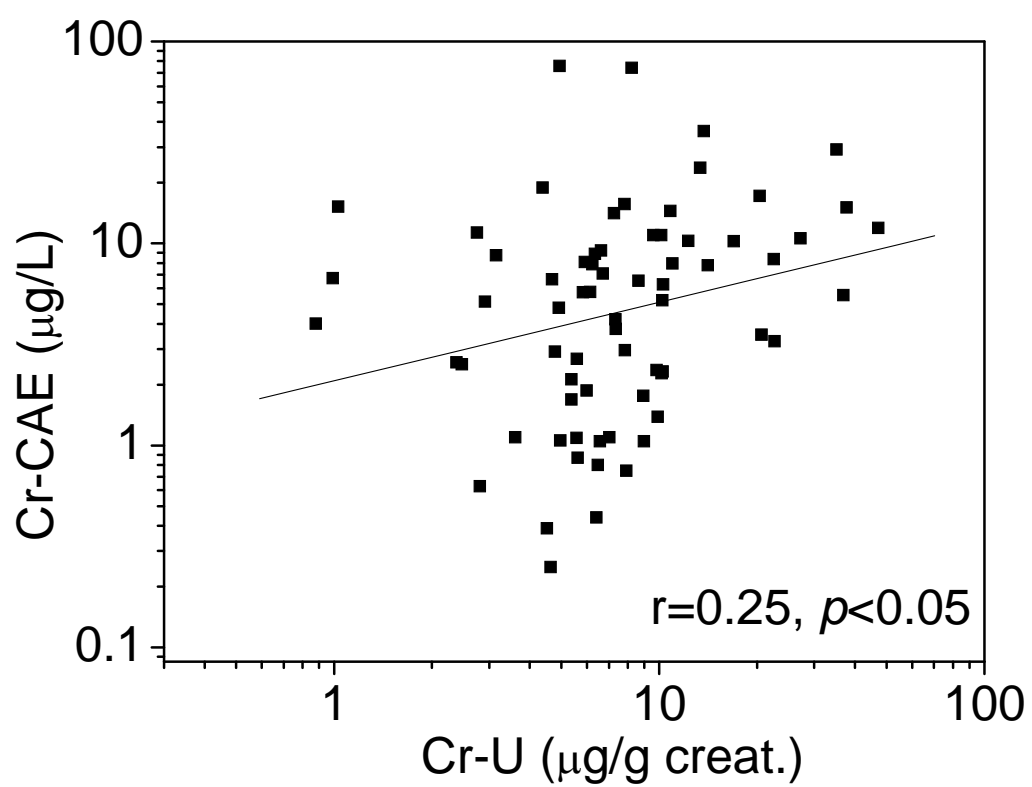


Figura 7: Correlazione con la retta di regressione e il coefficiente di correlazione lineare di Pearson su scala logaritmica tra Cr-U e Cr-CAE.

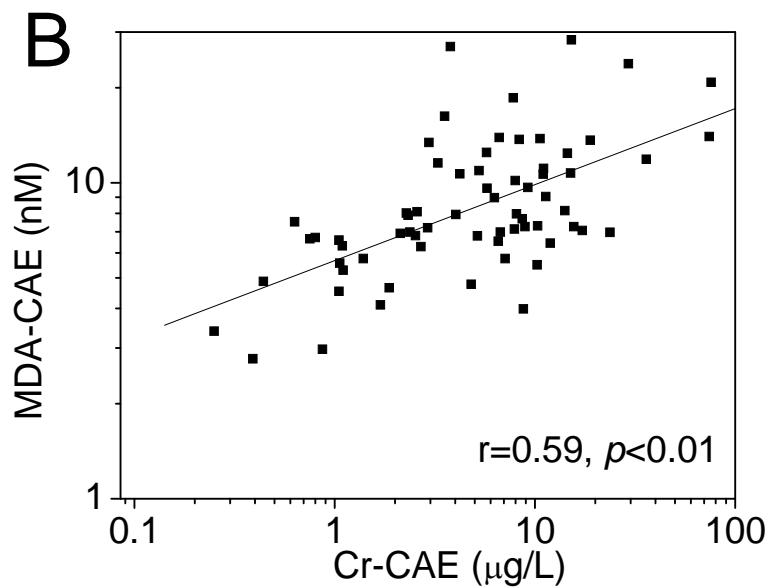
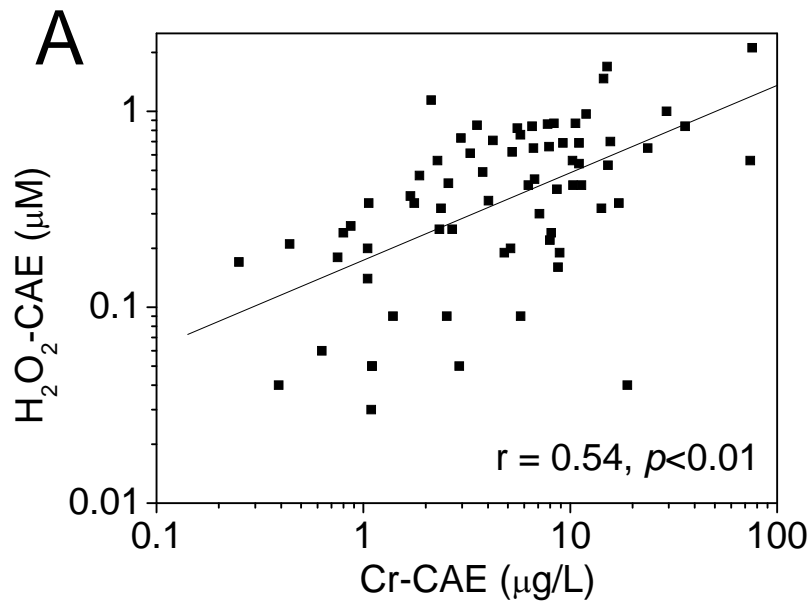


Figura 8: (A) Correlazione con la retta di regressione e il coefficiente di correlazione lineare di Pearson su scala logaritmica tra Cr-CAE e H_2O_2 -CAE. (B) Correlazione con la retta di regressione e il coefficiente di correlazione lineare di Pearson su scala logaritmica tra Cr-CAE e MDA-CAE.

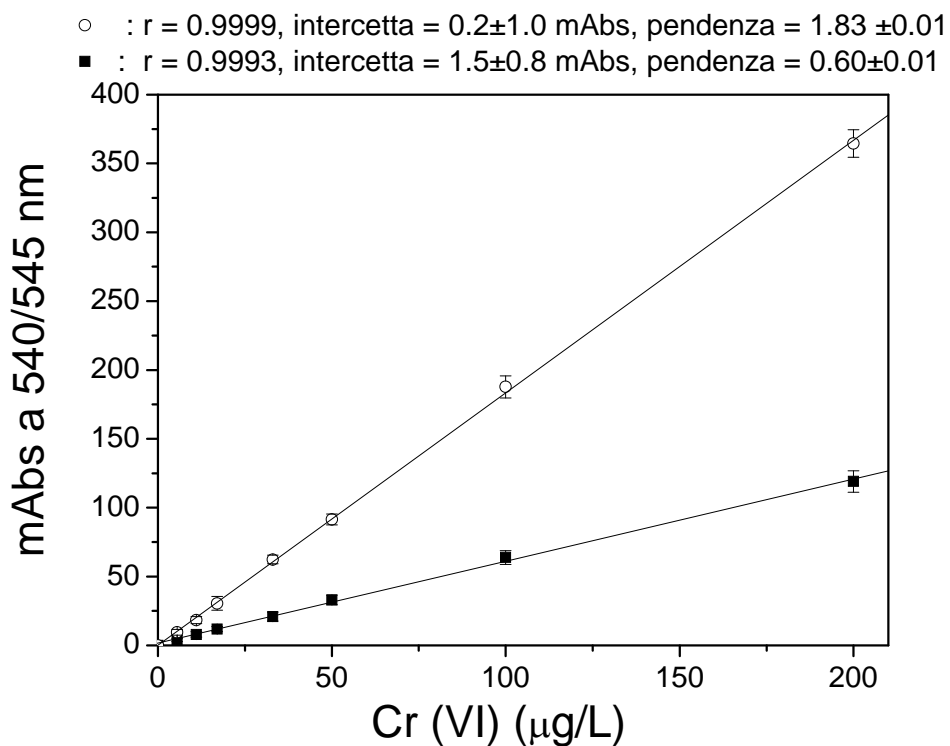


Figura 9: rette di calibrazione di Cr(VI) nell'intervallo 0-200 µg/L con l'estrazione del complesso Cr(VI)-DPC in 1-butanolo misurando l'assorbanza a 545 nm (○), e seguendo il protocollo NIOSH 7703 misurando l'assorbanza a 540 nm (■).

- acqua: intercetta = 13.1 ± 1.5 mAbs, pendenza = 16.8 ± 0.5 , $r = 0.998$
- CAE: intercetta = 13.3 ± 1.4 mAbs, pendenza = 14.5 ± 0.5 , $r = 0.997$

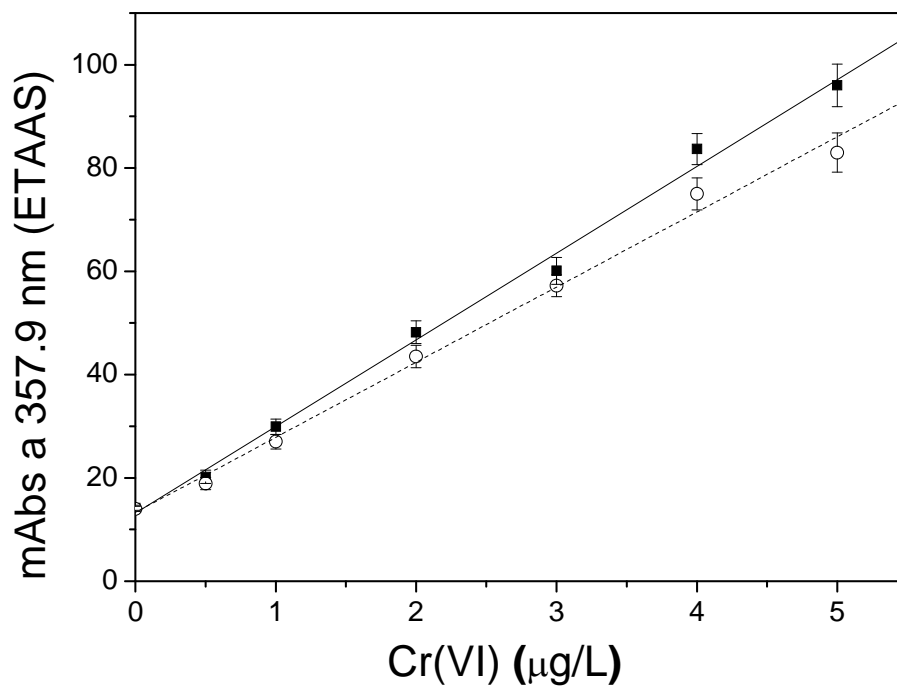


Figura 10: Retta di calibrazione di Cr(VI) in nell'intervallo 0-5 µg/L dopo estrazione con TBA e complessazione con DPC in acqua, and in un pool di CAE. L'intercetta rappresenta il valore del bianco in assenza di standard Cr(VI).

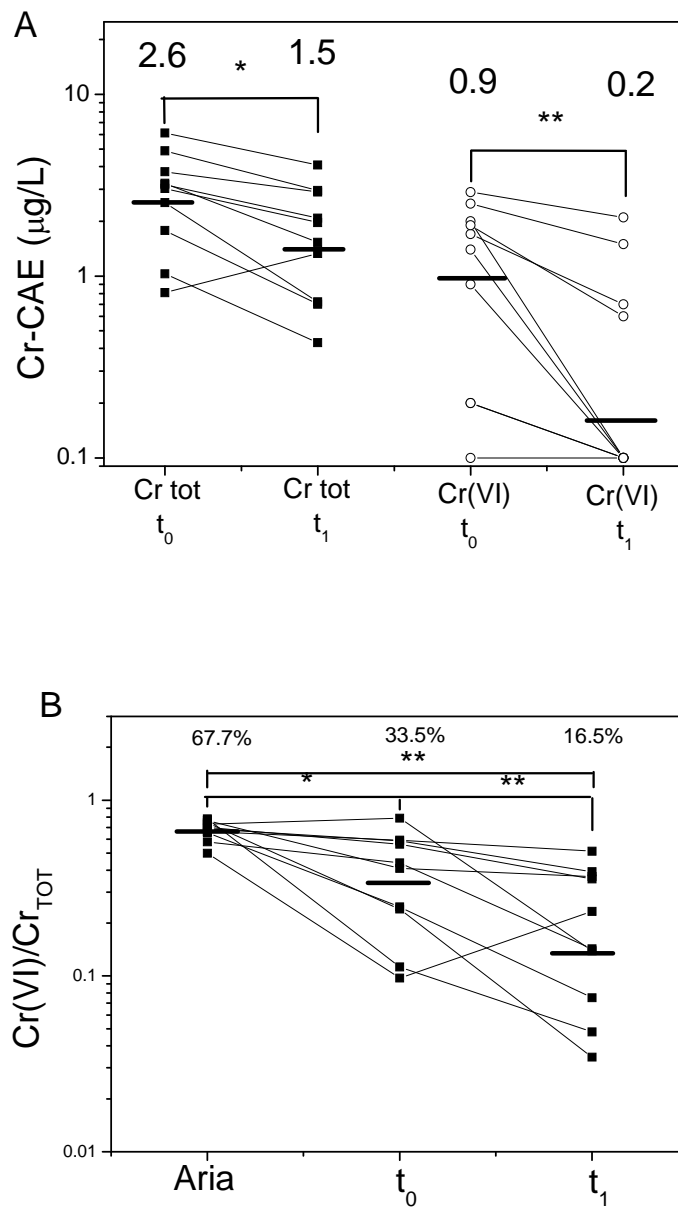


Figura 11: (A) Livelli di Cr e Cr(VI) alla fine del turno lavorativo del martedì (t_0) e all'inizio del turno lavorativo del mercoledì (t_1) ed è riportata anche la media geometrica. (B) Frazione di Cr(VI) nei campioni ambientali (Aria) a t_0 e a t_1 ed è riportata anche la media geometrica. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.05$ con un t-student per misure appaiate (A), ANOVA per misure ripetute seguito da test post-hoc di Tukey (B).

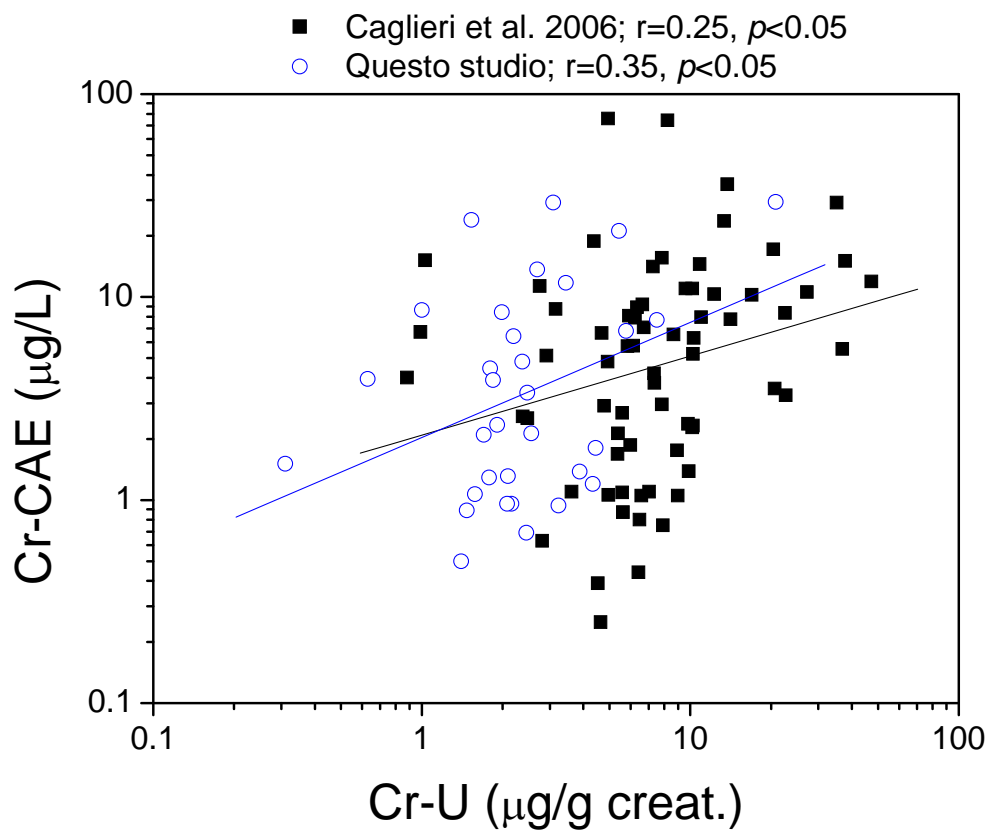


Figura 12: Correlazione tra Cr-U e Cr-CAE in questo studio confrontato con Caglieri et al., 2006). Sono riportati anche la retta di regressione su scala logaritmica, il coefficiente di correlazione lineare di Pearson e la significatività.

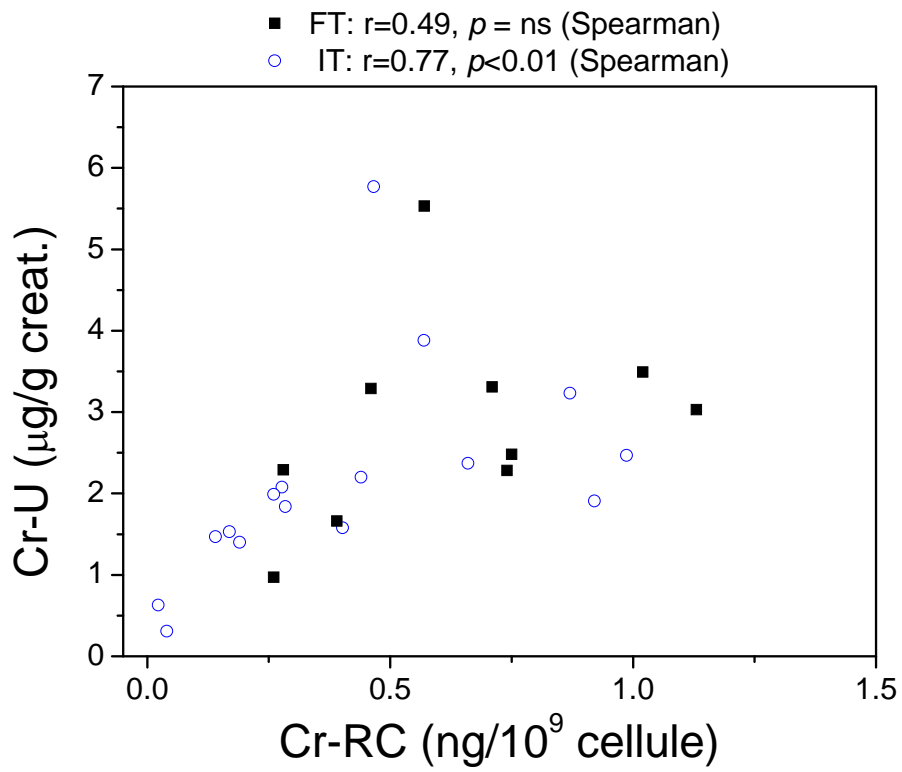


Figura 13: Correlazioni tra Cr-U e Cr-RC ad IT e FT. In questo caso, il coefficiente di correlazione è quello di Spearman.

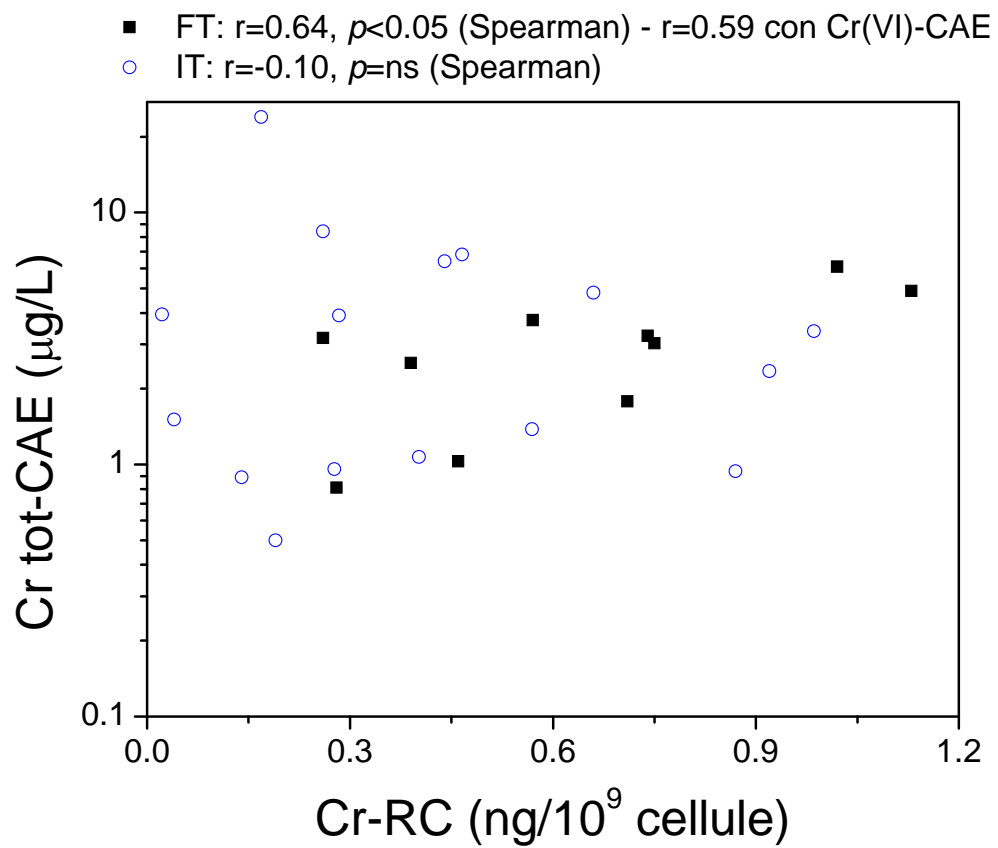


Figura 14: Correlazioni tra Cr-CAE e Cr-RC ad IT e FT. In questo caso, il coefficiente di correlazione è quello di Spearman.

$$\log(\text{Cr-CAE}) = -0.30 + 0.43 \cdot \log(\text{Cr-Tessuto}); r=0.55, p=0.01$$

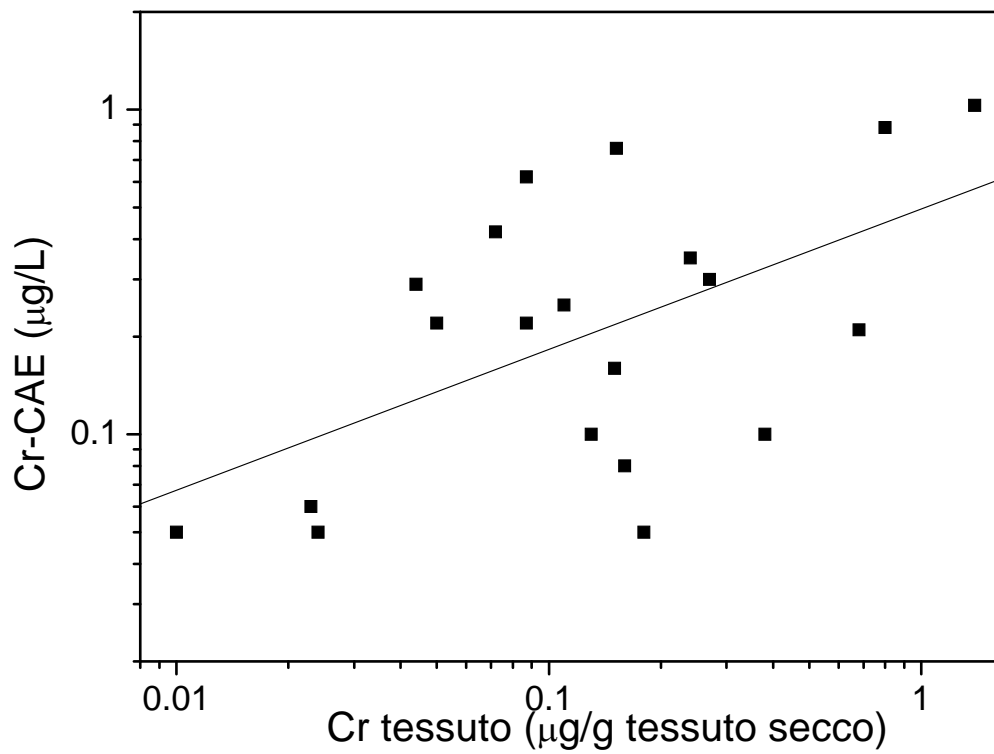


Figura 15. Correlazione tra Cr-CAE e Cr-Tessuto con l'equazione della retta di regressione.

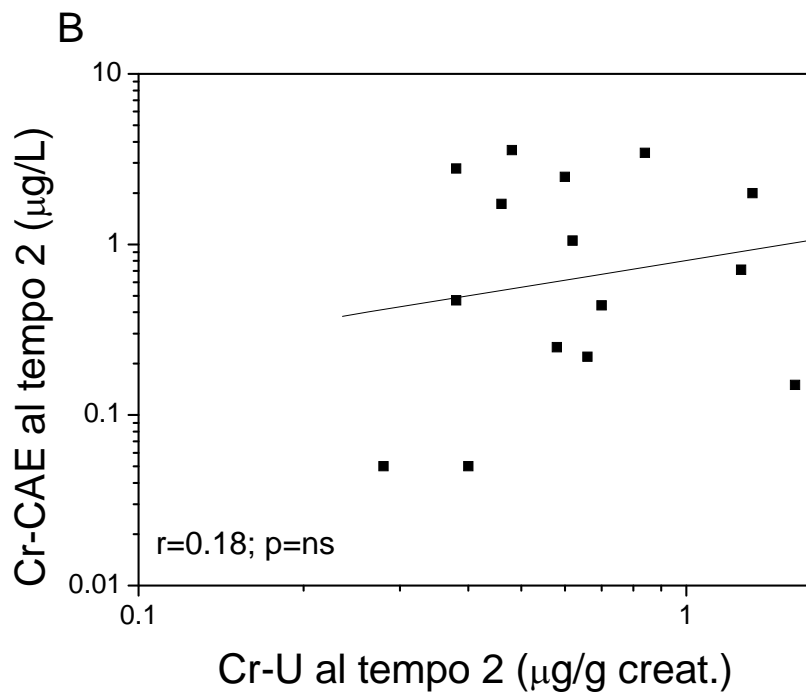
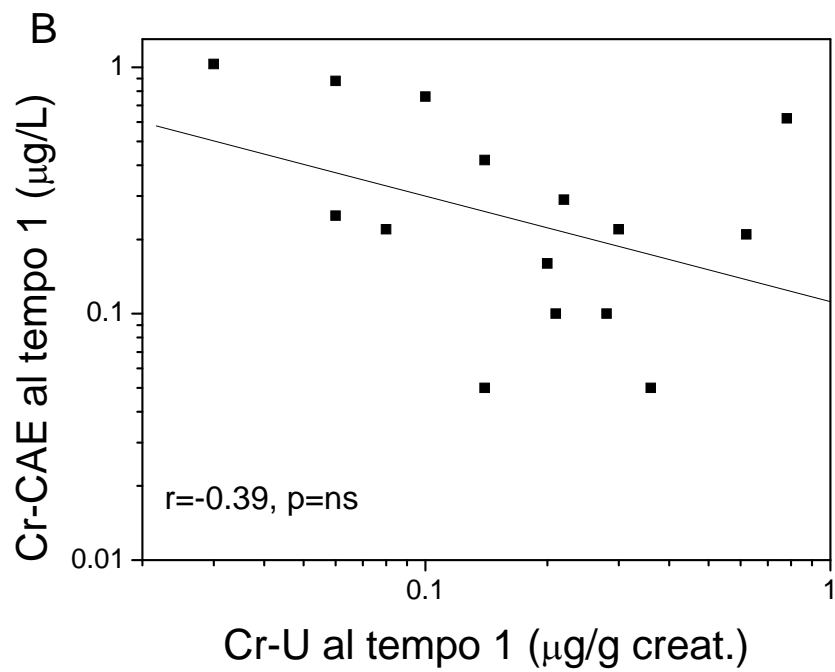


Figura 16. Correlazioni tra Cr-CAE e Cr-U prima (**A**) e dopo l'intervento (**B**). ns = non significativo.

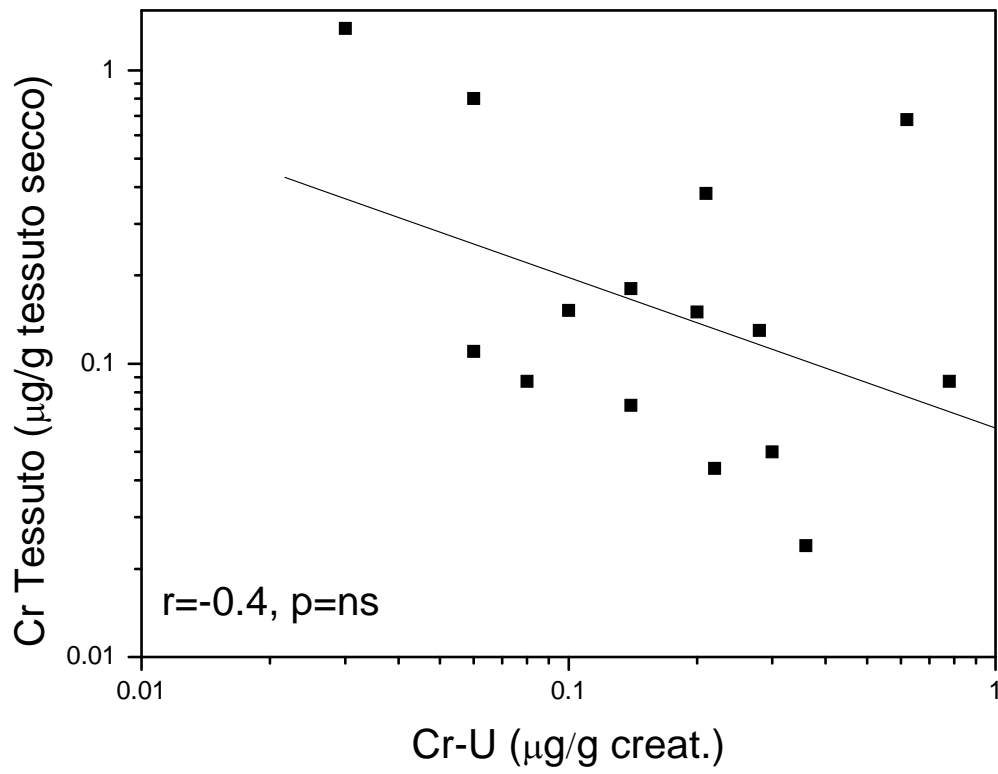


Figura 17. Correlazione tra Cr-Tessuto e Cr-U prima dell'intervento. ns=non significativo

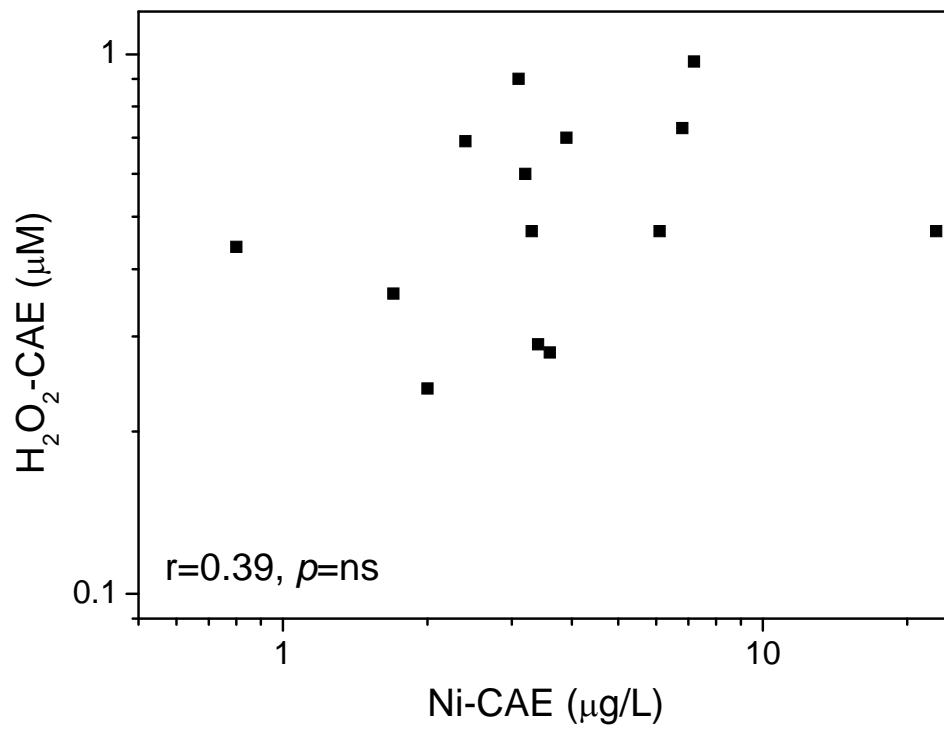


Figura 18: Correlazione tra Ni-CAE e H₂O₂-CAE. E' riportato anche il coefficiente di correlazione di Spearman.

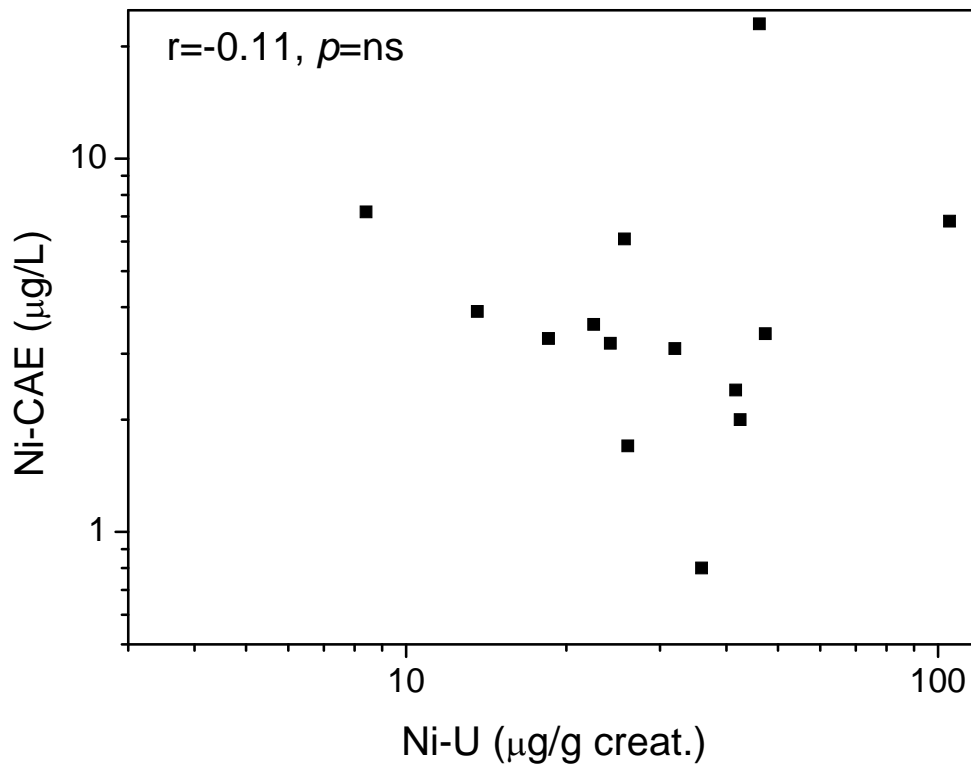


Figura 19: Correlazione tra Ni-U e Ni-CAE. E' riportato anche il coefficiente di correlazione di Spearman.

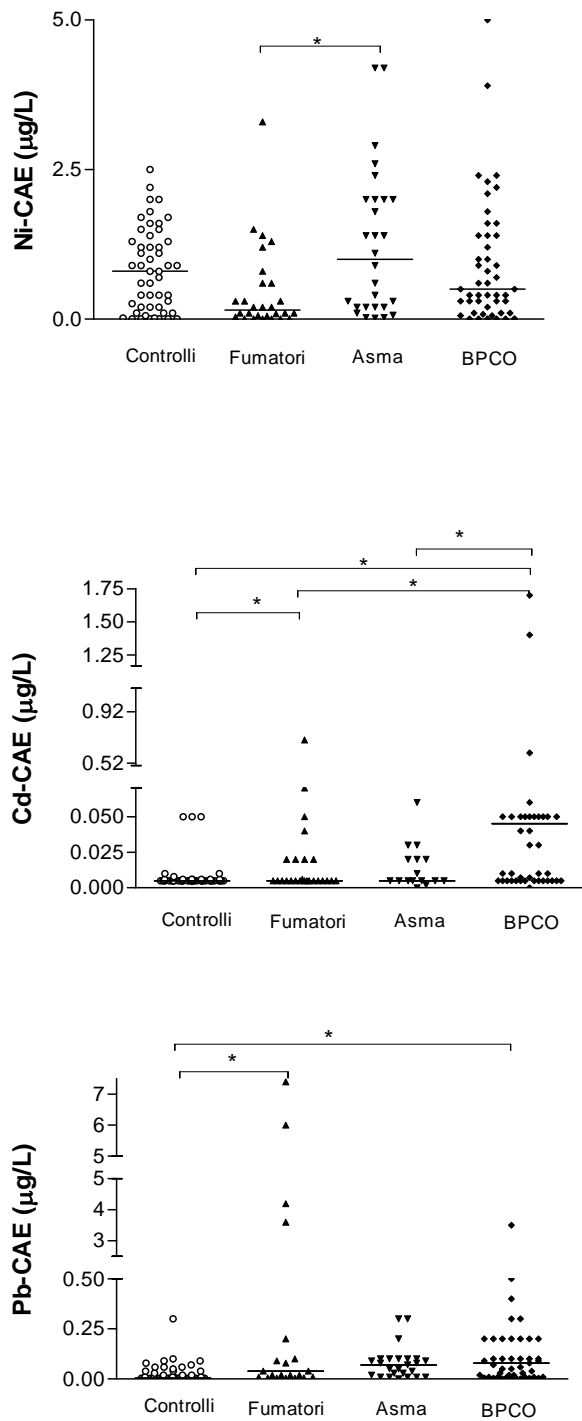


Figure 20: I livelli di Ni (A), Cd e Pb (B e C) (espresso in scala in log10) nel CAE dei gruppi studiati. Le differenze tra i gruppi sono state testate con il test di Kruskal-Wallis ($P < 0.0001$) seguito dal test *post-hoc* di Dunn ($* = p < 0.05$). Le linee orizzontali rappresentano le mediane.

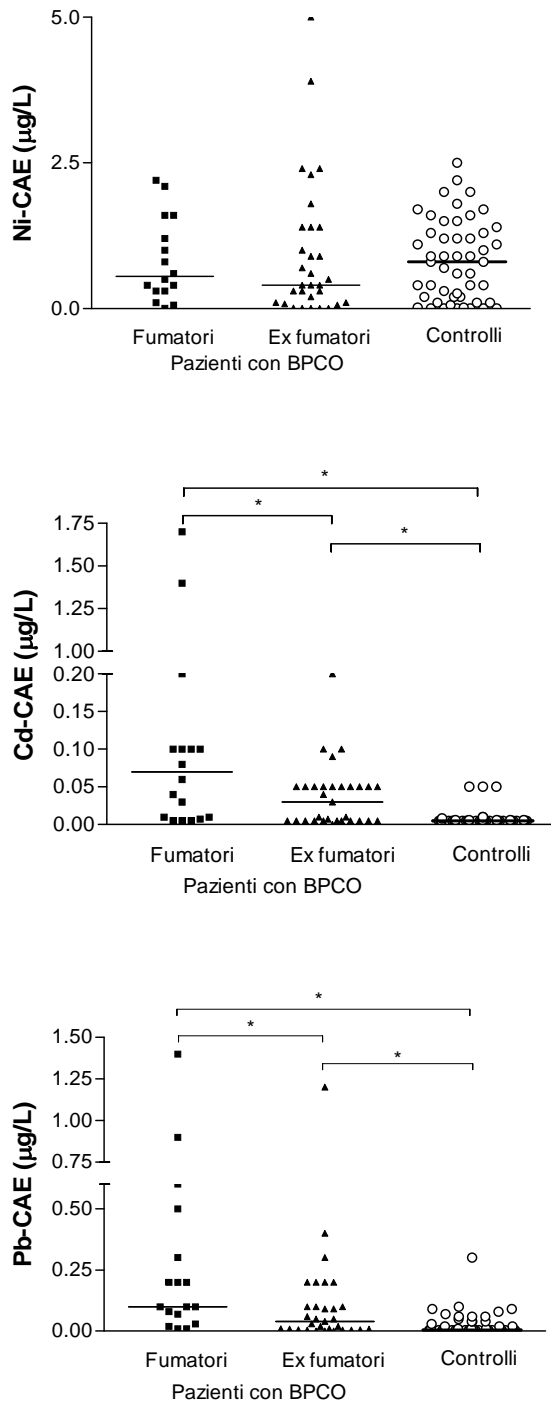


Figure 21: I livelli di Ni (A), Cd e Pb (B e C) nel CAE dei pazienti con BPCO, distinguendo fumatori ed ex fumatori, e controlli non fumatori. Le differenze tra i gruppi sono state testate con il test di Mann-Whitney ($*=p<0.05$). Le linee orizzontali rappresentano le mediane.

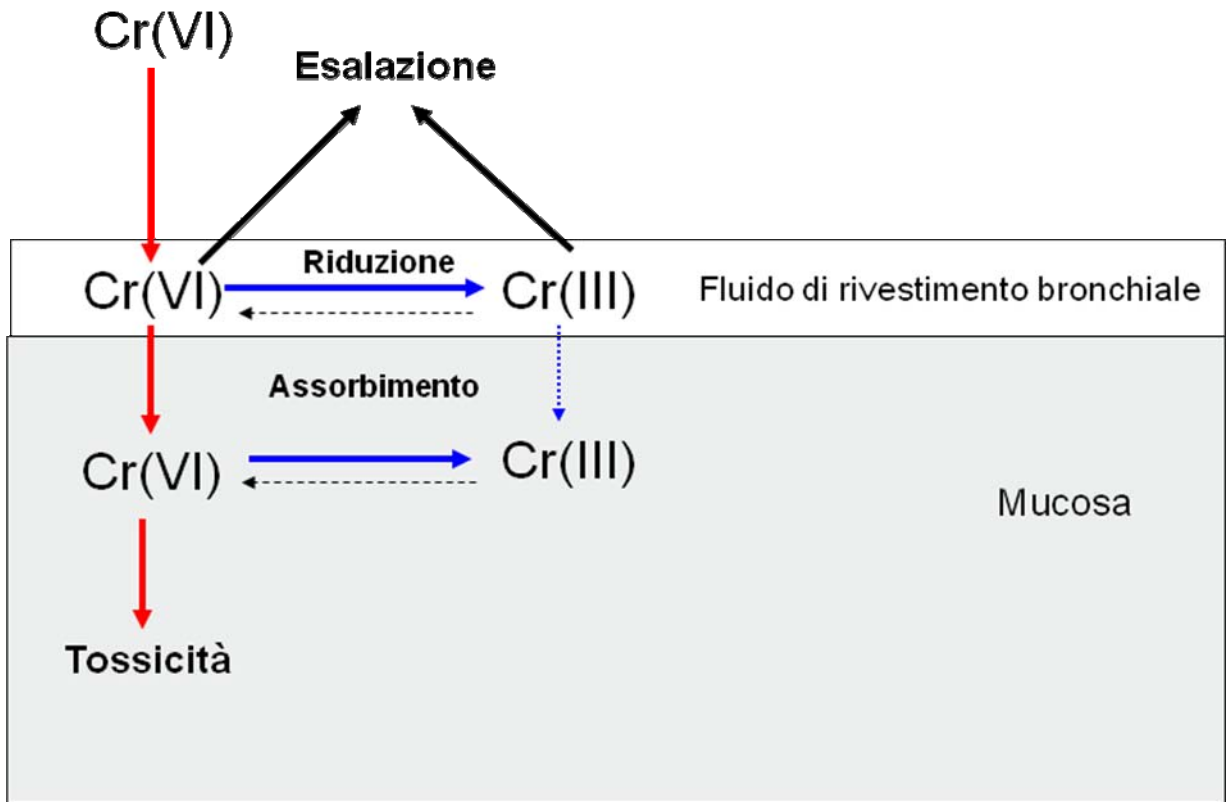


Figura 22: Ipotesi sulla tossicocinetica di Cr(VI) nelle vie aeree.

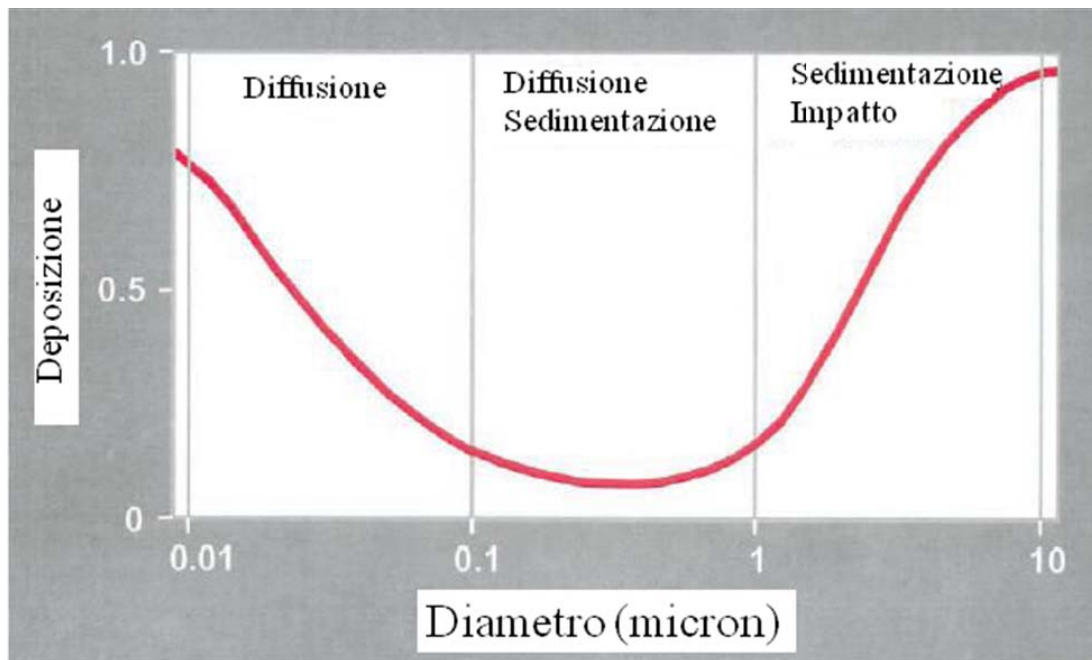


Figura 23: Modello teorico che descrive la deposizione polmonare frazionaria delle particelle in base al diametro aerodinamico (adattato da Heyder, 2004).

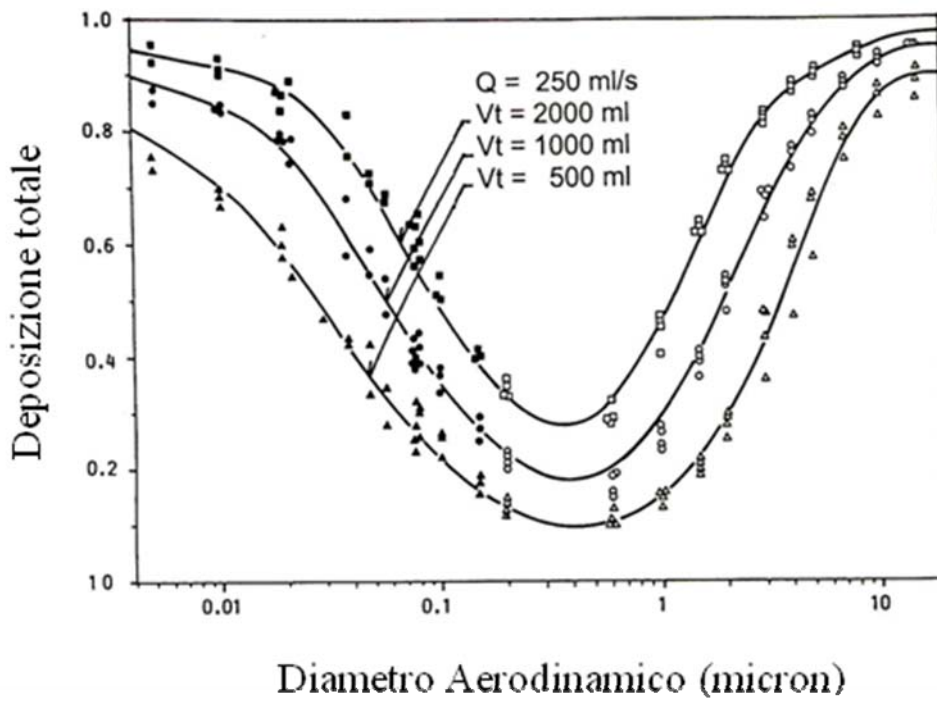


Figura 24: Dipendenza della deposizione totale frazionaria dal volume tidale (V_t) (adattato da Kim, 2000). Q è il flusso respiratorio.

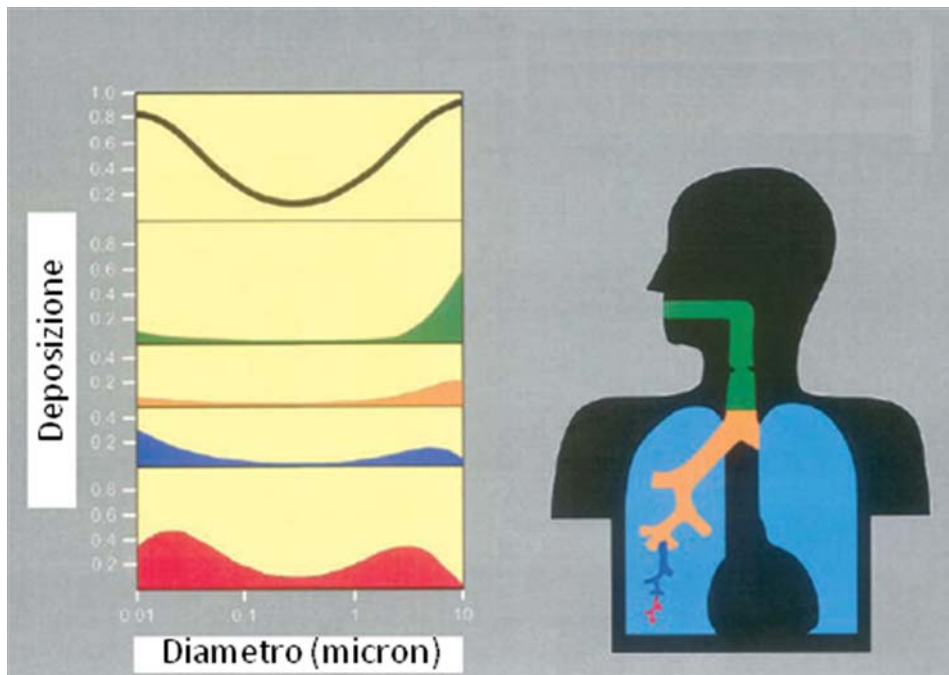


Figura 25: deposizione polmonare nei diversi tratti delle vie aeree (adattato da Heyder, 2004). Condizioni simulate: densità delle particelle 1 g/cm^3 , flusso respiratorio 0.3 L/s , ciclo respiratorio 5 s .

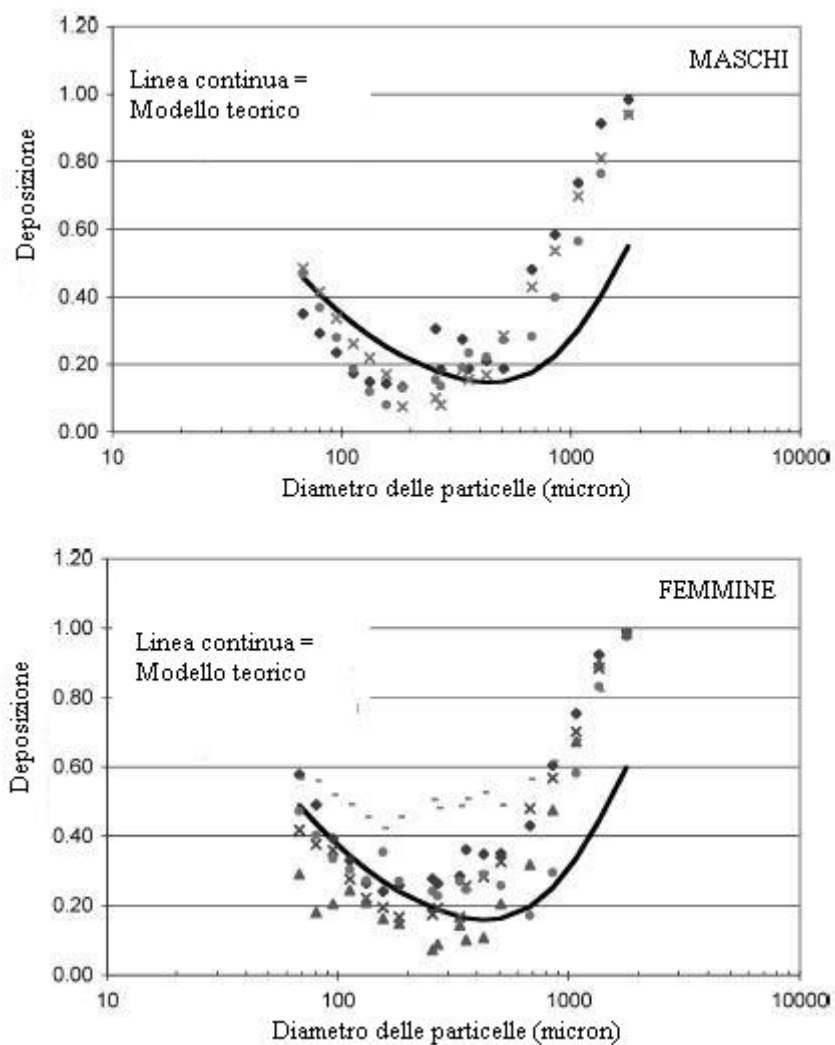


Figura 26: deposizione polmonare di particelle ambientali, distinguendo maschi e femmine. Il confronto è fatto rispetto ai modelli teorici (adattato da Montoya et al., 2004).

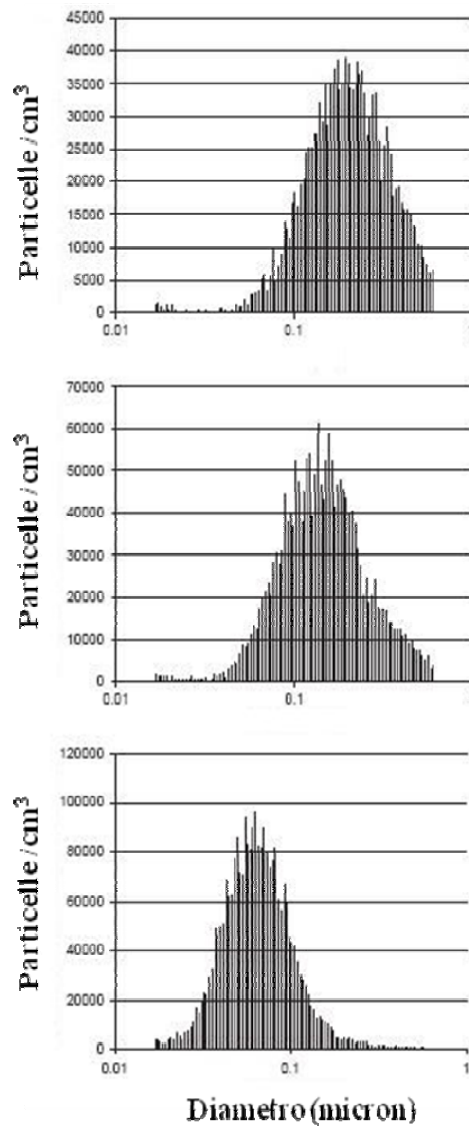


Figura 27: distribuzione delle particelle presenti nel fumo di sigaretta ambientale (primo grafico in alto), nel fumo di scarico delle automobili diesel (al centro), nel fumo di scarico delle auto a benzina (primo grafico in basso) (adattato da Morawska et al. 2005).

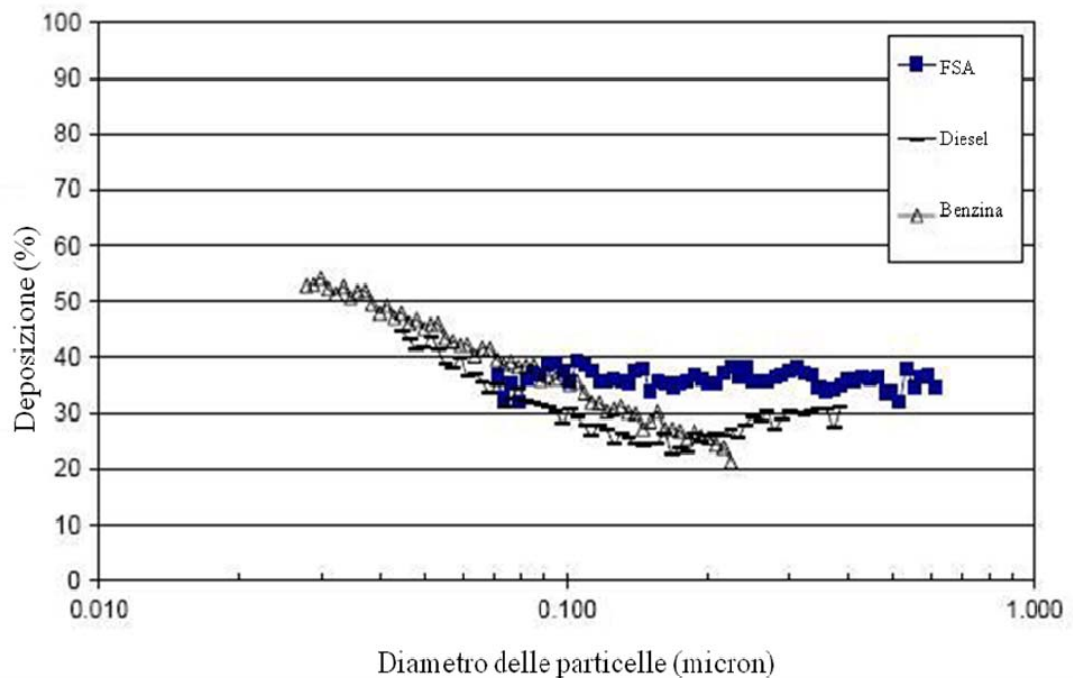


Figura 28: Deposizione (%) in funzione del diametro particellare delle particelle descritte in figura 27 (adattato da Morawska et al. 2005).

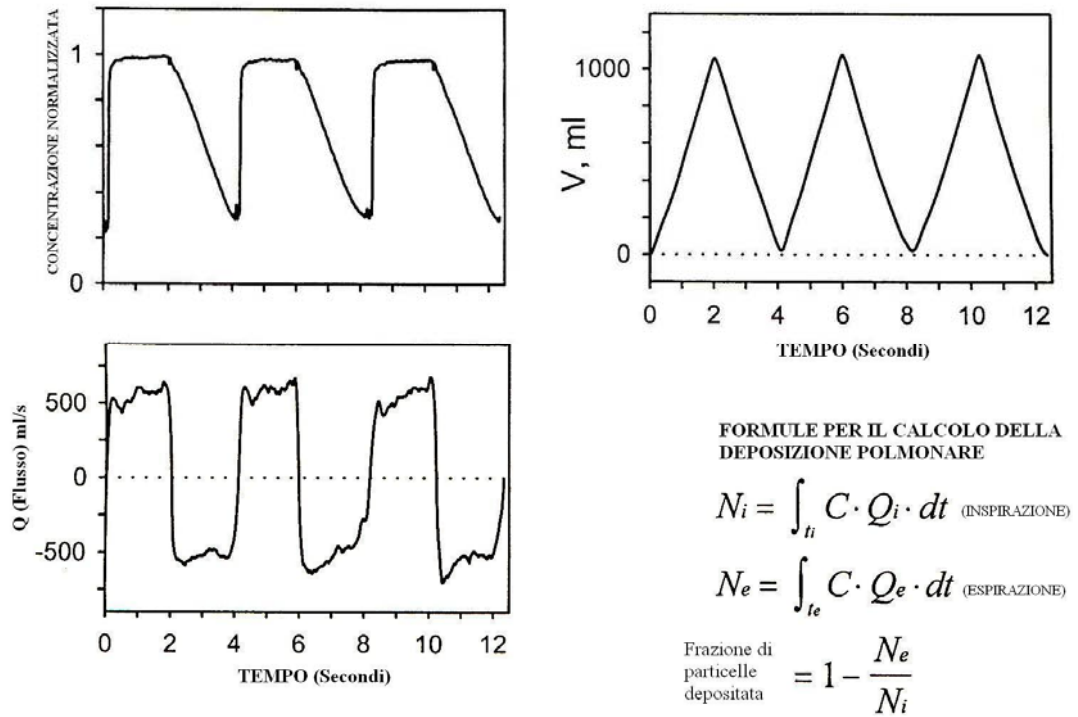


Figura 29: andamento della concentrazione delle particelle durante i cicli respiratori, del volume di aria inalata/esalata e del flusso (Q). Sono riportate anche le equazioni di Kim, dove i=inspirazione, e=espirazione, C=c(t) e Q=f(t) riportati nel testo a pag. 70 (adattato da Kim, 2000).

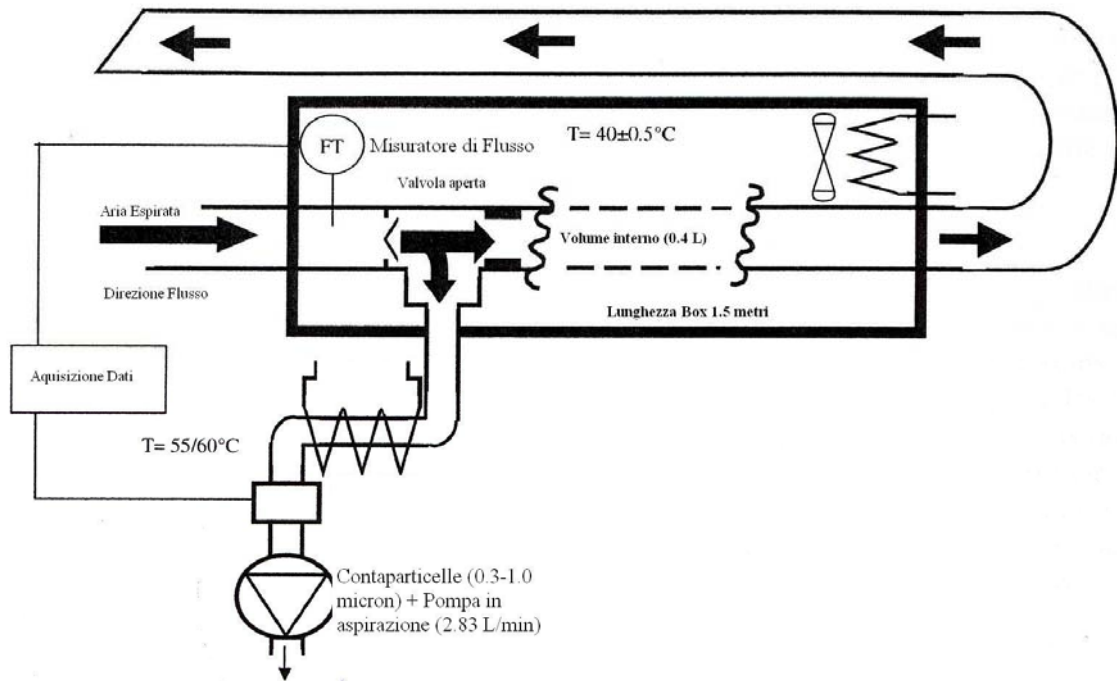


Figura 30: il sistema di misura della cinetica delle particelle esalate di Invernizzi et al. 2006.

Frazione Esalata + Frazione depositata =
rettangolo di lati livello ambientale e tempo di espirazione

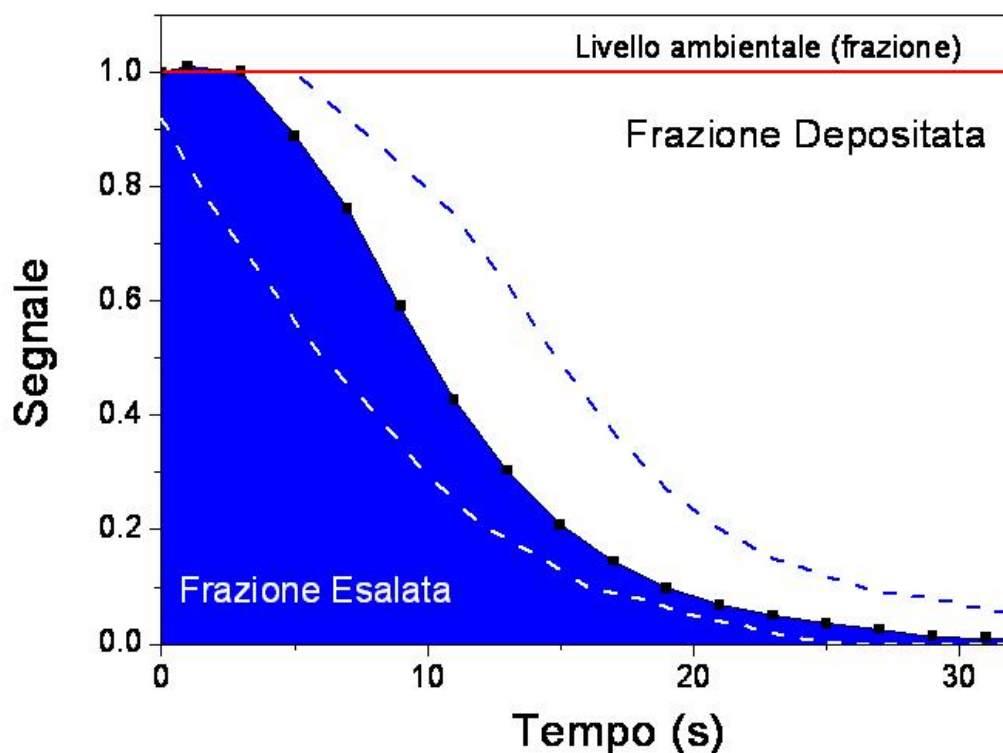


Figura 31: il segnale così come misurato dal contaparticelle utilizzando con un sistema come quello di Invernizzi et al. 2006. La linea tratteggiata blu rappresenta la simulazione di una curva che porterà ad una deposizione minore (Area sotto la curva > Area sotto la curva blu) rispetto allo standard (in nero), mentre la linea in bianco porterà ad una deposizione maggiore (Area sotto la curva < Area sotto la curva blu). In questo caso, per semplicità, si considera costante il flusso di esalazione.

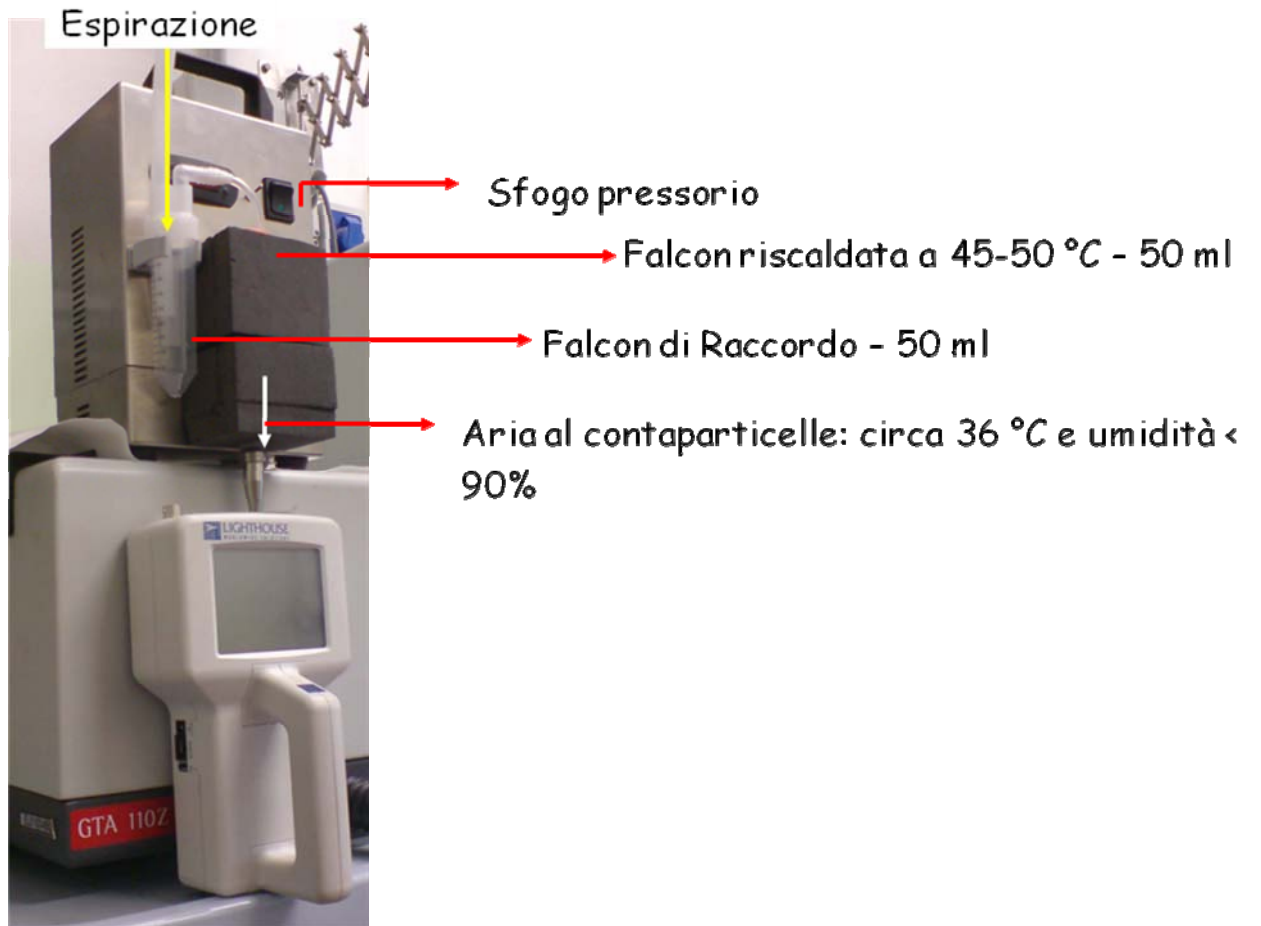


Figura 32: Il nostro sistema con le caratteristiche principali.

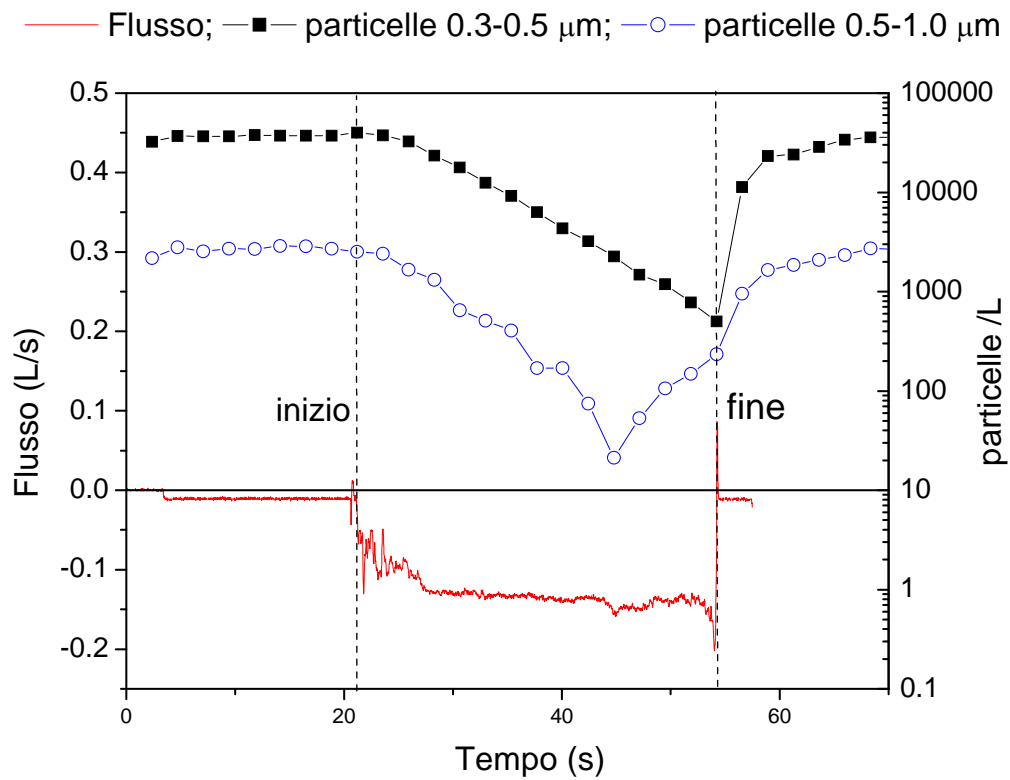


Figura 33: Esempio di segnale misurato con la nostra apparecchiatura su due canali (0.3 micron e 0.5 micron). Il flusso di espirazione è negativo per convenzione.

Particelle dopo un singolo puff (non fumatore)

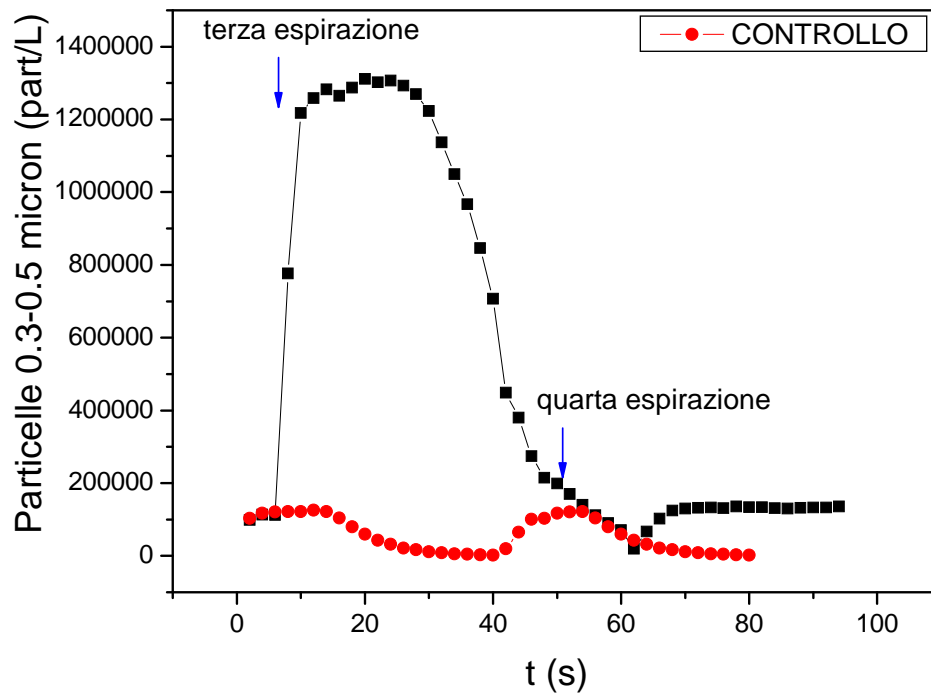


Figura 34: Andamento della concentrazione di particelle nel tempo dopo un singolo tiro ad una sigaretta da parte di un soggetto non fumatore.

Espirazione successiva a singola inalazione

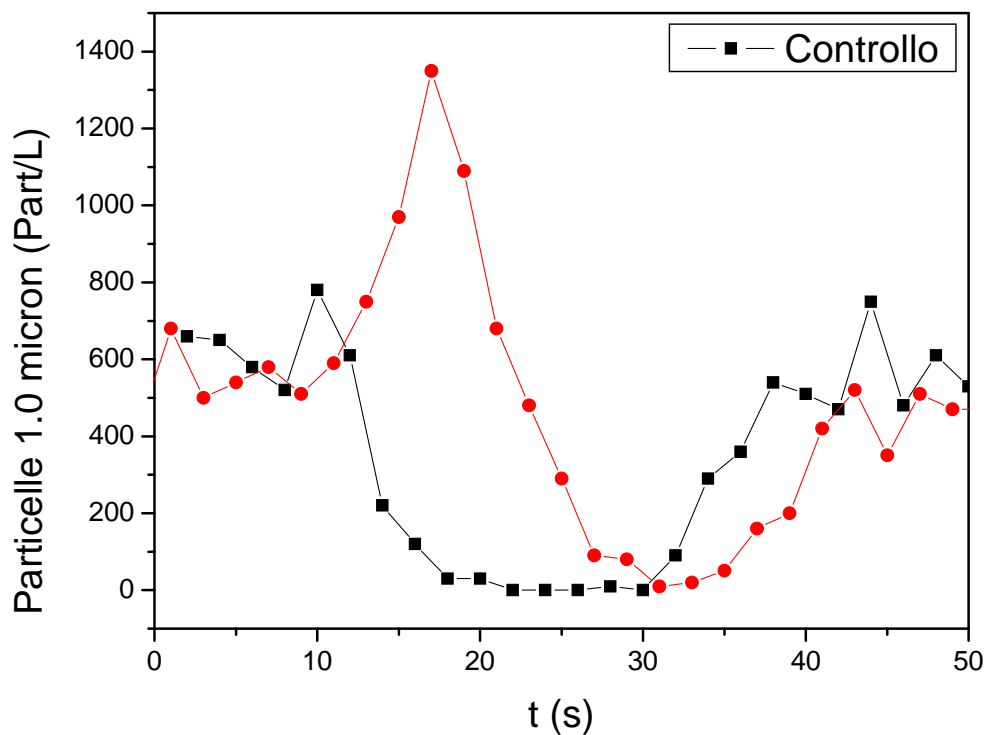


Figura 35: Andamento della concentrazione di particelle nel tempo dopo una singola espirazione di un farmaco per l'asma in polvere (SERETIDE®) sul canale 1.0 micron.

Appendice: altre attività del triennio 2005-2007

Altre attività e pubblicazioni, Anno 2005

Attività parallela ma non secondaria rispetto ai dati presentati nelle tesi è stata quella di mettere a punto il sistema TURBO-DECCS per la raccolta del CAE, concentrandomi in particolare sull'effetto della temperatura di condensazione su alcuni biomarcatori di uso comune, come MDA e H₂O₂, in relazione ad alcuni parametri che definiscono le caratteristiche fisico-chimiche del fluido CAE, quali la conducibilità dopo liofilizzazione (indicativa della concentrazione di ioni non volatili) e il volume totale raccolto. In particolare, entrambi i biomarcatori si dimostrano sostanze basso volatili *ex vivo*, pertanto non normalizzabili per la concentrazione di sostanze non volatili, quali le concentrazioni dei Sali stessi o l'urea, come suggeriscono alcuni autori.

Inoltre, ho collaborato al progetto RANTIV sulla neurotossicità dello stirene ossido in vitro e alla definizione di modelli statistici per l'analisi dei VOCs nell'aria esalata in soggetti con tumore al polmone. Infine, ho collaborato al progetto europeo DEVNERTOXY per studiare la neurotossicità di metil-mercurio e PCB153 e PCB126 in modelli *in vitro*.

Pubblicazioni più rilevanti a livello internazionale

- Vettori MV, Caglieri A, **Goldoni Matteo**, Castoldi AF, Darè E, Alinovi R, Ceccatelli S, Mutti A – Analysis of oxidative stress in SK-N-MC neurons exposed to styrene-7,8-oxide – **Toxicology in Vitro** (2005) 19: 11-20.
- Poli D, Carbognani P, Corradi M, **Goldoni Matteo**, Acampa O, Balbi B, Bianchi L, Rusca M, Mutti A. Exhaled volatile organic compounds in patients with non-small cell lung cancer: cross sectional and nested short-term follow-up study. **Respiratory Research** (2005) 6: 71.
- **Goldoni Matteo**, Caglieri A, Andreoli R, Poli D, Manini P, Vettori MV, Corradi M, Mutti A. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. **BMC Pulmonary Medicine** (2005) 5: 10.

Pubblicazioni scientifiche nazionali

- Alinovi R, Scotti E, Andreoli R, De Palma G, **Goldoni Matteo**, Apostoli P, Mutti A. Effetti neuroendocrini e renali del piombo inorganico. **G Ital Med Lav Erg** (2005) 27 Suppl. 1: 33-38.
- Andreoli R., Manini P., Alinovi R., **Goldoni Matteo**, De Palma G., Mutti A. Importanza della valutazione cronobiologica degli indicatori di effetto per una corretta strategia di campionamento. **G Ital Med Lav Erg** (2005) 27(3): 318-321.

Congressi Nazionali ed Internazionali: partecipazioni e posters

Mutti A, Corradi M, **Goldoni Matteo**, Caglieri A, Vettori MV, Apostoli P. Sensitivity of Exhaled Biomarkers: A field study on acute and persistent changes among Chromeplating workers. Proceedings of the American thoracic society, ATS 2005, International Conference, 20-25 may, San Diego, CA, USA (Poster).

Andreoli R, Manini P, Alinovi R, **Goldoni Matteo**, De Palma G, Mutti A. LC-MS/MS quantitation of urinary markers of oxidative damage to nucleic acids. SR-L06, pag. 56-57.

Massa 2005, An international Symposium on Mass Spectrometry. Roma, 28 giugno – 1 luglio 2005 (Poster).

Poli D, Vettori MV, **Goldoni Matteo**, Caglieri A, Corradi M, Carnevali S, Mutti A. Bioavailability of selected VOCs as assessed by SPME/GC/MS in pulmonary cell cultures exposed to cigarette smoke. TH-P15 pag. 129-130.

Massa 2005, An international Symposium on Mass Spectrometry. Roma, 28 giugno – 1 luglio 2005 (Poster).

Mutti A, Caglieri A, **Goldoni Matteo**, Acampa O, Andreoli R, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P. Assessment of target tissue dose and effects of inhaled chromium(VI) measuring biomarkers in exhaled breath condensate from chrome platers. Workshop: Chromium and Human Health. Presented by: Maine Center for Toxicology and Environmental Health, Abromson Community Education Center, University of Southern Maine. Portland, ME, 18-19 August 2005 (Poster).

Riassunti presentati al 68° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale, Parma, 5-8 Ottobre 2005:

- **Goldoni Matteo**, Corradi M., Caglieri A., Catalani S., Vettori M.V., Mutti A., Apostoli P. Valutazione comparativa degli indicatori biologici di esposizione a basse concentrazioni di cromo esavalente pag. 90-91 (Presentazione orale).
- Poli D., **Goldoni Matteo**, Corradi M., Carbognani P., Balbi B., Rusca M., Salvagni S., Franciosi V., Mutti A. I composti organici volatili nell'aria esalata come indicatori di esposizione ad inquinanti ambientali e come indicatori di patologia polmonare, pag. 92-93 (Poster).
- **Goldoni Matteo**, Corradi M., Apostoli P., Caglieri A., Poli D., Catalani S., Vettori M.V., Mutti A. Speciazione del cromo nel condensato dell'aria espirata di cromatori a spessore: dati preliminari, pag. 328-330 (Poster).
- Caglieri A., Vettori M.V., Buschini A., **Goldoni Matteo**, Iavicoli S., Mutti A. Effetti genotossici e attivazione della caspasi-3 in linfociti umani esposti a stirene 7,8-ossido, pag. 340-342 (Poster).
- Vettori M.V., Caglieri A., **Goldoni Matteo**, Darè E., Ceccatelli S., Mutti A. Meccanismo molecolare di tossicità dello stirene 7,8-ossido in cellule neuronali umane, pag. 343-344 (Poster).
- Manini P, Andreoli R., Alinovi R., **Goldoni Matteo**, De Palma G., Mutti A. Importanza della valutazione cronobiologica degli indicatori di effetto per una corretta strategia di campionamento, pag. 360-362 (Poster).
- Corradi M., Mutti A., **Goldoni Matteo**, Acampa O., Caglieri A., Catalani S., Vettori M.V., Andreoli R., Manini P., Apostoli P. Condensato dell'aria espirata per il monitoraggio biologico di lavoratori esposti a cromo esavalente, pag. 437-438 (Poster).

Ho curato, insieme al professor Antonio Mutti, il Volume "Medicina del Lavoro, tra acquisizioni e nuove frontiere", MUP (Monte Università Parma) Editore, che racchiude gli atti del 68° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina del Lavoro ed Igiene Industriale. Parma, 5-8 Ottobre 2005.

Altre attività e pubblicazioni, Anno 2006

Ho collaborato ad un progetto di ricerca finalizzato alla messa a punto di modelli *in vitro* per lo studio della tossicità di miscele di sostanze tossiche, in particolare del fumo di sigaretta e del cromo esavalente su linee cellulari immortalizzate di epitelio polmonare umano. Nell'ambito del progetto europeo DEVNERTOXY ho misurato i livelli di mercurio in eritrociti e cervello di ratti (mamme + figli) esposti a metilmercurio, sviluppando modelli matematici per studiare le interazioni tra la forma organica del metallo e alcuni PCBs (PCB 153 e PCB 126) e per studiarne la tossicocinetica a livello cerebrale.

Pubblicazioni più rilevanti a livello internazionale

- Mutti A., Corradi M., **Goldoni Matteo**, Vettori M.V., Bernard A., Apostoli P. Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease or Asthma. **Chest** (2006) 129: 1288-1297.
- Caglieri A., **Goldoni Matteo**, Acampa O., Andreoli R., Vettori MV, Corradi M., Apostoli P., Mutti A. The Effect of Inhaled Chromium on Different Exhaled Breath Condensate Biomarkers among Chrome-plating Workers. **Environmental Health Perspectives** (2006) 114: 542-546.
- **Goldoni Matteo**, Caglieri A., Poli D., Vettori MV, Corradi M., Apostoli P., Mutti A. Determination of hexavalent chromium in exhaled breath condensate and environmental air among chrome plating workers. **Analytica Chimica Acta** (2006) 562: 229-235.
- Poli D., Pavone L., Tansinda P., **Goldoni Matteo**, Tagliavini D., David S., Mutti A., Franchini I. Organic contamination in dialysis water: trichloroethylene as a model compound. **Nephrology Dialysis Transplantation** (2006) 21: 1618-1625.
- Vettori MV, **Goldoni Matteo**, Caglieri A., Poli D., Folesani G., Ceccatelli S., Mutti A. Antagonistic Effects of Methyl-Mercury and PCB153 on PC12 cells after a combined and simultaneous exposure. **Food and Chemical Toxicology** (2006) 44: 1505-1512.

- Johansson C, Tofighi R, Tamm C, **Goldoni Matteo**, Mutti A, Ceccatelli S. Cell death mechanisms in At20 pituitary cells exposed to polychlorinated biphenyls (PCB 126 and PCB 153) and methylmercury. **Toxicology Letters** (2006) 167: 183-190.

Partecipazioni a Congressi Nazionali ed Internazionali

- Vettori MV, Caglieri A, **Goldoni Matteo**, Poli D, Folesani G, Ceccatelli S, Mutti A. Sviluppo di un modello matematico per valutare gli effetti *in vitro* dell'esposizione combinata a metil-mercurio e PCB153. Poli D, Vettori MV, **Goldoni Matteo**, Caglieri A, Carnevali S, Franchini I, Mutti A. Utilizzo di un modello *in vitro* per lo studio della biodisponibilità di alcuni VOCs presenti nel fumo di sigaretta. XIV Congresso Nazionale della Società Italiana di Tossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 6-9 febbraio 2006.
- Mutti A, Corradi M, **Goldoni Matteo**, Vettori MV, Apostoli P. Metallic elements in exhaled breath condensate as a measure of long-term inhalatory exposure in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). **Goldoni Matteo**, Caglieri A, Poli D, Acampa O, Andreoli R, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A. Biomarkers in exhaled breath condensate of chrome-plating workers. 28th International Congress on Occupational Health (ICOH), 11-16 giugno 2006, Milan, Italy.
- Poli D, Caglieri A, **Goldoni Matteo**, Vettori MV, Coccini T, Castoldi AF, Ceccatelli S, Mutti A. PCB153 and methylmercury (MeHg) assessment of target tissues doses in rats after single and combined exposures: mothers versus pups comparisons. **Toxicology Letters**, 164 (Suppl. 1), S177-S178 abstract P12-08 .
Tofighi R, Johansson C, **Goldoni Matteo**, Vettori MV, Mutti A, Ceccatelli S. Hippocampal neurons undergo apoptotic and necrotic cell death after exposure to methylmercury, PCB 153 and PCB 126. **Toxicology Letters**, 164 (Suppl. 1), S207 abstract P15-09 .
- **Goldoni Matteo**, Vettori MV, Caglieri A, Poli D, Folesani G, Ceccatelli S, Mutti A. Competitive and additive effects of methylmercury and PCB153 on PC12 cells viability, lipidic peroxidation products (TBARS) and dopamine levels. **Toxicology Letters**, 164 (Suppl. 1), S211 abstract P15-17 .

Eurotox 2006 – 43rd congress of the European Societies of Toxicology, 6th congress of Toxicology in Developing Countries, Cavtat/Dubrovnik, 20-24 September 2006.

- Posters: **Goldoni Matteo** and Carolina Johansson. Comparison between Bliss independence criterion and Loewe additivity model in the study of interactions among toxicants; Poli D, **Goldoni Matteo**, Cagliari A, Vettori MV, Felipo V, Ceccatelli S, Mutti A. Purity of PCB126 and PCB153 assessed by solid phase extraction and GC/MS analysis; Coccini T, Bongiorno A, Castoldi AF, Roda E, Vitalone A, Costa LG, **Goldoni Matteo**, Manzo L. Effects of perinatal exposure to PCB126 and Methylmercury on circulating steroid hormone levels at weaning and puberty in the rat; Coccini T, Bongiorno A, Castoldi AF, Roda E, Gralewicz S, Sitarek K, Felipo V, **Goldoni Matteo**, Ceccatelli S, Manzo L. Long-lasting changes in sex hormone levels in rats exposed to PCB153 and Methylmercury during development; Roda E, Coccini T, Castoldi AF, Bongiorno A, Poli D, **Goldoni Matteo**, Manzo L. Effects of developmental exposure to methylmercury and PCB153 on cholinergic receptors at weaning and puberty in the rat; Castoldi AF, Roda E, Coccini T, **Goldoni Matteo**, Poli D, Vettori MV, Manzo L. Effects of developmental exposure to methylmercury and PCB153 on cerebral dopamine D1-like and D2-like receptors in weaning and pubertal rats; Tofighi R, Johansson C, **Goldoni Matteo**, Vettori MV, Mutti A, Ceccatelli S. Hippocampal neurons undergo apoptotic and necrotic cell death after exposure to methylmercury, PCB153 and PCB126; Johansson C, Tofighi R, Tamm C, **Goldoni Matteo**, Mutti A, Ceccatelli S. Cell death mechanisms in ATt20 pituitary cells exposed to polychlorinated biphenyls (PCB126 and PCB153) and methylmercury; Cagliari A, **Goldoni Matteo**, Vettori MV, Poli D, Folesani G, Ceccatelli S, Mutti A. Effects of methyl-mercury and PCB153 on two neuronal cell lines after single and combined exposure; Poli D, **Goldoni Matteo**, Cagliari A, Vettori MV, Vitalone A, Costa L, Piedrafita B, Felipo V, Ceccatelli S, Mutti A. PCB126 and methylmercury (MeHg) target dose in rat brain after single and combined mother exposure: pups vs mothers comparisons; Poli D, Goldoni M, Cagliari A, Vettori MV, Castoldi AF, Coccini T, Roda E, Sitarek K, Gralewicz S, Piedrafita B, Felipo V, Ceccatelli S, Mutti A. Actual dose of methylmercury (MeHg) and PCB153 in rat developing brain after mother single and combined

exposure. International Conference on Food Contaminants and Neurodevelopmental Disorders, Valencia, Spain, 3-5 December 2006.

Altre attività e pubblicazioni, Anno 2007

Con lo scopo di approfondire ulteriormente le proprietà chimico-fisiche del CAE e i suoi meccanismi di formazione, sono stati utilizzati due TURBO in serie e sono state misurate nelle due aliquote di CAE così raccolte il volume totale, l'ammonio, la conducibilità prima e dopo liofilizzazione e H₂O₂. Le alte concentrazioni di H₂O₂ misurate nella seconda aliquota di CAE non sono spiegabili in base alle proprietà fisico-chimiche del biomarcatore, che dovrebbe essere un composto a bassa volatilità. Abbiamo così supposto la formazione *in situ* di H₂O₂ durante la condensazione a causa di reazioni chimiche tra radicali liberi, così come accade nell'atmosfera durante la formazione delle nuvole.

E' stato poi portato a termine il progetto DEVNERTOXX, di cui ho curato anche la "Dissemination of Knowledge", fornendo a tutti partner files multimediali contenenti tutti i principali risultati del progetto e ponendo le basi per quello che oggi è presentato sul sito internet (www.imm.ki.se/devnertox/).

Pubblicazioni più rilevanti a livello internazionale

- **Goldoni Matteo**, Johansson C. A mathematical approach to study combined effects of toxicants in vitro: evaluation of the Bliss independence criterion and the Loewe additivity model. **Toxicology in vitro** (2007) 21: 759-769.
- Coccini T, Roda E, Castoldi AF, **Goldoni Matteo**, Poli D, Bernocchi G, Manzo L. Perinatal co-exposure to methylmercury and PCB153 or PCB126 in rats alters the cerebral cholinergic muscarinic receptors at weaning and puberty. **Toxicology** (2007) 238: 34-48.
- **Goldoni Matteo**, Caglieri A, Corradi M, Poli D, Rusca M, Carbognani P, Mutti A. Chromium in exhaled breath condensate and pulmonary tissue of non-small cell lung cancer patients. **International Archives of Occupational and Environmental Health** (2008) 81: 487-493.

- **Goldoni Matteo**, Caglieri A, Poli D, Vettori MV, Ceccatelli S, Mutti A. Methylmercury at low doses modulates the toxicity of PCB153 on PC12 neuronal cell line in asynchronous combination experiments. **Food and Chemical Toxicology** (2008) 46: 808-811.
- Corradi M, **Goldoni Matteo**, Caglieri A, Folesani G, Poli D, Corti M, Mutti A. Collecting exhaled breath condensate (EBC) with two condensers in series: a promising technique for studying the mechanisms of EBC formation, and the volatilità of selected biomarkers. **Journal of Aerosol Medicine** (2008). In press.
- Vitalone A, Catalani A, Chiodi V, Cinque C, Fattori V, **Goldoni Matteo**, Matteucci P, Poli D, Zuena AR, Costa LG. Neurobehavioural assessment of rats exposed to low doses of PCB126 and methyl mercury during development. **Environmental Toxicology and Pharmacology** (2008) 25: 103-113.

Pubblicazioni nazionali

- Corradi M., Sanchez M.M.J., Acampa O., Caglieri A., **Goldoni Matteo**, Andreoli R., Manini P., Mutti A. Valutazione non invasiva della patobiologia polmonare in una coorte di lavoratori del settore acconciatura. **La Medicina del Lavoro**. (2008) 99: 49-57.

Congressi Nazionali ed Internazionali: partecipazioni e posters

- La diagnosi precoce del tumore polmonare. Progetto ITALUNG – le ragioni di una scelta. Parma, 4 Giugno 2007. Attestato di partecipazione.
- Partecipazione in qualità di Relatore al Workshop. “Strategie ed indicatori innovativi per la valutazione delle interazioni gene-ambiente nei tumori polmonari professionali”, ISPESL – Sala Conferenze- Roma, 28 Giugno 2007. Titolo della relazione: Studio online della cinetica respiratoria di particelle aerodisperse.
- Poli D, **Goldoni Matteo**, Caglieri A, Andreoli R, Castoldi AF, Coccini T, Roda E, Ceccatelli S, Mutti A. SPME-GC/MS method for rapid determination of PCBs in rat tissues: comparison with SPE and liquid/liquid extraction. Massa 2007, Italian annual meeting on Mass Spectrometry, Lucca, 2-5 Settembre.

- Coccini T, Bongiorno A, Castoldi AF, Roda E, Vitalone A, Costa LG, **Goldoni Matteo**, Poli D, Mutti A, Manzo L. Effects of gestational and lactational exposure to PCB126 and methylmercury on circulating steroid hormone levels at weaning and pubertà in the rat. **Toxicology Letters** 172 (Suppl.) S192. Eurotox 2007 – 44rd congress of the European Societies of Toxicology, Amsterdam, the Netherlands, 07-10 October 2007.

Allegato I

The Effect of Inhaled Chromium on Different Exhaled Breath Condensate Biomarkers among Chrome-Plating Workers

Andrea Caglieri,¹ Matteo Goldoni,^{1,2} Olga Acampa,¹ Roberta Andreoli,^{1,2} Maria Vittoria Vettori,^{1,2} Massimo Corradi,^{1,2} Pietro Apostoli,³ and Antonio Mutti¹

¹Laboratory of Industrial Toxicology, Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences, University of Parma, Italy; ²National Institute of Occupational Safety and Prevention, Research Centre at the University of Parma, Parma, Italy; ³Laboratory of Industrial Hygiene, Department of Experimental and Applied Medicine, University of Brescia, Brescia, Italy

Chromium is corrosive, cytotoxic, and carcinogenic for humans and can induce acute and chronic lung tissue toxicity. The aim of this study was to investigate Cr levels in exhaled breath condensate (EBC) of workers exposed to Cr(VI) and to assess their relationship with biochemical changes in the airways by analyzing EBC biomarkers of oxidative stress, namely, hydrogen peroxide (H₂O₂) and malondialdehyde (MDA). EBC samples were collected from 24 chrome-plating workers employed in a chrome-plating plant both before and after the Friday work shift and before the work shift on the following Monday. Cr-EBC levels increased from the beginning (5.3 µg/L) to the end of Friday (6.4 µg/L) but were considerably lower on Monday morning (2.8 µg/L). A similar trend was observed for H₂O₂-EBC levels (which increased from 0.36 µM to 0.59 µM on Friday and were 0.19 µM on Monday morning) and MDA-EBC levels (which increased from 8.2 nM to 9.7 nM on Friday and were 6.6 nM on Monday). Cr-EBC levels correlated with those of H₂O₂-EBC ($r = 0.54$, $p < 0.01$) and MDA-EBC ($r = 0.59$, $p < 0.01$), as well as with urinary Cr levels ($r = 0.25$, $p < 0.05$). The results of this study demonstrate that EBC is a suitable matrix that can be used to investigate both Cr levels and biomarkers of free radical production sampling the epithelial-lining fluid of workers exposed to Cr(VI). **Key words:** chromium, exhaled breath condensate, hydrogen peroxide, lung, malondialdehyde. *Environ Health Perspect* 114:542–546 (2006). doi:10.1289/ehp.8506 available via <http://dx.doi.org/> [Online 8 December 2005]

Chromium is a transition element occurring in the environment (soil, rocks, plants, dust, and gases), primarily in the elemental, trivalent [Cr(III)], and hexavalent [Cr(VI)] oxidation states. Both Cr(III) and Cr(VI) are environmentally stable, and their toxicologic profiles are well known; Cr(III) has limited toxicologic properties [De Flora et al. 1990; International Agency for Research on Cancer (IARC) 1990] and is considered to be an essential trace metal in humans (Anderson 1981), whereas various Cr(VI) compounds are considered to be human carcinogens [Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2000; De Flora 2000; Ding and Shi 2002; IARC 1990; Kawanishi et al. 2002; O'Brien et al. 2003], are known to induce both acute and chronic toxic effects (ATSDR 2000), and are of the greatest occupational and environmental health concern.

The respiratory tract is the main target organ of Cr(VI) toxicity associated with both acute (short-term) and chronic (long-term) inhalation (ATSDR 2000; De Flora 2000): acute exposure may cause shortness of breath, coughing, and wheezing (Sobaszek et al. 2000). Chronic exposure leads to ulcerations and perforations of the nasal septum, chronic bronchitis, decreased pulmonary function, pneumonia, and other respiratory effects (Bradshaw et al. 1998). On the basis of experimental and epidemiologic evidence (De Flora 2000; Gibb et al. 2000; Luippold et al. 2005; Park et al. 2004), IARC has classified

Cr(VI) as a class 1 carcinogen (recognized human carcinogen).

Cr(VI) compounds are used in several industrial applications (chrome plating, welding inox steel and other special steels, painting, leather tanning, and wood preserving). Occupational exposure mainly occurs by inhalation, but it may involve the gastrointestinal tract and skin (De Flora 2000). Therefore, the respiratory tract is the primary target organ for Cr(VI) compounds. Experimental work on the rat showed that lung accumulation of Cr(VI) can be observed even after intravenous administration (Mutti et al. 1979). The mechanism of Cr(VI) cytotoxicity is not completely understood, but several studies have shown that Cr(VI) compounds induce oxidative stress, DNA damage, apoptotic cell death, and altered gene expression (Bagchi et al. 2002; Wise et al. 2002; Zhitkovich 2005). The reduction in Cr(VI) levels induced by redox-active enzymes and small molecules generates intermediate unstable states, such as Cr(V) or Cr(IV), that may mediate the formation of free hydroxyl, thiyl, ascorbate, and carbon-based radicals (Ding and Shi 2002; Levina and Lay 2005; O'Brien et al. 2003) that are capable of damaging macromolecular targets, such as DNA (Stohs et al. 2001). Interestingly, although Cr(III) reacts with DNA and proteins, it is unable to cross cell membranes. The opposite occurs for Cr(VI) species, which do not react with nucleophilic targets but can easily cross cell membrane through anion

channels. Once inside the cell, Cr(VI) is rapidly reduced to the trivalent state, and Cr(III) then interacts with cell proteins and DNA (Levina and Lay 2005).

Improved work areas, procedures, and hygiene measures have minimized occupational exposure to Cr(VI) compounds and led to a reduction in traditional adverse effects on the lung, such as tracheobronchitis or pneumonia; however, long-term Cr(VI) exposure may still cause airway disorders, including airway irritation, sensitization, and lung cancer. Sensitive tests are therefore needed to evaluate early biochemical changes that occur in the respiratory tract after Cr(VI) exposure. Furthermore, because the respiratory tract is the primary route of exposure to Cr(VI), the quantification of biomarkers of free radical production at the target organ level could improve the sensitivity and specificity of putative biomarkers.

We have recently shown that exhaled breath condensate (EBC), a fluid formed as a result of the cooling of expired air, is a suitable matrix not only for assessing the biomarkers of oxidative stress in exposed workers [malondialdehyde (MDA)] but also for quantifying the levels of some pneumotoxic substances in the lung, in particular, cobalt (Goldoni et al. 2004). The synergistic effect of tungsten to power the lipid peroxidation caused by cobalt has also been demonstrated (Goldoni et al. 2004).

The aim of the present study was to investigate Cr levels in the EBC of workers employed in the chrome-plating industry and to assess early biochemical changes in the airways by analyzing EBC biomarkers of oxidative stress, such as hydrogen peroxide (H₂O₂) and MDA.

Address correspondence to A. Mutti, Laboratory of Industrial Toxicology, Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences, University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy. Telephone: 39-0521-033075. Fax: 39-0521-033076. E-mail: antonio.mutti@unipr.it

This study was supported by the National Heart, Blood and Lung Institute (NHLBI; grant R01 HL72323) and the Italian Ministry of Education, University and Research (PRIN 200306145).

The contents of this article are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the NHLBI or the National Institutes of Health.

The authors declare they have no competing financial interests.

Received 15 July 2005; accepted 8 December 2005.

Materials and Methods

Subjects. Table 1 shows the demographic and clinical characteristics of the 24 chrome-plating workers recruited in the study, each of whom carried out various tasks during the same work day. Four of these subjects have a history of light smoking status (< 10 cigarettes/day, corresponding to < 10 packs/year), but we did not find any differences in exhaled biomarker levels between smoking and nonsmoking workers. All of the workforce volunteered to participate in this study, which took place during paid work hours. The “healthy worker effect” cannot be ruled out, owing to preemployment selection procedures. However, all of these workers underwent medical health surveillance, and all were asymptomatic and presumably healthy. The control group consisted of 25 healthy adult volunteers with no significant history of lung disease and who were not occupationally exposed to Cr. The workers also exhibited normal spirometric indices and did not report any significant previous or current respiratory diseases. None of them had any symptoms of acute respiratory illness during the 4 weeks preceding the study. We found no differences between male and female control subjects for the studied biomarkers.

Study design. Before enrollment, the subjects completed a short questionnaire concerning their current and previous medical history and underwent a spirometric examination. The EBC and urine samples of the workers were assessed three times: *a*) before the work shift on Friday (T_0); *b*) at the end of the same shift, after 8 hr of work (T_1); and *c*) before exposure on the following Monday (T_2). EBC and urine samples from the controls were collected in our laboratory during a normal work day, and a subgroup of 10 subjects repeated the procedures in the office area of the workplace in order to exclude any contamination by the office environmental air.

All of the subjects gave their written informed consent to the procedures, which were approved by our local ethics committee. The biologic material was sampled as described in the Declaration of Helsinki (World Medical Association 2002).

Spirometric measurements. Spirometry was performed using a pneumotachograph

(Koko Spirometer, Sensormedics, Milan, Italy). Mean forced expiratory volume in 1 sec (FEV_1) and forced vital capacity (FVC) were obtained from the three best acceptable test values of lung function, as recommended by the American Thoracic Society (1995).

Environmental measurements. Ambient monitoring was carried out by personal samplers. Briefly, airborne particulate was collected on polyvinyl chloride membrane filters (5.0 μ m porosity, 25 mm diameter) according to National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) protocol 7300 (NIOSH 2003a) at a constant flow of 3 L/min for a period ranging from 90 to 150 min in the morning or afternoon of the Friday work shift. The membranes were weighed in a thermohygrometrically conditioned cabinet using a precision balance with a sensitivity of 0.01 mg and dissolved in concentrated hyperpure nitric acid (70%), and the solution was diluted with ultrapure water. The analytical blank was obtained from virgin membranes. Total Cr was analyzed by means of electrothermal atomic absorption spectroscopy (ETAAS) with Zeeman background correction following UNICHIM (Italian Association for Unification in the Sector of Chemical Industry) method 886 (UNICHIM 1995), and expressed as micrograms per cubic meter. To validate the precision and the sensitivity of our method, we used the standard addition method using a certified Cr(VI) standard solution (Fluka, Milan, Italy). The amount of soluble hexavalent Cr in the ambient air was estimated following NIOSH protocol 7703 (NIOSH 2003b) after air collection using stationary samplers in the work rooms and office of the plant.

Airborne concentrations of total Cr for the Friday work shift were 8.8 (2.6) μ g/m³ [GM (GSD)] in the morning and 5.0 (2.5) μ g/m³ in the afternoon, and the weighted average was 7.8 (2.3) μ g/m³. Workers were significantly more exposed in the morning ($p < 0.05$) than during the afternoon half-shift, whereas there were no significant differences in the collection times between morning and afternoon. Soluble Cr(VI) was about 70% of the total Cr

monitored in the environment (data not shown); therefore, all measured Cr samples were below the limit proposed by the American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH 1999) for water-soluble Cr(VI) organic compounds (50 μ g/m³).

EBC collection. EBC was collected using a new portable TURBO-DECCS condenser (transportable unit for research on biomarkers obtained from disposable exhaled condensate collection systems; ItalChill, Parma, Italy; Figure 1A) specifically designed to collect EBC in clinical and work settings. The condenser has a refrigerating system (TURBO) that thermostatically controls the working temperature, and a disposable respiratory system (DECCS) that consists of a mouthpiece connected to a one-way aspiration valve and (through a tube with a special stopper) an EBC collection test tube at the end (Figure 1B). On the basis of preliminary data (not shown), we chose a condensation temperature of -5°C (Goldoni et al. 2005), a good compromise between the yield in terms of volume for multianalyses and detectable concentrations of the selected analytes.

The subjects were asked to breathe tidally through the mouthpiece for 15 min, while sitting comfortably in the workplace office where the level of total Cr was < 0.1 μ g/m³ (workers) or in the laboratory office (controls). They were instructed to form a complete seal around the mouthpiece with their mouths, which had to be kept dry by periodically swallowing excess saliva; they were also asked to rinse their mouths thoroughly before the maneuver and every 5 min during the test. To prevent any contamination from the skin, the subjects were asked to wash their hands before EBC and urine collection and to wear disposable latex gloves during the collecting procedures. EBC sample volume was accurately measured with a calibrated pipette, and salivary contamination was excluded by means of the colorimetric detection of alpha-amylase activity (Infinity amylase reagent; Sigma, Milan, Italy). Moreover, we measured the levels of Cr in saliva of five workers and found a

Table 1. Demographic and clinical data of subjects participating in this study (mean \pm SD).

| | Controls | Chrome-plating workers |
|------------------------------|------------------|------------------------|
| No. of subjects | 25 | 24 |
| Sex (male/female) | 13/12 | 24/0 |
| Age (years) | 31.0 \pm 6.7 | 37.7 \pm 6.3 |
| Smokers/ex-/non ^a | 0/5/20 | 4/2/18 |
| FVC (% predicted) | 108 \pm 10.4 | 89.8 \pm 10.7 |
| FEV_1 (% predicted) | 103.7 \pm 11.4 | 91.8 \pm 12.0 |
| FEV_1 :FVC | 81.9 \pm 6.3 | 83.1 \pm 7.5 |

^aSmokers/ex-smokers/nonsmokers.

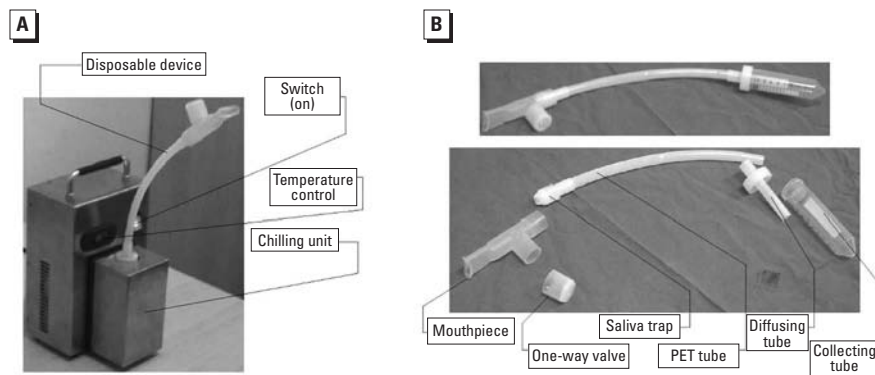


Figure 1. (A) TURBO-DECCS condenser. (B) DECCS-system disposable device. PET, polyethylene.

maximum salivary Cr level of about 10 times higher than the corresponding EBC value, not sufficient to justify salivary contamination, given that the limit of detection (LOD) of the amylase kit was much lower (between 1/10,000 and 1/5,000) than the amylase activity measured in saliva. Finally, the EBC samples were transported in dry ice to the laboratory and stored at -80°C until analysis.

Analysis of Cr in urine and EBC. Urinary Cr (Cr-U) was measured by ETAAS and expressed as a function of creatinine. Urinary overcorrection was excluded because none of the subjects presented creatinine levels $< 30\text{ mg/L}$ or $> 300\text{ mg/L}$. The LOD was $0.05\text{ }\mu\text{g/L}$, and a certified standard (Fluka) was repeated every 10 samples.

The ETAAS analysis protocol was applied to the EBC samples, and the results were confirmed by inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS) in a separate laboratory, with an interlaboratory regression coefficient of 0.95 and an average deviation between samples of about 10% (data not shown). The LOD was $0.05\text{ }\mu\text{g/L}$.

H_2O_2 -EBC measurements. H_2O_2 -EBC was measured as previously described (Corradi et al. 2002) using a commercial kit (Amplex Red hydrogen peroxide assay kit; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) with an LOD of $0.01\text{ }\mu\text{M}$. The analyses were made 2–3 days after EBC collection. Samples were stored at -80°C up to 3 days at the most (Goldoni et al. 2005).

MDA-EBC measurements. MDA-EBC was measured by tandem liquid chromatography–mass spectrometry as previously described by Andreoli et al. (2003), with an LOD of 1 nM .

Statistical analysis. The data were analyzed using SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) and PRISM 3.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). The measured parameters showed a log-normal distribution (Shapiro-Wilk test) for all the considered groups of subjects; therefore, the data were log-transformed for all of the statistical tests, and the results were expressed as the geometric mean (GM) and geometric SD (GSD). Median values and interquartile ranges are also reported. We analyzed log-transformed data using repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons or a paired Student *t*-test in order to assess the differences within the workers' group at different times. One-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons, was used to assess the differences between the workers and controls. Pearson's *r* was used to assess the correlations between variables in the log-scale. The normality is required for all parametric comparison tests, whereas for tests assessing differences between repeated measures in dependent samples, a normal distribution is required for those differences. A log-transformation of our data was necessary to satisfy both the above requirements. Moreover, such a log-transformation was necessary to limit the

undue influence of the highest values on the *r*- and *p*-values. A *p*-value of < 0.05 (two-tailed) was considered significant for all of the tests.

Results

Ambient Cr levels sampled during the afternoon moderately correlated with Cr-U ($r = 0.48$, $p < 0.05$) and Cr-EBC at T_1 ($r = 0.47$, $p < 0.05$), as shown in Figure 2.

Table 2 shows the Cr-U and Cr-EBC levels at the different time points. Compared with the controls, the exposed workers had higher levels of both at all of the time points (except for a few Cr-EBC levels at T_2) ($p < 0.01$). Cr-U levels were higher at T_1 than at T_0 ($p < 0.05$) and T_2 ($p < 0.01$), and the difference between T_0 and T_2 was also significant ($p < 0.01$). Cr-EBC levels were higher at T_0 and T_1 than at T_2 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively), whereas no difference was observed between T_0 and T_1 .

Workers' H_2O_2 -EBC levels were higher than those of the controls at T_0 ($p < 0.05$) and T_1 ($p < 0.01$), and there was a significant difference between T_2 and both T_0 and T_1 ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively); the difference between T_0 and T_1 was not significant (Table 2).

The MDA-EBC levels of workers were not significantly higher than those of the controls at every time point, although 12 of 24 workers (whose median of Cr-EBC was $11\text{ }\mu\text{g/L}$) presented MDA levels above the 95% confidence interval (CI) upper limit for controls (10 nM) at T_1 . The other workers with MDA-EBC $< 10\text{ nM}$ showed a median of $2.5\text{ }\mu\text{g/L}$ of Cr-EBC. The only significant difference in MDA-EBC was between T_1 and T_2 ($p < 0.01$, Table 2).

All nonparametric tests gave results consistent with those observed using their parametric counterpart on log-transformed values. Cr-U and Cr-EBC levels presented a weak-to-moderate correlation at all time points ($r = 0.25$, $p < 0.05$; Figure 3A). Cr-EBC and H_2O_2 -EBC correlated closely ($r = 0.54$, $p < 0.01$; Figure 3B), particularly at T_1 ($r = 0.72$, $p < 0.01$; data not shown); Cr-EBC also correlated with MDA-EBC ($r = 0.59$, $p < 0.01$; Figure 3C). H_2O_2 and MDA were positively correlated with each other ($r = 0.49$, $p < 0.01$; Figure 3D).

There was also a correlation between H_2O_2 -EBC and Cr-U levels—although it was lower than the correlation between Cr-EBC and H_2O_2 -EBC ($r = 0.41$, $p < 0.01$; Figure 3E)—whereas the correlation between Cr-U and MDA-EBC was not significant (Figure 3F). The significance of all the correlations was confirmed by the Spearman non-parametric correlation test.

We observed no statistically significant differences in EBC-collected volumes between exposed workers (mean \pm SD, $1,545 \pm 255\text{ }\mu\text{L}$ at T_0 , $1,460 \pm 270\text{ }\mu\text{L}$ at T_1 , and $1,570 \pm$

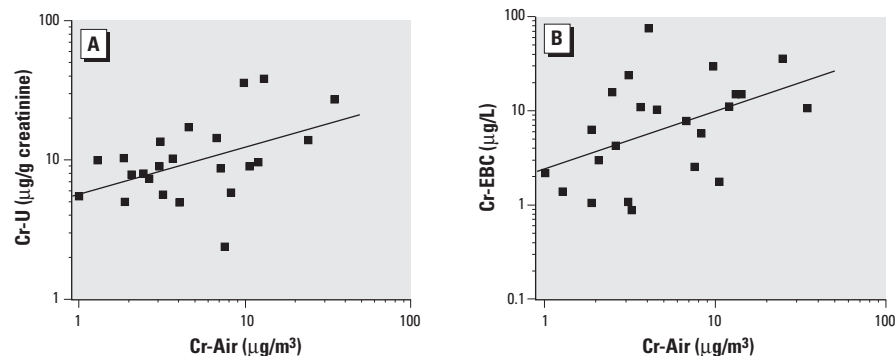


Figure 2. Correlations, with linear regression lines and Pearson's *r*, between environmental airborne Cr (Cr-Air) and Cr-U (A; $r = 0.48$, $p < 0.05$) and between Cr-Air and Cr-EBC (B; $r = 0.47$, $p < 0.05$).

Table 2. Cr-U, Cr-EBC, H_2O_2 -EBC, and MDA-EBC levels of controls and of workers at different sampling times.

| | Cr-U ($\mu\text{g/g creatinine}$) | Cr-EBC ($\mu\text{g/L}$) | H_2O_2 -EBC (μM) | MDA-EBC (nM) |
|-------------------------------|-------------------------------------|----------------------------|---|-----------------|
| Controls | | | | |
| GM (GSD) | 0.25 (2.3) | 0.28 (2.6) | 0.09 (1.6) | 6.0 (1.5) |
| Median (25th–75th percentile) | 0.24 (0.09–0.45) | 0.25 (0.1–0.44) | 0.12 (0.05–0.2) | 6.5 (5.0–8.2) |
| Workers (T_0) | | | | |
| GM (GSD) | 8.2 (2.1)** | 5.3 (2.9)** | 0.36 (2.4)* | 8.2 (1.5) |
| Median (25th–75th percentile) | 7.9 (6.2–10.8) | 7.3 (2.3–9.2) | 0.44 (0.22–0.61) | 7.7 (6.6–11.5) |
| Workers (T_1) | | | | |
| GM (GSD) | 9.4 (2.1)**,# | 6.4 (3.4)** | 0.59 (2.0)** | 9.7 (1.7) |
| Median (25th–75th percentile) | 9.0 (5.6–13.4) | 7.8 (2.1–15.2) | 0.69 (0.42–0.86) | 10.7 (6.9–13.4) |
| Workers (T_2) | | | | |
| GM (GSD) | 5.7 (2.2)**,#,† | 2.8 (3.2)**,#,† | 0.19 (2.6)#,† | 6.6 (1.5)† |
| Median (25th–75th percentile) | 5.6 (3.1–6.7) | 4.0 (1.1–6.6) | 0.21 (0.09–0.35) | 6.8 (5.3–8.0) |

* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with controls. # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ compared with T_0 . † $p < 0.01$ compared with T_1 .

280 μL at T_2) and controls ($1,585 \pm 240 \mu\text{L}$). The exhaled markers did not correlate with total condensed volume, and because there were no statistical differences between the total EBC volumes at the different time points, total condensed volume was excluded from the analysis. The total expired air was not measured because, as already demonstrated by Gessner et al. (2001), the total volume of expired air is highly correlated ($r = 0.95$) with the total volume of EBC.

Discussion

Blood and urine are currently used for the biologic monitoring of workers exposed to Cr (Franchini and Mutti 1988; Mutti et al. 1984, 1985), and thus represent the gold standard matrices for the assessment of exposure. However, they provide little information concerning lung levels, which are not necessarily related to absorbed dose, but are certainly responsible for local inflammation on the respiratory tract. EBC analysis is a novel approach to biologic monitoring, enabling us to quantify both internal dose levels of inhaled metals and to assess epithelial-lining fluid levels of biomarkers of free radical production. The results of our study show that EBC is a suitable medium for assessing biomarkers of inflammation (i.e., oxidative stress) and that it can be used to investigate lung tissue levels and biomarkers of effect in workers exposed to Cr(VI). However, future studies are needed to look at the quantitative relationship between Cr concentration in air and EBC levels as well as the association with relevant clinical outcome to assess health effects, such as spirometry, or methacholine reactivity, and so forth.

Our study was designed to assess biologic markers at different sampling times in order to evaluate the consequences of long-term and daily lung exposure. Cr-EBC and Cr-U levels were much higher in exposed subjects than in controls at all time points. Furthermore, the two variables were only slightly positively correlated with each other, such a weak-to-moderate correlation being possibly explained by the relatively complex kinetics of Cr (long-life kinetic components inside the body, in particular after chronic exposure) and the presence of other absorption routes (e.g., dermal).

Owing to their moderate correlation with Cr levels in ambient air, both Cr-EBC and Cr-U can be considered biomarkers of exposure. However, further work is needed for a full validation of Cr-EBC as a biomarker of exposure and before this metric can be used independently to assess exposure or health risk.

Looking at the different correlations between variables, Cr-U and Cr-EBC levels seem to provide different information: there were weak or no correlations between Cr-U and biomarkers of free radical production, whereas Cr-EBC concentrations correlated

with higher and significant r -values with both MDA and H_2O_2 levels in EBC, thus suggesting that they may be more representative of the lung dose responsible for local free radical production.

We assessed inflammation in the lung after Cr exposure, relying on biomarkers of oxidative stress, which may be sensitive end points for evaluating early biochemical changes in the airways. This approach will probably overcome the limitations of traditional spirometric tests, which often indicate late and frequently irreversible lung dysfunction.

Analyses of MDA and H_2O_2 levels in EBC have shown that they are reliable indices of airway oxidative stress (Corradi et al. 2003; Forteza et al. 2005), and they may be of some help in assessing and understanding the underlying mechanisms of metal-induced carcinogenesis. Accumulated evidence suggests that

the oxidative stress caused by an imbalance of cellular free radical generation and anti-oxidative defense plays an important role in metal-induced cell responses and carcinogenesis (Desoize 2003; Sorensen et al. 2005). Although MDA and H_2O_2 levels were in the normal range after 2 days away from work, H_2O_2 levels increased to above-normal values after a weekly and a daily Cr exposure, whereas 50% of workers (the most exposed) showed MDA levels higher than the 95% CI upper limit of control MDA levels at the end of the work shift. However, we speculate that further influencing factors, such as individual susceptibility to Cr, may modify MDA levels. As in the case of the toxic effect of cigarette smoke on the lungs, it cannot be excluded that an intermittent and repeated inhaled Cr stimulus may also be responsible for lung damage. It is worth noting that the increased H_2O_2 levels observed

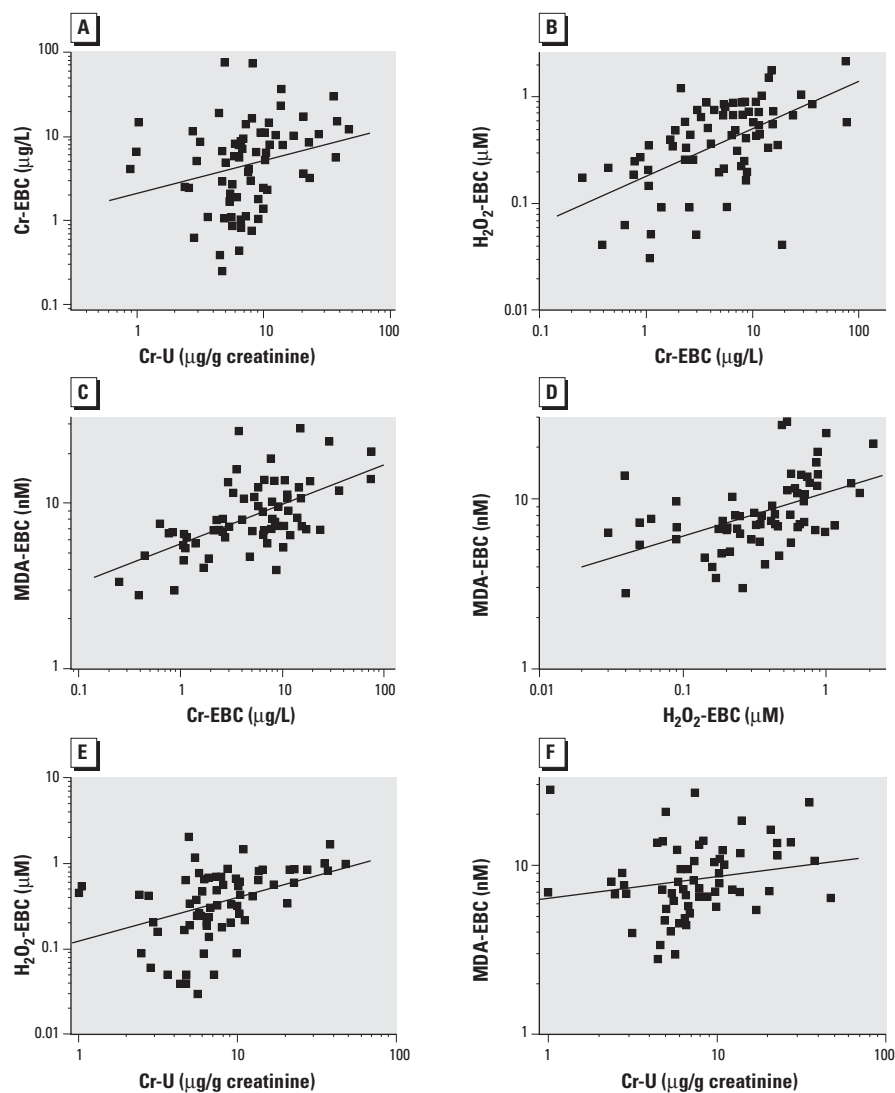


Figure 3. Correlations between variables, with linear regression lines, Pearson's r , and significance. (A) Cr-U versus Cr-EBC ($r = 0.25$, $p < 0.05$). (B) Cr-EBC versus H_2O_2 -EBC ($r = 0.54$, $p < 0.01$). (C) Cr-EBC versus MDA-EBC ($r = 0.59$, $p < 0.01$). (D) H_2O_2 -EBC versus MDA-EBC ($r = 0.49$, $p < 0.01$). (E) Cr-U versus H_2O_2 -EBC ($r = 0.41$, $p < 0.01$). (F) Cr-U versus MDA-EBC ($r = 0.19$, not significant).

in EBC of our workers at the end of a work day were similar to those reported by Gerritsen et al. (2005) in chronic obstructive pulmonary disease patients during exacerbations.

Unlike their H₂O₂ levels, the workers' MDA-EBC levels did not increase after a day's exposure, which suggests that H₂O₂ may be a more sensitive marker of acute lung free radical production in more highly Cr-exposed workers. However, MDA-EBC and H₂O₂-EBC were positively correlated, thus confirming the idea that the biologic induction of H₂O₂ (a marker of inflammatory processes) may increase *in vivo* oxidative stress and lipid peroxidation products.

Because there is a good correlation between Cr levels and airway free radical production and because many studies have identified Cr(VI) as the most toxic form of Cr, we are carrying out further studies on the characterization of Cr species in EBC samples after exposure to Cr(VI).

Finally, to explain the interindividual variability (e.g., workers with an anomalous trend compared with the average), it should be considered that different jobs and tasks in a chrome-plating plant may imply exposure to different Cr species. Different physicochemical properties, in terms of valence and solubility, may imply different kinetic and dynamic properties, thus accounting for a different behavior of lining fluid (EBC) compared with urine, whose Cr content is only justified by absorption of soluble Cr(VI).

In conclusion, EBC can be considered a promising medium for investigating both long-term and recent Cr exposure at target tissue level and, together with biomarkers of free radical production, it can provide insights into the oxidative lung interactions between pulmonary tissue and pneumotoxic metals occurring in exposed workers.

REFERENCES

- ACGIH 1999. Chromium. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
- American Thoracic Society. 1995. Standardization of spirometry, 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1107–1136.
- Andreasen RA. 1981. Nutritional role of chromium. *Sci Tot Environ* 17:13–29.
- Andreoli R, Manini P, Corradi M, Mutti A, Niessen WM. 2003. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:637–645.
- ATSDR. 2000. Final Report of Toxicological Profile for Chromium. NTIS Accession No. PB2000-108022. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG. 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 180:5–22.
- Bradshaw LM, Fishwick D, Slater T, Pearce N. 1998. Chronic bronchitis, work related respiratory symptoms, and pulmonary function in welders in New Zealand. *Occup Environ Med* 55:150–154.
- Corradi M, Alinovi R, Goldoni M, Vettori MV, Folesani G, Mozzoni P, et al. 2002. Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone. *Toxicol Lett* 134:219–225.
- Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, Manini P, Caglieri A, Poli D, et al. 2003. Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1380–1386.
- De Flora S. 2000. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21:533–541.
- De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zanacchi P. 1990. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res* 238:99–172.
- Desoize B. 2003. Metals and metal compounds in carcinogenesis. *In Vivo* 17:529–539.
- Ding M, Shi X. 2002. Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 234/235:293–300.
- Forteza R, Salathe M, Miot F, Forteza R, Conner GE. 2005. Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:462–469.
- Franchini I, Mutti A. 1988. Selected toxicological aspects of chromium(VI) compounds. *Sci Total Environ* 71:379–387.
- Gerritsen WB, Asin J, Zanen P, van den Bosch JM, Haas FJ. 2005. Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respir Med* 99:84–90.
- Gessner C, Kuhn H, Seyfarth HJ, Pankau H, Winkler J, Schauer J, et al. 2001. Factors influencing breath condensate volume. *Pneumologie* 55:414–419.
- Gibb HJ, Lees PSJ, Pinsky PF, Rooney BC. 2000. Lung cancer among workers in chromium chemical production. *Am J Ind Med* 38:115–126.
- Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, Poli D, Manini P, Vettori MV, et al. 2005. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm Med* 5:10; doi: 10.1186/1471-2466-5-10 [online 1 September 2005].
- Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, et al. 2004. Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten. *Environ Health Perspect* 112:1293–1298.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1990. Chromium, Nickel and Welding. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum 49:1–677.
- Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. 2002. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 32:822–832.
- Levina A, Lay PA. 2005. Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium. *Coord Chem Rev* 249:281–298.
- Luippold RS, Mundt KA, Dell LD, Birk T. 2005. Low-level hexavalent chromium exposure and rate of mortality among US chromate production employees. *J Occup Environ Med* 47:381–385.
- Mutti A, Cavatorta A, Borghi L, Canali M, Giaroli C, Franchini I. 1979. Distribution and urinary excretion of chromium. Studies on rats after administration of single and repeated doses of potassium dichromate. *Med Lav* 70:171–179.
- Mutti A, Lucertini S, Valcavi P, Neri TM, Fornari M, Alinovi R, et al. 1985. Urinary excretion of brush-border antigen revealed by monoclonal antibody: early indicator of toxic nephropathy. *Lancet* 26:914–917.
- Mutti A, Pedroni C, Arfini G, Franchini I, Minoia C, Micoli G, et al. 1984. Biological monitoring of occupational exposure to different chromium compounds at various valency states. *Int J Environ Anal Chem* 17:35–41.
- NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health). 2003a. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). 4th ed. Method 7300: Elements by ICP (Nitric/Perchloric Acid Ashing). Available: <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/7300.pdf> [accessed 18 October 2005].
- NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health). 2003b. NIOSH Method 7703: Hexavalent Chromium by Field-Portable Spectrophotometry. Available: <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/7703.pdf> [accessed 10 July 2005].
- O'Brien TJ, Ceryak S, Patierno SR. 2003. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mut Res* 533:3–36.
- Park RM, Bena JF, Stayner LT, Smith RJ, Gibb HJ, Lees PS. 2004. Hexavalent chromium and lung cancer in the chromate industry: a quantitative risk assessment. *Risk Anal* 24:1099–1108.
- Sobaszek A, Boulenguez C, Frimat P, Robin H, Haguenoer JM, Edme JL. 2000. Acute respiratory effects of exposure to stainless steel and mild steel welding fumes. *J Occup Environ Med* 42:923–931.
- Sorensen M, Schins RP, Hertel O, Loft S. 2005. Transition metals in personal samples of PM_{2.5} and oxidative stress in human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1340–1343.
- Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20:77–88.
- UNICHIM (Italian Association for Unification in the Sector of Chemical Industry). 1995. 886: Ambienti di Lavoro—Determinazione di Nichel, Manganese e Cromo nei Fumi di Saldatura—Metodo con Spettrometro ad Assorbimento Atomico Dotato di Fornetto di Grafite. Available: http://www.unichim.it/htm/pagine_publicazioni/pagina_iniziale_publicazioni.htm [accessed 15 October 2005].
- Wise JP Sr, Wise SS, Little JE. 2002. The cytotoxicity and genotoxicity of particulate and soluble hexavalent chromium in human lung cells. *Mut Res* 517:221–229.
- World Medical Association. 2002. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Ferny-Voltaire, France: World Medical Association. Available: <http://www.wma.net/e/policy/pdf/17c.pdf> [accessed 15 April 2005].
- Zhitkovich A. 2005. Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI). *Chem Res Toxicol* 18:3–11.

Allegato II

Determination of hexavalent chromium in exhaled breath condensate and environmental air among chrome plating workers

Matteo Goldoni^{a,b}, Andrea Caglieri^a, Diana Poli^{a,b}, Maria Vittoria Vettori^{a,b},
Massimo Corradi^{a,b}, Pietro Apostoli^c, Antonio Mutti^{a,*}

^a *Laboratory of Industrial Toxicology, Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences, University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy*

^b *National Institute of Occupational Safety and Prevention, Research Centre at the University of Parma, Parma, Italy*

^c *Laboratory of Industrial Hygiene, Department of Experimental and Applied Medicine, University of Brescia, Italy*

Received 5 December 2005; received in revised form 18 January 2006; accepted 19 January 2006

Available online 24 February 2006

Abstract

Chromium speciation has attracted attention because of the different toxicity of Cr(III), which is considered relatively non-toxic, and Cr(VI), which can cross cell membranes mainly as a chromate anion and has been classified as a class I human carcinogen. The aims of the present study were to measure soluble Cr(VI) levels in environmental samples, to develop a simple method of quantifying Cr(VI) in exhaled breath condensate (EBC), and to follow the kinetics of EBC Cr(VI) in chrome plating workers.

Personal air samples were collected from 10 chrome platers; EBC was collected from the same workers immediately after the work shift on Tuesday and before the work shift on the following Wednesday. Environmental and EBC Cr(VI) levels were determined by means of colorimetry and electrothermal absorption atomic spectrometry, respectively.

The method of detecting Cr(VI) in environmental air was based on the extraction of the Cr(VI)-diphenylcarbazide (Cr(VI)-DPC) complex in 1-butanol, whereas EBC Cr(VI) was determined using a solvent extraction of Cr(VI) as an ion pair with tetrabutylammonium ion, and subsequent direct determination of the complex (Cr(VI)-DPC) in EBC.

Kinetic data showed that airborne Cr(VI) was reduced by 50% in airway lining fluid sampled at the end of exposure and that there was a further 50% reduction after about 15 h. The persistence of Cr(VI) in EBC supports the use of EBC in assessing target tissue levels of Cr(VI).

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cr(VI); Speciation; Exhaled breath condensate; ETAAS; Chrome plating

1. Introduction

Chromium (Cr) is present in the environment in two main oxidation states: Cr(III) and Cr(VI). Whereas Cr(III) can be present in non-polluted environments, Cr(VI) is largely anthropogenic. Both forms are detectable in the workplace air of stainless steel production plants, chromium plating plants, chromium pigment factories, etc. [1]. Chromium speciation has attracted a great deal of attention because of the differential toxicity of its stable species: Cr(III) cannot usually cross cell membranes and its toxicity is considered to be relatively low [2,3], whereas Cr(VI) is transported through anion channels as chromate (CrO_4^{2-}) [4],

and its reduction by different intracellular components (such as glutathione, ascorbate, tocopherols and different enzyme cofactors) generates stable Cr(III) or unstable Cr(IV) and Cr(V) intermediates, all of which are capable of forming complexes with peptides, proteins and DNA, and generating oxidative stress in vitro and in vivo, though Cr(VI) oxidizing potential in humans is not known with certainty [5–8]. Cr(VI) has been recognised as a highly toxic elemental species on the basis of experimental and epidemiological evidence, and has been classified as a class I human carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC) [2].

In occupational settings, Cr(VI) exposure mainly occurs as a result of inhalation, and it is known that Cr(VI) compounds cause lung cancer [1]. The ex vivo monitoring of Cr species at the target organ level is important in occupational toxicology, because the measurement of total Cr in white and red blood cells

* Corresponding author. Tel.: +39 0521 033075; fax: +39 0521 033076.
E-mail address: antonio.mutti@unipr.it (A. Mutti).

[9] can only give information concerning systemic levels, which however reflect only exposure to soluble Cr(VI) and are influenced by absorption from all routes, including dermal exposure. Similar information can be obtained from Cr in urine, where Cr is completely reduced to the trivalent state [10]. However, the most toxic Cr species are represented by Cr(VI) compounds that are poorly absorbed and persist in the lung, where – when taken up by resident cells – can cause cancer.

We have recently demonstrated that total Cr is measurable in the exhaled breath condensate (EBC) of chrome plating workers, and that its EBC levels correlate with biomarkers of inflammation and oxidative stress, such as malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H₂O₂), thus suggesting that exhaled total Cr may reflect the lung dose responsible for toxic effects on the airways [11]. There are no published data concerning the Cr(VI)/Cr(III) equilibrium in the airway lining fluid, nor any data is available concerning its reducing power, although different concentrations of individual reducing agents (glutathione, ascorbic acid) may affect the reduction of Cr(VI) to Cr(III), and thus the levels of Cr(VI) that reach pulmonary tissue [12]. The measurement of Cr(VI) in EBC, which is also a suitable fluid for assessing the lung doses and effects of cobalt and tungsten in exposed workers [13], may therefore be a useful means of following the reduction pathways of Cr at target organ level and studying the mechanisms of pulmonary Cr(VI) toxicity.

Published methods of measuring Cr(VI) in environmental and water samples include colorimetry after the complexation of chromate ions with 1,5-diphenylcarbazide (DPC) or other molecules, with and without previous extraction and pre-concentration steps [14–18], and chromatographic techniques for the separation of different oxidation forms [19–21] and stripping voltammetry [22]. Furthermore, the website of the National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) shows various protocols for determining Cr(VI) in environmental air [23], and a comparison of the different analytical methods [24]. The state of the art concerning the measurement of airborne Cr(VI) compounds in workplace aerosols and related samples has recently been reviewed [25]. Cr(VI) has never been assayed in EBC after exposure to hexavalent Cr compounds.

The aims of this study were to develop a simple liquid/liquid extraction and colorimetric method for monitoring soluble Cr(VI) in environmental samples without the need for more complex and expensive separation methods such as solid phase extraction (SPE), to measure EBC Cr(VI) levels in exposed workers, and to follow the kinetics of Cr(VI) exhalation using an even more precise and sensitive method based on ion pair extraction followed by electrothermal absorption atomic spectrometry (ETAAS).

2. Experimental

2.1. Subjects

The study involved 10 workers employed in a chrome plating plant who had normal spirometric indices and did not report any significant current or past respiratory disease; none of them had experienced any symptoms of acute respiratory illness in the 4

Table 1
Demographic and clinical data of the study subjects

| | Chrome plating workers |
|--------------------------------|------------------------|
| Number of subjects | 10 |
| Sex (M/F) | 10/0 |
| Age (years) | 39.3 ± 7.3 |
| Smokers/ex-smokers/non-smokers | 1/0/9 |
| FVC (% predicted) | 91.2 ± 8.3 |
| FEV1 (% predicted) | 92.5 ± 9.1 |
| FEV1/FVC (%) | 83.4 ± 9.2 |

The pulmonary parameters and age are expressed as mean values ± S.D. FVC: forced expiratory vital capacity; FEV1: forced expiratory volume in 1 s.

weeks preceding the study. Their demographic and clinical data are summarised in Table 1. Two EBC samples were collected: one immediately after the end of the work shift on Tuesday evening (t_0) and the other before the beginning of the work shift on Wednesday morning (t_1), about 15 h after the last Cr exposure.

All of the enrolled subjects gave their written informed consent to the procedures, which were approved by our local Institutional Human Ethics Committee. The biological material was sampled as laid down in the Declaration of Helsinki [26].

2.2. EBC collection

EBC was collected using a TURBO-DECCS (Transportable Unit for Research on Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection Systems) (ItalChill, Parma, Italy) as previously described [11]. Briefly, the subjects were asked to breathe tidally through the mouthpiece for 15 min, while sitting comfortably in the workplace office where the level of total Cr was below 0.1 µg/m³. The collecting temperature was –5 °C. We also measured total Cr in EBC of controls [11], but Cr levels were too low to detect the fraction of Cr(VI).

2.3. Instrumentation

Sonication was carried out in a Transsonic 460 ultrasonic bath (Elma, Singen, Germany). The solid phase (SPE) was extracted using a VacMasterTM-10 SPE Manifold (IST, Glamorgan, UK) connected to a vacuum pump by means of a pressure control valve. The PTFE valve liners came from IST (Glamorgan, UK), and the strong anion-exchange solid-phase extraction (SAE-SPE) cartridges were SupelcleanTM LC-Florisil SPE Tubes (6 ml) from Supelco (Bellefonte, PA, USA). A DU 640 spectrophotometer (Beckman, Fullerton, CA, USA) was used for the colorimetric measurements, and a 220 Z atomic absorption spectrometer (VARIAN, Palo Alto, USA) with Zeeman effect background correction was used to monitor Cr in the biological samples.

2.4. Reagents

The standard certified Cr(VI) solution came from Fluka (Buchs, Germany), and the standard Cr(III) atomic absorption solution from Aldrich (Milwaukee, WI, USA) as tetrabutylammonium bromide 99% (TBAB), 4-methyl-2-pentanone and

nitric acid 69.5%. The 1,5-diphenylcarbazide (DPC), acetonitrile, ammonium sulphate and ammonium hydroxide (all reagent grade) came from Sigma (St. Louis, MI, USA). Hydrochloric acid 37% (HCl), 1-butanol and absolute ethanol came from Carlo Erba (Milan, Italy).

2.5. Environmental measurements

2.5.1. Environmental sample collection and extraction procedure

Ambient monitoring was carried out by means of personal samplers. Briefly, airborne particulates were collected on PVC membrane filters (5.0 μm porosity, 25 mm diameter, Supelco, Bellefonte, PA, USA) at a constant flow of 3 l min^{-1} for 90–150 min in the morning or afternoon of the Tuesday work shift. The reducing power of the filters was excluded by incubating some of them with known Cr(VI) concentrations for 24 h (data not shown). The 7703 NIOSH method [23] for the extraction of total Cr by sonication of the membranes (10 ml of extraction buffer – 0.05 M ammonium sulphate, 0.05 M ammonium hydroxide – was used for every membrane) was strictly followed. During the 24 h following the environmental air collection, Cr(VI) and total Cr were, respectively, measured by means of a colorimetric method and ETAAS with Zeeman effect background correction.

2.5.2. Cr(VI) determinations

The standards were freshly prepared from a certified Cr(VI) solution after dilution with water. Moreover, adequate amounts of standards were added directly to the membrane and extracted as the samples, with a recovery close to 100%. In the original NIOSH 7703 protocol, Cr(VI) was extracted from SPE cartridges with 9 ml of elution solution (0.5 M ammonium sulphate, 0.1 M ammonium hydroxide), but better Cr(VI) recovery was obtained by slightly changing the SPE procedure to include a cartridge washing step with methanol 3 ml, the cartridge loading of 3 ml of the aqueous extraction samples obtained from membranes after sonication, and the subsequent addition of 1 ml water to clean up the impurities. Finally, Cr(VI) was extracted from the cartridge with 9 ml of buffer elution 0.01 M ammonium sulphate and 0.01 M ammonium hydroxide and 100 μl of HCl 37% and 3 ml of DPC complexation solution (25 mM of DPC in acetonitrile) were added to the SPE recovery samples. The determinations of the Cr(VI)–DPC complex were made by measuring solution absorbance at 540 nm.

The same analysis was carried out in parallel by changing the Cr(VI) colorimetric detection protocol. We found experimentally that the Cr(VI)–DPC complex tended to concentrate in some organic solvents such as 1-butanol (see Section 3), and so 9 ml of the elution solution with Cr(VI) and 3 ml of DPC standard solution (2 mM) in 1-butanol were added together with 400 μl of HCl 37%. The samples were mixed thoroughly and, after five minutes, centrifuged ($2000 \times g$, 5 min) to separate the phases. The determinations of the Cr(VI)–DPC complex were made on the organic phase by measuring absorbance at 545 nm

as the use of 1-butanol as solvent shifted the absorbance peak of the complex from 540 to 545 nm.

2.5.3. Cr(VI) determinations without SPE procedures

The great affinity between the Cr(VI)–DPC complex and 1-butanol induced us to develop a simpler method of detecting Cr(VI) in environmental samples that avoided the SPE procedure. Because of the relatively high concentrations of Cr(VI) in the membranes, 1 ml of the extracted Cr(VI) was mixed directly with 1 ml of butanolic DPC solution (2 mM) without any previous extraction. In the mixing phase, we added 100–150 μl of HCl 37% and directly measured the absorbance of the organic phase at 545 nm after centrifugation at $2000 \times g$ for 2 min.

2.6. Cr(VI) and total Cr determinations in EBC

The protocol for measuring Cr(VI) in EBC was derived from published solvent extraction procedures for water samples [27]. Briefly, 1 ml of TBAB in 4-methyl-2-pentanone, 50 mM solution, and 50 μl nitric acid 69.5% were added to 1 ml of EBC, and the biphasic system was thoroughly mixed for 10 min. After centrifugation at $2000 \times g$ for 5 min, 800 μl of the organic phase containing the ion couple between the chromate and tetrabutylammonium ion were mixed with 50 μl of a concentrated aqueous solution of DPC (20 mM) in 60% ethanol and 7% nitric acid, and 1 ml of pure water. After mixing for 2–3 min, the two phases were separated by centrifuging the solution at $3000 \times g$ for 1 min. Because of the low concentration of Cr(VI) in EBC, the Cr(VI) complexed with DPC in the aqueous phase was measured by means of ETAAS, which is about 2.5 times more sensitive than the colorimetric method used for the environmental analysis.

Total Cr in EBC was measured by means of ETAAS as previously reported [11].

2.7. Statistical analysis

The Bland–Altman method was used to compare the different methods of Cr(VI) detection [28]. Because of the relatively small number of studied subjects, parametric tests were used on logarithms to reduce the effect of outliers (dependent Student's *t*-test or ANOVA for repeated measures followed by Tukey's post hoc test) with a significant *p* value of 0.05. The data are expressed as geometric means (geometric S.D.), and also ranges.

3. Results

3.1. Detection of Cr(VI) in environmental samples

In order to test the liquid/liquid Cr(VI)/DPC extraction efficiency of 1-butanol and compare it with that of the colorimetric method suggested by the NIOSH 7703 protocol, in which DPC is dissolved in acetonitrile and directly added to the Cr(VI) solution [23], two different calibration lines were used in the range of 0–200 $\mu\text{g l}^{-1}$ of Cr(VI) in elution buffer (Fig. 1). Within this range, both methods showed a linear response

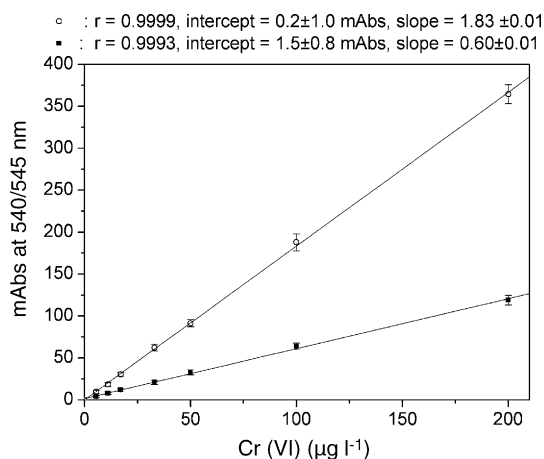


Fig. 1. Calibration lines of Cr(VI) in the range 0–200 $\mu\text{g l}^{-1}$ in elution buffer with the extraction of Cr(VI)–DPC in 1-butanol measuring absorbance at 545 nm (○), and following the NIOSH 7703 protocol measuring absorbance at 540 nm (■). The figure also shows Pearson's r -value, the intercept and the slope of the lines with their S.D.s.

($R=0.999$), but the accumulation of Cr–DPC in 1-butanol enormously enhanced the signal: the slope of the regression lines passed from 0.60 ± 0.01 for the standard method to 1.83 ± 0.01 for butanol liquid/liquid extraction, and the limit of detection (LOD) calculated as 3 S.D. of the blank variability changed from about 1.5 to $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$. The use of 1-butanol as solvent shifted the wavelength of maximum absorbance to 545 nm without changing the intensity of the peak (data not shown).

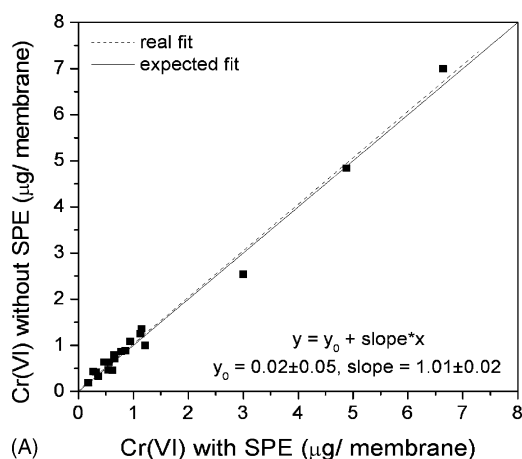
Fig. 2A shows the experimental detection of Cr(VI) in environmental samples (20 experimental points in the range of 0.1–7.0 $\mu\text{g}/\text{membrane}$) with and without SPE (see Section 2 for further details). The slope of the straight line in the regression fit was 1.01 ± 0.03 , and the correlation coefficient 0.995 (Fig. 2A), whereas the Bland–Altman graph (Fig. 2B) showed only one point between 2 and 3 S.D. (as expected with 20 experimental points), and the mean deviation between the two methods was near to 0 (0.03 $\mu\text{g}/\text{membrane}$).

In relation to the selected workers, the morning exposure to total Cr [3.7 (2.8) $\mu\text{g m}^{-3}$, range 0.8–14.1 $\mu\text{g m}^{-3}$] was not statistically different from the afternoon exposure [4.6 (2.7) $\mu\text{g m}^{-3}$, range 1.4–23.4 $\mu\text{g m}^{-3}$]. This was confirmed by the measurements of Cr(VI), which passed from 2.5 (2.8) (range 0.5–10.3) $\mu\text{g m}^{-3}$ in the morning to 3.3 (3.2) (range 1–17.6) $\mu\text{g m}^{-3}$ in the afternoon. In terms of % Cr(VI) content, 67.8% (1.1) (range 56.7–76.6%) of the total Cr in the morning, and 70.1% (1.3) (range 43.9–100%) in the afternoon, was in the form of soluble Cr(VI).

On the basis of these results, the weighted average exposure of the workers during the work shift was 4.3 (2.6) (range 1.2–18.6) $\mu\text{g m}^{-3}$ of total Cr, of which 2.9 (2.6) (range 0.8–13.8) $\mu\text{g m}^{-3}$ was soluble Cr(VI). Soluble Cr(VI) accounted for 67.5% (1.1) (range 49.9–78.3%) of the total.

3.2. Detection of Cr(VI) in EBC

Various experiments were performed to validate the procedure for EBC Cr(VI) determinations described in Section 2.



(A) Correlation between the Cr(VI) concentrations determined with and without SPE in the environmental air samples, also showing the function of the fit with the values of the intercept with y -axis (y_0) and slope. The expected fit is $y=x$.

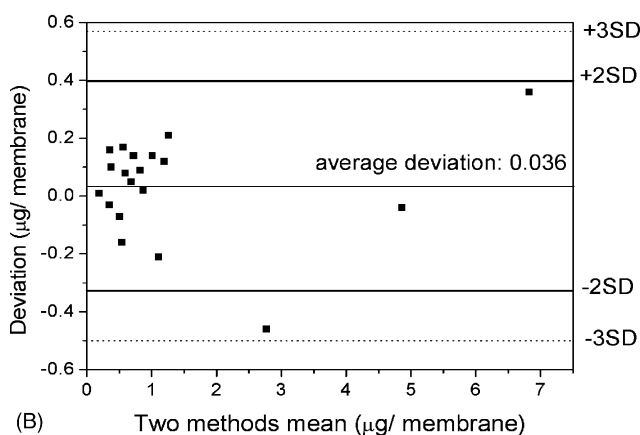


Fig. 2. (A) Correlation between the Cr(VI) concentrations determined with and without SPE in the environmental air samples, also showing the function of the fit with the values of the intercept with y -axis (y_0) and slope. The expected fit is $y=x$. (B) Bland–Altman graph in which the “two methods mean” is the average of the values measured with and without SPE, and “deviation” the difference between these values. The figure also shows the lines representing ± 2 S.D. (—) and 3 S.D. (...).

- The signals of standard Cr(VI) alone and complexed with DPC in aqueous solution measured by means of ETAAS were similar (differences $<5\%$, data not shown).
- About 90% of the Cr(VI) initially present in the solution was extracted as an ion pair with TBAB in water; the extraction efficiency was slightly lower in EBC (about 85%); the calibration curves in Fig. 3 shows that the extraction in both water and EBC was independent of the Cr(VI) concentration. On the contrary, $<2\%$ of Cr(III) was extracted in the organic phase with TBAB, and its contribution to the final Cr(VI) signal was negligible up to $50 \mu\text{g l}^{-1}$ (data not shown).
- The contribution of the contamination of DPC, nitric acid, TBAB and 4-methyl-2-pentanone to the blank signal was low, but not negligible (data not shown).
- To test the effects of other anions on the complexation procedures (i.e. competition effects of different ions forming the ion pair) and the ETAAS Cr(VI) signal, Cr(VI) was determined in two different drinking waters in which the concentrations of anions such as chloride, carbonate, nitrate and sulfate can be easily measured. The spectrum of a standard

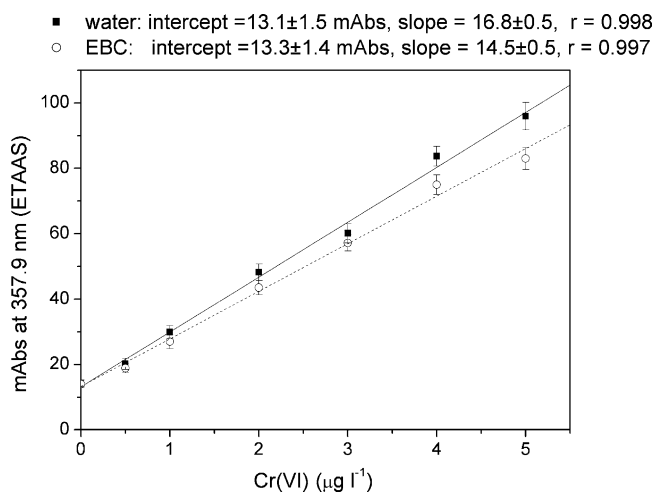


Fig. 3. Calibration curve of Cr(VI) in the range 0–5 $\mu\text{g l}^{-1}$ after extraction with TBAB and complexation with DPC in water, and in a pool of EBC; the slopes of the curves and Pearson's r -value are also shown. The intercept represents the value of the blank in the absence of standard Cr(VI).

Cr(VI) concentration (5 $\mu\text{g l}^{-1}$) was unaffected by the matrix (data not shown), and the simultaneous presence in solution of 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ Cr(VI) and 500 $\mu\text{g l}^{-1}$ Fe^{2+} (which tends to reduce Cr(VI) at acidic pH) reduced the ETAAS Cr(VI) absorption peak by only about 10%.

- The calibration curve of Cr(VI) in a pool of different EBCs (total Cr = 0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$) showed an approximately 10% decrease in the Cr signal within the range 0–5 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Fig. 3). Moreover, as in the case of water, the presence of up to 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ of Cr(III) in EBC did not interfere with the Cr(VI) signal.
- Considering 3 S.D. of the blank, the LOD of EBC Cr(VI) was about 0.2 $\mu\text{g l}^{-1}$.
- The coefficient of variation (CV) of the measurements of standard samples (0.8, 2 and 5 $\mu\text{g l}^{-1}$) in water and a pool of EBCs was <10% (2 and 5 $\mu\text{g l}^{-1}$) and <30% (0.8 $\mu\text{g l}^{-1}$) for all of the intra- and inter-day determinations.

Fig. 4A shows total Cr in EBC, with the corresponding Cr(VI) concentrations. At t_0 , total Cr was 2.6 (1.5) (range 0.8–6.1) $\mu\text{g l}^{-1}$, significantly higher ($p < 0.05$) than at t_1 [1.5 (2.0), range 0.4–4.1 $\mu\text{g l}^{-1}$], and Cr(VI) passed from 0.9 (3.4) (range 0.1–2.9) $\mu\text{g l}^{-1}$ at t_0 with only one of the 10 EBC samples below the LOD, to 0.2 (3.6) (range 0.1–2.1) $\mu\text{g l}^{-1}$ at t_1 ($p < 0.01$), with six of the 10 EBC samples below the LOD. Where Cr(VI) was less than 0.2 $\mu\text{g l}^{-1}$, half of the LOD (0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$) was assigned. The Cr(VI)/total Cr ratio (Fig. 4B) showed that EBC Cr(VI) levels were significantly lower at t_1 [16.5% (2.5), range 3.0–51.2% of total Cr] than at t_0 [33.5% (2.0), range 9.7–79.0%; $p < 0.05$] and in the environmental air ($p < 0.01$); the difference between t_0 and environmental air was also significant ($p < 0.05$).

4. Discussion

Our study shows that it is possible to determine Cr(VI) in EBC and that the fractional contribution of Cr(VI) to total Cr

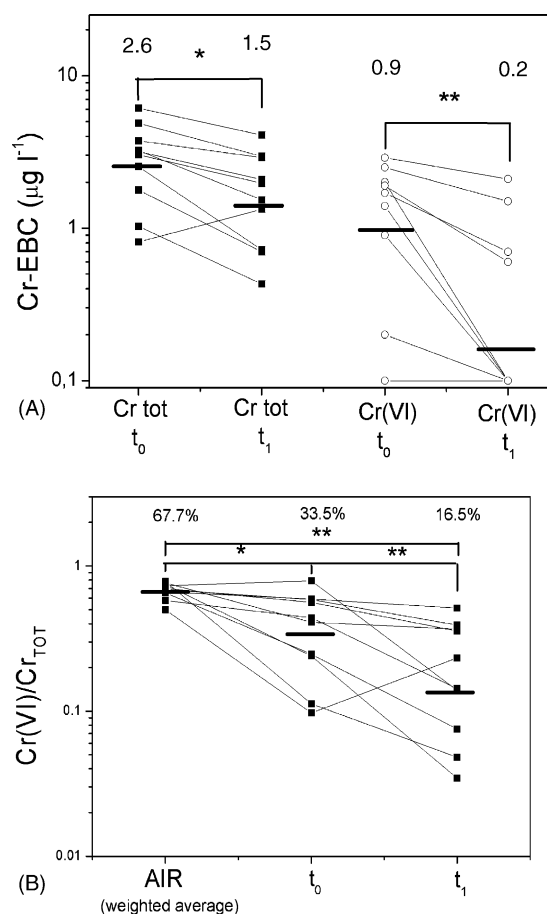


Fig. 4. (A) Cr and Cr(VI) levels at the end of the Tuesday work shift (t_0) and at the beginning of the Wednesday work shift (t_1), and their geometric means (top of the graph). (B) The fraction of Cr(VI) in the environmental samples (AIR) at t_0 and t_1 , and their geometric means (top of the graph). * $p < 0.05$; ** $p < 0.05$ with a paired Student's t -test (A) and repeated measures ANOVA followed by Tukey's post hoc tests (B).

decreased over time from the last exposure, thus ruling out its meaning as a simple marker of environmental contamination. This time-dependent decrease can in fact only be explained as an interaction between inhaled Cr(VI) and the pulmonary lining fluid, with a consequent reduction to Cr(III). The persistence of Cr(VI) in EBC reinforces the idea that the lower airways are the main target of Cr(VI) toxicity [10].

Cr(VI) can be detected in environmental samples using different approaches: soluble or total Cr(VI) can be distinguished by changing the extraction solution from the membrane buffer [29], and more sophisticated separation can be obtained by means of SPE or chromatography techniques [23]. However, as these are time-consuming and relatively expensive methods, we propose a very simple and rapid method of detecting soluble Cr(VI) based on the direct extraction of the Cr(VI)–DPC complex in 1-butanol and by-passing such extraction procedures as SPE. On the other hand, interferences may be problematic in workplaces where potentially interfering metals, like Fe in different oxidation states, could be present in much greater concentrations. Sample preparation procedures may be necessary in such cases. Our method has the advantage that Cr(VI) can

be concentrated in the organic phase simply by changing the volume of the DPC/butanol solution: using a 3:1 ratio of sample:DPC/butanol solution (9:3 ml), tripled the increase in signal intensity and reduced the LOD by a factor of 3 (Fig. 1). This means that about 75% of Cr(VI) complexed with DPC was concentrated in the organic phase. Cr(VI) extraction of some pieces of membrane with the buffer suggested by Hazelwood et al. [29] in order to monitor the soluble and insoluble Cr(VI) compounds did not significantly change the results, the concentration of insoluble Cr(VI) in this study being considered negligible.

Fig. 2A and B also shows negligible interferences from other cationic transition elements in environmental samples. The results with and without the SPE step recommended in the literature to clean the samples from other cationic transition elements or impurities were perfectly consistent in the investigated range of concentrations, and this was confirmed by *in vitro* experiments in which $500 \mu\text{g l}^{-1}$ of Cr(VI) were incubated with equal absolute quantities of cationic Fe, Pb, Ni, Cd, Cu and Co (data not shown). Another advantage of our method is that the SPE cartridges could be saturated by high concentrations of Cr(VI), whereas a direct colorimetric measure is linear in the range of the linearity of the spectrophotometer (Abs about 1.5). Further work is needed to compare our method with the ISO 16740 speciation method recently published [30].

In determining EBC Cr(VI), we adopted a different and more sensitive method that is useful for small concentrations and small volume samples (the LOD passes from 0.5 to $0.2 \mu\text{g l}^{-1}$). Tetraalkylammonium (tetrapropyl or tetrabutylammonium) bromide tends to form ion pairs with metal cyanides, alkyl sulfonate, sulfur oxide, inorganic anions and oxyanions [31–34] and, in particular, tetrabutylammonium ions form stable ion pairs with chromate at acidic pH in aqueous solutions [17,27]. This ion pair can be selectively extracted in organic solvents as 4-methyl-2-pentanone or chloroform, or in aqueous two-phase systems [17,27]. We adapted the method of Noroozifar and Khorasani-Motlagh [27] to the small volumes of collected EBC (never more than 2 ml over 15 min), and the use of ETAAS also allowed good sensitivity in the generally diluted EBC samples. The percent recovery of Cr(VI) as an ion pair in 4-methyl-2-pentanone was in line with that observed in previous studies [17,27] despite the small volumes, and did not depend on the Cr(VI) concentration in the considered range (Fig. 3).

Moreover, the experiments using drinking water and Fe^{2+} , together with the results of interference studies published in the literature [27], make the developed method ideal for diluted samples such as EBC, although the slight decrease in the extraction efficiency of Cr(VI) as an ion pair and then as a complex with DPC (about 10% overall) suggested adding the standard directly to the pools of EBCs and treating them as samples. This can be explained as a probable interference of traces of EBC anions (salts and proteins) present upon the extraction of Cr(VI). The slight effect of the different components on the signal of the blank suggested using highly pure reagents to minimise these effects, but the blank absorbance was in any case acceptable: about 14 mAbs against the 6 mAbs of pure water.

The optimisation of the methods of measuring soluble Cr(VI) in environmental samples and EBC allowed us to study the kinet-

ics of Cr(VI) in the airways. First of all, total Cr in EBC decreased 15 h after the last exposure, a finding that is in line with previous results observed before and after a weekend, and confirms that Cr can pass through airway lining fluid [11]: the kinetics of pulmonary lung desorption is relatively slow [35], and Cr accumulation has recently been observed in the bronchi and lungs of chromate workers [36]. Most importantly, the EBC Cr(VI) data confirmed that Cr(VI) was reduced to Cr(III) by airway lining fluid, but not completely so (Fig. 4A and B), even in workers exposed to smaller environmental Cr(VI) concentrations than the limits suggested by ACGIH [37], and those exposed to lower Cr concentrations than those reported in our previous study [11]. About 33.5% of Cr was still in the hexavalent form immediately after chromate exposure (about 67% of the environmental samples were hexavalent): 9/10 workers had clearly detectable EBC Cr(VI) levels, and 4/10 had detectable levels about 15 h after the last exposure. The persistence of Cr(VI) in the airways can justify the previously reported increase in biomarkers of inflammation in EBC [11], because unreduced Cr(VI) can be absorbed at pulmonary level and reveal its toxicity in pulmonary cells. We are currently attempting to relate the reduction kinetics of EBC Cr(VI) to individual susceptibility and EBC biomarkers of inflammation in a larger number of subjects.

5. Conclusions

In conclusion, we have developed a method for measuring EBC Cr(VI) based on ion pair extraction followed by ETAAS determination. The results of this study highlight the potential of EBC as a medium for assessing lung dose and effects after exposure to inhaled pneumotoxic substances (particularly transition elements) with different oxidation states. The integrated use of EBC and classic biological matrices such as urine and blood, which reflect systemic exposure, may therefore allow the fundamental completion of the biological monitoring of pneumotoxic compounds.

Acknowledgements

This study was supported by the National Heart, Blood and Lung Institute (NHLBI), Bethesda, MD, USA (grant R01 HL72323), and the Italian Ministry of Education, University and Research (PRIN 200306145).

References

- [1] ATSDR, Toxicological profile for Chromium (final report), NTIS Accession No. PB2000-108022. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Atlanta, GA, 2000, 461pp.
- [2] International Agency for Research on Cancer, Chromium, nickel and welding, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, vol. 49, IARC Scientific Publications, IARC, Lyon, 1999.
- [3] S. De Flora, M. Bagnasco, D. Serra, P. Zanacchi, *Mutat. Res.* 238 (1990) 99–172.
- [4] S. De Flora, K.E. Wetterhahn, *Life Chem. Rep.* 7 (1989) 169–244.
- [5] D. Bagchi, S.J. Stohs, B.W. Downs, M. Bagchi, H.G. Preuss, *Toxicology* 180 (2002) 5–22.

- [6] A. Zhitkovich, *Chem. Res. Toxicol.* 18 (2005) 3–11.
- [7] J.P. Wise Sr., S.S. Wise, J.E. Little, *Mut. Res.* 517 (2002) 221–229.
- [8] A. Levina, P.A. Lay, *Coord. Chem. Rev.* 249 (2005) 281–298.
- [9] T.P. Coogan, K.S. Squibb, J. Motz, P.L. Kinney, M. Costa, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108 (1991) 157–166.
- [10] D.J. Paustenbach, J.M. Panko, M.M. Fredrick, B.L. Finley, D.M. Proctor, *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 26 (1997) S23–S34.
- [11] A. Caglieri, M. Goldoni, O. Acampa, R. Andreoli, M.V. Vettori, M. Corradi, P. Apostoli, A. Mutti, *Environ. Health Perspect.*, in press, doi:10.1289/ehp.8506.
- [12] S. De Flora, *Carcinogenesis* 21 (2000) 533–541.
- [13] M. Goldoni, S. Catalani, G. De Palma, P. Manini, O. Acampa, M. Corradi, R. Bergonzi, P. Apostoli, A. Mutti, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 1293–1298.
- [14] J. Wang, K. Ashley, D. Marlow, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1027–1032.
- [15] D.M. Adria-Cerezo, M. Llobat-Estelles, A.R. Mauri-Aucejo, *Talanta* 51 (2000) 531–536.
- [16] I.S. Balogh, I.M. Maga, A. Hargitai-Toth, V. Andruch, *Talanta* 53 (2000) 543–549.
- [17] Y. Akama, A. Sali, *Talanta* 57 (2002) 681–686.
- [18] J. Chwastowska, W. Skwara, E. Sterlinska, L. Psonicki, *Talanta* 66 (2005) 1345–1349.
- [19] E.H. Borai, E.A. El-Sofany, A.S. Abdel-Halim, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 741–745.
- [20] J.S. Wang, K.H. Chiu, *Anal. Sci.* 20 (2004) 841–846.
- [21] M.A. Hossain, M. Kumita, Y. Michigami, T.S.A. Islam, S. Mori, *J. Chrom. Sci.* 43 (2005) 98–103.
- [22] O. Dominguez, J. Arcos, *Anal. Chim. Acta* 470 (2002) 241–252.
- [23] Available at the site <http://www.cdc.gov/niosh/topics/hexchrom/>.
- [24] J.M. Boiano, M.E. Wallace, W.K. Sieber, J.H. Groff, J. Wang, K. Ashley, *J. Environ. Monit.* 2 (2000) 329–333.
- [25] K. Ashley, A.M. Howe, M. Demange, O. Nygren, *J. Environ. Monit.* 5 (2003) 707–716.
- [26] World Medical Association, World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Ferney-Voltaire, France: The World Medical Association, 2002. Available: <http://www.wma.net/e/policy/pdf/17c.pdf>.
- [27] M. Noroozifar, M. Khorasani-Motlagh, *Anal. Sci.* 19 (2003) 705–708.
- [28] J.M. Bland, D.G. Altman, *Lancet* 1 (1986) 307–310.
- [29] K.J. Hazelwood, P.L. Drake, K. Ashley, D. Marcy, *J. Occup. Environ. Hyg.* 1 (2004) 613–619.
- [30] ISO, 16740 method: workplace air – Determination of hexavalent chromium in airborne particulate matter – method by ion chromatography and spectrophotometric measurement using diphenyl carbazide. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, 2005.
- [31] W.J. Maeck, G.L. Booman, M.E. Kussy, J.E. Rein, *Anal. Chem.* 33 (1961) 1775–1780.
- [32] S. Kusakabe, M. Arai, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 69 (1996) 581–588.
- [33] A.A. Abramov, M.S. Dzhigir Khanov, B.Z. Iofa, S.V. Volkova, *Radiochemistry* 44 (2002) 270–273.
- [34] Y. Akama, M. Ito, S. Tanaka, *Talanta* 53 (2000) 645–650.
- [35] E.J. O’Flaherty, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 138 (1996) 54–64.
- [36] K. Kondo, Y. Takahashi, S. Ishikawa, H. Uchihara, Y. Hirose, K. Yoshizawa, M. Tsuyuguchi, H. Takizawa, T. Miyoshi, S. Sakiyama, Y. Monden, *Cancer* 98 (2003) 2420–2429.
- [37] ACGIH, Chromium. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Cincinnati, OH, 1999.

Allegato III

Chromium in exhaled breath condensate and pulmonary tissue of non-small cell lung cancer patients

Matteo Goldoni · Andrea Caglieri · Massimo Corradi ·
Diana Poli · Michele Rusca · Paolo Carbognani ·
Antonio Mutti

Received: 24 November 2006 / Accepted: 14 August 2007 / Published online: 28 August 2007
© Springer-Verlag 2007

Abstract

Objective Chromium in exhaled breath condensate (EBC) has recently been proposed as a biomarker of pulmonary exposure. The aim of this study was to measure the Cr levels in the EBC and pulmonary tissue of patients with early, operable non-small cell lung cancer (NSCLC) who had not been occupationally exposed to Cr before and after tumour resection and to correlate Cr in lung tissue with that in EBC.

Methods Cr levels in the EBC and pulmonary tissue of 20 NSCLC patients were measured by means of electrothermal atomic absorption before and after tumour resection. Cr levels were also measured in the urine of 15 of these patients.

Results The pre-surgery EBC Cr levels of the NSCLC patients were not different from those of the controls, but both EBC and urinary Cr levels increased after surgery. There was a significant correlation between Cr levels in EBC and pulmonary tissue ($R = 0.55$, $P = 0.01$), but not between these and urinary Cr levels.

Conclusion Cr levels in EBC and urine of NSCLC patients were increased after surgical intervention. Measured Cr EBC levels were by one order of magnitude lower than those observed in moderately exposed workers. This fact, together with the correlation between Cr in EBC and in pulmonary tissue, confirms that EBC is a promising biological fluid to test pulmonary exposure to Cr, giving complementary information to that provided by urinary Cr, not correlated with EBC and tissue.

Keywords Chromium · Exhaled breath condensate · Lung cancer · Pulmonary tissue

Introduction

Chromium in the trivalent oxidation state [Cr(III)] shows limited toxicological properties, whereas hexavalent chromium [Cr(VI)] compounds have been classified as class 1 carcinogens by the IARC (IARC 1990). Indeed, there is sufficient epidemiological and experimental evidence indicating that exposure to Cr(VI) is associated with an increased incidence of lung cancer (De Flora et al. 1990; ATSDR 2000; De Flora 2000; Gibb et al. 2000; Park et al. 2004). Cr(VI) compounds have a number of industrial applications and exposure usually occurs by inhalation. The respiratory tract is therefore the primary target organ of Cr(VI) toxicity and carcinogenicity (ATSDR 2000; De Flora 2000).

Owing to the pneumotoxic properties of Cr(VI), some authors have directly measured Cr concentrations in the pulmonary tissue of chromate workers and also lung cancer patients, because urine and blood Cr levels are more representative of systemic than target organ exposure. In general, chromate workers with or without lung cancer have

M. Goldoni · A. Caglieri · M. Corradi · D. Poli · A. Mutti (✉)
Laboratory of Industrial Toxicology,
Department of Clinical Medicine,
Nephrology and Health Sciences,
University of Parma, Via Gramsci 14,
43100 Parma, Italy
e-mail: antonio.mutti@unipr.it

M. Goldoni · A. Caglieri · D. Poli
National Institute of Occupational Safety and Prevention
Research Center at the University of Parma,
Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy

M. Rusca · P. Carbognani
Unit of Thoracic Surgery, University of Parma,
Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy

higher pulmonary tissue Cr levels than controls (Tsuneta et al. 1980), whereas Cr levels in occupationally unexposed lung cancer patients and patients with other lung diseases are lower and variable.

Exhaled breath condensate (EBC), which is obtained by cooling the air exhaled under conditions of spontaneous breathing, has recently been proposed as a promising biological fluid to monitor lung pathobiology. Various biomarkers of inflammation and oxidative stress have been identified and assayed (Rahman and Kelly 2003; Horvath et al. 2005) and, over the last year, it has been demonstrated that traces of pneumotoxic transition elements from tobacco smoke or polluted environments, or involved in oxidative stress as part of the redox system, can be found in EBC (Mutti et al. 2006). Furthermore, a number of transition metals have been measured in pulmonary tissue (Adachi et al. 1991; Gerhardsson and Nordberg 1993; Kubala-Kukus et al. 1999), and Cr has been related to biomarkers of oxidative stress in the EBC of exposed chrome plating workers (Caglieri et al. 2006). These findings suggest that the measurement of EBC Cr seems to be a promising method for defining target organ Cr levels without using invasive means.

The aim of this study was to measure Cr in EBC and in urine in non-occupationally exposed non-small cell lung cancer (NSCLC) patients before and after surgical intervention. Moreover, we also took the advantage of this opportunity to investigate the correlation between Cr levels in EBC and pulmonary tissue.

Materials and methods

Subjects

We enrolled 20 patients, who underwent tumour resection because of histological evidence of NSCLC at the University of Parma's Department of Thoracic Surgery. Tumour size and node involvement were assessed using the International Union Against Cancer TNM staging system, and all of the patients were classified as having stage Ia, Ib or IIa lung cancer. None of the patients received radiation or chemotherapy before surgery. In particular, stage I (a or b) is characterised by the absence of regional lymph node metastasis (N0) and distant metastasis (M0) and stage IIa (N1M0) is characterised by the presence of ipsilateral peribronchial and/or ipsilateral hilar nodal metastases or intrapulmonary nodes involved by direct extension of the primary tumour, and by the absence of distant metastasis.

The asymptomatic group of control were 20 non-smokers, not occupationally exposed to Cr, without any pulmonary symptoms or a history of pulmonary disease, and with normal lung spirometry results.

Table 1 shows the characteristics of the study subjects. In particular, 19 of the 20 NSCLC patients were smokers or ex-smokers, all of whom had a history of at least 20 years smoking of at least 15 cigarettes/day.

Study design

Before enrolment, the subjects completed a short questionnaire concerning their current and previous medical history. The EBC and urine samples of the NSCLC patients were assessed immediately before and 2–4 days after tumour resection, when patients were able to perform the manoeuvre. Urine samples were obtained from only 15 patients, as the other five presented with haematuria. Portions of cancerous and non-cancerous lung tissue pieces were collected during surgery, and immediately stored at -80°C until analysis. The control EBC and urine samples were collected during a normal working day in our laboratory.

All of the subjects gave their written informed consent to the procedures, which were approved by our local ethics committee. The biological material was sampled as laid down in the Declaration of Helsinki.

EBC collection

EBC was collected using a TURBO-DECCS condenser (Italchill, Parma, Italy) as previously described (Caglieri et al. 2006; Goldoni et al. 2005, Mutti et al. 2006); the selected condensation temperature was -5°C .

The subjects were asked to breathe tidally through the mouthpiece for 10 min. They were instructed to form a complete seal around the mouthpiece with their mouth, which had to be kept dry by periodically swallowing excess saliva. They were also asked to rinse their mouth with drinking water thoroughly before, and every 5 min during the test. The NSCLC patients had no difficulty in performing the manoeuvre even during 2–4 days after tumour resection.

The EBC volume was measured using a calibrated pipette, with salivary contamination being excluded by

Table 1 Demographic characteristics of studied groups

| | NSCLC | Controls |
|---------------------|-------|----------|
| Subjects (no.) | 20 | 20 |
| Age (median, years) | 68.5 | 62.5 |
| Sex (male/female) | 17/3 | 14/6 |
| Current smokers | 10 | 0 |
| Ex-smokers | 9 | 0 |
| Never smokers | 1 | 20 |

The ex-smokers had stopped smoking for at least 1 year; otherwise they were considered to be current smokers. All of the ex-smokers had a 20–50-year history of smoking at least 15 cigarettes/day, like the current smokers

means of alpha-amylase detection (Infinity amylase reagent; Sigma, Milan, Italy). Alpha-amylase was never detected and none of the samples was excluded. The EBC samples were stored at -80°C until analysis.

Detection of urine and EBC Cr

Urinary Cr (Cr-U) was measured by means of electrothermal atomic absorption spectrometry (ETAAS) with Zeeman effect background correction, using a $1/10^5$ dilution of a certified standard control (1 g/l) in water (Fluka) for every ten samples and confirmed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in a separate laboratory. Finally, the ETAAS method was validated using a lyophilised urine control (Clincheck®, Recipe, Germany, Cr = 7.5 $\mu\text{g/L}$). The limit of detection (LOD) was 0.05 $\mu\text{g/l}$. Cr was normalised for urinary creatinine content (all the samples were between 30 and 300 mg% of creatinine), and therefore expressed as $\mu\text{g/g}$ creatinine. No samples of NSCLC patients were below the LOD and in the statistical analysis no data were censored.

EBC Cr (Cr-EBC) was measured by means of ETAAS, as previously described (Caglieri et al. 2006), and confirmed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in a separate laboratory. The LOD was 0.05 $\mu\text{g/l}$. No samples of NSCLC patients were below the LOD and in the statistical analysis no data were censored. Unfortunately, in most EBC samples, Cr was too low to be speciated with the method proposed by Goldoni et al. 2006 and no more sensitive methods are present in literature.

Detection of tissue Cr

Three small pieces of non-cancerous lung tissue that had not been in direct contact with the surgical instruments were collected from each NSCLC patient. The tumour resection involved the upper lobe in 13 patients and the lower lobe in 7 patients. Portions of cancerous and non-cancerous lung tissue pieces derived from the parenchyma were ablated. It is important to note that tissue pieces weighed, in general, a few grams and cut signs were evident on them. Therefore, small pieces where Cr was dosed (about 30–50 mg each) were in the opposite part of the cut. Samples were immediately stored at -80°C and Cr analysis was performed a few days later. A partial confirmation of contamination avoidance was that Cr was similar in the several small pieces of tissue from the same patient (data not shown).

Samples were boiled at 90°C overnight in order to eliminate their water content. The dry tissue was weighed and digested for 3 h with a solution containing 1,250 μl of water and 1,250 μl of nitric acid (69%) at 65°C . Cr was measured by means of ETAAS using certified standard

controls (Fluka, Milan, Italy) for every ten samples after appropriate dilution to minimise the effect of Cr contamination due to the use of nitric acid. The LOD was 0.05 $\mu\text{g/l}$, but the concentrations were expressed as $\mu\text{g/g}$ dry tissue. The measurement was also repeated using a piece of cancerous tissue. No samples were below the LOD and in the statistical analysis no data were censored.

Detection of Cr in surgical instruments

Surgical clips were incubated for 3 h in an aqueous solution, alone or attached to the plastic tube of the EBC collection system, as were the standard linear cutter and head of the endosurgery machine. Cr was directly measured in the water used for washing and expressed as ng/clip for the clips, and $\mu\text{g/g}$ for the other surgical instruments.

Statistical analysis

For the controls, a value of 0.025 $\mu\text{g/l}$ was assigned, if Cr was below the LOD in urine or EBC. The non-parametric Shapiro–Wilk’s statistical test was used because of the non-normal nature of the data, which were expressed as median values with interquartile ranges. Paired samples were compared using Wilcoxon’s test for repeated measures and the Mann–Whitney test for independent samples. For the linear regression analysis, we used Pearson’s correlation coefficient on a log–log scale in order to avoid heteroscedasticity and to normalise standardised residuals. *P* values of 0.05 or less were considered statistically significant.

Results

As there was neither difference in the EBC volume between the controls and NSCLC patients at either collection time nor any correlation between EBC volume and the levels of the measured transition elements in EBC (data not shown), total EBC volume was not considered in the statistical analysis. Moreover, no differences in the EBC volume were observed before and after the surgical intervention (data not shown).

Table 2 shows the Cr-EBC and Cr-U levels. There was no difference between the NSCLC patients and controls at time 1, but there was a significant increase in Cr-EBC of the patients at time 2 in comparison with time 1 ($P < 0.05$) and in comparison with the controls ($P < 0.05$). There was also a similar increase in the Cr-U levels ($P < 0.01$ vs time 1 and controls).

The level of Cr was 0.14 (0.04–0.24) $\mu\text{g/g}$ in normal pulmonary tissue and 0.14 (0.06–0.3) $\mu\text{g/g}$ in cancerous tissue ($P = \text{ns}$).

Surgical clips released only a small amount of Cr [0.03 (0.02–0.04) ng/clip], but the linear cutter and the head of

Table 2 Cr concentrations in EBC and urine of controls and NSCLC patients before (time 1) and after tumour resection (time 2)

| | Controls | NSCLC time 1 | NSCLC time 2 |
|-----------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|
| Cr-EBC (µg/l) | 0.18 (ND-0.43) | 0.22 (0.08–0.35) | 0.40 (0.10–1.73)*-# |
| Cr-U (µg/g creat.) | 0.19 (0.12–0.25) | 0.20 (0.08–0.30) | 0.60 (0.40–0.84)**-## |

Median (interquartile range) is reported

ND not detectable (<0.05 µg/l)

* $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs controls (Mann–Whitney test), and

$P < 0.05$ and ## $P < 0.01$ vs NSCLC time 1 (Wilcoxon’s test)

the endo-surgery machine released more substantial amounts (respectively 0.4 and 3.2 µg/g). Therefore, taking into account that only 10–20% of Cr was released into water in 3 h by 10 g of surgical instrument during intervention (10 g was almost the part in direct contact with tissue and blood), for about 10–20 fixed clips an approximate absorbed Cr dose was about 3–6 µg, the head of the endo-surgery machine being the greatest Cr source.

Figure 1 shows a significant moderate correlation between tissue and EBC Cr levels at time 1 ($r = 0.55$, $P = 0.01$). There were no significant correlations in Cr-EBC and Cr-U between the two time-points (Fig. 2a, b) in the patients or controls (not shown), nor between Cr-Tissue and Cr-U at time 1 in the NSCLC patients (Fig. 3).

Discussion

Our findings show that there was no difference in Cr-EBC or Cr-U levels between NSCLC patients not occupationally

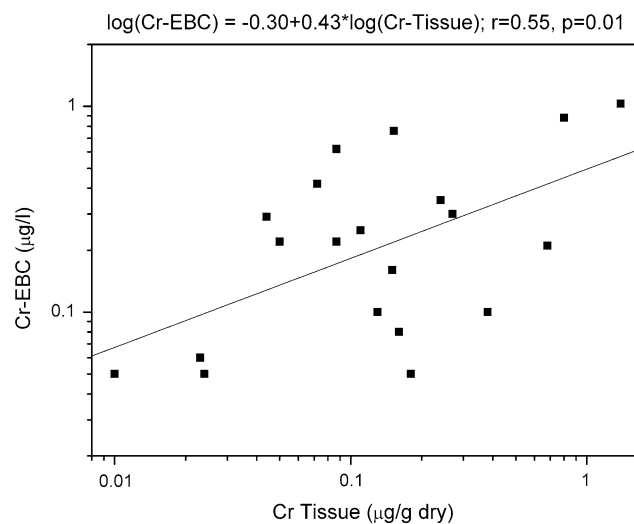


Fig. 1 Correlation between Cr levels in pulmonary tissue and EBC immediately before surgical intervention, and the linear regression equation

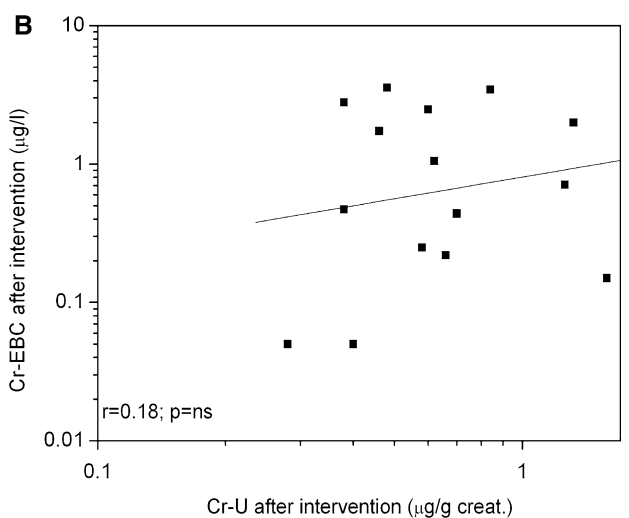
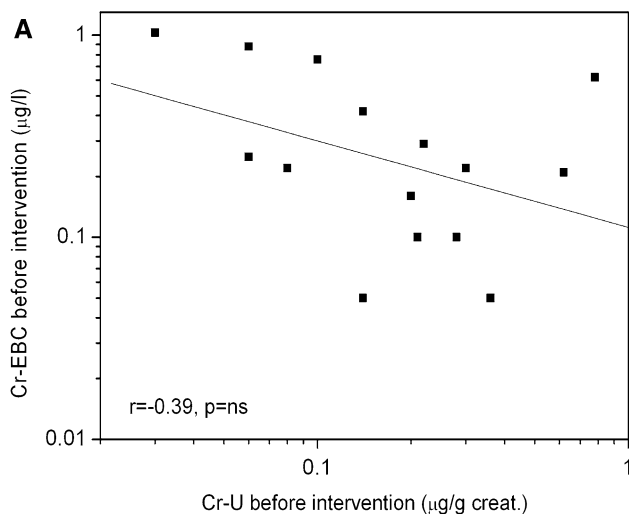


Fig. 2 Correlations between Cr-EBC and Cr-U before (a) and after surgery (b). ns = not significant

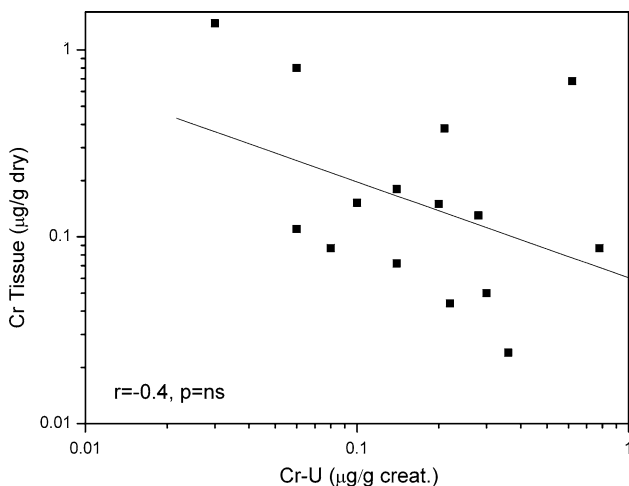


Fig. 3 Correlation between Cr-Tissue and Cr-U before surgery. ns = not significant

exposed to Cr and non-smoking controls before the intervention. However, we noted a significant increase in both levels after the intervention. Finally, we found a moderate but significant correlation between Cr-EBC and pulmonary tissue Cr levels, whereas Cr-U did not significantly correlate with either Cr-EBC or Cr-tissue.

Although controls were non-smokers and NSCLC patients prevalently smokers or ex-smokers, no differences were seen in Cr levels in the biological media, thus suggesting that cigarette smoke is not a source of Cr contamination, as already noted (Mutti et al. 2006). Moreover, urinary levels of NSCLC patients were substantially in line with published Italian reference levels [0.08 µg/l with a 95% CI of 0.24 µg/l (Apostoli et al. 1997), and near 0.5 µg/l in Northern Italy, Minoia et al. 1988], even if in those manuscripts Cr was not reported in µg/g creatinine. On the other hand, pulmonary tissue Cr levels have never been standardised in literature and very different values have been reported in subjects unaffected by occupational Cr exposure. Furthermore, environmental exposure, as well as age, gender, regional origin (Kollmeier et al. 1990; Takemoto et al. 1991), and probably also lifestyle, may significantly influence tissue Cr levels. However, our findings are consistent with those of Tsuneta et al. 1980, Raithel et al. 1987 and 1993 and Al-Saleh et al. 1996, and with some of the reference values reported in the literature (0.01–2.5 µg/g dry, Vanoeteren et al. 1986). Preliminary data in five subjects without lung cancer but with other diseases did not reveal different lung tissue Cr levels. Finally, as already observed (Raithel et al. 1989a, 1989b), Cr did not significantly accumulate in cancerous tissues.

Some authors have reported that tobacco smoke may increase tissue Cr levels in patients with lung cancer of non-occupational origin (Paakko et al. 1989; Raithel et al. 1989b; Akslen et al. 1990), but recent studies on cigarette smoke have found Cr constantly at levels about the limit of detection (Wagner et al. 2001; Rustemeier et al. 2002), whereas Cd and Pb, traditionally contaminating tobacco smoke, were clearly detectable (Chiba and Masironi 1992; Kalcher et al. 1993). However, we cannot exclude the possibility that the Cr content of cigarettes may vary from country to country and thus give rise to different results, or that it may have decreased over recent years due to more stringent control procedures.

The significant increase in both Cr-EBC and Cr-U after surgical intervention suggested the possibility to test if surgical instruments could be a possible source of Cr, as previously observed (Raithel et al. 1989a). Our findings showed that they release 3–6 µg Cr during surgical operation, which gives rise to increased levels of Cr-EBC and Cr-U 2–4 days after the intervention. However, it does not exclude other Cr sources being present (physiological fluid, medicines, etc.). Because the increase in Cr-EBC (from 0.22 to

0.40 µg/l) was more than one order of magnitude less than that observed in moderately exposed workers (from a median of 7.8 µg/l at the end of a work shift to 4.0 µg/l 24 h after the last exposure), consistent with changes in Cr-U (from 0.2 to 0.6 µg/g creatinine in this study and from 9.0 µg/g creatinine at the end of a work shift to 5.6 µg/g creatinine 24 h after the last exposure in Caglieri et al. 2006), Cr in EBC can be considered a sensitive biomarker of local exposure. Finally, it was also confirmed by Murgia et al. 2006, who found that in exposed workers, the Cr levels in induced sputum were very similar to Cr-EBC levels reported by Caglieri et al. 2006.

Differences in Cr-EBC before and after the intervention cannot be related to changes in expiratory flow. In fact, EBC volume, which has been demonstrated to reflect overall subject ventilation (McCafferty et al. 2004), was unchanged by intervention.

It is known that occupationally exposed workers with or without lung cancer have higher pulmonary tissue Cr levels than controls (Tsuneta et al. 1980; Ishikawa et al. 1994; Raithel et al. 1993). The present study shows for the first time a correlation between EBC and pulmonary tissue Cr levels in subjects who had not been occupationally exposed to Cr, thus suggesting that EBC Cr levels can be considered representative of local exposure at target organ level.

On the other hand, Cr-EBC did not significantly correlate with Cr-U either before or after tumour resection; moreover, pre-surgery Cr-U did not significantly correlate with tissue Cr. Although all of these correlations need validation in a larger number of subjects, they suggest that EBC and urine Cr levels provide parallel, but different, information, probably because of the relatively slow kinetics of Cr in possible exposure routes other than inhalation or pulmonary contamination. In the case of the study, the contamination sources were probably not only in contact with pulmonary tissue but also with blood. On the basis of our results, it is likely that increased EBC Cr levels are more representative of pulmonary tissue contamination, whereas Cr-U could be more representative of blood contamination.

Even though correlation between Cr in tissue and EBC was moderate, these data seem to confirm that the measurement of Cr (and probably other pneumotoxic metals) in EBC can provide additional information to that obtained by traditional biomonitoring even at very low levels of exposure. The relatively low correlation coefficients are justified by the narrow interval of measured values and the associated high intra- and extra-individual variability. Moreover, many authors have reported that pulmonary tissue Cr levels are not uniform in both exposed and unexposed subjects, and that Cr tends to accumulate in the upper lung areas and bronchi (Raithel et al. 1987; Vanoeteren et al. 1986; Ishikawa et al. 1994; Kondo et al. 2003). Although we measured

Cr in three different tissue pieces, this non-uniformity may explain the moderate r and r^2 values in our correlation with Cr-EBC ($r = 0.55$, $r^2 = 0.30$).

Conclusions

Cr in EBC and urine of NSCLC patients not occupationally exposed to Cr were not significantly different from those of non-smoking controls. The slight, but significant, increase in the levels of Cr-EBC after surgical intervention in NSCLC patients adds new information to the sensitivity of Cr-EBC as a biomarker of lung exposure, and thus indirectly validates its use in occupational settings. As already observed in occupationally exposed workers (weak correlation between Cr-U and Cr-EBC), the lack of significant correlation between Cr-U and Cr-EBC seems to confirm that Cr-EBC provides information to that obtained from urinary Cr.

Acknowledgments This study was supported in part by a grant (Ricerca Finalizzata 2003) from the Italian Ministry of Health and in part by a grant R01 HL72323 from the National Heart, Blood and Lung Institute (NHLBI; Bethesda, USA). Its contents are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the NHLBI or National Institutes of Health. All of the authors exclude any competing interest.

References

- Adachi S, Takemoto K, Ohshima S, Shimizu Y, Takahama M (1991) Metal concentrations in lung tissue of subjects suffering from lung cancer. *Int Arch Occup Environ Health* 63:193–197
- Akslen LA, Myking AO, Morkve O, Gulsvik A, Raithel HJ, Schaller KH (1990) Increased content of chromium and nickel in lung tissues from patients with bronchial carcinoma. *Pathol Res Pract* 186:717–722
- Al-Saleh IA, Al-Doush J (1996) Sequential multielement analysis of Cd, Cr, Ni, and Pb in human tissues by inductively coupled plasma spectrometry. *Bull Environ Contam Toxicol* 57:511–516
- Apostoli P, Maranelli G, Duca PG, Bavazzano P, Bortoli A, Crucianti A, Elia G, Minoia C, Piccinini R, Sabbioni E, Sciarra G, Soave C (1997) Reference values of urinary chromium in Italy. *Int Arch Occup Environ Health* 70:173–179
- ATSDR (Agency for Toxic Substances, Disease Registry) (2000) Final report of toxicological profile for chromium. NTIS accession no. PB2000-108022, Atlanta
- Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, Andreoli R, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A (2006) The effect of inhaled chromium on different exhaled breath condensate biomarkers among chrome-plating workers. *Environ Health Perspect* 114:542–546
- Chiba M, Masironi R (1992) Toxic and trace elements in tobacco and tobacco smoke. *Bull World Health Org* 70:269–275
- De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zanacchi P (1990) Genotoxicity of chromium compounds. a review. *Mutat Res* 238:99–172
- De Flora S (2000) Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21:533–541
- Gerhardsson L, Nordberg GF (1993) Lung cancer in smelter workers—interactions of metals as indicated by tissue levels. *Scand J Work Environ Health* 19(suppl 1):90–94
- Gibb HJ, Lees PSJ., Pinsky PF, Rooney BC (2000) Lung cancer among workers in chromium chemical production. *Am J Ind Med* 38:115–126
- Goldoni M, Caglieri A, Poli D, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A (2006) Determination of hexavalent chromium in exhaled breath condensate and environmental air among chrome plating workers. *Anal Chim Acta* 562:229–235
- Horvath I, Hunt J, Barnes PJ, et al (2005) Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 26:523–548
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1990) Chromium, nickel and welding. *IARC Monog Eval Carcinog Risks Hum* 49:1–677
- Ishikawa Y, Nakagawa K, Satoh Y, Kitagawa T, Sugano H, Hirano T, Tsuchiya E (1994) “Hot spots” of chromium accumulation at bifurcations of chromate workers. *Cancer Res* 54:2342–2346
- Kalcher K, Kern W, Pietsch R (1993) Cadmium and lead in the smoke of a filter cigarette. *Sci Total Environ* 128:21–35
- Kollmeier H, Seemann JW, Rothe G, Muller KM, Wittig P (1990) Age, sex and region adjusted concentrations of chromium and nickel in lung tissue. *Br J Ind Med* 47:682–687
- Kondo K, Takahashi Y, Ishikawa H, Uchihara H, Hirose Y, Yoshizawa K et al (2003) Microscopic analysis of chromium accumulation in the bronchi and lung of chromate workers. *Cancer* 98:2420–2429
- Kubala-Kukus A, Braziewicz J, Banas D, Majewska U, Gozdz S, Urbaniak A (1999) Trace element load in cancer and normal lung tissue. *Nucl Instrum Methods Phys Res B* 150:193–199
- McCafferty JB, Bradshaw TA, Tate S, Greening AP, Innes JA (2004) Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations. *Thorax* 59:694–698
- Minoia C, Apostoli P, Maranelli G, Baldi C, Pozzoli L, Capodaglio E (1988) Urinary chromium levels in subjects living in two north Italy regions. *Sci Total Environ* 71:527–531
- Murgia N, Muzi G, Dell’Omo M, Montuschi P, Melchiorri D, Ciabattini G, Abbritti EP, Orazi N, Sapia IE, Abbritti G (2006) Induced sputum, exhaled breath condensate and nasal lavage fluid in electroplating workers exposed to chromium. *Int J Immunopathol Pharmacol* 19(4 Suppl):67–71
- Mutti A, Corradi M, Goldoni M, Vettori MV, Bernard A, Apostoli P (2006) Exhaled metallic elements and serum pneumoproteins in asymptomatic smokers and patients with COPD and asthma. *Chest* 129:1288–1297
- Paakko P, Kokkonen P, Anttila S, Kalliomaki PL (1989) Cadmium and chromium as markers of smoking in human lung tissue. *Environ Res* 49:197–207
- Park RM, Bena JF, Stayner LT, Smith LJ, Gibb HJ, Lees PS (2004) Hexavalent chromium and lung cancer in the chromate industry: a quantitative risk assessment. *Risk Anal* 24:1099–1108
- Rahman I, Kelly F (2003) Biomarkers in breath condensate: a promising new non-invasive technique in free radical research. *Free Radic Res* 37:1253–1266
- Raithel HJ, Ebner G, Schaller KH, Schellmann B, Valentin H (1987) Problems in establishing norm values for nickel and chromium concentrations in human pulmonary tissue. *Am J Ind Med* 12:55–70
- Raithel HJ, Hennig F, Schaller KH (1989a) Quantitative determination of chromium and nickel in tumour and tumour-free human tissue. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 9:115–126
- Raithel HJ, Schaller KH, Akslen LA, Myking AO, Morkve O, Gulsvik A (1989b) Analyses of chromium and nickel in human pulmonary tissue. Investigations in lung cancer patients and a control population under special consideration of medical expertise aspects. *Int Arch Occup Environ Health* 61:507–512

- Raithel HJ, Schaller KH, Kraus T, Lehnert G (1993) Biomonitoring of nickel and chromium in human pulmonary tissue. *Int Arch Occup Environ Health* 65(Suppl 1):S197–S200
- Rustemeier K, Stabbert R, Hausmann HJ, Roemer E, Carmines EL (2002) Evaluation of potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 2: Chemical composition of mainstream smoke. *Food Chem Toxicol* 40:93–104
- Takemoto K, Kawai H, Kuwahara T, Nishima M, Adachi S (1991) Metal concentrations in human lung tissue, with special reference to age, sex, cause of death emphysema and contamination of lung tissue. *Int Arch Occup Environ Health* 62:579–586
- Tsuneta Y, Ohsaki Y, Kimura K, Mikami H, Abe S, Murao M (1980) Chromium content of lungs of chromate workers with lung cancer. *Thorax* 35:294–297
- Vanoeteren C, Cornelis R, Versieck J (1986) Evaluation of trace elements in human lung tissue. I. Concentration and distribution. *Sci Total Environ* 54:217–230
- Wagner KA, Mc Daniel R, Self D (2001) Collection and preparation of sidestream cigarette smoke for trace elemental determinations by graphite furnace atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. *J AOAC Int* 84:1934–1940

Allegato IV

CHEST[®]

Official publication of the American College of Chest Physicians



Exhaled Metallic Elements and Serum Pneumoproteins in Asymptomatic Smokers and Patients With COPD or Asthma

Antonio Mutti, Massimo Corradi, Matteo Goldoni, Maria Vittoria Vettori,
Alfred Bernard and Pietro Apostoli

Chest 2006;129:1288-1297
DOI 10.1378/chest.129.5.1288

The online version of this article, along with updated information
and services can be found online on the World Wide Web at:

<http://chestjournals.org/cgi/content/abstract/129/5/1288>

CHEST is the official journal of the American College of Chest Physicians. It has been published monthly since 1935. Copyright 2007 by the American College of Chest Physicians, 3300 Dundee Road, Northbrook IL 60062. All rights reserved. No part of this article or PDF may be reproduced or distributed without the prior written permission of the copyright holder (<http://www.chestjournal.org/misc/reprints.shtml>). ISSN: 0012-3692.

A M E R I C A N C O L L E G E O F



P H Y S I C I A N S[®]



Exhaled Metallic Elements and Serum Pneumoproteins in Asymptomatic Smokers and Patients With COPD or Asthma*

Antonio Mutti, MD; Massimo Corradi, MD; Matteo Goldoni, Phys;
Maria Vittoria Vettori, PhD; Alfred Bernard, PhD; and Pietro Apostoli, MD

Study objectives: The aim of this study was to characterize the elemental composition of exhaled breath condensate (EBC) in order to identify new biomarkers of exposure and susceptibility in COPD patients. Serum pneumoproteins were used as lung-specific biomarkers of effect.

Design: EBC was obtained from 50 healthy subjects, 30 healthy smokers, 30 asthmatics, and 50 patients with stable COPD, and was collected by cooling exhaled air. Trace elements and toxic metals in the samples were measured by means of inductively coupled plasma-mass spectrometry and electrothermal atomic absorption spectroscopy. The serum pneumoproteins were immunoassayed.

Results: The EBC of COPD subjects had higher levels of such toxic elements as lead, cadmium, and aluminum, and lower levels of iron and copper, than that of the nonsmoking control subjects. There were no between-group differences in surfactant protein (SP)-A and SP-B levels. Clara-cell protein and SP-D levels were negatively and positively influenced, respectively, by tobacco smoke.

Conclusions: Our results show that toxic metals and transition elements are detectable in the EBC of studied subjects. We propose new biomarkers of exposure as a means of assessing the target tissue dose of carcinogenic and pneumotoxic substances from tobacco smoke or polluted workplaces, and the use of the transition elements involved in redox systems of oxidative stress as disease biomarkers associated with effect or susceptibility. Together with biomarkers of effect, such as serum pneumoproteins, the elemental composition of EBC may be clinically useful in distinguishing similar diseases. (CHEST 2006; 129:1288–1297)

Key words: COPD; exhaled breath condensate; metals; pneumoproteins; trace elements

Abbreviations: ANOVA = analysis of variance; CC16 = Clara-cell secretory protein; EBC = exhaled breath condensate; ETAAS = electrothermal atomic absorption spectroscopy; ICP-MS = inductively coupled plasma-mass spectrometry; LOD = limit of detection; PM = particulate matter; SOD = superoxide dismutase; SP = surfactant protein

COPD is one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide, and represents a substantial economic burden on global health.¹ It is characterized by small airways disease, mucus hypersecretion, and chronic bronchitis, which lead to an obstructed airflow that impairs ventilatory capacity and gas exchange, and causes shortness of breath.¹

Various instruments have been developed for diagnosing, monitoring, and evaluating COPD. Lung function tests offer insights into changes in airway caliber, exhaled air flow, lung volumes, and gas exchange,² and imaging techniques (especially high-resolution CT) offer insight into the loss of lung

tissue³; both provide indirect measurements of the adverse effects occurring in a biological system as a consequence of exposure to toxic or noxious agents. More direct evaluation of biological lung events can be obtained using more or less invasive measurements (bronchoscopy, induced sputum). These have improved our understanding of the biological processes occurring in lung diseases and still represent the “gold standard” for evaluating the diseases themselves,⁴ but their applicability is limited mainly because the invasiveness of the sampling procedures makes them unsuitable for routine clinical use.

Modern research relies on biomarkers, which are

defined as any substance, structure, or process that can be measured in the body or its products, and which influence or predict the incidence of outcome or disease.⁵ Biomarkers of lung diseases can be developed on the basis of exhaled air and blood analyses.

The analysis of exhaled air is feasible and noninvasive.⁶ Exhaled breath condensate (EBC) obtained by cooling exhaled air under conditions of spontaneous breathing is a promising biological fluid that could provide a real-time assessment of pulmonary pathobiology. It can be easily and noninvasively collected from patients of any age using portable devices in an outpatient setting or even at home. EBC is particularly suitable for the sequential and longitudinal sampling of the lower respiratory tract, and published data on inflammation mediators suggest that it reflects the abnormalities noted in bronchoscopic specimens.⁷ Despite the enthusiasm of a few research groups, there is skepticism concerning the diagnostic and monitoring validity of EBC because of the analytical problems associated with measuring trace amounts of unstable and nonspecific mediators, which mainly relies on immunochemistry techniques that lack reference methods and materials, and are affected by their poor sensitivity, specificity, and selectivity.⁸

As EBC mainly consists of water that is practically free of potentially interfering solutes, it is an ideal biological fluid for elemental determinations based on relatively common techniques, such as electrothermal atomic absorption spectroscopy (ETAAS), or less frequently available reference instruments such as inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS).

The aim of this study was to investigate the elemental composition of EBC in order to identify

new biomarkers of exposure, or susceptibility, in COPD patients. The working hypothesis was that long-term exposure to tobacco smoke (which may cause the development of COPD) leads to an increased lung uptake of toxic metals that, because of their stability, can also be used as tracers of environmental pollution. Likewise, hard metals in occupationally exposed workers⁹ and toxic metals (such as lead, cadmium, chromium, nickel, and aluminum) should provide a quantitative estimate of target tissue burden.

EBC was also used to quantify essential elements as biomarkers of susceptibility, which have been defined as "indicators of an inherited or acquired limitation of an organism's ability to respond to the challenge of exposure to a xenobiotic substance."⁵ Individual detoxifying capacity modulates the lung response to inhaled pneumotoxic substances, and there is considerable variability in individual responses to toxic substances. A growing body of evidence indicates that many transition elements play important roles in biological processes by activating or inhibiting enzymatic reactions, by competing with other elements and metalloproteins for binding sites, or by affecting the permeability of cell membranes.

The possible biomarkers of susceptibility were investigated bearing in mind that some transition elements play a fundamental role in the respiratory chain (iron), or are components of mitochondrial (manganese) or cytoplasmic (copper, zinc) superoxide dismutases (SODs), or glutathione peroxidase (selenium). Given their key roles in the generation and detoxification of reactive oxygen species, and the scavenging of free radicals, transition elements modulate the response to toxic substances,¹⁰ thus possibly accounting for the limited proportion (15 to 20%) of smokers acquiring COPD. Biomarkers of susceptibility may be useful in identifying and counseling people at increased risk of disease when exposed to tobacco smoke or environmental pollutants.

Finally, we analyzed serum pneumoproteins (Clara-cell secretory protein [CC16]), and three surfactant proteins (SPs), SP-A, SP-B, and SP-D, which were used as a complementary approach to develop biomarkers of effect suitable for the long-term monitoring of COPD patients. As these proteins are mainly (if not exclusively) secreted within the respiratory tract, their occurrence in the vascular compartment can only be explained by assuming their leakage from the lung into the bloodstream. Excluding changes in renal function, their serum concentrations can be expected to reflect their rate of synthesis and the permeability of the lung epithelium.¹¹

*From the Laboratory of Industrial Toxicology (Dr. Mutti), Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences, University of Parma, Parma, Italy; National Institute of Occupational Safety and Prevention (Drs. Corradi and Vettori, and Mr. Goldoni), Research Centre at the University of Parma, Parma, Italy; Unit of Toxicology (Dr. Bernard), Catholic University of Louvain, Brussels, Belgium; and Laboratory of Industrial Hygiene (Dr. Apostoli), Department of Experimental and Applied Medicine, University of Brescia, Brescia, Italy.

This study was supported by National Heart, Blood, and Lung Institute grant R01 HL72323. The contents of this article are solely the responsibility of the authors, and do not necessarily represent the official views of the National Heart, Blood, and Lung Institute or the National Institutes of Health.

Manuscript received August 14, 2005; revision accepted November 4, 2005.

Reproduction of this article is prohibited without written permission from the American College of Chest Physicians (www.chestjournal.org/misc/reprints.shtml).

Correspondence to: Antonio Mutti, MD, Laboratory of Industrial Toxicology, Department of Clinical Medicine, Nephrology, and Health Sciences, University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy; e-mail: antonio.mutti@unipr.it

MATERIALS AND METHODS

Subject Characteristics

The characteristics of the study subjects are shown in Table 1. The sample size required to obtain a sufficient power was calculated taking into account the mean values and SDs of EBC elements in control subjects, and assuming that a 100% increase or 50% decrease in comparison with the central tendency of the controls might reflect biologically relevant processes. All of the COPD patients met the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease¹ diagnostic criteria: history of cough and sputum production for > 2 consecutive years and for most days in a consecutive 3-month period, as well as fixed airflow obstruction, which was defined as a postbronchodilator FEV₁/FVC ratio < 70%, and a postbronchodilator reversibility of FEV₁ of < 12% measured at baseline and after the inhalation of a β_2 -agonist (salbutamol, 400 μ g, via a metered-dose inhaler).

Asthma was diagnosed according to the National Institutes of Health guidelines¹² as a \geq 12% increase in FEV₁ in response to a bronchodilator. None of the COPD or asthma patients were receiving oral corticosteroids, and none reported any worsening in their symptoms (exacerbation) during at least the 4 weeks preceding EBC collection.

The other study subjects were control smokers and nonsmokers with normal spirometry results and no significant history of respiratory diseases. Tobacco smoke exposure was evaluated in terms of self-reported current smoking status, the number of cigarettes smoked per day, the number of years of tobacco smoking, and (in ex-smokers) the number of years since stopping. Ex-smokers were defined as those who had stopped smoking at least 1 year before the test (mean, 12.7 years; SEM, 2.3 years). In order to avoid possible confounding factors, subjects using drugs such as salicylates, trace element-containing supplements, and patients with concomitant renal, hepatic, cardiac, immunologic, or inflammatory diseases or cancer were excluded.

The study was conducted in conformity with the Declaration of Helsinki and was approved by the Ethics Committee of the University of Parma. All of the patients gave informed written consent.

EBC Collection and Analysis

EBC was collected using a portable condenser (TURBO-DECCS; ItalChill; Parma, Italy) specifically designed to collect EBC in clinical and working settings (TURBO-DECCS is the acronym of "transportable unit for research on biomarkers obtained from disposable exhaled condensate collection systems"), and whose validity has recently been shown.¹³ The

condenser has a refrigerating system that thermostatically controls the working temperature, and a disposable respiratory system consisting of a mouthpiece connected to a one-way aspiration valve and (through a tube with a special stopper) an EBC collection test tube at the end. On the basis of preliminary data, we chose a condensation temperature of -5°C .¹³ The concentrations of all residual elements on the condenser walls were below the limit of detection (LOD).

The subjects were asked to breathe tidally through the mouthpiece for 15 min while sitting comfortably in the laboratory. They were instructed to form a complete seal around the mouthpiece with their mouths, which had to be kept dry by periodically swallowing excess saliva; they were also asked to rinse their mouths thoroughly before the maneuver and every 5 min during the test. In preliminary experiments, we observed that the mouth-rinsing maneuver did not influence the elemental composition of EBC.

Salivary contamination was excluded by means of the colorimetric detection of α -amylase (Infinity Amylase Reagent; Sigma; Milan, Italy), whose LOD is approximately 1/5,000 to 1/10,000 of the activity measured in saliva. However, as stated in the recent European Respiratory Society/American Thoracic Society task force report,¹⁴ it is not very useful to measure EBC amylase without also measuring the salivary concentration of the studied biomarkers. In order to address this issue further, we measured the concentrations of the selected metals in the saliva and EBC of 15 healthy subjects, and calculated their saliva/EBC ratio, whose maximum was as follows: nickel: 7 times; lead, 12 times; cadmium, 15 times; copper, 45 times; manganese, 140 times; aluminum, 285 times; and iron, 700 times. A dilution factor of 5,000 (the worst case in terms of sensitivity of the amylase kit) would imply a maximum of approximately 14% of salivary iron in EBC and a proportion even lower for the other elements, thus not enough to justify the differences we observed between groups and intersubject variability. Therefore, the amylase kit was adequate to rule out salivary contamination, at least for the selected biomarkers we measured. Furthermore, we observed that the elemental pattern in saliva and in EBC is significantly different from each other (data not shown), thus making the salivary contamination of EBC negligible. However, according to American Thoracic Society/European Respiratory Society guidelines,¹⁴ further studies are in progress to develop an alternative and more sensitive test than amylase one. Contamination due to ambient air was also excluded; in fact, when outpatients' room ambient air was passed through cooled condensers for 120 min, the concentration of elements was below the LOD.

The EBC samples were transported in dry ice to the laboratory and stored at -80°C until analysis. Their elemental composition was determined by means of ETAAS or ICP-MS, as appropriate

Table 1—Characteristics of Study Subjects*

| Characteristics | COPD | Asthma | Smokers | Control |
|-----------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|
| Subjects | 50 | 30 | 30 | 50 |
| Female gender | 14 | 19 | 10 | 12 |
| Age, yr | 65.6 (2.1) | 44.6 (2.7) | 43.6 (1.8) | 54.9 (2.1) |
| Smokers/ex-smokers/nonsmokers | 16/28/6 | 0/4/26 | 30/0/0 | 0/6/44 |
| Pack/yr for smokers | 28.9 (4.3) | 0 | 17.7 (2.3) | 0 |
| FVC, L | 4.5 (1.6) | 3.8 (0.2) | 4.5 (0.1) | 4.6 (0.1) |
| FVC, % of predicted | 83.3 (4.4) | 104.3 (3.1) | 109.5 (2.2) | 111.8 (2.2) |
| FEV ₁ , L | 1.7 (0.1) | 2.9 (0.2) | 3.5 (0.1) | 3.7 (0.1) |
| FEV ₁ , % of predicted | 60.3 (3.8) | 94.1 (3.5) | 103.6 (2) | 106.1 (0.9) |
| FEV ₁ /FVC | 0.5 (0.2) | 0.75 (0.01) | 0.8 (0.08) | 0.77 (0.8) |

*Data are presented as mean (SEM) or No.

in terms of analytical reliability. Both the ICP-MS (ELAN 5000; Perkin Elmer; Wellesley, MA) and Zeeman ETAAS (SpectrAA 220Z; Varian; Palo Alto, CA) analyses were made using the external calibration method^{15,16} and reference material 1643 from the National Institute of Standards and Technology (Gaithersburg, MD) for the assessment of analytical accuracy.

The data concerning the validity of ETAAS and ICP-MS methods in measuring some toxic elements (cobalt and tungsten) in EBC samples have been previously published.⁹ We further controlled the analytical validity of other elemental determinations in EBC in order to obtain accurate and reliable results: briefly, as observed for cobalt and tungsten, an agreement between data obtained with two techniques relying on different principles (optical and mass-spectrometric techniques) was observed, thus strongly supporting the validity of analytical results.

Of the 33 elements determined, only those with measurable levels in > 50% of the samples from COPD or control subjects are reported. The LOD for selenium and aluminum by ICP-MS was 0.01 µg/L (calculated as 3 SDs of the blank), the limit of quantification being approximately 0.03 µg/L; the sensitivity for the other elements was even higher (LOD and limit of quantification values of 0.005 µg/L and 0.015 µg/L, respectively). The coefficients of variation for the measurements of standard samples (5 µg/L and 0.5 µg/L) in water and in a pool of EBC were < 10% (higher concentration) and 20% (lower concentration) for all intraday and interday determinations.

Serum Analysis

CC16 concentration was determined by means of a latex immunoassay using rabbit anti-Clara cell antibody (Dakopatts; Glostrup, Denmark) and CC16 purified in our laboratory as standards,¹⁷ with all of the samples being run in duplicate at two different dilutions. This assay has validated against a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay,¹⁸ and the between-run and within-run coefficients of variation range from 5 to 10%. The serum concentrations of SP-A and SP-B were determined by enzyme-linked immunosorbent assay,¹⁹ and that of SP-D was measured by SP-D enzyme immunoassay.²⁰

Statistics

The statistical analysis was performed using statistical software (Prism 4; GraphPad; San Diego, CA; and SPSS 13.0; SPSS; Chicago, IL). The Gaussian nature of the data distribution was assessed using Kolmogorov-Smirnov test. The between-group comparisons were made by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test in the case of a normal or log-normal distribution, or by means of the Kruskal-Wallis test followed by Dunn test in the case of nonnormally distributed variables. Depending on the data distribution, the correlations between the variables were assessed using Pearson or Spearman tests. The significance level for all of the tests was $p = 0.05$ (two sided). Finally, a parametric multivariate ANOVA of the log-transformed data, reinforced by a nonparametric ANOVA (<http://www.folk.uio.no/ohammer/past/index.html>), was performed to test the overall significance of the differences between groups and the role of age as a possible covariate.

RESULTS

Biomarkers of Exposure

The toxic metals (lead, cadmium, nickel, aluminum) found in the EBC samples are shown in Figure

1. The COPD patients had higher levels of lead, cadmium, and aluminum than the nonsmoking control subjects. Interestingly, only nickel levels were higher in the asthmatics than in the smokers. The control smokers had higher lead and cadmium levels than the control nonsmokers. When the COPD patients were subdivided into smokers vs ex-smokers and nonsmokers, the former had higher lead, cadmium, and aluminum levels, whereas there was no difference in nickel levels (Fig 2).

The cadmium levels in the COPD patients positively correlated with smoking history (pack-years) [$r = 0.5$; $p = 0.001$; data not shown]. No correlations were observed between spirometric values and EBC toxic metal concentrations.

Biomarkers of Susceptibility

Figure 3 shows the iron, selenium, copper, and manganese levels in the EBC samples. The COPD patients had lower iron and copper levels than the control nonsmokers. There were no between-group differences in manganese and selenium levels. No differences were observed in the levels of transition elements when the COPD patients were subclassified into smokers vs ex-smokers and nonsmokers (data not shown). The copper levels in the COPD patients positively correlated with their FEV₁ values (Fig 4).

Biomarkers of Effect

The data concerning serum pneumoprotein levels are shown in Figure 5. CC16 levels were lower in the current smokers than in the healthy nonsmoking control subjects and COPD patients. There were no between-group differences in SP-A and SP-B levels, but SP-D levels were higher in the control smokers than in the control nonsmokers and asthmatics. The COPD patients had higher SP-D levels than the asthmatics and control smokers. When the COPD patients were subclassified on the basis of their smoking habits, CC16 levels were lower in the smokers than in the ex-smokers or nonsmokers ($p = 0.005$); there were no differences in SP-D levels. The control smokers showed a negative correlation between serum CC16 levels and the number of cigarettes per day, whereas in the COPD ex-smokers, they positively correlated with the number of years since stopping smoking. Serum SP-D levels in the COPD patients positively correlated with their smoking history (cigarette smoking, $r = 0.4$, $p = 0.003$; pack-years, $r = 0.4$, $p = 0.04$). Serum CC16 levels negatively correlated with the EBC concentrations of lead ($r = -0.2$, $p = 0.02$) and cadmium ($r = -0.2$, $p = 0.04$).

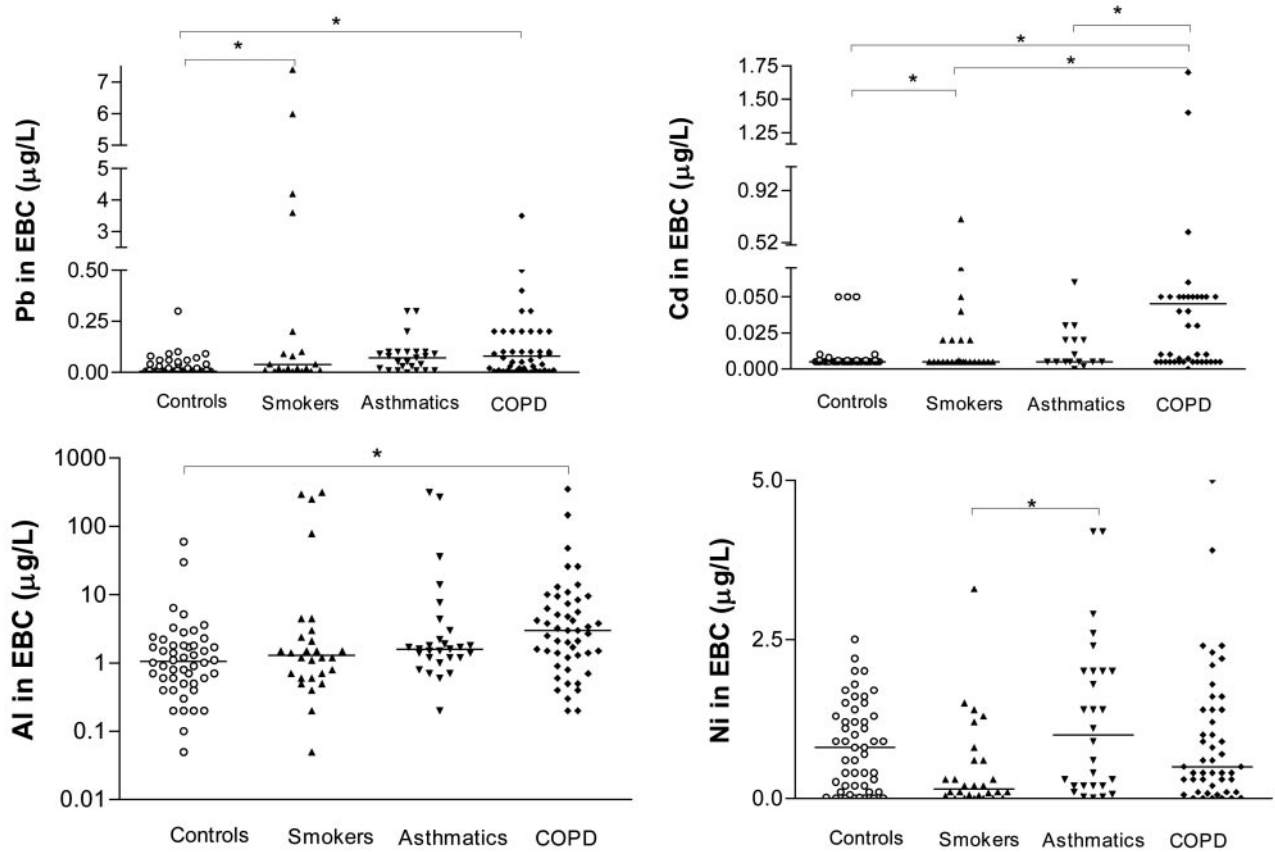


FIGURE 1. Lead, cadmium, aluminum (expressed in \log_{10} scale), and nickel levels in the EBC of the studied groups. Between-group differences were sought using the Kruskal-Wallis test ($p < 0.0001$), followed by Dunn multiple comparison test (* $p < 0.05$). The horizontal lines represent median values.

DISCUSSION

The results of this study show that toxic metals and transition elements are detectable in the EBC of healthy and nonsmoking control subjects, and COPD patients. Together with biomarkers of effect, such as pneumoproteins, the metal composition of EBC could be clinically useful in distinguishing potentially overlapping diseases. Elemental analysis could also provide mechanistic insights that may be useful in setting up preventive and possibly curative interventions.

To the best of our knowledge, this is the first report concerning the metal composition of the EBC of COPD patients, and so our results cannot be compared with previous findings. Although a comparison between EBC and BAL fluid element levels would be very interesting, it may be difficult because some authors²¹ have measured BAL element levels per number of cells. Romeo et al²² reported BAL metal concentrations in micrograms per liter, and it is interesting to note that these were of the same order of magnitude of those measured by us (apart from iron, whose intracellular concentrations may affect the data).

It is also difficult to compare published serum elemental composition²³ with EBC data because the first is representative of the entire body rather than lung burden. EBC elemental analysis is a novel approach that reflects specific pulmonary levels of pneumotoxic or essential transition elements, and can be considered a significant advance in lung physiology in comparison with the analysis of alternative media (BAL fluid, blood, serum, urine, hair), which are not as reliable because of the presence of interfering substances in the complex matrix.

The source of the elements found in EBC is the first obvious question we tried to answer. Any possible release from plastics or contamination during EBC collection was excluded in repeated experiments (not shown) involving the extensive washing of each component of the cooling circuit. Furthermore, any relevant contribution to the exhaled metals from the upper airways was ruled out by the fact that the metal levels in EBC collected from the mouth are of the same order of magnitude as those obtained in EBC below the glottides of intubated subjects (data not shown).

In relation to the biomarkers of exposure, cad-

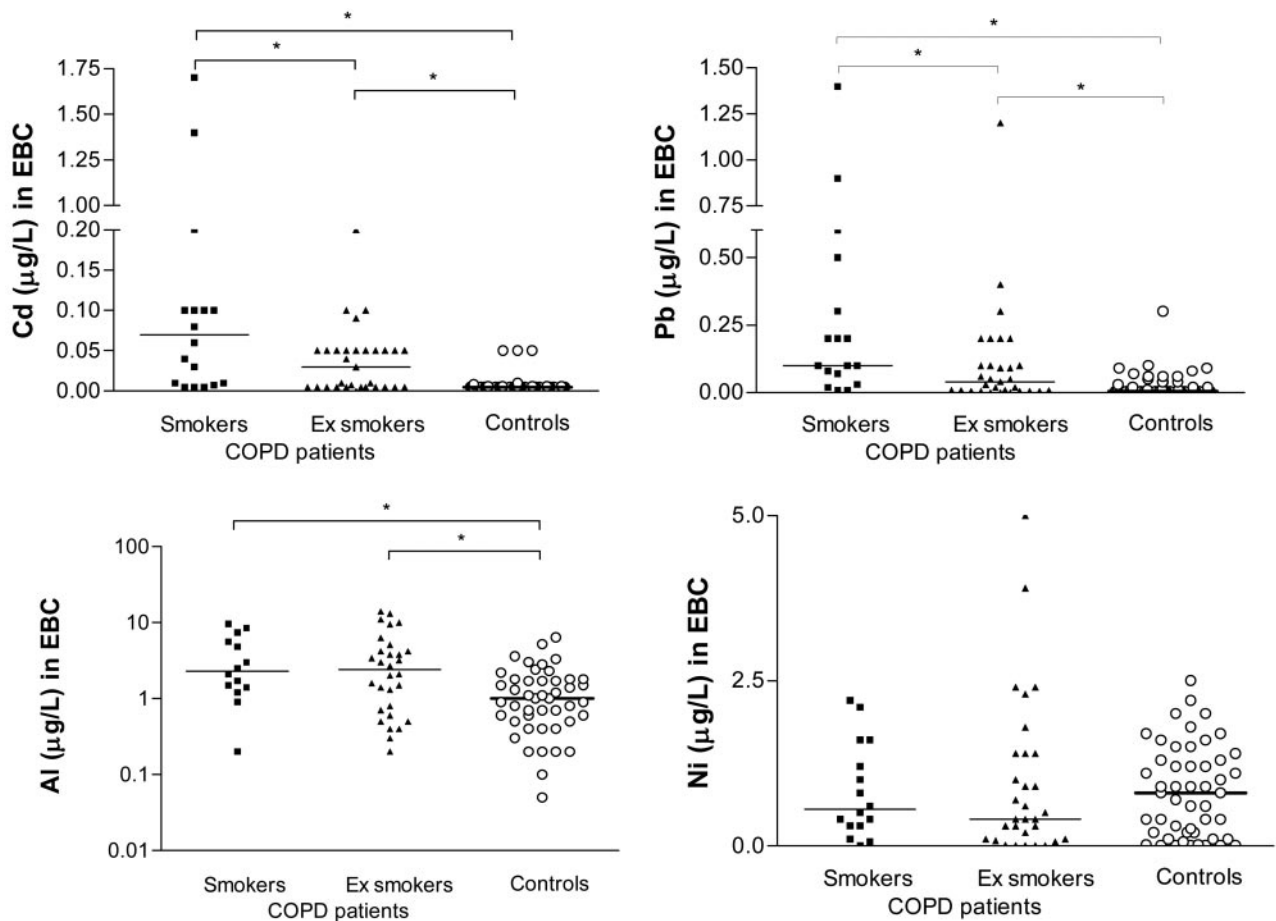


FIGURE 2. Lead, cadmium, aluminum (expressed in \log_{10} scale), and nickel levels in the EBC of COPD patients (smokers vs ex-smokers and nonsmokers) and control subjects (* $p < 0.05$, Mann-Whitney U test). The horizontal lines represent median values.

mium, lead, and aluminum levels were higher in the EBC of our COPD patients than in the control subjects. Given that these toxic metals are all contained in tobacco smoke,^{24,25} EBC metal levels could be biomarkers of current tobacco smoking (like exhaled carbon monoxide, urinary cotinine), but there were still differences between the COPD patients and control subjects when the former were classified into smokers and ex-smokers or nonsmokers. This means that exhaled metal levels may also provide a measure of cumulative long-term exposure to tobacco smoke and environmental exposure to toxic metals.

When the COPD patients were classified on the basis of disease severity (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease guidelines), we did not find any differences among subgroups (multivariate analysis) in EBC levels of toxic metals; however, the present study was not powered enough to address this issue. Further studies are therefore warranted to evaluate whether the levels of toxic

elements in EBC change depending on the severity of the underlying chest disease.

Exhaled metals are not just a means of assessing exposure to tobacco smoke, but they are also markers of the dose because of their inherent lung toxicity. For example, it is known that cadmium exposure leads to the development of emphysema,²⁶ and *in vitro* evidence suggests that cadmium may play an important role in the pathogenesis of the emphysema associated with the long-term inhalation of cadmium fumes by inhibiting the production of connective tissue proteins.²⁷ It is interesting to note that, in a representative US population, higher urinary cadmium levels were found to be significant predictors of lower FVC, FEV₁, and FEV₁/FVC values in current and former smokers, but not in never-smokers.²⁸

Although there is no clear evidence of a relationship between lead exposure and the development of COPD, lead may play a pathogenetic role because of its high affinity for sulfhydryl groups, which may

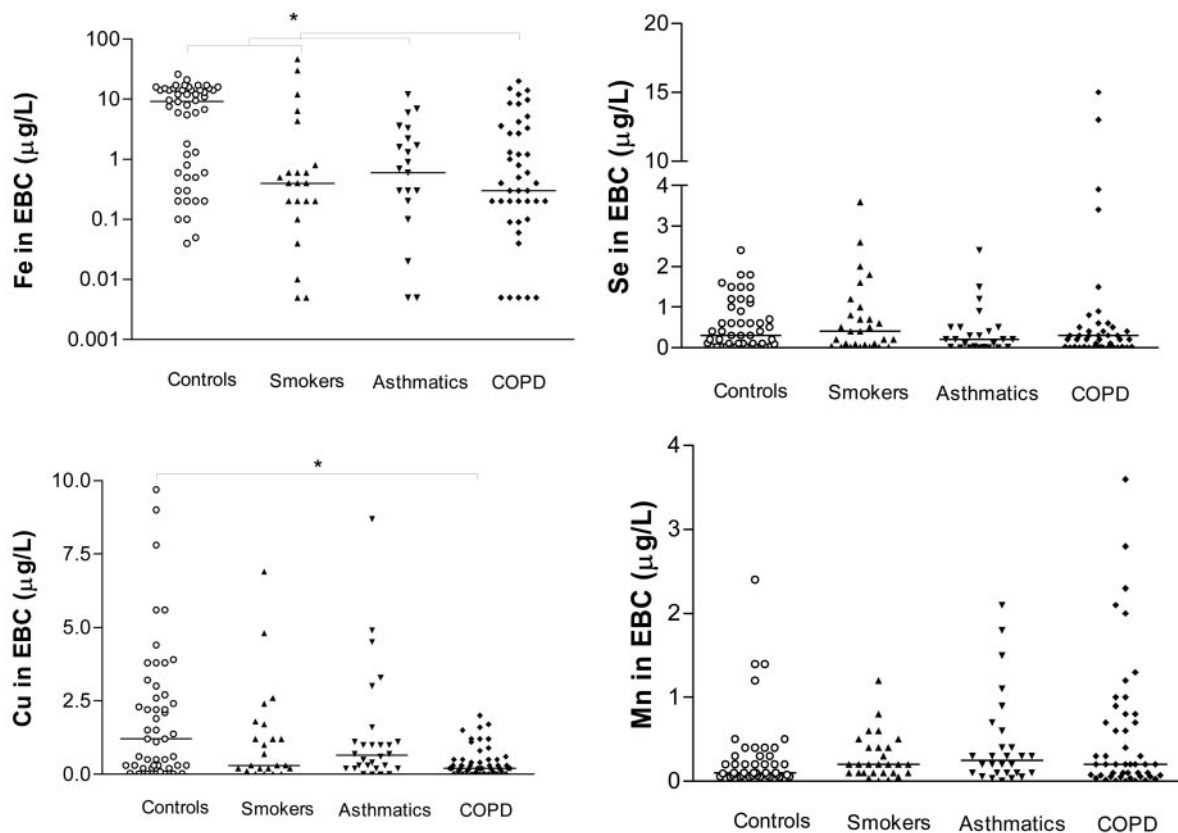


FIGURE 3. Iron (expressed in \log_{10} scale), selenium, copper, and manganese levels in the EBC of the studied groups. Between-group differences in iron and copper were sought using the Kruskal-Wallis test ($p < 0.0001$), followed by Dunn multiple comparison test ($*p < 0.05$); one-way analysis of variance was used for selenium and manganese. The horizontal lines represent the median values of iron and copper, and the mean values of selenium and manganese.

cause glutathione depletion and thus reduce its scavenging potential. It is worth noting that the study of transition metals in exhaled air may also help to assess the toxic lung effects of particulate air pollu-

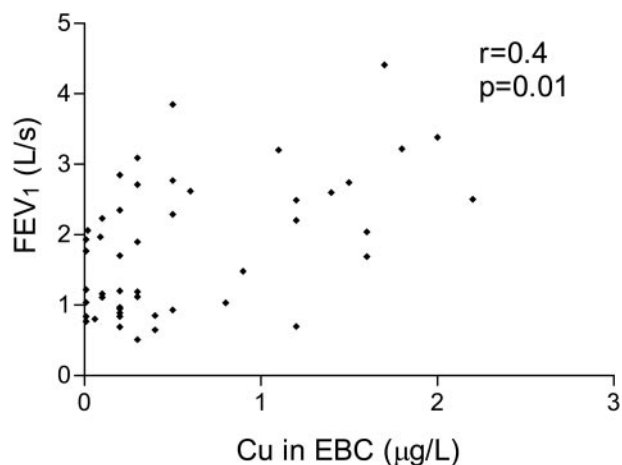


FIGURE 4. Spearman correlations between EBC copper levels and FEV₁ in COPD patients.

tion (*ie*, particulate matter [PM] up to 10 μm in diameter, and PM up to 2.5 μm in diameter) because transition elements may modulate the toxic effects of PM up to 10 μm in diameter by means of oxidative stress,²⁹ and there is now considerable epidemiologic evidence supporting a relationship between increased levels of particulate air pollution and increased morbidity and mortality due to respiratory diseases.³⁰

Blood or urine levels of toxic metals may reflect their absorption, but exhaled toxic metal analysis may make it possible to assess metal dose at target tissue level. This may give rise to new therapeutic strategies (procedures and/or interventions aimed at altering the levels of trace element and toxic metals, such as the use of detoxifying and metal chelating agents or scavengers) in a disease for which no curative therapies are currently available.^{1,31}

Although the changes in EBC manganese and selenium levels were not statistically significant, our COPD patients had reduced EBC copper and iron levels. This is at least partially in line with a study³² showing a decrease in the levels of various metals

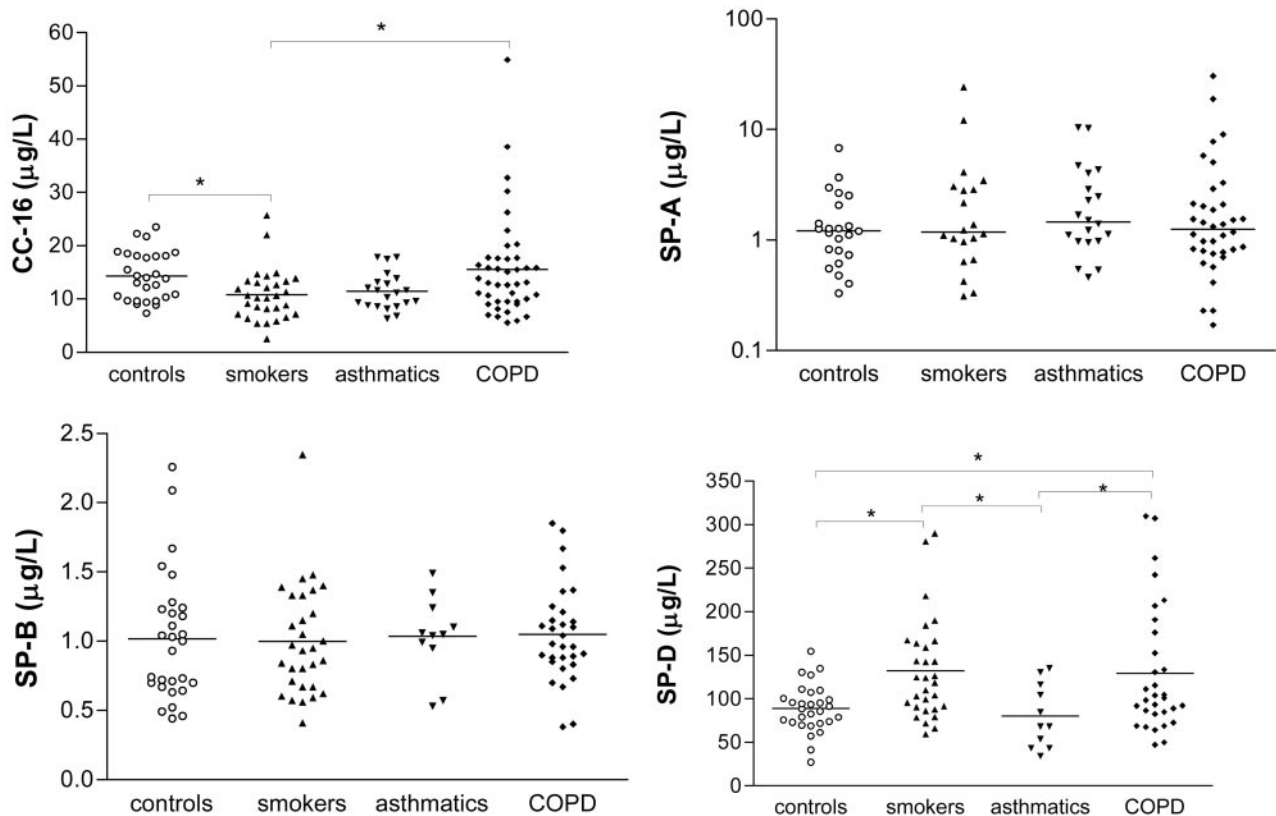


FIGURE 5. Serum CC-16, SP-A (expressed in \log_{10} scale), SP-B, and SP-D levels in the studied groups. Between-group differences in SP-A were sought using the Kruskal-Wallis test; one-way analysis of variance followed by Tukey multiple comparison test were used for CC-16, SP-D ($*p < 0.05$), and SP-B. The horizontal lines represent the median values of SP-A, and the mean values of the other pneumoproteins.

(calcium, manganese, iron, copper, zinc, selenium) in cancerous lung tissue, and thus supports the view that chronic oxidative stress may be associated with the metal depletion involved in the antioxidant responsive element.

EBC copper levels in COPD patients may be of particular interest because of their positive correlation with lung function parameters. Although there are published studies of the expression of SODs in the lung tissue of patients with COPD, and we did not evaluate lung SOD expression, we speculate that low copper levels may be associated with a reduction in SOD expression and activity, which could be due to the direct toxic effects of cigarette smoke or neutrophil-derived free radicals. Numerous studies have investigated whether injected or inhaled SOD enzyme proteins can protect lung tissue against oxidant injury, and a number of classes of synthetic SOD mimetics have been developed and shown to possess significant antioxidant capacity.³³ However, we are aware that the information obtained by means of elemental analysis may be ambiguous, not least because certain transition elements can be essential

or toxic depending on their valence, physical state, and total burden; further work is therefore needed to support our hypothesis and relate the transition elements of biological relevance with the pulmonary proteins that have them as cofactors.

Nonvolatile substances such as elements are mainly expired in small droplets and further diluted with exhaled water vapors.³⁴ It is thought that droplet formation is due to random convective processes and may not be directly related to water vapor production, something that has raised the issue of variable droplet dilution in EBC and given rise to some concerns regarding the interpretation of EBC biomarkers on the basis of their absolute concentration. However, Effros et al³⁴ found that the mean values of three different putative dilution factors (urea, conductivity, and total cation levels) were not significantly different between normal and COPD subjects, and so the differences in mediator concentrations between our study groups may be attributable to differences in respiratory fluid concentrations rather than the number of droplets.

All of the EBC produced for this study was

dedicated to elemental analysis, and so no data are available concerning the exhaled biomarkers of effect and we were unable to detect pneumoproteins in EBC. However, we have further ongoing studies aimed at evaluating whether there is a correlation between elemental levels and biomarkers of effect in COPD.

The few extreme data points that seem to distinguish different groups are unlikely to affect (influence) statistical differences, which have been calculated relying either on nonparametric tests (whose significance depends on ranks rather than on absolute values) or on parametric tests after log-transformation (necessary to obtain a normal distribution of data). In either cases, extreme values do not influence the statistical significance of observed differences.

Our COPD patients were older than the subjects belonging to the other groups. However, age had a significant effect only on EBC iron levels ($F = 19.83$, $p < 0.001$). Differences between groups remained highly significant considering age as a covariate ($F = 20.44$, $p < 0.001$).

Our CC16 data (the negative correlations between serum CC16 levels and smoking history, as well as EBC cadmium and lead levels) confirm that cigarette smoke reduces serum CC16 concentrations.³² The levels of this antiinflammatory protein returned to normal in the COPD patients who had stopped smoking (note the positive correlation between serum CC16 levels and the number of years as an ex-smoker).

There is sufficient published evidence^{35,36} to attribute the decrease in serum CC16 levels in smokers and COPD patients to chronic tobacco-induced damage to Clara cells. When renal function is normal or just slightly impaired (as in the volunteers we selected), serum CC-16 levels are only influenced by the intrapulmonary pool (*eg*, decreased in smokers) and the rate at which CC16 leaks into serum.

No between-group differences were observed in SP-A and SP-B levels, but the SP-D results were interesting. It is particularly interesting to note the different SP-D levels in asthmatics and COPD patients because these may be clinically useful in distinguishing potentially overlapping diseases. Unlike serum CC16 levels, serum SP-D concentrations were higher in both smokers and COPD patients than in normal control subjects. This may be explained on the basis of the role of SP-D in local host defense, and our data are in line with the increased serum SP-D levels reported in patients with various lung diseases.³⁵ However, other plausible hypotheses concerning increased SP-D levels include increased lung epithelium permeability and increased surfactant degradation; although it has been demonstrated

that SP-D is a "collectin" that is also found outside of the lungs and is therefore not an exclusively pulmonary marker.³⁷

We conclude that EBC elemental analysis is a novel noninvasive approach to investigating lung pathobiology that is suitable for identifying the following: (1) the target tissue dose of carcinogenic and pneumotoxic substances from tobacco smoke and polluted workplaces or environments (cadmium, chromium, nickel, lead); and (2) the transition elements (manganese, copper, selenium, iron) involved in oxidative stress as part of redox systems. Together with biomarkers of effect such as serum pneumoproteins, the elemental composition of EBC may be clinically useful in distinguishing overlapping diseases.

REFERENCES

- 1 Pauwels RA, Buist AS, Calverly PMA, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1256–1276
- 2 Pellegrino R, Brusasco V. On the causes of lung hyperinflation during bronchoconstriction. *Eur Respir J* 1997; 10:468–475
- 3 Baldi S, Miniati M, Bellina CR, et al. Relationship between extent of pulmonary emphysema by high resolution computed tomography and lung elastic recoil in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:585–589
- 4 Saetta M, Turato G, Maestrelli P, et al. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1304–1309
- 5 NRC (National Research Council). Biological markers in environmental health research. *Environ Health Perspect* 1987; 74:1–19
- 6 Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled markers of pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163:1693–1722
- 7 Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, et al. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:731–737
- 8 Rahman I, Biswas SK. Non-invasive biomarkers of oxidative stress: reproducibility and methodological issues. *Redox Rep* 2004; 9:125–143
- 9 Goldoni M, Catalani S, De Palma G et al. Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten. *Environ Health Perspect* 2004; 112:1293–1298
- 10 Kondo H, Nakagaki I, Sasaki S, et al. Mechanism of oxidative stress in skeletal muscle atrophied by immobilization. *Am J Physiol* 1993; 265:E839–E844
- 11 Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:646–678
- 12 Revised GINA guidelines 2002: Global initiative for asthma. Bethesda, MD: National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute. NIH publication No. 02–3659 2002
- 13 Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, et al. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm Med* 2005; 5:10
- 14 Horvath I, Hunt J, Barnes PJ. Exhaled breath condensate:

- methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; 26:523–548
- 15 Apostoli P, Morandi C, Menditto A. Multiple determination of elements in human seminal plasma. *J Trace Elem Med Biol* 1998; 11:182–184
 - 16 Apostoli P. Elements in environmental and occupational medicine. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2002; 778:63–97
 - 17 Bernard A, Roels H, Buchet JP, et al. Decrease of serum Clara cell protein in smokers [letter]. *Lancet* 1992; 339:1620
 - 18 Hermans C, Aly O, Nyberg BI, et al. Determinants of Clara cell protein (CC16) concentration in serum: a reassessment with two different immunoassays. *Clin Chim Acta* 1998; 272:101–110
 - 19 Doyle IR, Hermans C, Bernard A, et al. Clearance of Clara cell secretory protein 16 (CC16) and surfactant proteins A and B from blood in acute respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158:1528–1535
 - 20 Nagae H, Takahashi H, Kuroki Y, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay using F(ab')₂ fragment for the detection of human pulmonary surfactant protein D in sera. *Clin Chim Acta* 1997; 266:157–171
 - 21 Maier EA, Rastegar F, Heimbürger R, et al. Simultaneous determination of trace elements in lavage fluids from human bronchial alveoli by energy dispersive x-ray fluorescence: 1. Technique and determination of the normal reference interval. *Clin Chem* 1985; 31:551–555
 - 22 Romeo L, Maranelli G, Malesani F, et al. Tentative reference values for some elements in broncho-alveolar lavage fluid. *Sci Total Environ* 1992; 120:103–110
 - 23 Karadag F, Cildag O, Altinisik M, et al. Trace elements as a component of oxidative stress in COPD. *Respirology* 2004; 9:33–37
 - 24 Chiba M, Masironi R. Toxic and trace elements in tobacco and tobacco smoke. *Bull World Health Org* 1992; 70:269–275
 - 25 Rustemeier K, Stabbert R, Haussmann HJ, et al. Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes: Part 2. Chemical composition of mainstream smoke. *Food Chem Toxicol* 2002; 40:93–104
 - 26 Hendrick DJ. Smoking, cadmium, and emphysema. *Thorax* 2004; 59:184–185
 - 27 Tatrai E, Kovacicova Z, Hudak A, et al. Comparative *in vitro* toxicity of cadmium and lead on redox cycling in type II pneumocytes. *J Appl Toxicol* 2001; 21:479–483
 - 28 Mannino DM, Holguin F, Greves HM, et al. Urinary cadmium levels predict lower lung function in current and former smokers: data from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Thorax* 2004; 59:194–198
 - 29 MacNee W, Donaldson K. Mechanism of lung injury caused by PM₁₀ and ultrafine particles with special reference to COPD. *Eur Respir J* 2003; 21:47–51
 - 30 Pope CA, Dockery DW. Epidemiology of particle effects. In: Holgate ST, Samet JM, Koren HS, et al, eds. *Air pollution and health*. San Diego, CA: Academic Press, 1999; 673–705
 - 31 Bachelet M, Pinot F, Polla RI, et al. Toxicity of cadmium in tobacco smoke: protection by antioxidants and chelating resins. *Free Radic Res* 2002; 36:99–106
 - 32 Kubala-Kukus A, Braziewicz J, Banas D, et al. Trace element load in cancer and normal lung tissue. *Nucl Instrum Methods Phys Res Sect B* 1999; 150:193–199
 - 33 Jiang F, Guo Y, Salvemini D, et al. Superoxide dismutase mimetic M40403 improves endothelial function in apolipoprotein(E)-deficient mice. *Br J Pharmacol* 2003; 139:1127–1134
 - 34 Effros RM, Peterson B, Casaburi R, et al. Epithelial lining fluid solute concentrations in chronic obstructive lung disease patients and normal subjects. *J Appl Physiol* 2005; 99:1286–1292
 - 35 Hermans C, Bernard A. Lung epithelium-specific proteins: characteristics and potential applications as markers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:646–678
 - 36 Hermans C, Dong P, Robin M, et al. Determinants of serum levels of surfactant proteins A and B and Clara cell protein CC16. *Biomarkers* 2003; 8:461–471
 - 37 Leth-Larsen R, Floridon C, Nielsen O, et al. Surfactant protein D in the female genital tract. *Mol Hum Reprod* 2004; 10:149–154

**Exhaled Metallic Elements and Serum Pneumoproteins in
Asymptomatic Smokers and Patients With COPD or Asthma**
Antonio Mutti, Massimo Corradi, Matteo Goldoni, Maria Vittoria Vettori,
Alfred Bernard and Pietro Apostoli
Chest 2006;129;1288-1297
DOI 10.1378/chest.129.5.1288

This information is current as of May 23, 2007

| | |
|---|---|
| Updated Information & Services | Updated information and services, including high-resolution figures, can be found at: http://chestjournals.org/cgi/content/full/129/5/1288 |
| References | This article cites 35 articles, 14 of which you can access for free at: http://chestjournals.org/cgi/content/full/129/5/1288#BIBL |
| Permissions & Licensing | Information about reproducing this article in parts (figures, tables) or in its entirety can be found online at: http://chestjournals.org/misc/reprints.shtml |
| Reprints | Information about ordering reprints can be found online: http://chestjournals.org/misc/reprints.shtml |
| Email alerting service | Receive free email alerts when new articles cite this article sign up in the box at the top right corner of the online article. |
| Images in PowerPoint format | Figures that appear in CHEST articles can be downloaded for teaching purposes in PowerPoint slide format. See any online article figure for directions. |



Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto il Prof. Mutti, il Dr. Corradi ed il Prof. Franchini per l'appoggio e il sostegno in questi tre anni di duro lavoro.

Un particolare ringraziamento ad Andrea, che mi sopporta tutti i giorni.

Un ringraziamento a tutti gli altri miei colleghi ed amici.