

Milano



Comune
di Milano

SETTORE SALUTE,
SICUREZZA E LOGISTICA

PERVENUTO IL 4/4/12

bzevi manu

**Progetto di studio sugli effetti sanitari connessi
all'esposizione a particolato fine e prime
valutazioni rumore per gli Agenti della Polizia
Locale di Milano**

**Attività di studio e ricerca
sulla valutazione del rischio di
esposizione al particolato atmosferico
per gli agenti della Polizia Locale di
Milano**

RELAZIONE FINALE

<i>elaborato:</i> RELAZIONE		<i>codifica:</i> 60320018_00.doc	
		<i>revisione:</i> 00	
<i>data:</i> 23 / 10 / 2008	<i>redatto:</i> Silvia Moroni Simone Casadei Univ. degli Studi di Milano Bicocca	<i>verificato:</i> Silvia Moroni	<i>approvato:</i> Bruno Villavecchia

INDICE

1. INQUADRAMENTO BIBLIOGRAFICO	2
1.1 Concentrazione e composizione chimica del PM	2
1.2 Sorgenti per l'inquinamento atmosferico da PM	3
1.3 Particolato atmosferico di origine secondaria e reattività atmosferica	4
1.4 Condizioni meteorologiche e inquinamento atmosferico da PM	5
1.5 Tossicità del PM	5
2. RACCOLTA DI CAMPIONI SIGNIFICATIVI DI PARTICOLATO ATMOSFERICO IN SITI RITENUTI SIGNIFICATIVI PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE DEL PERSONALE DELLA POLIZIA LOCALE CON RILIEVI NEI PRESSI DI INTERSEZIONI VIARIE (inquinamento Outdoor) E, IN CONTEMPORANEA, IN UFFICI ADIACENTI (inquinamento Indoor).	8
2.1 Siti e periodo di campionamento	8
2.2 Sistemi di campionamento in ambiente Outdoor e Indoor	8
2.3 Risultati del campionamento gravimetrico giornaliero per PM1 e PM2.5 in ambiente Outdoor e Indoor	8
2.4 Risultati con contatore ottico di particelle in ambiente Outdoor e Indoor	12
2.5 Confronto delle concentrazioni misurate negli ambienti Outdoor e Indoor	13
2.6 Campionatori personali	18
3. SPECIAZIONE CHIMICO-FISICA DEI CAMPIONI DI PARTICOLATO FINE ATMOSFERICO RACCOLTI PER L'IDENTIFICAZIONE DEI PROFILI DI COMPOSIZIONE CHIMICA FINALIZZATI ALLA DEFINIZIONE DELLE COMPONENTI DI INTERESSE PER L'IMPATTO SULLA SALUTE	22
4. ANALISI PER LA DETERMINAZIONE IN VITRO DELLA TOSSICITÀ DEL PM2.5 E DEL PM1 SULLA LINEA CELLULARE POLMONARE UMANA DI RIFERIMENTO (A549) FINALIZZATA ALLA DEFINIZIONE DI MARKERS DI TOSSICITÀ E GENOTOSSICITÀ PER L'UOMO	26
4.1 Introduzione	26
4.2 Materiali e metodi	27
4.3 Vitalità cellulare	28
4.4 Stress Ossidativo	29
4.5 Risposte infiammatorie	31
4.6 Genotossicità	33
5. RELAZIONI TRA I PARAMETRI DI TOSSICITÀ INDIVIDUATI E LA COMPOSIZIONE CHIMICA E/O FISICA DEL PARTICOLATO ATMOSFERICO RACCOLTO	36
6. VALUTAZIONE DEL RISCHIO CONNESSO ALL'ESPOSIZIONE AL PARTICOLATO ATMOSFERICO RACCOLTO	37
6.1 Materiali e metodi	38
6.2 Risultati	39
BIBLIOGRAFIA	44

1. INQUADRAMENTO BIBLIOGRAFICO

L'area urbana milanese è stata studiata in modo approfondito in questi ultimi anni con specifici progetti di ricerca. Nel paragrafo che segue si riportano le principali conoscenze attualmente disponibili per l'area, ovvero dati relativi a:

- 1) Concentrazione e composizione chimica del PM per l'area urbana milanese inserita nel contesto regionale e nazionale italiano.
- 2) Sorgenti di PM nell'area urbana milanese e regionale.
- 3) Reattività atmosferica per la formazione di particolato atmosferico di origine secondaria.
- 4) Effetti delle condizioni meteorologiche sull'inquinamento da PM nell'area urbana milanese.
- 5) Tossicità del PM.

1.1 Concentrazione e composizione chimica del PM

Misure di concentrazione di PM10 e PM2.5 urbano milanese sono riportate nel progetto PUMI (progetto PUMI, 2003). Il campionamento del PM10 e PM2.5 è stato eseguito mediante campionamento gravimetrico (sistema di riferimento secondo normativa 99/30/CE): in siti rappresentativi dell'inquinamento di fondo urbano milanese (non influenzati da sorgenti locali) sono state determinate le concentrazioni giornaliere di PM10 e PM2.5 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).

La concentrazione media annua (2002) di PM10 e PM2.5 per l'area urbana milanese è rispettivamente di 67 e 42 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. La concentrazione media annua di PM10 supera largamente il limite previsto dalla normativa di 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (99/30/CE). Il rapporto medio annuo (2002) tra la frazione fine di particolato (PM2.5) e il PM10 è 0.63 indicando come la frazione fine sia prevalente. Le concentrazioni medie annue di PM10 e PM2.5 (campionamento gravimetrico) sono state misurate in diversi siti della Regione Lombardia (Progetto PARFIL). I risultati mostrano come l'area di Milano presenta valori superiori rispetto ai siti di pianura della Regione, che nel loro insieme sono caratterizzati da condizioni di omogeneità per le concentrazioni di PM10 (e ancor più di PM2.5).

I campioni di particolato atmosferico (raccolti con sistema di campionamento gravimetrico) sono caratterizzati chimicamente per la ricostruzione della composizione di massa del PM rispetto alle principali classi di composti. La composizione chimica media annua di PM2.5 e PM10 per l'area urbana milanese è determinata da circa il 40% di carbonio totale (total carbon = TC: 42,8 % per PM2.5 e 44,9 % per PM10), da ioni inorganici di origine secondaria (somma di solfati, SO_4^{2-} ; nitrati, NO_3^- ; ammonio, NH_4^+ : rispettivamente 45,9% e 32,5% per PM2.5 e PM10), da elementi della polvere del suolo (somma di AL, Si, K, Ca, Ti; rispettivamente 1,0 e 7,6% per PM2.5 e PM10), da elementi in traccia da attività antropica (1,2% e 4,2% per PM2.5 e PM10) (progetto PUMI, 2003). Diversi dati sulla composizione chimica del PM per l'area urbana milanese sono presenti in letteratura.

La composizione elementare del PM è stata studiata in modo approfondito: rispetto ai diversi contributi di origine crostale (polvere del suolo) e di origine antropica (traffico e industria) per PM2.5 e PM10 (Marcazzan G., 2001; Bolzacchini E., 2002), in relazione alle variazioni stagionali per PM2.5 e PM10 (Vecchi R., 2004) e alle variazioni giorno-notte in campioni di PM10 (Vecchi R., 2007).

La frazione carboniosa (total carbon =TC) è data da 2 contributi: carbonio organico (organic carbon = OC) e carbonio elementare (elemental carbon =EC). EC rappresenta la frazione carboniosa di tipo grafittica, è un inquinante di origine primaria, emesso nei processi di combustione. OC è costituito da un'ampia classe di composti organici presenti in atmosfera in fase particolata, di origine sia primaria che secondaria. OC ed EC sono stati analizzati in campioni di PM10 invernali per l'area

urbana milanese indicando un contributo percentuale rispetto alla massa totale di PM10 rispettivamente di 29 % e 2.5% (Fermo P., 2006). Il contributo della sorgente primaria e secondaria al carbonio organico (OC) presente nel PM2.5 urbano milanese è stato valutato. Durante la stagione estiva il particolato organico è principalmente di origine secondaria (secondary organic aerosol =SOA): per l'area urbana milanese il SOA rappresenta l'84% del particolato organico in estate (Lonati G., 2007), sottolineando l'importanza dei processi di formazione secondaria del PM.

Il particolato di origine secondaria relativo alla frazione ionica inorganica (solfati, SO_4^{2-} ; nitrati, NO_3^- ; ammonio, NH_4^+) come precedentemente riportato è un contributo importante del particolato atmosferico. Il contributo totale della frazione ionica inorganica di origine secondaria è mediamente costante durante l'anno, ma con diversità stagionali rilevanti per quanto riguarda il contributo relativo di solfati e nitrati, in relazione ai processi di formazione secondaria a partire da precursori gassosi e volatilità (ripartizione fase gassosa/particolata). Il contributo medio % alla massa totale di PM2.5 nell'area urbana milanese per i solfati varia dal 22% per l'estate all'8% per l'inverno. Al contrario i nitrati passano da un 28% invernale a un 4% estivo, in relazione ai processi di volatilizzazione dei nitrati (composti semivolatili) da fase particolata in fase gassosa (Perrone M.G., 2006).

Nella letteratura internazionale è riportato che gli IPA sono tra i principali composti a determinare il potere mutageno del particolato atmosferico urbano (Pedersen, 2005; Hanningan, 1998). Il benzo[a]pirene (BaP) è considerato dalla normativa europea (99/30/CE) come indicatore del rischio cancerogenico per la classe degli IPA nel particolato atmosferico urbano, con un obiettivo di qualità di 1 ng/m^3 per la concentrazione media annua. Gli IPA nel particolato atmosferico urbano milanese sono stati analizzati in campioni di PM2.5 e PM10 giornalieri, e per oltre il 90% risultano essere distribuiti nella frazione fine PM2.5 (progetto PUMI, 2003). L'andamento delle concentrazioni di IPA in fase particolata per l'area urbana milanese presenta un marcato andamento stagionale, con concentrazioni invernali fino a 100 volte maggiori rispetto a quelle estive. La concentrazione di IPA (somma 9 IPA: benzo[a]antracene, crisene, benzo[b]fluorantene, benzo[k]fluorantene, benzo[e]pirene, benzo[a]pirene, dibenzo[a,h]antracene, indeno[1,2,3-c,d]pirene, benzo[g,h,i]terilene) raggiunge valori fino a 70 ng/m^3 in alcuni giorni invernali rispetto ad un tipico valore medio estivo intorno a 1 ng/m^3 (Perrone M.G., 2004). La concentrazione di BaP passa da un valore medio di $0.027 (\pm 0.014) \text{ ng/m}^3$ in estate (luglio 2005) a un valore medio di $3.68 (\pm 2.63) \text{ ng/m}^3$ in inverno (Perrone M.G., 2006).

Considerando il rapporto in peso % del PM, gli IPA (somma 9 IPA) rappresentano circa lo 0.06% del PM2.5 (valore medio annuo): il trend stagionale indica un rapporto in peso % degli IPA nel PM2.5 10 volte maggiore nel periodo invernale rispetto a quello estivo (Perrone M.G., 2004).

Le concentrazioni e la composizione chimica di PM2.5 e PM10 per l'area urbana milanese è stata confrontata con altre realtà urbane del Nord-Centro-Sud Italia (Catania, Taranto, Bari, Firenze, Bologna, Padova, Milano, Trieste) con il progetto SITECOS (Bruno M., 2005). La forte stagionalità del rapporto in peso % di IPA in campioni di PM che si ha per l'area urbana milanese risulta essere meno marcata per le città del Centro Italia (es. Firenze) e non si osserva per le aree urbane del Sud Italia (es. Bari, Catania) (Bolzacchini E., 2007).

1.2 Sorgenti per l'inquinamento atmosferico da PM

La principale sorgente di inquinamento da particolato l'area urbana di Milano risulta essere la sorgente traffico, che rende conto del 69% delle emissioni di PM10 e del 66% delle emissioni di PM2.5 nell'anno 2005 (Inventario delle emissioni del Comune di Milano - AMA, 2007).

La sorgente traffico è stata investigata in modo specifico con misure sperimentali dei fattori di emissione di PM per autoveicoli a diverso livello omologativo, rappresentativi del parco medio effettivamente circolante per l'area urbana milanese (progetto PUMI, 2003). Emissioni elevate di PM10 (mg/km) sono misurate per veicoli EURO I: i veicoli con un più moderno livello di

omologazione (EURO III) presentano fattori di emissione di PM10 oltre 50% inferiori. Le particelle emesse dagli autoveicoli (sia diesel che benzina) hanno dimensioni finissime, sempre inferiori a 1 μm , con moda vicino a 0.1 μm . I fattori di emissione di PM da sorgente traffico sono stati approfonditi per veicoli diesel commerciali leggeri, rappresentativi del traffico di autoveicoli diesel (furgoni) adibiti al trasporto merci nei centri urbani (progetto PARFIL).

In letteratura sono riportati dati relativi all'influenza della sorgente traffico sull'inquinamento da PM nell'area urbana milanese, con riferimento alla composizione chimica del PM e a specifici markers caratteristici della sorgente traffico.

Campioni di PM2.5 e PM1 sono stati raccolti all'interno dell'area urbana milanese in siti con diversa influenza della sorgente traffico, analizzando il contributo della componente carboniosa distinta in carbonio elementare (EC) e carbonio organico (OC), con un rapporto OC/EC di 1.34 per la sorgente traffico (emissione primaria) (Giugliano M., 2005).

Per la composizione elementare di PM10 e PM2.5 Pb, Br e K sono indicati come gruppo rappresentativo delle emissioni autoveicolari (Marcazzan G., 2001).

Markers caratteristici della sorgente traffico sono gli IPA. Campioni di PM2.5 raccolti nell'area urbana milanese con frequenza ogni 4h (00-04; 04-08; 08-12; 12-16; 16-20; 20-24) sono stati caratterizzati chimicamente per le concentrazioni di IPA. I trends sono stati confrontati con i tipici andamenti della sorgente traffico in Milano: il massimo contenuto di IPA nel PM2.5 si ha durante le ore (08-12) in cui si registra il massimo di veicoli pesanti circolanti (Perrone M.G., 2004).

Una sorgente di particolato atmosferico è rappresentata anche dalla parte biogenica. L'influenza di tale sorgente sulle concentrazioni di PM è stata studiata analizzando come markers specifici alcani lineari (da C14 a C32) in campioni di PM10 dell'area urbana milanese. Si osserva che durante i mesi estivi gli alcani di origine vegetale rappresentano circa il 38% del totale degli alcani presenti nel PM10; tale valore è circa 1/3 per i mesi invernali (12%) (progetto PARFIL).

1.3 Particolato atmosferico di origine secondaria e reattività atmosferica

Sulle concentrazioni ambientali di particolato atmosferico influisce fortemente la formazione di particolato secondario a partire da precursori gassosi. Di origine secondaria sono gli ioni inorganici (solfati, SO_4^- ; nitrati, NO_3^- ; ammonio, NH_4^+) che come precedentemente riportato costituiscono su media annua il 32,5 % e 48,9% rispettivamente del PM2.5 e PM10 (progetto PUMI, 2003). Inoltre parte del carbonio organico (OC) è di origine secondaria (secondary organic aerosol, SOA). Giugliano (Giugliano M., 2005) riporta che, considerando sia il secondario inorganico che organico, è stimato (a partire da misure sperimentali) che per l'area urbana milanese la somma di entrambi contribuisce per circa il 75% e 40% della massa totale di PM2.5 rispettivamente per il periodo invernale ed estivo.

La formazione e distribuzione di particolato secondario nell'area urbana milanese è stata studiata anche con modelli (modello CAMx: Environ, 2006), valutando gli effetti di politiche di abbattimento delle emissioni di precursori gassosi (VOC e NO_x , NH_3) rispetto alle risultanti concentrazioni di particolato secondario (S. Andreani-Aksoyoglu, 2004).

Per quanto riguarda la distribuzione dimensionale del PM, la frazione ultrafine è identificabile come particolato di origine primaria. Studi sperimentali nell'area urbana milanese relativi alla concentrazione numerica di particelle in funzione di diverse classi dimensionali, mediante contatori ottici di particelle (optical particle counter OPC) e DMA-CPC (differential mobility analyzer-condensed particle counter), evidenziano come l'andamento di particelle ultrafini ($d < 21 \text{ nm}$) è correlabile all'andamento di inquinanti primari quali CO (g) e NO (g). Lo stesso andamento si osserva anche per particelle grossolane (progetto PARFIL).

1.4 Condizioni meteorologiche e inquinamento atmosferico da PM

In particolare per il Nord Italia, e quindi per l'area urbana milanese, hanno una forte influenza le tipiche condizioni di stabilità atmosferica che caratterizzano il periodo invernale, con conseguenti fenomeni di limitata dispersione degli inquinanti, confinati nei primi metri dell'atmosfera con conseguenti elevate concentrazioni al suolo. Tale aspetto è stato studiato in modo specifico con approccio sperimentale innovativo mediante pallone aerostatico. La diluizione e dispersione degli inquinanti atmosferici dipende dall'altezza dello strato di rimescolamento. Nel progetto PROFILI VERTICALI l'inquinamento da PM nell'area urbana milanese è stato studiato lungo il profilo verticale dell'atmosfera. Lo studio è stato condotto presso il sito di campionamento di Torre Sarca (Viale Sarca - Viale Chiese) mediante innalzamento di un pallone aerostatico frenato di 4 metri di diametro fino a una quota di 300 m AGL; la dispersione verticale del particolato atmosferico è stata indagata con l'ausilio di un contatore ottico di particelle a 15 classi dimensionali. Durante il periodo invernale si hanno giorni con una situazione particolarmente critica per l'inquinamento da PM nell'area urbana milanese. Tali situazioni sono associate a condizioni meteorologiche di elevata stabilità con un'altezza dello strato di rimescolamento limitato alle prime centinaia di metri dell'atmosfera durante tutta la giornata (Ferrero L., 2007).

1.5 Tossicità del PM

Le sorgenti di emissione che contribuiscono a determinare le concentrazioni e la composizione del PM in atmosfera sono molteplici. È stato tuttavia dimostrato che buona parte della frazione più fine (PM 2.5 e particelle ultrafini, PUF) del particolato di origine antropica, deriva direttamente dal traffico veicolare (Chen et al., 2001). Infatti, virtualmente, tutte le particelle emesse da processi di combustione di combustibile fossile nei motori sono più piccole di 2.5 μm , ma la maggior parte di queste risultano inferiori a 0.5 μm . Il traffico veicolare inoltre contribuisce in modo significativo non solo sul PM2.5, ma anche sul PM10, dato che particelle riferibili a quest'ultima frazione dimensionale derivano direttamente dall'abrasione dei sistemi frenanti e degli pneumatici (Camatini et al., 2000; Camatini et al., 2001; Hjortenkras et al., 2007). Se il traffico veicolare contribuisce in modo così determinante alle concentrazioni di PM in atmosfera, è verosimile che contribuisca allo stesso modo ai suoi effetti tossici (Camatini et al., 2003; Gualtieri et al., 2005). IPA e derivati infatti si formano prevalentemente dalla combustione dei carburanti fossili, mentre molti metalli (inclusi i metalli di transizione) dai processi catalitici.

Nonostante nella maggior parte dei paesi europei la qualità dell'aria sia considerevolmente migliorata negli ultimi decenni, esistono abbondanti evidenze che suggeriscono come l'esposizione in ambiente aereo inquinato, seppure ai livelli riscontrabili oggi in Europa, provochi effetti deleteri sulla salute. In particolare l'esposizione a inquinanti atmosferici come il PM e l'ozono risulta un importante fattore di rischio ed è stata associata all'aumento di ammissioni ospedaliere, di malattie respiratorie e cardio-circolatorie e di mortalità in molti paesi europei. Numerosi studi epidemiologici hanno infatti dimostrato l'associazione tra l'esposizione a PM e l'insorgenza di infezioni dell'apparato respiratorio, di tumori del polmone e di malattie croniche sia dell'apparato respiratorio che cardio-circolatorio.

Nell'ultimo decennio l'attenzione della comunità scientifica si è progressivamente spostata verso la caratterizzazione chimica e tossicologica delle frazioni fini del particolato (PM2.5), grazie alla consapevolezza che le frazioni dimensionali più piccole sono in grado di penetrare più profondamente nelle vie respiratorie, impattando e mediando risposte biologiche nei tratti maggiormente sensibili dell'albero respiratorio, ovvero le zone bronchiali e alveolari (Englert, 2004).

I meccanismi biologici che sottintendono a queste evidenze epidemiologiche risultano tuttavia ancora poco conosciuti. Sebbene attualmente il monitoraggio ambientale del PM rilevi le

concentrazioni di particelle aerodisperse, attualmente la discussione scientifica è orientata soprattutto alla discriminazione degli effetti biologici in base alle categorie dimensionali del PM e alla sua composizione chimica. Lo studio della letteratura scientifica pubblicata sulle riviste specializzate nel settore indica che in studi di tossicità *in vitro* il PM ha la potenzialità di indurre molte tipologie di danno a livello cellulare: effetti citotossici, mutagenici, danno al DNA e produzione di citochine proinfiammatorie (Calini et al., 2002; Gualtieri et al., 2005a, 2005b; De Kok et al., 2006).

Per capire l'attendibilità e la significatività scientifica dei metodi di studio e dei risultati ottenibili in questo progetto, si riporta una breve relazione sugli effetti biologici prodotti dall'esposizione a PM, riferita ai dati presenti nella letteratura internazionale.

I dati epidemiologici correlano l'esposizione a concentrazioni crescenti di particolato atmosferico con un incremento di effetti avversi sulla salute umana (mortalità, ospedalizzazione, esacerbazione di patologie preesistenti). I dati risultano consistenti anche per indagini sul campo a breve termine effettuate in condizioni ambientali e di inquinamento atmosferiche diverse, portando a stime di rischio di incremento della mortalità paragonabili tra loro. Di più difficile interpretazione risultano, a oggi, le stime di rischio per incrementi di malattie o ammissioni ospedaliere, a causa di un'elevata eterogeneità nelle risposte misurate. Per quanto riguarda gli studi a lungo termine (effetti cronici) viene messa in evidenza una stretta correlazione tra esposizione ed effetti sull'apparato cardio-respiratorio.

Nonostante le prove derivanti dagli studi epidemiologici siano in buona parte conclusive, le ricerche mirate alla comprensione dei meccanismi di azione risultano ancora lontane dall'aver raggiunto risultati soddisfacenti.

Per quanto riguarda gli effetti sull'apparato respiratorio, un valido aiuto alla comprensione dei meccanismi d'azione di PM fine deriva dagli studi sui sistemi *in vitro*, che rappresentano un buon modello che simula l'apparato respiratorio, in quanto queste linee cellulari sono cellule immortalizzate simili a quelle degli alveoli polmonari (linea A549) e sono utilizzate da tutti i laboratori che effettuano ricerche inerenti l'esposizione delle vie respiratorie a particolato.

Tra i principali effetti analizzati a carico dell'apparato respiratorio, la risposta infiammatoria è di primaria importanza: macrofagi e cellule dell'epitelio polmonare bronchiale e alveolare, rispondono a classi di PM rilasciando elevate quantità di mediatori dell'infiammazione (citochine). Le differenze di risposta riscontrate in termini di citossicità, risposta infiammatoria, danno al DNA, etc. in letteratura sono imputabili sia al modello *in vitro* sia alle caratteristiche del PM impiegati (Sutherland et al., 2003; McClellan, 1987), pertanto sono fortemente metodo e sito specifiche.

Per quanto concerne gli effetti a carico dell'apparato cardio-circolatorio (insorgenza di aritmie, fattori di coagulazione) le ipotesi più plausibili si riferiscono all'effetto del particolato ultrafine, dei metalli presenti nel PM e delle molecole infiammatorie che traslocano dai polmoni al sistema circolatorio (Devlin et al., 2003; Seaton et al., 1999).

Le proprietà fondamentali del PM che sembrano coinvolte nelle risposte cellulari sono:

- **La dimensione:** questo parametro determina i processi di inalazione, deposizione ed eliminazione. Le frazioni fine e ultrafine raggiungono facilmente gli alveoli, rispetto alla frazione coarse, e la frazione ultrafine ha una maggiore efficienza di deposizione. Le dimensioni del PM influenzano quindi in modo profondo la localizzazione delle particelle nell'albero respiratorio e di conseguenza gli effetti potenziali di queste. Diversi studi, epidemiologici e di laboratorio, hanno evidenziato differenti correlazioni in funzione delle dimensioni del PM (Schwartz et al., 1999; Beretta et al., 2007; Mantecca et al., 2007; Schins et al., 2004).
- **La componente inorganica:** i metalli di transizione possono agire da catalizzatori per la formazione di ROS (Reactive Oxygen Species) (Gualtieri et al., 2008). Altri metalli, come lo zinco, possono invece interagire direttamente con le componenti cellulari, le proteine ad

esempio, esercitando un effetto tossico (Donaldson et al., 2003; Haase and Maret, 2005). Diversi studi sperimentali hanno dimostrato l'importanza della componente metallica presente nel PM per definirne gli effetti biologici come risposte infiammatorie o induzione di stress ossidativo.

- **I composti organici:** molecole complesse come idrocarburi policiclici aromatici (IPA) rappresentano una parte importante del PM. In aria questi composti possono subire delle trasformazioni chimiche che ne possono influenzare gli effetti biologici (Forsberg et al., 2005). L'importanza delle molecole organiche adsorbite sul PM è da sempre al centro di numerose indagini *in vitro* soprattutto nella comprensione degli effetti biologici dovuti ad esposizione di particelle derivanti da processi di combustione (diesel exhaust). I composti organici sono infatti in grado di interagire con il DNA (formando addotti) aumentando il rischio di insorgenza di tumori a livello polmonare (Pope et al., 2002). Inoltre, sebbene in minima parte, se confrontate con la frazione metallica, le molecole organiche sono in grado di indurre la produzione di chemochine come IL-8 (Fahy et al., 1999).

La riduzione della concentrazione di PM in atmosfera è ormai riconosciuta come misura per limitare il rischio per la salute umana, sebbene siano ancora necessari sforzi di ricerca perché la riduzione delle emissioni sia accompagnata da una conoscenza delle caratteristiche chimiche e tossicologiche del PM, al fine di rendere i provvedimenti più mirati ed efficaci. Ciononostante le attuali norme per il controllo della qualità dell'aria sono ancora basate su parametri quantitativi (massa) piuttosto che qualitativi (composizione).

Mentre da una parte le evidenze epidemiologiche hanno dimostrato inconfutabilmente il rischio per la popolazione associato all'esposizione acuta o cronica ad alte concentrazioni ambientali di PM10 e PM2.5, dall'altra occorre riconoscere che si è ancora lontani dall'aver individuato con precisione quali meccanismi biologici stiano alla base di questa tossicità e come questi effetti tossici possano variare a seconda della concentrazione, della composizione, della stagionalità, e delle sorgenti di emissione. In particolare risulta sempre più pressante l'esigenza di discriminare il grado di rischio associabile alle diverse categorie professionali (e non) particolarmente esposte a PM, di valutare come possano variare le risposte biologiche a seconda dei differenti ambienti di vita frequentati, e della possibile variabilità fisico-chimica del PM su scala locale, e non solo regionale.

Per quanto riguarda l'area urbana milanese, attualmente la percezione del rischio associabile all'esposizione a PM è affidata in maniera pressoché esclusiva ai rilevamenti delle stazioni di monitoraggio ARPA che misurano le concentrazioni di particelle in aria. Non sono invece disponibili informazioni circa la speciazione chimica e l'impatto biologico e sanitario dei diversi PM campionabili nelle diverse condizioni ambientali su scala locale. A maggior ragione risulta inesplorata la possibilità che il grado e la tipologia di esposizione, nonché il conseguente danno biologico possano variare anche su scala locale a seconda dello stile di vita, degli ambienti frequentati durante la giornata.

Al fine di gettare le basi di un metodo di scelta delle politiche locali coerente con le evidenze scientifiche, questo progetto si prefigge di fornire risultati circa la variabilità chimica del PM fine a cui è esposta una sotto-popolazione particolarmente a rischio, quale quella degli Agenti di Polizia Locale di Milano, valutandone il potenziale rischio sulla salute attraverso l'applicazione di test biologici di laboratorio particolarmente sensibili e coerenti con le evidenze sperimentali verificabili in letteratura.

2. RACCOLTA DI CAMPIONI SIGNIFICATIVI DI PARTICOLATO ATMOSFERICO IN SITI RITENUTI SIGNIFICATIVI PER LA VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE DEL PERSONALE DELLA POLIZIA LOCALE CON RILIEVI NEI PRESSI DI INTERSEZIONI VIARIE (inquinamento Outdoor) E, IN CONTEMPORANEA, IN UFFICI ADIACENTI (inquinamento Indoor).

2.1 Siti e periodo di campionamento

I siti di campionamento sono stati individuati dall' Agenzia Mobilità Ambiente in accordo con la Polizia Locale di Milano.

Sotto sono riportati i periodi di campionamento.

CAMPAGNA ESTIVA - AUTUNNALE

Sito	VERZIERE 1	TIBALDI	CERMENATE	PONZIO	VERZIERE 2
Periodo	16 - 29 Luglio 07	20 Agosto - 2 Settembre 07	3 - 16 Settembre 07	17 - 30 Settembre 07	1 - 14 Ottobre 2007

TAB. 1 Siti e periodo di campionamento per la campagna estivo-autunnale

Per il campionamento gravimetrico del particolato atmosferico la campagna di riferimento per il sito di Verziere per il periodo estivo-autunnale è VERZIERE 2.

CAMPAGNA INVERNALE

Sito	VERZIERE	CERMENATE	PONZIO	TIBALDI
Periodo	14 - 27 Gennaio 08	28 Gennaio - 10 Febbraio 08	11 - 24 Febbraio 08	25 Febbraio- 9 Marzo 08

TAB. 2 Siti e periodo di campionamento per la campagna invernale

2.2 Sistemi di campionamento in ambiente Outdoor e Indoor

In ogni sito (VERZIERE, TIBALDI, CERMENATE, PONZIO) è stato effettuato il campionamento del particolato atmosferico, in parallelo in ambiente outdoor e indoor. In tabella sono riportati i sistemi di campionamento utilizzati:

	CAMPIONATORE	CAMPIONATORE
OUTDOOR	Campionatore gravimetrico PM2.5 e PM1	Campionatore ottico di particelle da 0,3 a > 20 µm
INDOOR	Campionatore gravimetrico PM2.5 e PM1	Campionatore ottico di particelle da 0,3 a > 20 µm
MISURA	misura giornaliera (24 h) della concentrazione in massa (µg/m ³) di PM1 e PM2.5	misura (risoluz. temporale: 1 min) della concentrazione numerica (# dm ⁻³) di particelle, per 15 diverse classi dimensionali da 0.3 µm a >20 µm

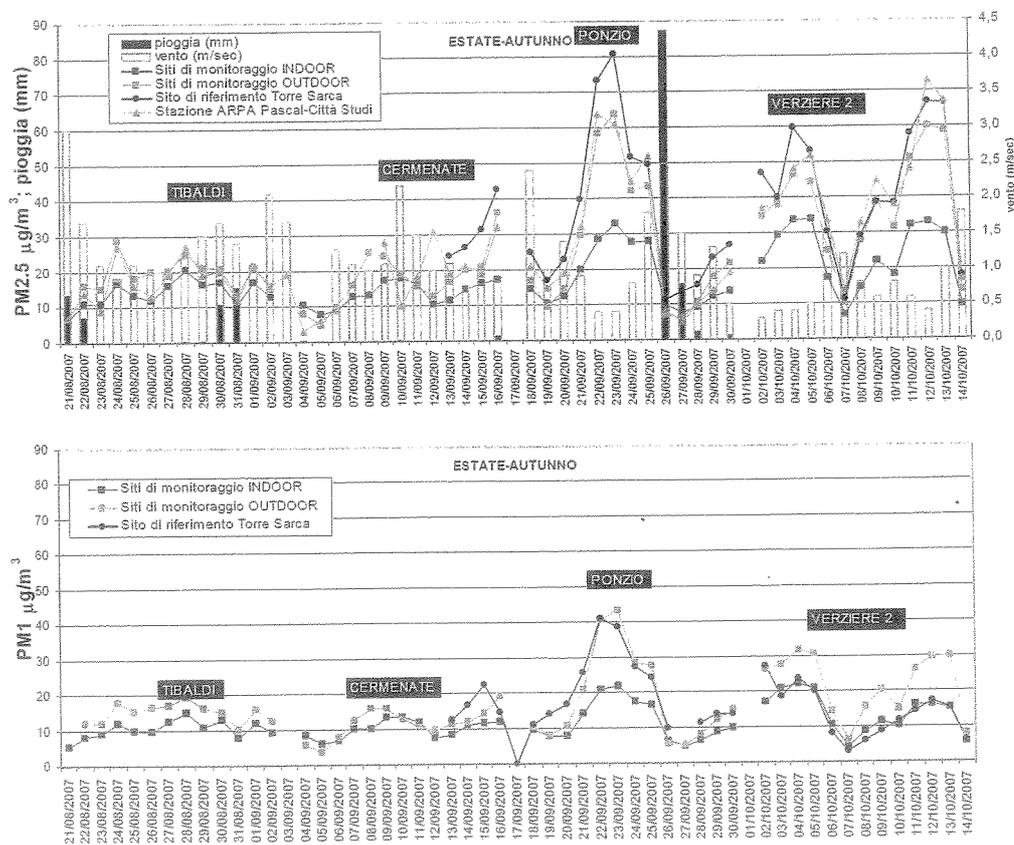
TAB. 3 Campionatori gravimetrici ed ottici per il campionamento del particolato atmosferico in ambiente outdoor e indoor

2.3 Risultati del campionamento gravimetrico giornaliero per PM1 e PM2.5 in ambiente Outdoor e Indoor

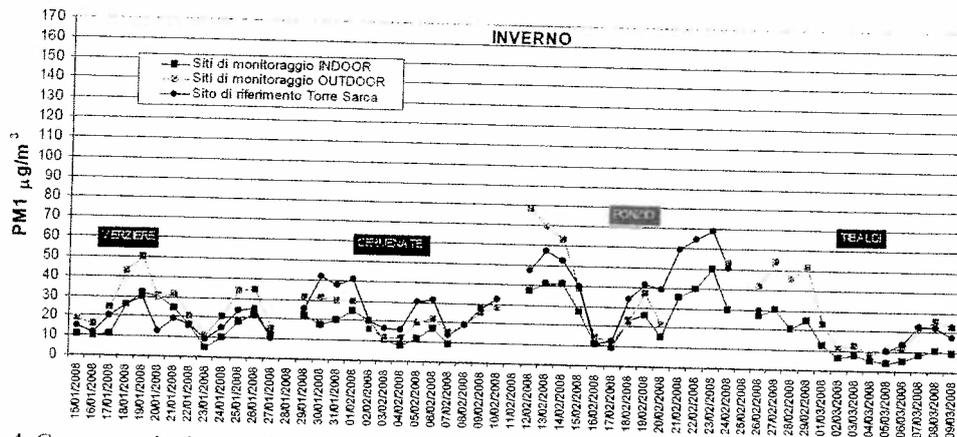
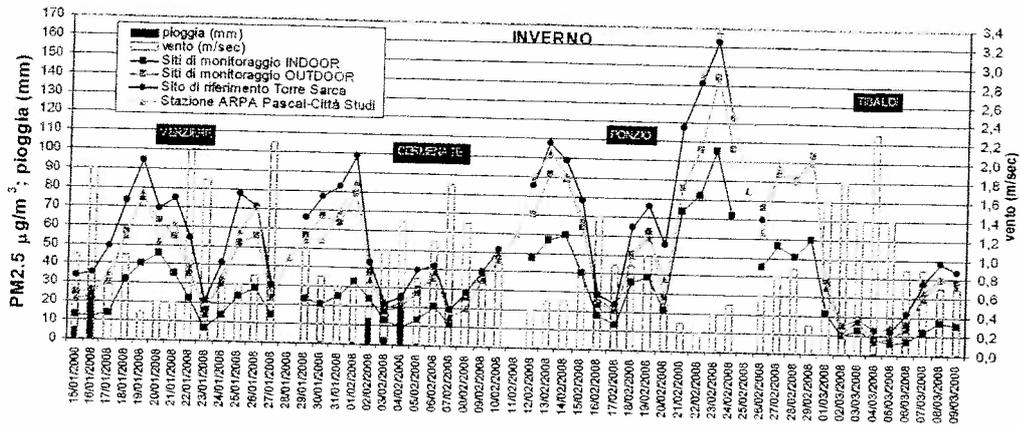
Nelle FIGG. 1, 2, 3, 4 sono riportati tutti i risultati del campionamento giornaliero outdoor e indoor PM1 e PM2.5 per il periodo estivo-autunnale (FIGG. 1 e 2) ed invernale (FIGG. 3 e 4).

Per un inquadramento contestuale delle campagne di rilevamento del particolato eseguite nel presente studio in riferimento ai dati di concentrazione di particolato disponibili sul territorio del Comune di Milano, sono riportati:

- i dati di concentrazione giornaliera di PM1 e di PM2.5 rilevati presso il sito di Torre Sarca (angolo Viale Sarca-Viale Chiese), Milano. Il campionamento è stato effettuato presso tale sito utilizzando la stessa strumentazione e seguendo la stessa procedura di campionamento delle campagne di rilevamento eseguite presso tutti i siti di VERZIERE, CERMENATE, PONZIO, TIBALDI. I sistemi di campionamento sono stati tra loro intercalibrati.
- i dati di concentrazione giornaliera PM2.5 rilevati da rete ARPA per il Comune di Milano presso il sito di Città Studi-Pascal, Milano.
- i dati rilevati da rete ARPA di precipitazione cumulata e di velocità del vento, per un inquadramento delle condizioni meteorologiche dei giorni delle campagne di rilevamento.



FIGG. 1 e 2. Concentrazioni giornaliere di PM2.5 e PM1 durante la campagna di rilevamento estivo-autunnale (dal 20/08 al 14/10/2008)



FIGG. 3 e 4. Concentrazioni giornaliere di PM2.5 e PM1 durante le campagna di rilevamento invernale (dal 15/01 al 09/03/2008)

Sono riassunti i risultati del campionamento gravimetrico outdoor e indoor PM1 e PM2.5 presso i diversi siti (Verziere, Cermenate, Ponzio, Tibaldi) durante le campagne di rilevamento estiva (TAB. 4) ed invernale (TAB. 5).

I dati sono relativi a tutti i risultati del campionamento giornaliero (vedi FIGG. da 1 a 4), ed è riportata la concentrazione media, deviazione standard, n° dati disponibili e deviazione standard della media.



Mappa dei siti di campionamento selezionati e delle stazioni di riferimento considerate per la raccolta dei dati di concentrazione del particolato.

ESTATE-AUTUNNO		OUTDOOR		INDOOR	
		PM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PM2.5 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PM2.5 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
		TIBALDI	MEDIA	15	20
	DEV.ST	3	4	3	4
	N VALORI	12	12	13	13
	DEV. ST MEDIA	1	1	1	1
CERMENATE	MEDIA	12	18	10	13
	DEV.ST	4	8	2	3
	N VALORI	13	13	13	13
	DEV. ST MEDIA	1	2	1	1
PONZIO	MEDIA	18	26	12	17
	DEV.ST	13	20	6	9
	N VALORI	13	13	13	13
	DEV. ST MEDIA	4	5	2	2
VERZIERE 2	MEDIA	22	37	14	23
	DEV.ST	9	16	6	9
	N VALORI	13	13	13	13
	DEV. ST MEDIA	2	4	2	3

TAB. 4. Risultati del campionamento gravimetrico PM2.5 e PM1 nei siti di TIBALDI, CERMENATE, PONZIO e VERZIERE2 durante la campagna di rilevamento estivo-autunnale.

INVERNO		OUTDOOR		INDOOR	
		PM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PM2.5 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	PM2.5 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
		VERZIERE	MEDIA	27	42
	DEV.ST	12	18	9	12
	N VALORI	13	13	13	13
	DEV. ST MEDIA	3	5	2	3
CERMENATE	MEDIA	22	42	16	19
	DEV.ST	7	20	6	8
	N VALORI	13	13	10	10
	DEV. ST MEDIA	2	5	2	2
PONZIO	MEDIA	42	75	30	53
	DEV.ST	23	36	12	27
	N VALORI	11	14	14	14
	DEV. ST MEDIA	7	10	3	7
TIBALDI	MEDIA	26	45	13	25
	DEV.ST	16	34	9	20
	N VALORI	13	13	13	13
	DEV. ST MEDIA	5	9	3	6

TAB. 5. Risultati del campionamento gravimetrico PM2.5 e PM1 nei siti di TIBALDI, CERMENATE, PONZIO e VERZIERE durante la campagna di rilevamento invernale.

Calcolando il rapporto tra concentrazioni giornaliere di PM1 e PM2.5 misurate in ambiente indoor rispetto all'outdoor, in estate si ha un valore medio di 77% ($[PM]_{\text{indoor}}/[PM]_{\text{outdoor}}$), sia per PM1 che per PM2.5. In inverno si ha un valore medio inferiore, di 64% e 57%, rispettivamente per PM1 e PM2.5. Questo ad indicare un minore scambio di masse d'aria tra indoor e outdoor in inverno, quando solitamente le finestre sono tenute chiuse (FIG. 5).

Il rapporto tra le concentrazioni giornaliere per le 2 frazioni di PM (PM1/PM2.5) è pari in estate a 69 % ($\pm 1\%$), sia in ambiente indoor che in ambiente outdoor, indicando nei 2 ambienti un'uguale distribuzione dimensionale del PM riferita a tali 2 classi. Per la stagione invernale si ha un uguale valore in ambiente outdoor ($69 \pm 2\%$), mentre in ambiente indoor un rapporto inferiore pari a $63 \pm 2\%$.

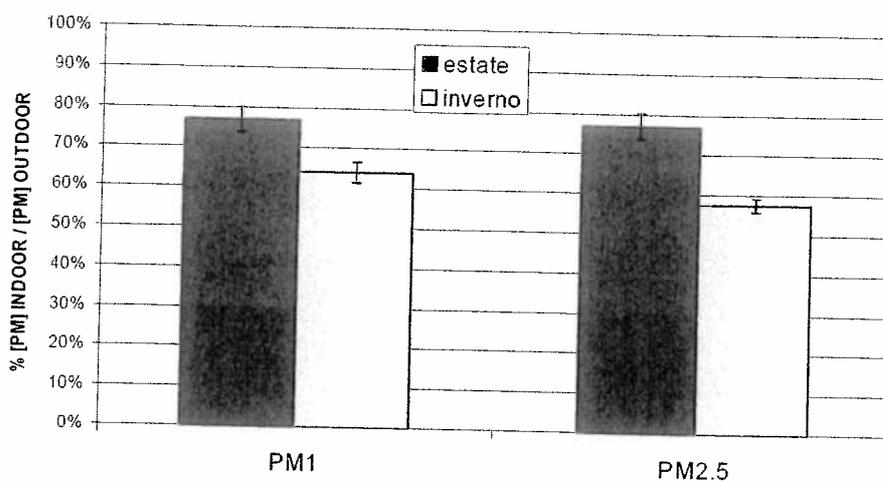


FIG. 5. Media e deviazione standard della media per il rapporto tra le concentrazioni giornaliere di PM1 e PM2.5 in ambiente indoor rispetto all'outdoor, per estate ed inverno.

2.4 Risultati con contatore ottico di particelle in ambiente Outdoor e Indoor

In tutti e 4 i siti di campionamento (Verziere, Tibaldi, Cermenate e Ponzio), sia in ambiente indoor che outdoor, sono state misurate le concentrazioni numeriche ($\#particelle \cdot dm^{-3}$) e la distribuzione dimensionale del particolato atmosferico mediante l'utilizzo di due tipologie di contatori ottici di particelle:

- OPC GRIMM 1.107 "Environcheck": utilizzato in ambienti outdoor (32 classi dimensionali da 0.25 a 32.0 μm e $> 32.0 \mu m$)
- OPC GRIMM 1.108 "Dustcheck": utilizzato in ambienti indoor e come misuratore dell'esposizione del personale in servizio di pattuglia (15 classi dimensionali da 0.3 -20.0 μm e $>20.0 \mu m$)

I contatori ottici restituiscono un valore di concentrazione numerica e distribuzione dimensionale con risoluzione temporale al minuto: le elaborazioni che verranno mostrate nella presente relazione sono effettuate considerando sia i valori medi misurati nel corso della durata di ciascuna campagna di campionamento, sia i valori al minuto, con particolare riferimento allo studio delle possibili esposizioni a concentrazioni acute degli agenti prestanti servizio di pattuglia lungo i percorsi stabiliti dall'Agenzia Mobilità Ambiente in accordo con la Polizia Locale di Milano. Inoltre, poiché i contatori ottici di particelle restituiscono la misura della concentrazione numerica suddivisa in

differenti classi dimensionali, e a causa del differente limite inferiore di rilevazione dei due OPC, nella presente relazione i dati di concentrazione verranno presentati suddivisi in due macroclassi:

- particelle appartenenti alla moda di accumulazione, con d_p compreso tra 0.3 e 1.6 μm
- particelle appartenenti alla moda dei nuclei giganti, con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$

Sempre a causa delle differenze intrinseche dei due modelli di OPC, gli stessi sono stati sottoposti a una campagna di interconfronto al fine di determinarne l'equivalenza ed eventualmente di determinare dei coefficienti correttivi da applicare ai dati misurati.

2.5 Confronto delle concentrazioni misurate negli ambienti Outdoor e Indoor

Nelle TABB. 6 e 7 vengono riportate la media e la deviazione standard della media delle concentrazioni numeriche inerenti i siti di campionamento e le campagne di misura stagionali effettuate sia in ambiente indoor che outdoor.

In particolare la TAB. 6 mostra tali valori per particelle con un d_p da 0.3 a 1.6 μm , e la TAB. 7 i valori per particelle con un $d_p > 1.6 \mu\text{m}$.

Unità di misura della concentrazione: # dm^{-3}		Diametro 0.3-1.6 μm									
		Verziere			Cermenate		Ponzio		Tibaldi		
		Estate	Autunno	Inverno	Estate	Inverno	Estate	Inverno	Estate	Inverno	
		16-30/07/07	1-15/10/07	14-28/01/08	3-17/09/07	28/01-11/02/08	17-30/09/07	11-25/02/08	20/08-3/09/07	25/02-10/03/08	
Outdoor	Mean	61578	292565	287906	105231	308720	223476	615770	131092	310189	
	mean st.dev	219	1057	1698	684	1570	1328	2749	556	1715	
Indoor	Mean	52061	145768	75711	40072	97307	91091	398447	69832	171267	
	mean st.dev	195	809	525	144	578	580	2098	329	1095	

TAB. 6: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con d_p 0.3-1.6 μm in ambiente outdoor e indoor, per le campagne estive-autunnali e invernali.

Unità di misura della concentrazione: # dm^{-3}		Diametro $> 1.6 \mu\text{m}$									
		Verziere			Cermenate		Ponzio		Tibaldi		
		Estate	Autunno	Inverno	Estate	Inverno	Estate	Inverno	Estate	Inverno	
		16-30/07/07	1-15/10/07	14-28/01/08	3-17/09/07	28/01-11/02/08	17-30/09/07	11-25/02/08	20/08-3/09/07	25/02-10/03/08	
Outdoor	Mean	520	736	400	480	1143	484	614	423	622	
	mean st.dev	2	3	2	2	63	2	2	2	6	
Indoor	Mean	371	397	170	177	57	333	429	252	307	
	mean st.dev	1	2	1	1	0	2	2	1	3	

TAB. 7: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$ in ambiente outdoor e indoor, per le campagne estive-autunnali e invernali.

Per ciascun sito di campionamento sono state confrontate le concentrazioni medie di particolato misurate in ambiente indoor e outdoor.

Le concentrazioni misurate in ambienti indoor sono risultate sempre inferiori rispetto alle concentrazioni outdoor, sia per la concentrazione numerica per particelle con $d_p < 1.6 \mu\text{m}$ che per particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$. Nelle FIGG. 6 e 7 vengono mostrate le concentrazioni numeriche per le suddette classi dimensionali: in funzione del sito e del periodo di campionamento, si riporta anche il rapporto percentuale calcolato fra le concentrazioni misurate in ambienti indoor ed outdoor.

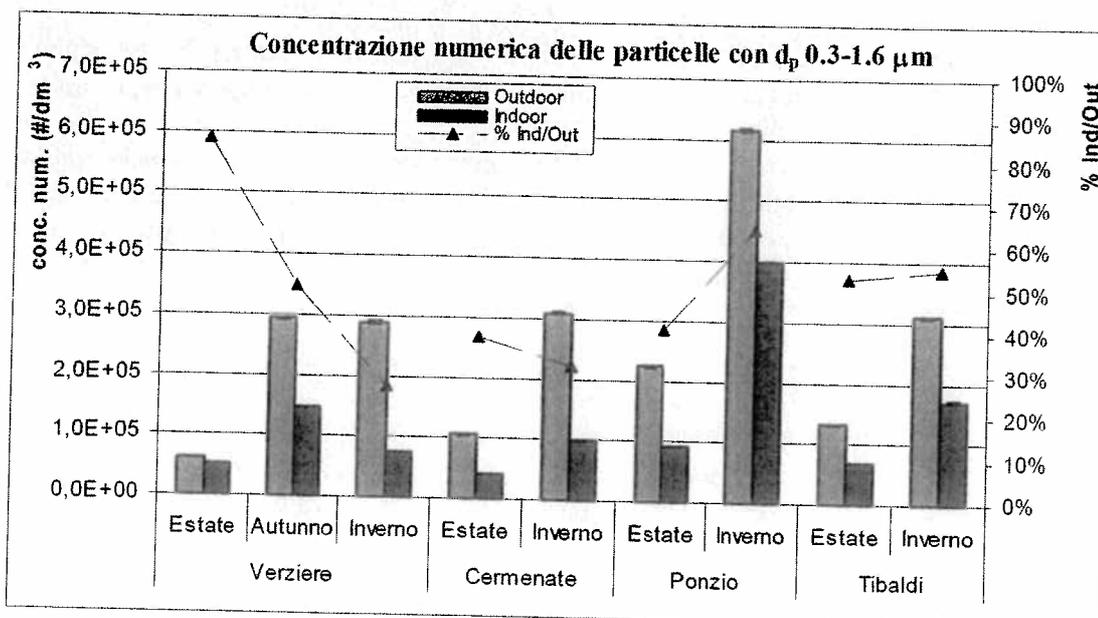


FIG. 6: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con d_p tra 0.3 e 1.6 μm in ambiente outdoor e indoor, per le campagne estive-autunnali ed invernali.

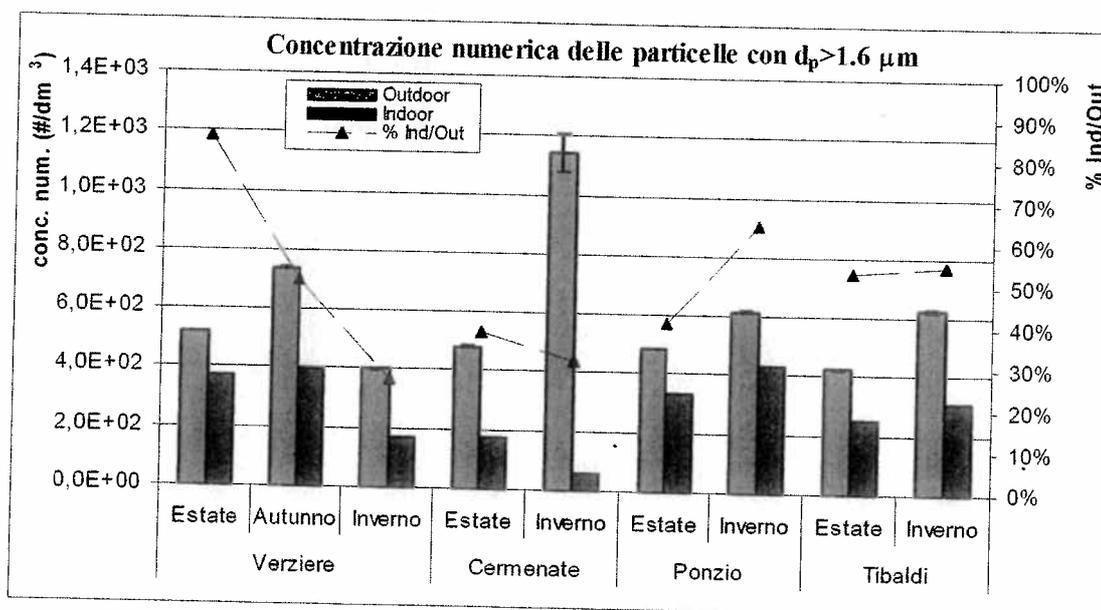


FIG. 7: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$ in ambiente outdoor e indoor, per le campagne estive-autunnali e invernali.

Come osservato per i risultati da campionamento gravimetrico per PM_{10} e $\text{PM}_{2.5}$, complessivamente si osserva una riduzione delle concentrazioni passando da ambienti outdoor a indoor; i rapporti medi percentuali delle concentrazioni misurate in indoor rispetto all'outdoor per particelle con d_p compreso tra 0.3 e 1.6 μm sono stati del $54 \pm 11\%$ e del $44 \pm 9\%$ rispettivamente in estate e inverno (FIG. 8). I maggiori valori di rapporto indoor/outdoor avvengono perciò in estate a fronte di una maggior aerazione degli ambienti di lavoro. Tale dato è confermato dal comportamento delle particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$ per le quali i valori medi di rapporto percentuale sono stati del $59 \pm 8\%$ e del $42 \pm 14\%$ rispettivamente in estate ed in inverno (FIG. 9). Risulta particolare la situazione di Cermenate durante la campagna invernale, per quel che concerne le particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$, dovuta alla ridotta attività svolta in indoor rispetto a un qualunque altro sito della Polizia Locale (vedi TAB. 7 e FIG. 7). Ne consegue che i valori medi di concentrazione assoluti, e i valori medi di rapporto percentuale delle particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$ sono

influenzati da questa peculiarità. Escludendo il sito di Cermenate durante la campagna invernale, i valori medi di rapporto percentuale indoor/outdoor (per $d_p > 1.6 \mu\text{m}$) sono stati in inverno del $54 \pm 8\%$; tale dato mostra una minor diminuzione passando dal periodo estivo a quello invernale nel rapporto indoor/outdoor stimato per le particelle appartenenti alla moda dei nuclei giganti rispetto a quelle appartenenti alla moda di accumulazione. Ciò può essere dovuto alla presenza di sorgenti indoor di particelle di dimensioni maggiori. In FIG. 9 i rapporti medi percentuali misurati in ambienti indoor e outdoor sono presentati sia considerando, che omettendo i dati relativi al sito di Cermenate (indoor - inverno).

Nelle FIGG. 10 e 11 vengono mostrate le correlazioni tra le concentrazioni misurate in ambiente indoor e outdoor per le diverse classi dimensionali; in FIG. 11 il sito di Cermenate durante il periodo invernale è stato considerato come un outlier. Come è possibile osservare il valore di R^2 è maggiore per le particelle appartenenti alla moda di accumulazione ($R^2 = 0.855$) rispetto a quelle appartenenti alla moda dei nuclei giganti ($R^2 = 0.543$) ad indicare una maggiore modulazione delle stesse in ambienti indoor in funzione delle concentrazioni outdoor.

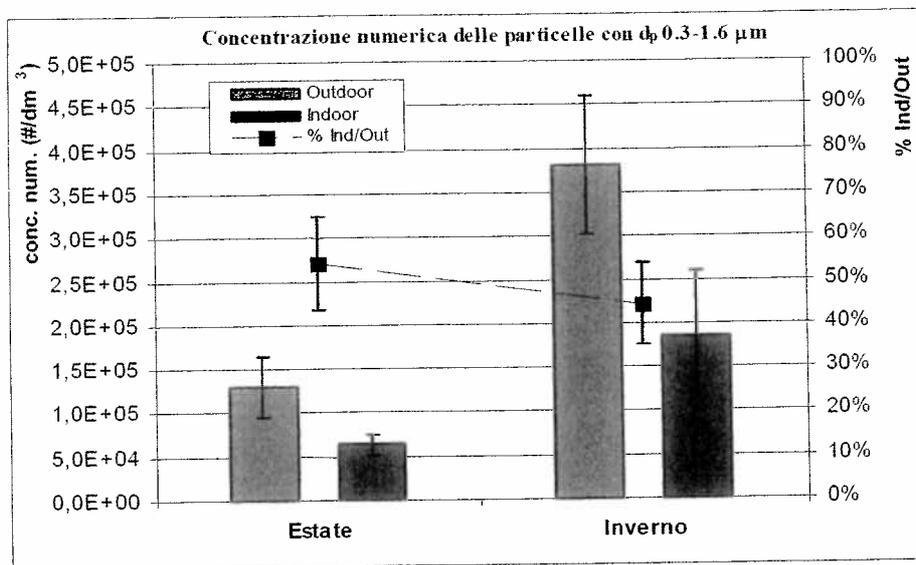


FIG. 8: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con d_p tra 0.3 e 1.6 μm in ambiente outdoor e indoor tra i vari siti, per le campagne estive-autunnali e invernali.

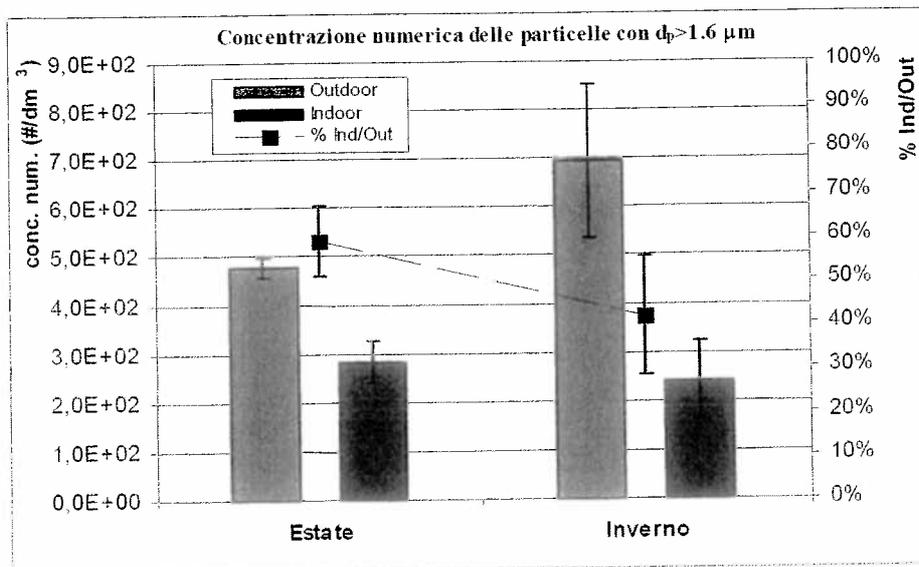


FIG. 9: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$ in ambiente outdoor e indoor tra i vari siti, per le campagne estive-autunnali e invernali.

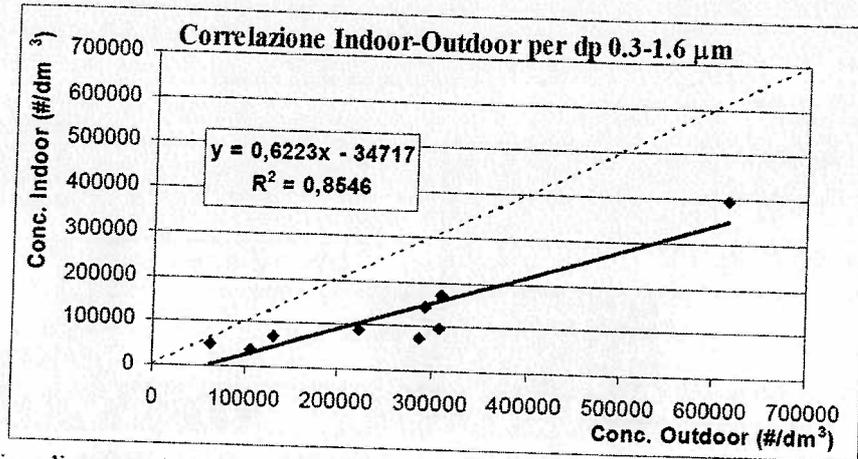


FIG. 10: Correlazione lineare tra le concentrazioni numeriche di particelle con dp tra 0.3 e 1.6 μm in ambiente outdoor e indoor tra i vari siti, per le campagne estive-autunnali e invernali.

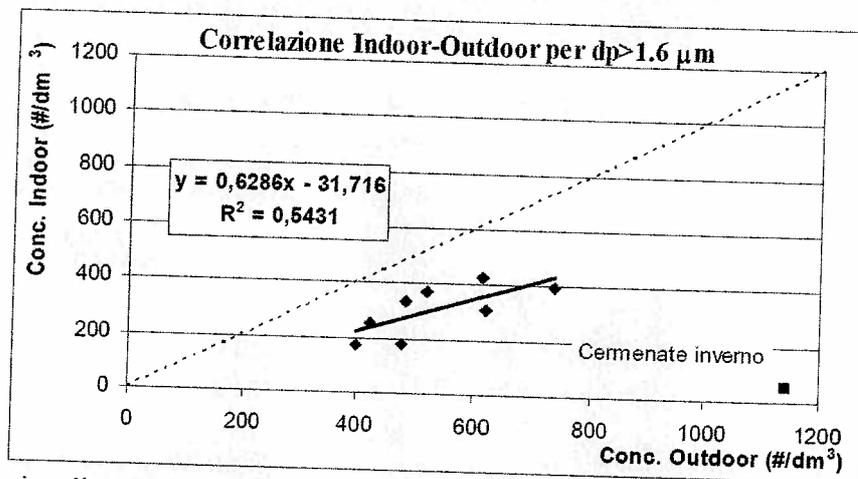


FIG. 11: Correlazione lineare tra le concentrazioni numeriche di particelle con dp > 1.6 μm in ambiente outdoor e indoor tra i vari siti, per le campagne estive-autunnali e invernali.

La maggior correlazione rilevata per le particelle tra 0.3 e 1.6 μm tra i valori misurati indoor e outdoor è evidente anche osservando l'andamento dei valori medi di concentrazione misurato in ciascun sito, per ciascuna campagna nelle due classi dimensionali considerate (FIGG. 12 - 15).

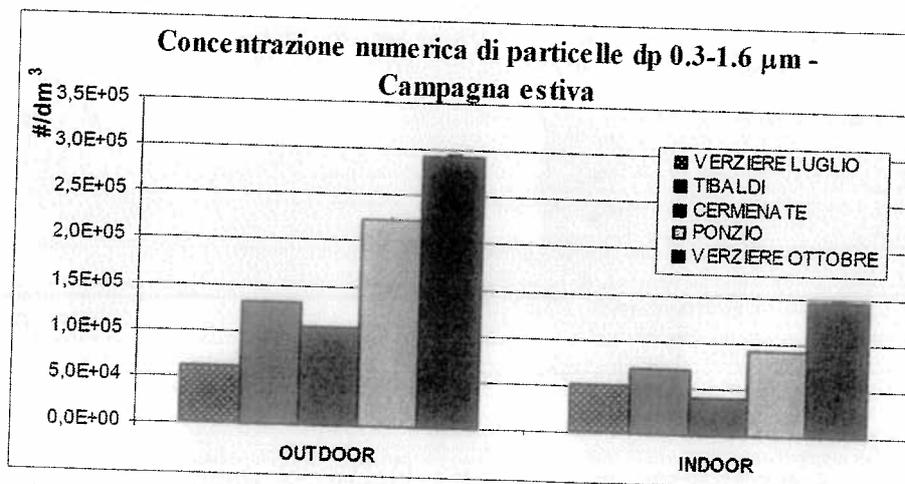


FIG. 12: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con dp tra 0.3 e 1.6 μm in ambiente outdoor e indoor, per le campagne estivo-autunnali.

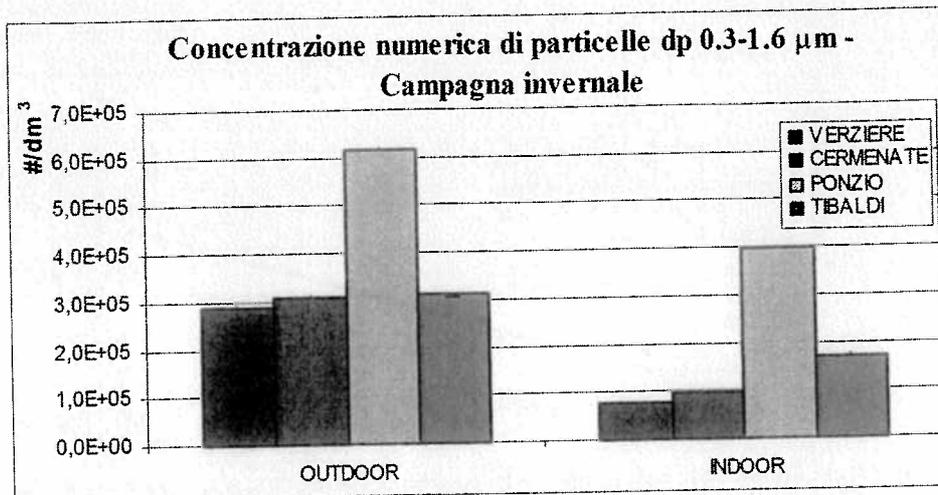


FIG. 13: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con dp tra 0.3 e 1.6 μm in ambiente outdoor e indoor, per la campagna invernale.

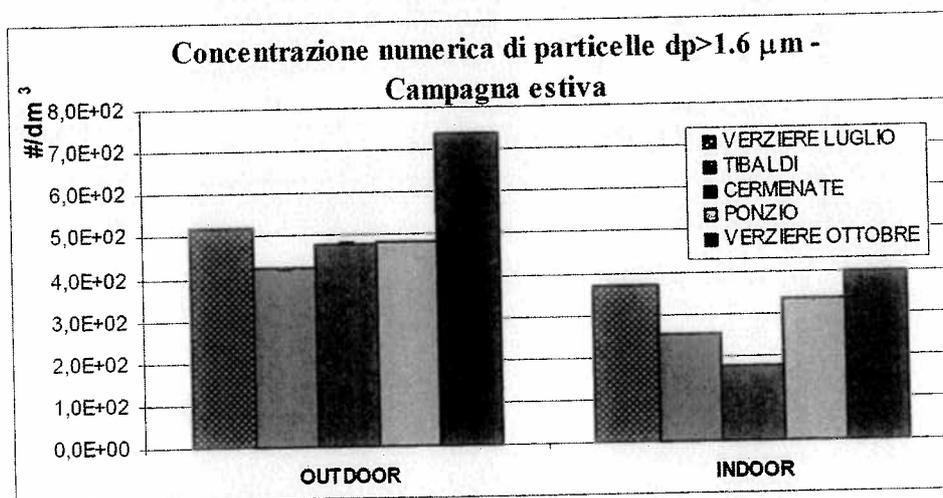


FIG. 14 Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con dp > 1.6 μm in ambiente outdoor e indoor, per la campagna estivo-autunnale.

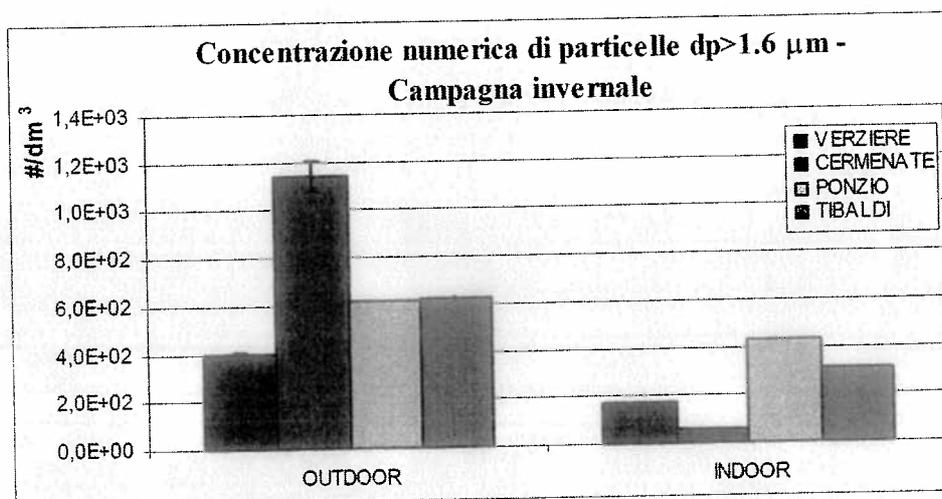


FIG. 15: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con dp tra 0.3 e 1.6 μm in ambiente outdoor e indoor, per la campagna invernale.

2.6 Campionatori personali

In tutti e 4 i siti di campionamento (Verziere, Tibaldi, Cermenate e Ponzio) sono state misurate le concentrazioni numeriche di particolato con contatore ottico di particelle portatile, in collaborazione con il personale della Polizia Locale. Due campionatori personali sono stati utilizzati ogni giorno da personale volontario della Polizia Locale durante il servizio, lungo due tragitti (A e B) solitamente percorsi durante le ore di servizio dagli agenti e definiti dall'Agenzia Mobilità Ambiente del Comune di Milano in accordo con la Polizia Municipale.

Nelle TABB. 8 e 9 vengono riportate la media delle concentrazioni numeriche e la deviazione standard della media delle stesse, inerenti i siti e le campagne di misura stagionali effettuate in ambiente outdoor e nei percorsi stabiliti, mediante i campionatori ottici personali.

In particolare la TAB. 8 mostra tali valori per particelle con un d_p da 0.3 a 1.6 μm e la TAB. 9 i valori per particelle con un $d_p > 1.6 \mu\text{m}$. I dati, sia per i campionatori personali che per il campionatore ottico fisso in outdoor nello stesso sito, si riferiscono al campionamento durante le ore lavorative, indicativamente dalle h 7.30 alle h. 19.30.

Unità di misura della concentrazione: # dm^{-3}		Diametro 0.3-1.6 μm								
		Verziere			Cermenate		Ponzio		Tibaldi	
		Estate 16-30/07/07	Autunno 1-15/10/07	Inverno 14-28/01/08	Estate 3-17/09/07	Inverno 28/01-11/02/08	Estate 17-30/09/07	Inverno 11-25/02/08	Estate 20/08-3/09/07	Inverno 25/02-10/03/08
Percorso A	Mean	76617	396810		106221		184449	668306	152623	336514
	mean st.dev	1806	2850		1353		2287	5805	2020	3431
Percorso B	Mean	81715	380641	313685	107701	304432	178415	662143	143954	334088
	mean st.dev	1935	2860	3307	1934	4074	2041	5949	1898	3182
Outdoor	Mean	51717	295298	319085	91462	302204	214049	584097	126090	310907
	mean st.dev	283	1704	2243	934	2405	1771	3935	870	2455

TAB. 8: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con d_p tra 0.3 e 1.6 μm in ambiente outdoor e per il campionamento personale.

Unità di misura della concentrazione: # dm^{-3}		Diametro >1.6 μm								
		Verziere			Cermenate		Ponzio		Tibaldi	
		Estate 16-30/07/07	Autunno 1-15/10/07	Inverno 14-28/01/08	Estate 3-17/09/07	Inverno 28/01-11/02/08	Estate 17-30/09/07	Inverno 11-25/02/08	Estate 20/08-3/09/07	Inverno 25/02-10/03/08
Percorso A	Mean	1063	1173		733		619	943	833	925
	mean st.dev	49	11		21		26	20	25	15
Percorso B	Mean	776	1061	671	581	884	545	802	874	887
	mean st.dev	16	10	10	8	47	9	26	16	14
Outdoor	Mean	472	774	469	445	459	476	627	428	623
	mean st.dev	2	4	3	3	3	3	3	3	6

TAB. 9: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$ in ambiente outdoor e per il campionamento personale.

Per ciascun sito di campionamento sono state confrontate le concentrazioni medie di particolato misurate lungo i percorsi e nel sito stesso in ambiente outdoor fisso.

Le concentrazioni misurate lungo i percorsi sono risultate in media superiori rispetto alle concentrazioni outdoor, sia per la concentrazione numerica per particelle con $d_p < 1.6 \mu\text{m}$ che per particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$.

Nelle FIGG. 16 e 17 vengono mostrate le concentrazioni numeriche per le suddette classi dimensionali in funzione del sito e del periodo di campionamento e del percorso effettuato; vengono inoltre mostrate anche le concentrazioni misurate nei corrispettivi ambienti outdoor.

Va precisato che un intasamento alla linea di prelievo dei campionatori personali relativi al percorso A effettuato presso i comandi di Verziere e Cermenate durante il periodo invernale, causato da un non corretto utilizzo dello strumento, ha determinato una perdita di accuratezza dei dati, per la maggior parte delle due campagne, che quindi non risultano rappresentativi dei 15 giorni complessivi. Tali dati, inseriti comunque nelle figure, non sono stati successivamente considerati nelle elaborazioni inerenti le sovraesposizioni lungo i percorsi stessi.

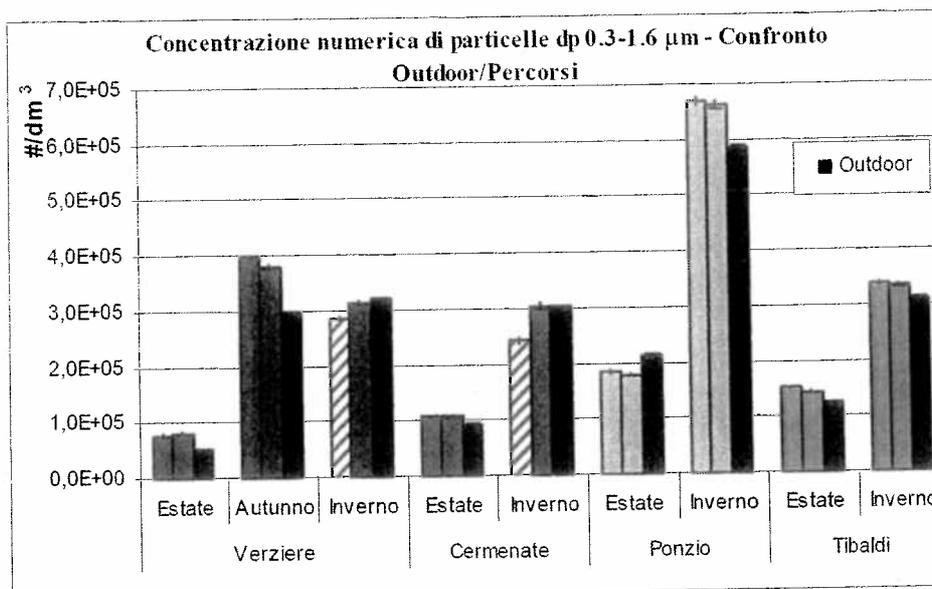


FIG. 16: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con d_p tra 0.3 e 1.6 μm in ambiente outdoor e lungo i percorsi, per tutti i dati inerenti le campagne estive-autunnali e invernali.

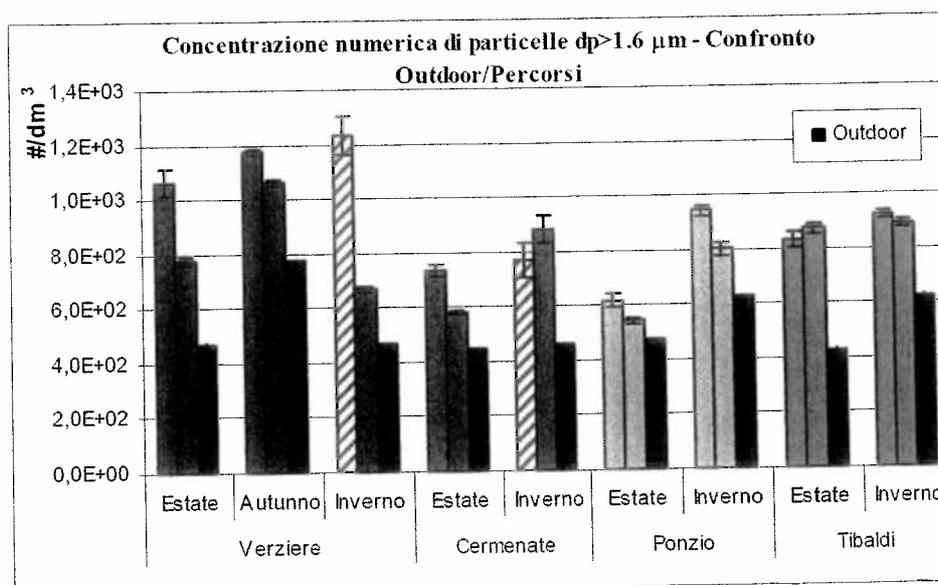


FIG. 17: Media e deviazione standard della media per la concentrazione numerica di particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$ in ambiente outdoor e lungo i percorsi, per tutti i dati inerenti le campagne estive-autunnali e invernali.

Come è possibile osservare dalle FIGG. 16 e 17, l'esposizione degli agenti lungo i percorsi di pattuglia scelti risulta normalmente maggiore rispetto all'esposizione che avrebbero in outdoor presso il comando di zona di appartenenza; tale fenomeno è evidente sia per le particelle appartenenti alla moda di accumulazione sia per quelle appartenenti alla moda dei nuclei giganti.

A partire dai valori di concentrazione è possibile calcolare la sovrapposizione media relativa a un percorso di pattuglia a Milano. In media la sovrapposizione per le particelle con d_p tra 0.3 e 1.6 μm è stata del $18 \pm 9\%$ e del $7 \pm 3\%$ rispettivamente in estate ed in inverno; per le particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$ la sovrapposizione media in estate ed in inverno è stata rispettivamente del $66 \pm 14\%$ e del $51 \pm 9\%$ (FIG. 18).

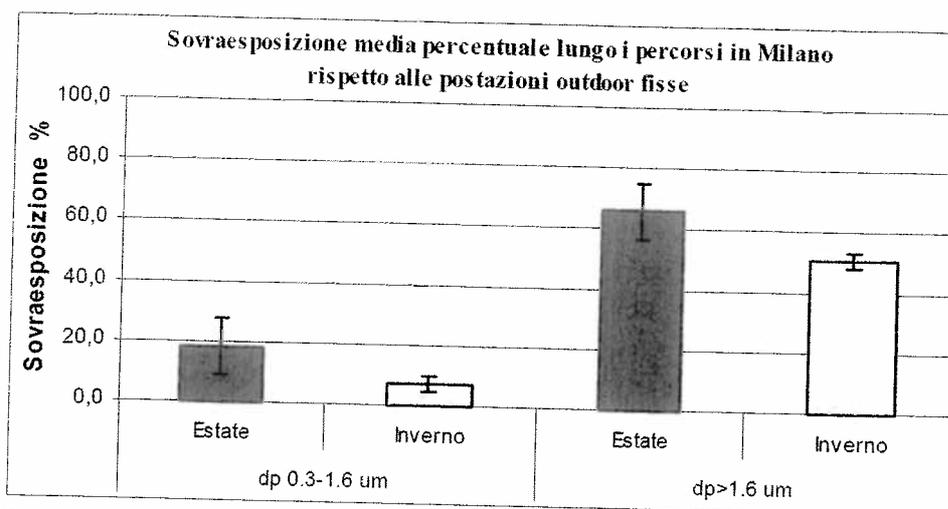


FIG. 18: Media e deviazione standard della media per la sovraesposizione della concentrazione numerica di particelle con d_p tra 0.3 e 1.6 μm e con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$ lungo i percorsi.

Questi valori riflettono un comportamento medio delle concentrazioni lungo i percorsi rispetto a quelle misurate nelle postazioni outdoor fisse lungo l'arco diurno lavorativo.

Al fine di quantificare la presenza di picchi acuti di esposizione lungo i percorsi di pattuglia sono stati considerati i dati dei contatori ottici di particelle con risoluzione al minuto.

E' stato calcolato un intervallo di confidenza mobile al 95% di probabilità attorno ai valori di concentrazione delle postazioni outdoor fisse per le due classi dimensionali; i valori misurati dai contatori ottici di particelle in dotazione agli agenti sono stati messi in sincronia temporale con quelli degli outdoor fissi e sono stati studiati i picchi acuti di esposizione lungo i percorsi rispetto alle concentrazioni rilevate presso vari comandi di zona. Nelle FIGG. 19 e 20 si riporta la percentuale di picchi acuti di esposizione rispetto al tempo totale di percorrenza dei percorsi e il rapporto delle concentrazioni di picco misurate lungo i percorsi rispetto alle concentrazioni misurate in outdoor presso i comandi di zona.

A partire da questi dati è possibile calcolare la sovraesposizione media a picchi di concentrazione rilevabili lungo un percorso di pattuglia a Milano. In media la sovraesposizione in termini di percentuale di numero picchi di esposizione per le particelle con d_p tra 0.3 e 1.6 μm è stata del $28 \pm 5\%$ e del $30 \pm 3\%$ rispettivamente in estate e in inverno; per le particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$ la sovraesposizione media in estate ed in inverno è stata rispettivamente del $26 \pm 3\%$ e del $25 \pm 1\%$. I rapporti di intensità medi durante le campagne estive e invernale sono stati di 1.56 ± 0.09 e 1.21 ± 0.04 per le particelle con d_p tra 0.3 e 1.6 μm , e di 2.32 ± 0.20 e 2.93 ± 0.83 per le particelle con $d_p > 1.6 \mu\text{m}$.

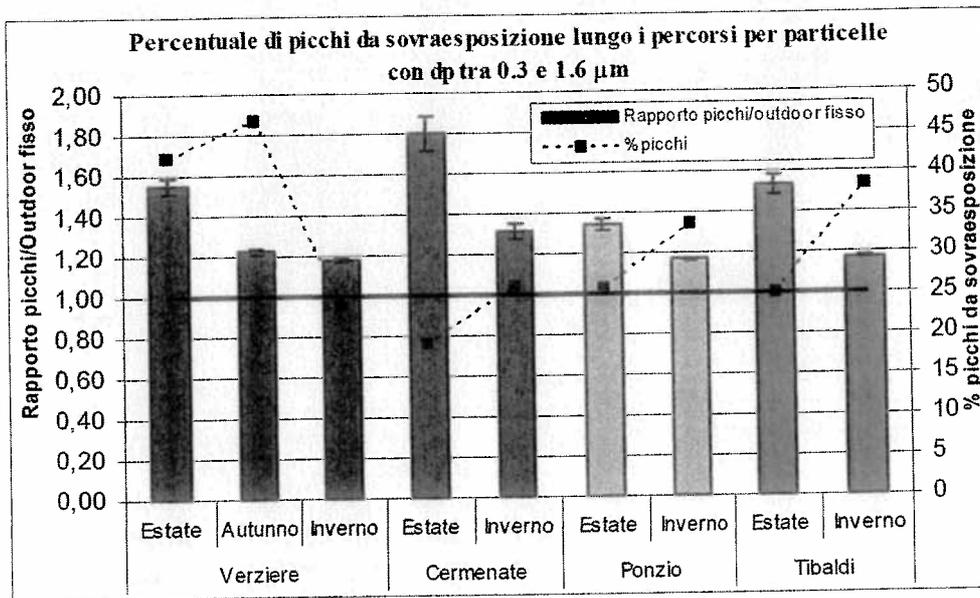


FIG. 19: Media e deviazione standard della media per la percentuale di picchi da sovraesposizione della concentrazione numerica di particelle con dp tra 0.3 e 1.6 μm lungo i percorsi; viene riportato anche il rapporto di intensità riferito alle concentrazioni misurate in outdoor presso i Comandi di Zona.

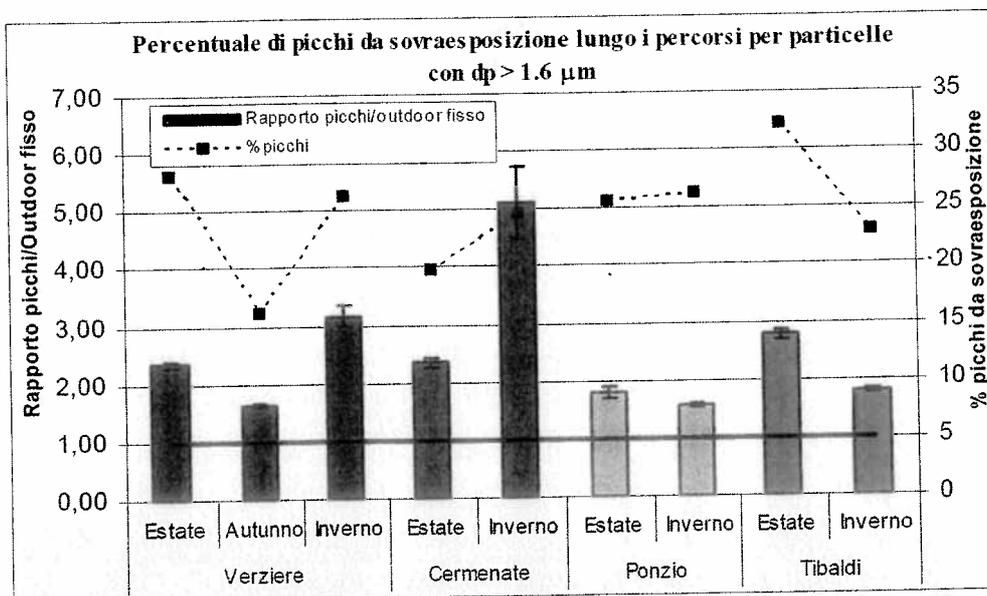


FIG. 20: Media e deviazione standard della media per la percentuale di picchi da sovraesposizione della concentrazione numerica di particelle con dp > 1.6 μm lungo i percorsi; viene riportato anche il rapporto di intensità riferito alle concentrazioni misurate in outdoor presso i Comandi di Zona.

3. SPECIAZIONE CHIMICO-FISICA DEI CAMPIONI DI PARTICOLATO FINE ATMOSFERICO RACCOLTI PER L'IDENTIFICAZIONE DEI PROFILI DI COMPOSIZIONE CHIMICA FINALIZZATI ALLA DEFINIZIONE DELLE COMPONENTI DI INTERESSE PER L'IMPATTO SULLA SALUTE

Sulla base delle analisi chimiche effettuate per gli ioni inorganici, gli idrocarburi policiclici aromatici e gli elementi, è stata ricostruita la composizione chimica caratteristica (% massa) per campioni di PM1 e PM2.5, indoor e outdoor, relativi alle campagne di misura estiva e invernale.

E' riportata la % rispetto alla massa totale di PM1 e PM2.5 per ioni (FIG. 21), IPA (FIG. 22) ed elementi (FIG. 23). Sono riportati i valori medi (e deviazione standard media) per i campioni di PM1 e PM2.5 indoor e outdoor, divisi per campagna estivo-autunnale ed invernale.

I risultati relativi agli ioni inorganici (FIG. 21) indicano:

- una diversa composizione chimica del PM indoor rispetto all'outdoor, con una minore presenza di ioni inorganici nei campioni indoor. Questo risulta particolarmente evidente per la campagna estivo-autunnale;
- una diversa composizione chimica del PM indoor per la stagione estivo-autunnale rispetto a quella invernale. In ambiente indoor la % di ioni inorganici rispetto alla massa totale di PM è inferiore per la stagione estivo-autunnale (per il PM1: 27% rispetto a 36%; per il PM2.5: 30% rispetto a 42%). In ambiente outdoor i valori si mantengono mediamente costanti in estate ed inverno, con gli ioni inorganici che spiegano rispettivamente il 43-44% della massa di PM1 e il 50% della massa di PM2.5.

I risultati relativi agli idrocarburi policiclici aromatici (FIG. 22) indicano:

- una diversa composizione chimica del PM estivo-autunnale rispetto a quello invernale, sia in ambiente indoor che outdoor. I valori invernali (0.040-0.056%) sono 4-7 volte maggiori rispetto a quelli estivo-autunnali (0.008-0.011%).

I risultati relativi agli elementi (FIG. 23) indicano:

- una diversa composizione chimica del PM indoor rispetto all'outdoor, con una maggiore presenza di elementi nei campioni di PM in ambiente indoor rispetto all'outdoor, sia durante la campagna estivo-autunnale che invernale.

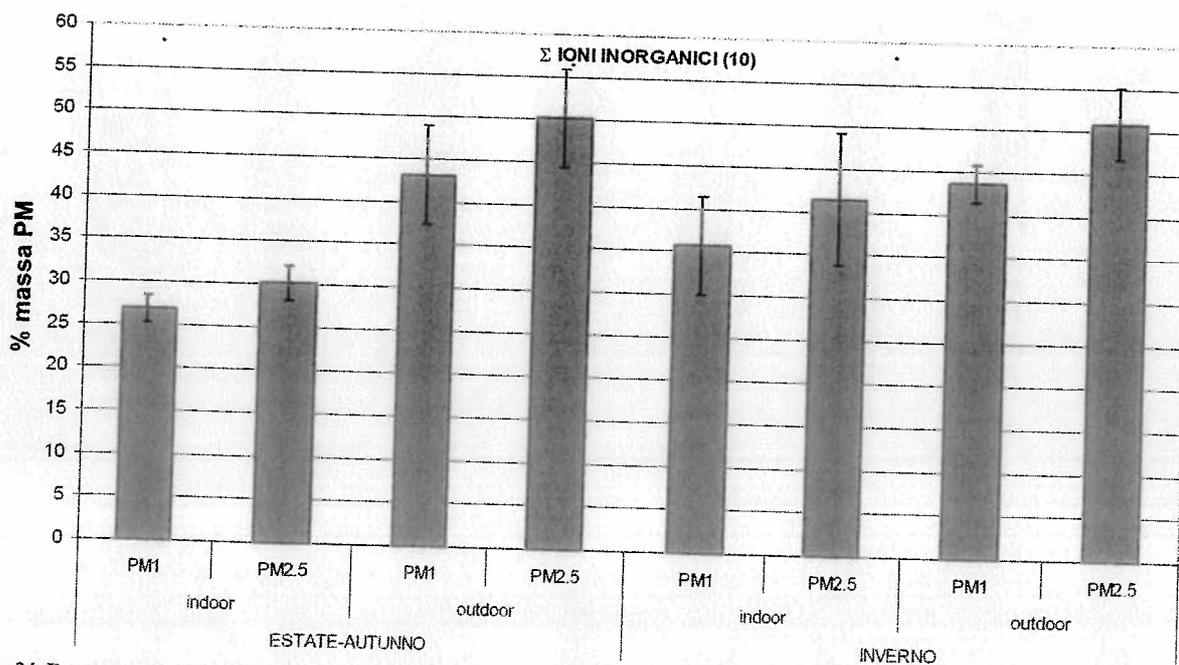


FIG. 21 Rapporto in massa ($\mu\text{g}/\mu\text{g} \%$) di ioni inorganici ($\Sigma 10 = \text{F}^-, \text{Cl}^-, \text{NO}_3^-, \text{PO}_4^{3-}, \text{SO}_4^{2-}, \text{Na}^+, \text{NH}_4^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$) in campioni di PM1 e PM2.5, relativi al campionamento indoor e outdoor, durante le campagne di rilevamento estivo-autunnali ed invernali.

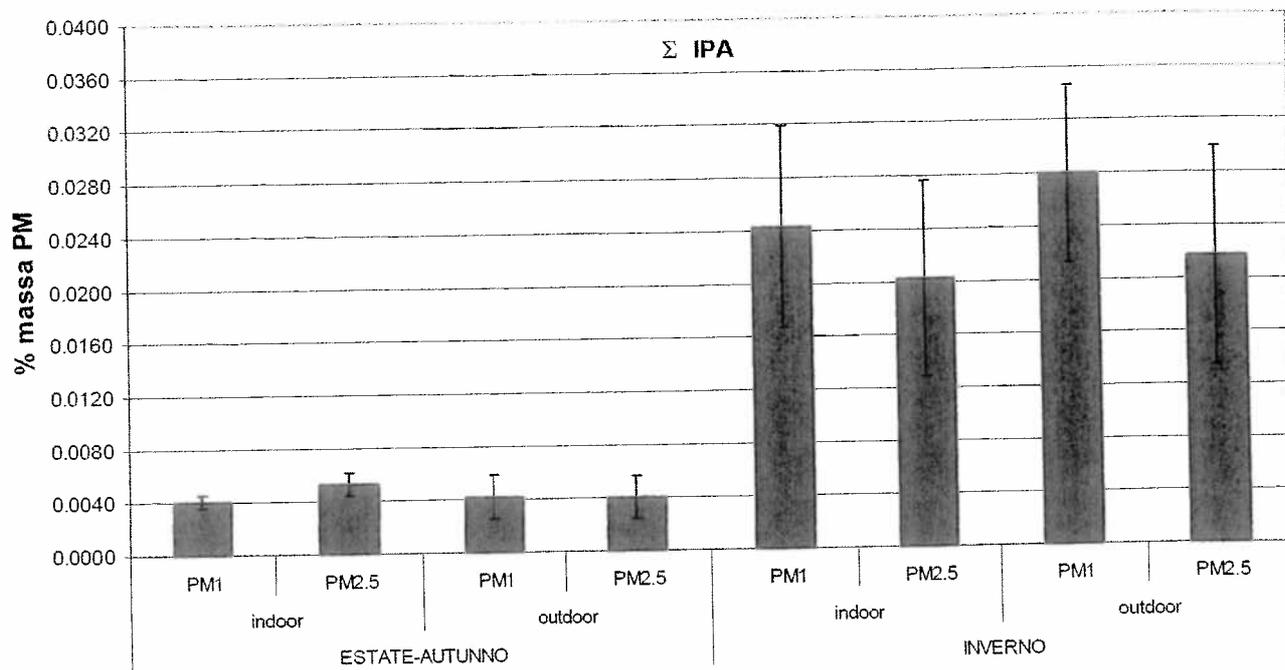


FIG. 22 Rapporto in massa ($\mu\text{g}/\mu\text{g} \%$) di idrocarburi policiclici aromatici ($\Sigma 10 = \text{BaA, Cr, BeP, Bb+jF, BkF, BaP, dBahA, BghiP, IcdP}$) in campioni di PM1 e PM2.5, relativi al campionamento indoor e outdoor, durante le campagne di rilevamento estivo-autunnali ed invernali.

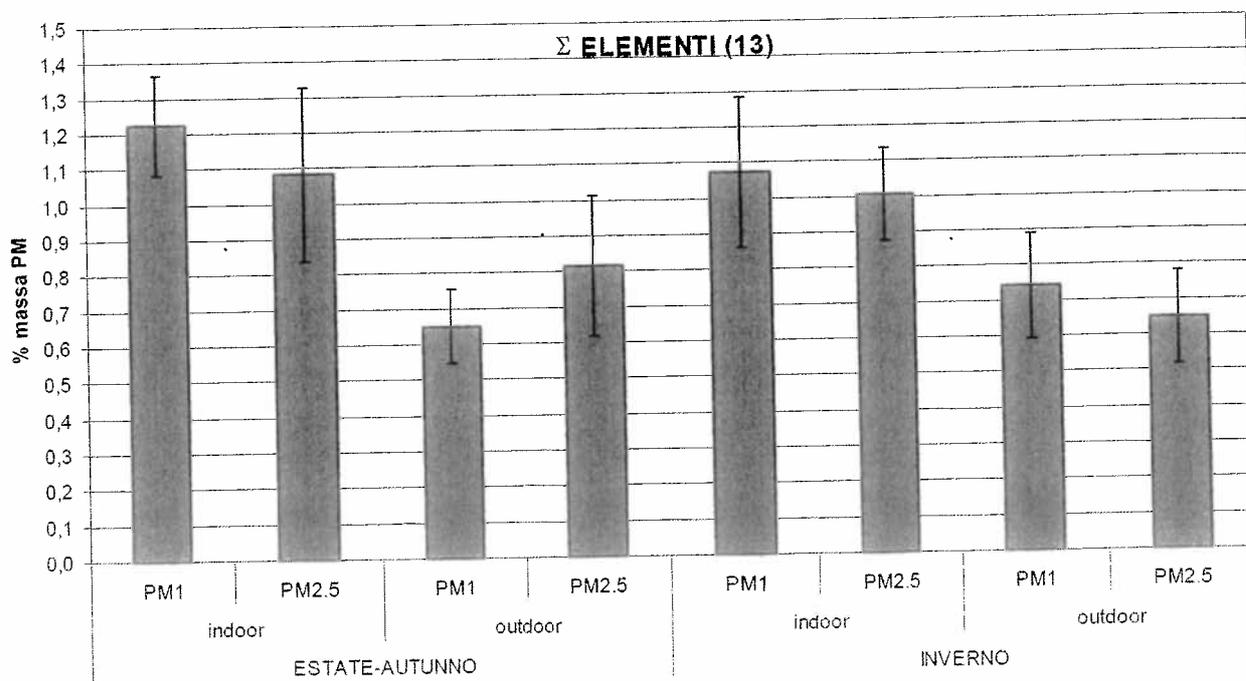


FIG. 23 Rapporto in massa ($\mu\text{g}/\mu\text{g} \%$) di elementi ($\Sigma 13 = \text{Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn}$) in campioni di PM1 e PM2.5, relativi al campionamento indoor e outdoor, durante le campagne di rilevamento estivo-autunnali ed invernali.

Riassumendo le principali informazioni derivanti dalla caratterizzazione chimica effettuata sono le seguenti:

- i campioni di PM1 e PM2.5 in ambiente indoor e outdoor si differenziano per un diverso contenuto in ioni inorganici solubili ed elementi, con un trend opposto: il particolato fine PM1 e PM2.5 in ambiente indoor è caratterizzato da una minore presenza di ioni inorganici solubili e da una maggiore presenza di elementi rispetto al particolato fine outdoor.
- ci sono delle differenze stagionali, relative al periodo estivo-autunnale rispetto ai mesi invernali. In particolare la differenza più rilevante è legata al diverso contenuto in idrocarburi policiclici aromatici, elevato durante la stagione invernale.

Nelle FIGG. 24, 25 e 26 sono riportati i dati di composizione chimica di PM1 e PM2.5 per i diversi siti di campionamento.

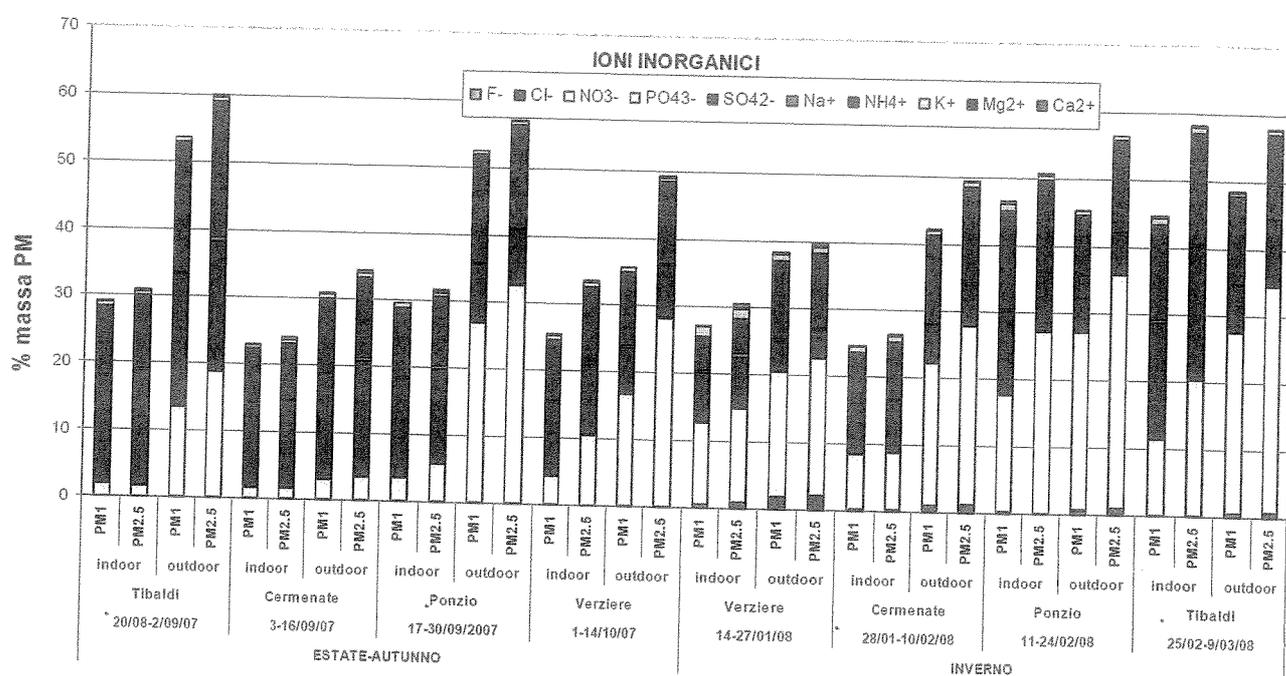


FIG. 24 Rapporto in massa ($\mu\text{g}/\mu\text{g} \%$) di ioni inorganici ($\Sigma 10 = \text{F}^-, \text{Cl}^-, \text{NO}_3^-, \text{PO}_4^{3-}, \text{SO}_4^{2-}, \text{Na}^+, \text{NH}_4^+, \text{K}^+, \text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$) in campioni di PM1 e PM2.5 nei diversi siti di campionamento, durante le campagne di rilevamento estivo-autunnali ed invernali.

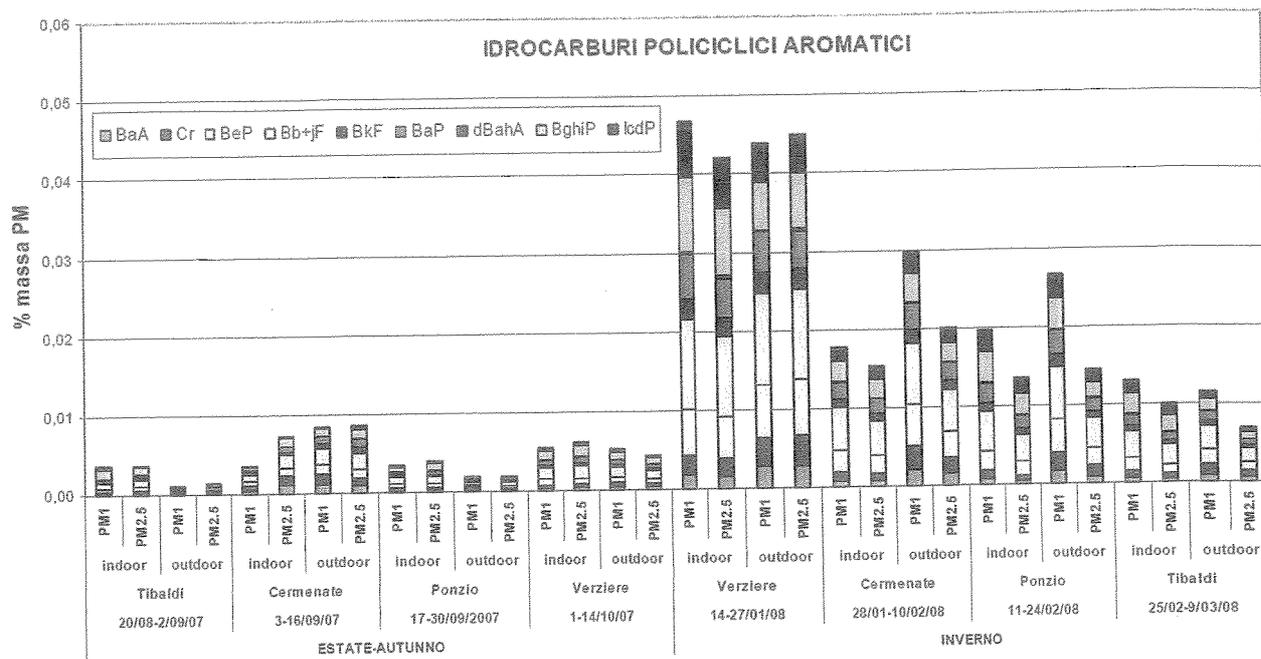


FIG. 25 Rapporto in massa ($\mu\text{g}/\mu\text{g} \%$) di idrocarburi policiclici aromatici ($\Sigma 10 = \text{BaA, Cr, BeP, Bb+jF, BkF, BaP, dBahA, BghiP, IcdP}$) in campioni di PM1 e PM2.5 nei diversi siti di campionamento, durante le campagne di rilevamento estivo-autunnali ed invernali.

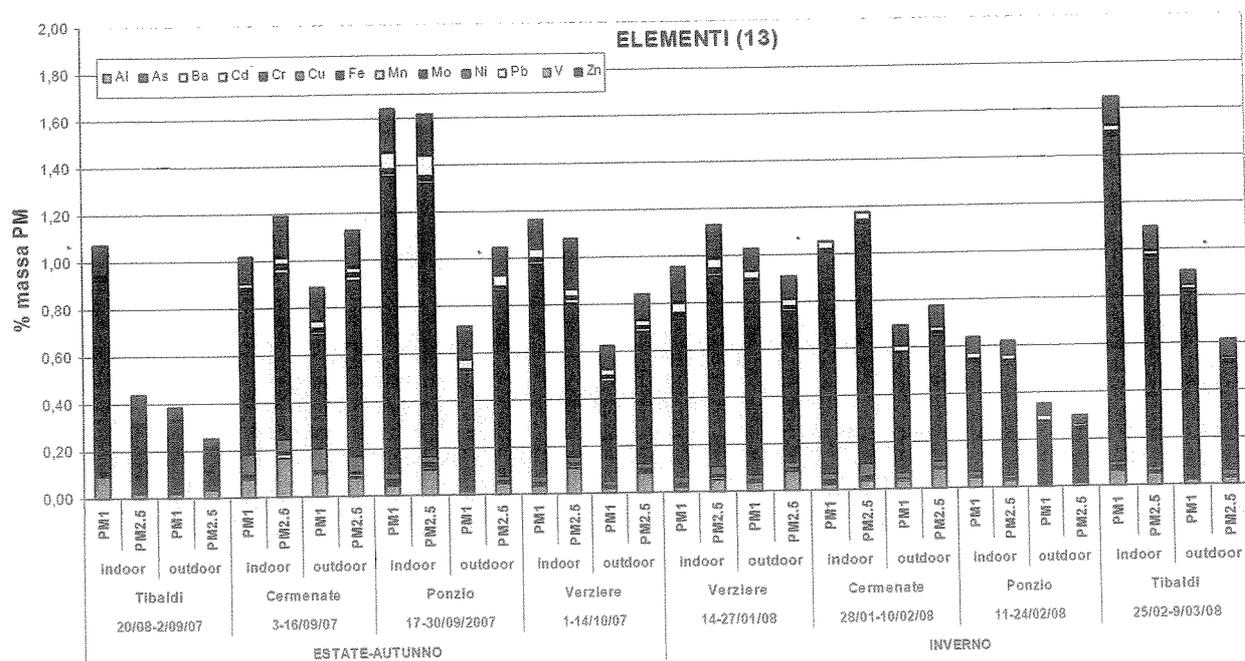


FIG. 26 Rapporto in massa ($\mu\text{g}/\mu\text{g} \%$) di elementi ($\Sigma 13 = \text{Al, As, Ba, Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, V, Zn}$) in campioni di PM1 e PM2.5 nei diversi siti di campionamento, durante le campagne di rilevamento estivo-autunnali ed invernali.

4. ANALISI PER LA DETERMINAZIONE IN VITRO DELLA TOSSICITÀ DEL PM2.5 E DEL PM1 SULLA LINEA CELLULARE POLMONARE UMANA DI RIFERIMENTO (A549) FINALIZZATA ALLA DEFINIZIONE DI MARKERS DI TOSSICITÀ E GENOTOSSICITÀ PER L'UOMO

4.1 Introduzione

Per quanto riguarda gli effetti sull'apparato respiratorio, un valido aiuto alla comprensione dei meccanismi d'azione di PM fine deriva dagli studi sui sistemi *in vitro*, che rappresentano un buon modello che simula l'apparato respiratorio, in quanto queste linee cellulari sono cellule immortalizzate simili a quelle degli alveoli polmonari (linea A549) e sono utilizzate da tutti i laboratori che effettuano ricerche inerenti l'esposizione delle vie respiratorie a particolato.

La linea cellulare A549 è riconosciuta nella comunità scientifica internazionale come modello dell'epitelio alveolare polmonare umano sia per studi di tossicità che per studi farmacologici. E' acquistabile da banche per le linee cellulari ufficiali (in Europa e USA, si veda www.atcc.org) a cui fanno riferimento tutte le ricerche di livello condotte per valutare gli effetti di inquinanti atmosferici sulla salute umana.

In questo studio la linea cellulare polmonare umana A549 è stata utilizzata per la valutazione di esposizione a PM2.5 e PM1 nei siti scelti per i campionamenti effettuati.

In ognuno dei siti sono stati raccolti campioni di PM1 e PM2.5 sia in ambiente indoor che outdoor, e processato in base a quanto descritto nel paragrafo 4.2 'Materiali e metodi'.

I parametri analizzati sono stati (TAB.10):

- la vitalità cellulare mediante MTT, che misura l'attività metabolica delle cellule,
- la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS),
- l'espressione di IL-6 e IL-8, e il TNF- α che sono indice di processi infiammatori,
- il danno al DNA tramite il test Comet Assay.

PARAMETRI CONSIDERATI	EFFETTI SUI SISTEMI IN VITRO	BIOMARKER UTILIZZATI
a) Vitalità cellulare	Modificazione del metabolismo	test di vitalità cellulare (MTT)
b) Stress ossidativo	Formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS - <i>Reactive Oxygen Species</i>)	analisi in fluorescenza
c) Risposte infiammatorie	Produzione di citochine	IL-6, IL-8, TNF- α
d) Genotossicità	Rotture al DNA	Comet Assay

TAB 10 Analisi Tossicologiche realizzate sul particolato campionato

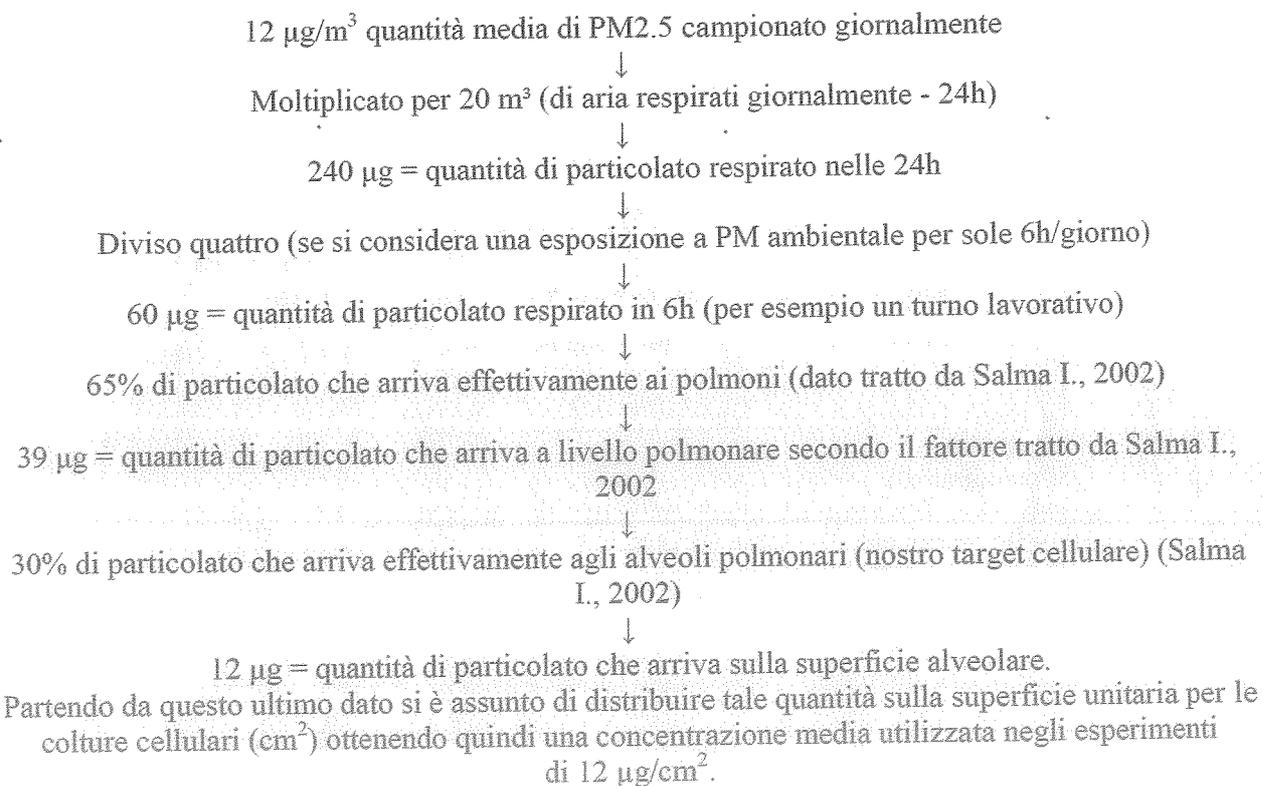
4.2 Materiali e metodi

Estrazione del particolato per le analisi biologiche: Le particelle depositate sui filtri sono staccate mediante sonicazione in un bagnetto ad ultrasuoni ad elevata potenza (SONICA® Soltec): ogni filtro viene sonicato 4 volte con 2 ml di acqua sterile per 20 – 25 minuti. Ad ogni nuova sonicazione i 2 ml di acqua sterile vengono raccolti e rinnovati con altri 2 ml. Alla fine del ciclo di sonicazione si ottiene una sospensione del particolato precedentemente su filtro di Teflon. Questa sospensione è stata suddivisa in *eppendorf* da 1 ml e posta ad essiccare mediante un essiccatore con un gel di silice sotto vuoto. Le *eppendorf* sono state pesate prima (tara) e dopo l'essiccazione, per quantificare la resa di PM. Con questo procedimento è stata ottenuta una resa di estrazione del 70 - 80%.

Mantenimento delle colture cellulari: le cellule della linea A549 sono state mantenute in terreno Opti-Mem (Invitrogen) addizionato con 10% siero fetale bovino e 1% penicillina/streptomicina. Le cellule sono state mantenute in incubatore a 37 °C e 5% di CO₂ (Zucco e Bianchi, 1994).

Trattamento con particolato: Le cellule sono state esposte a concentrazioni crescenti di PM campionato nei quattro siti previsti dal progetto. Le concentrazioni utilizzate sono state rispettivamente pari a 1, 6 e 12 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, per tutte le valutazioni effettuate ad eccezione dei campioni trattati con PM2.5 outdoor, per i quali si sono usate concentrazioni di 1, 12 e 25 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Queste dosi sono state calcolate considerando la quantità media ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) di particolato campionato nell'area urbana milanese in 24 h e il volume di aria in media respirata comunemente al giorno (20 m³). È stata quindi determinata la quantità di particolato che viene inalata per ogni turno lavorativo di 6 h, tenendo anche conto dei modelli di deposizione del particolato sull'epitelio polmonare presenti in bibliografia (Oberdörster G. et al., 2005; Salma et al., 2002) per cui solo una piccola parte del particolato inalato, arriva effettivamente a livello degli alveoli polmonari.

Si riporta nel seguito come esempio il calcolo della deposizione di particolato a livello alveolare partendo da una concentrazione ipotetica di 12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ di PM2.5.



4.3 Vitalità cellulare

Il parametro vitalità cellulare ha un importante significato in quanto indica la % di cellule danneggiate. Se la % è pari o supera il 50% viene indicato come IC50 e corrisponde al parametro di LC50 (*Lethal Concentration*) dei sistemi in vivo. Il parametro ha molte metodologie di misura, la più significativa è il test MTT che si basa sulla riduzione cellulare di sali di tetrazolio, che evidenziano nelle cellule vitali un precipitato rosso cupo (Carmichael et al., 1987).

4.3.1. Metodo di analisi

La vitalità cellulare è stata misurata mediante saggio metabolico MTT, un test colorimetrico quantitativo che consente di stimare l'attività mitocondriale. L'MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolio bromide) è un sale di colore giallo che attraversa la membrana plasmatica e viene convertito dall'enzima mitocondriale succinato deidrogenasi, nelle cellule metabolicamente attive, in sali di formazano insolubili di colore viola. I cristalli di formazano vengono quindi solubilizzati con DMSO e l'assorbanza della soluzione colorata è misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 570 nm. La misura della concentrazione di formazano è un parametro indicativo dell'efficienza metabolica e quindi della vitalità delle cellule. L'MTT test risulta un metodo valido per gli studi citotossicologici: consente di stimare la riduzione di vitalità che si osserva a seguito del trattamento dell'agente citotossico (Carmichael J. et al., 1987; Wendy Hsiao W.L et al., 2000).

4.3.2. Principali risultati

- La vitalità cellulare a 24 ore di trattamento subisce una riduzione dose dipendente, ossia diminuisce parallelamente alle dosi utilizzate.
- In estate la riduzione di vitalità alle dosi più elevate raggiunge valori superiori al 30%, mentre in inverno si mantiene sempre al di sotto di tale percentuale.
- In nessuno dei siti campionati, né nella stagione estiva né in quella invernale, la composizione del particolato campionato induce una diminuzione di vitalità cellulare pari al 50%, ciò significa che non viene raggiunta la soglia di tossicità acuta (IC 50).
- Non risultano differenze statisticamente significative nella diminuzione di vitalità cellulare tra i diversi siti campionati né nella campagna estiva, né in quella invernale.
- Non si sono riscontrate differenze tra indoor e outdoor nella stagione estiva, mentre nella stagione invernale risulta diminuita la vitalità in ambienti indoor. Questo risultato ha indotto a ipotizzare la presenza di fumatori o di particolari sorgenti di calore negli uffici di cui non si è potuto ottenere riscontro.
- L'analisi di correlazione tra composizione chimica ed effetti biologici condotta nello studio ha evidenziato una correlazione diretta tra incremento di vitalità ed un maggior peso, nel PM, degli ioni. Sulla base di tali risultati si può ipotizzare che il decremento della vitalità cellulare sia imputabile ad un incremento del rapporto in peso del particolato analizzato della parte organica e dei metalli, come conseguenza di una minore presenza di ioni (Mg, Ca, Cl, K, Na).

In FIG. 27 si riportano, come esempio, i risultati del test riferiti alla campagna estiva svolta presso il sito di Ponzio nel periodo estivo.

4.4 Stress Ossidativo

Il parametro stress ossidativo è stato analizzato mediante la valutazione della formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS - *Reactive Oxygen Species*). Queste ultime sono prodotte nelle cellule da metalli di transizione e da altre specie chimiche presenti in atmosfera. La formazione di ROS come risposta a inquinanti atmosferici può essere responsabile sia di risposte infiammatorie, che si manifestano con un possibile aumento del fattore tumorigenico di necrosi (TNF- α) e delle citochine proinfiammatorie (IL-6 e IL-8), sia di interazioni con le principali macromolecole della cellula (fosfolipidi, DNA e proteine).

Le specie reattive dell'ossigeno (ROS) sono responsabili di processi biologici negativi in quanto sono una delle prime risposte ai meccanismi di tossicità scatenati sia dalle frazioni solubili di PM (metalli di transizione) sia da quella organica insolubile. La valutazione di espressione di ROS in linee cellulari polmonari umane trattate con PM risulta quindi un ottimo marker di tossicità e un test importante per la valutazione dell'esposizione (Zhang et al., 1998; Don Porto Carero et al., 2001; Hetland et al., 2001; Li et al., 2003).

4.4.1. Metodo di analisi

Come si è detto il parametro stress ossidativo è stato analizzato mediante la valutazione della formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS - *Reactive Oxygen Species*). L'espressione di ROS è stata valutata qualitativamente mediante analisi in fluorescenza.

Le cellule sono state trattate con PM1 e PM2,5 indoor e outdoor a concentrazioni crescenti. Alla scadenza delle 3 ore di trattamento le cellule sono state lavate con PBS sterile e trattate con fluoresceina di acetato (DCFHDA) a concentrazione 20 μ M. Segue incubazione al buio per 15 minuti.

Dopo due lavaggi con PBS non sterile, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% per 15 minuti al buio. I campioni sono stati infine analizzati sotto microscopio a fluorescenza Axioplan Zeiss con obiettivo 63x. Le informazioni qualitative sulla formazione di ROS sono state acquisite mediante videocamera dedicata.

4.4.2. Principali risultati

- I risultati evidenziano in tutti i siti un sensibile aumento di spot fluorescenti per entrambe le tipologie di PM utilizzato (PM1 e PM2.5), pertanto la produzione di ROS è risultato evento rilevante.
- La produzione di ROS è risultata inoltre 'dose dipendente', in quanto il numero di spot fluorescenti aumenta parallelamente alla dose utilizzata nel trattamento del campione.
- La formazione di ROS può essere correlata sia ai metalli presenti sul particolato atmosferico, che promuovono la formazione di ROS attraverso reazioni ossido riduttive, sia alla componente organica, soprattutto composti come i chinoni, che possono reagire a formare specie radicaliche. Nel corso del presente studio non è stato possibile determinare una componente principale che possa influenzare questo parametro avendolo potuto valutare solo in termini qualitativi. Ciononostante le differenze segnalate per alcuni siti sono correlabili alle variazioni degli elementi chimici, soprattutto ai metalli presenti.

In FIG 28 si riportano, quale esempio, i risultati relativi alla campagna estiva presso il sito di Tibaldi.

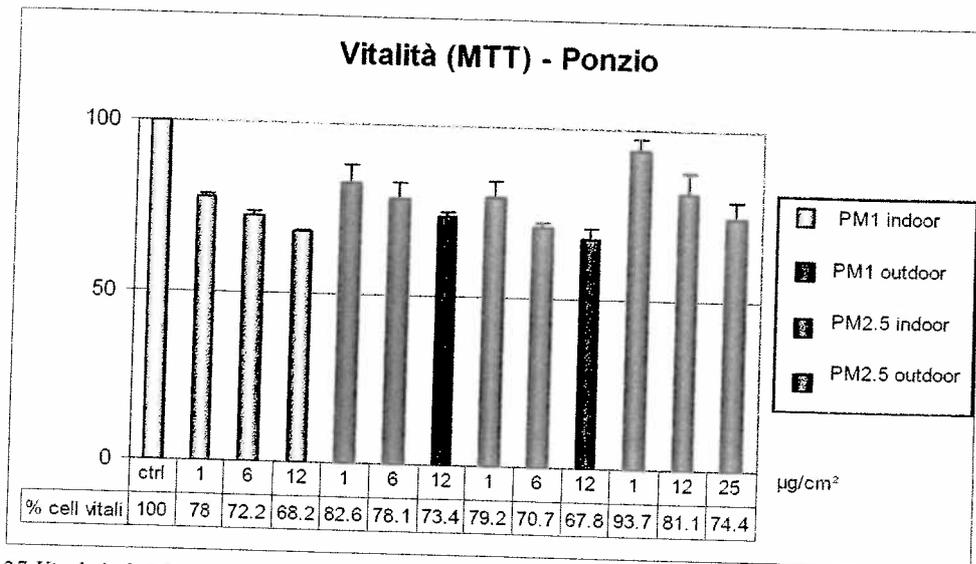


FIG. 27 Vitalità di PM2.5 e PM1 sulla linea A549 alle dosi indicate nel sito di Ponzio, campagna estiva

Tibaldi

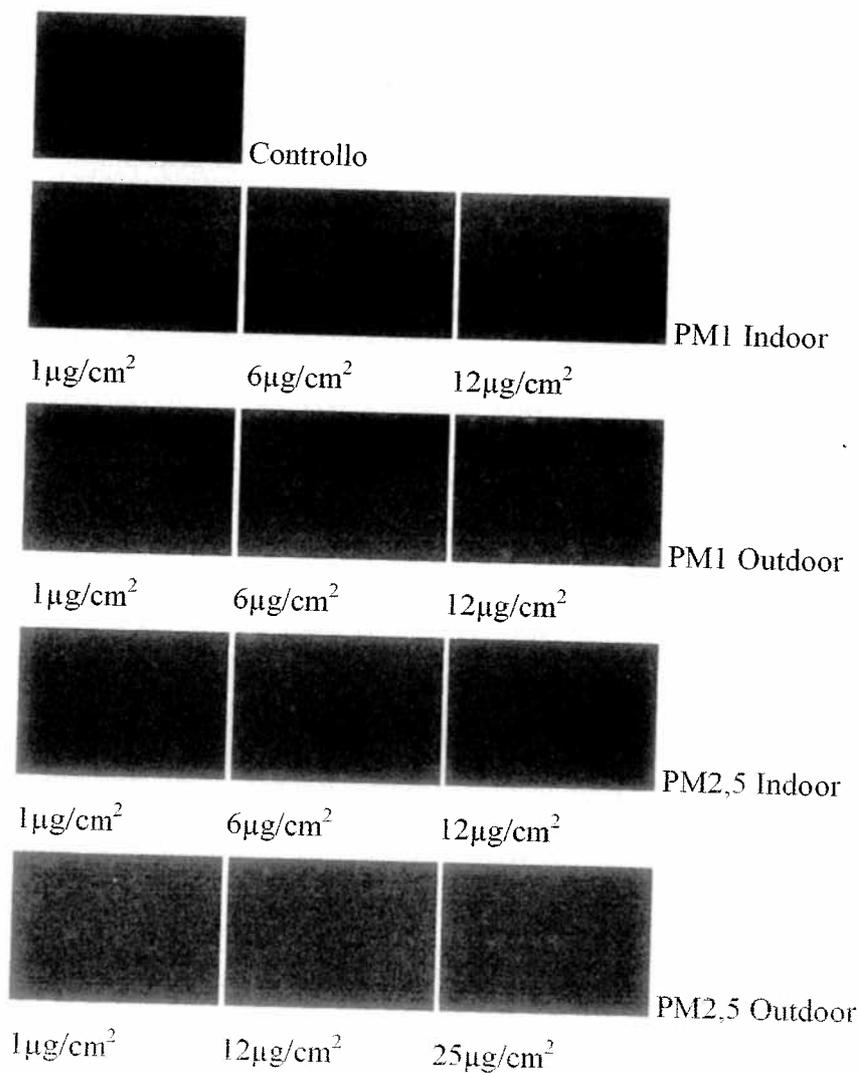


FIG. 28
Formazione di ROS in cellule A549 esposte a PM1 e PM2,5 indoor/outdoor campionati nel sito di Tibaldi, campagna estiva

4.5 Risposte infiammatorie

La produzione di specifici mediatori biochimici del processo infiammatorio è stata valutata mediante la quantificazione delle citochine. Queste ultime sono molecole proteiche, prodotte da vari tipi di cellule e secrete nel mezzo circostante in risposta ad uno stimolo, in grado di modificare il comportamento di altre cellule inducendo nuove attività come crescita, differenziamento e morte. La loro azione è locale, ma a volte le risposte coinvolgono l'intero organismo. Le citochine possono quindi avere un effetto autocrino (modificando il comportamento della stessa cellula che l'ha secreta) o paracrino (modificano il comportamento di cellule adiacenti). Alcune citochine possono invece agire in modo endocrino, modificando cioè il comportamento di cellule molto distanti da loro. L'espressione di IL-6, IL-8 e TNF- α viene misurata con la tecnica ELISA (Hetland et al., 2004; Lequin, 2005) e rappresenta un buon marker di individuazione di risposte infiammatorie.

4.5.1. Metodo di analisi

La produzione delle citochine di interesse (IL-6, IL-8 e TNF- α) è stata valutata tramite la metodica ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). Il protocollo impiegato per la preparazione e la lettura delle lastre è stato quello dettato dalla casa produttrice R&D Systems Inc. Le specifiche del protocollo sono riportate sul sito www.rndsystems.com nella sezione ELISA/Assay kits. La lettura delle piastre è avvenuta mediante Thermo Scientific Multiplate Reader che ha permesso la quantificazione delle proteine oggetto di studio.

4.5.2. Principali risultati

- L'espressione di fattori di infiammazione IL-6 e TNF- α in cellule A549 trattate con PM1 e PM2,5 campionato (indoor e outdoor) nei diversi siti non mostra differenze statisticamente significative¹ rispetto ai controlli, sia in estate che in inverno.
- In estate l'IL-8 risulta più espressa rispetto ai controlli per le due tipologie di particolato (PM1, PM2,5), sia in indoor che in outdoor, ma l'aumento non è significativo se non alle dosi più elevate.
- In inverno la produzione di IL-8 presenta significative differenze rispetto ai controlli, risulta dose dipendente e può essere direttamente correlata alla presenza di metalli (Cd, Zn, Mn, Al) presenti nel PM.

Si riportano, quale esempio, i risultati (FIG. 29) relativi alla produzione delle citochine di interesse (IL-6, IL-8 e TNF- α) per il sito di Verziere nella campagna estiva.

¹ Un valore 'non significativo' per le risposte biologiche è una variazione del dato inferiore al 10%. Al di sopra di questa soglia, oltre alla differenza tra i valori medi, è necessario valutare la distribuzione dei dati e la eventuale sovrapposizione delle barre di errore, che esclude l'esistenza di una differenza statisticamente significativa.

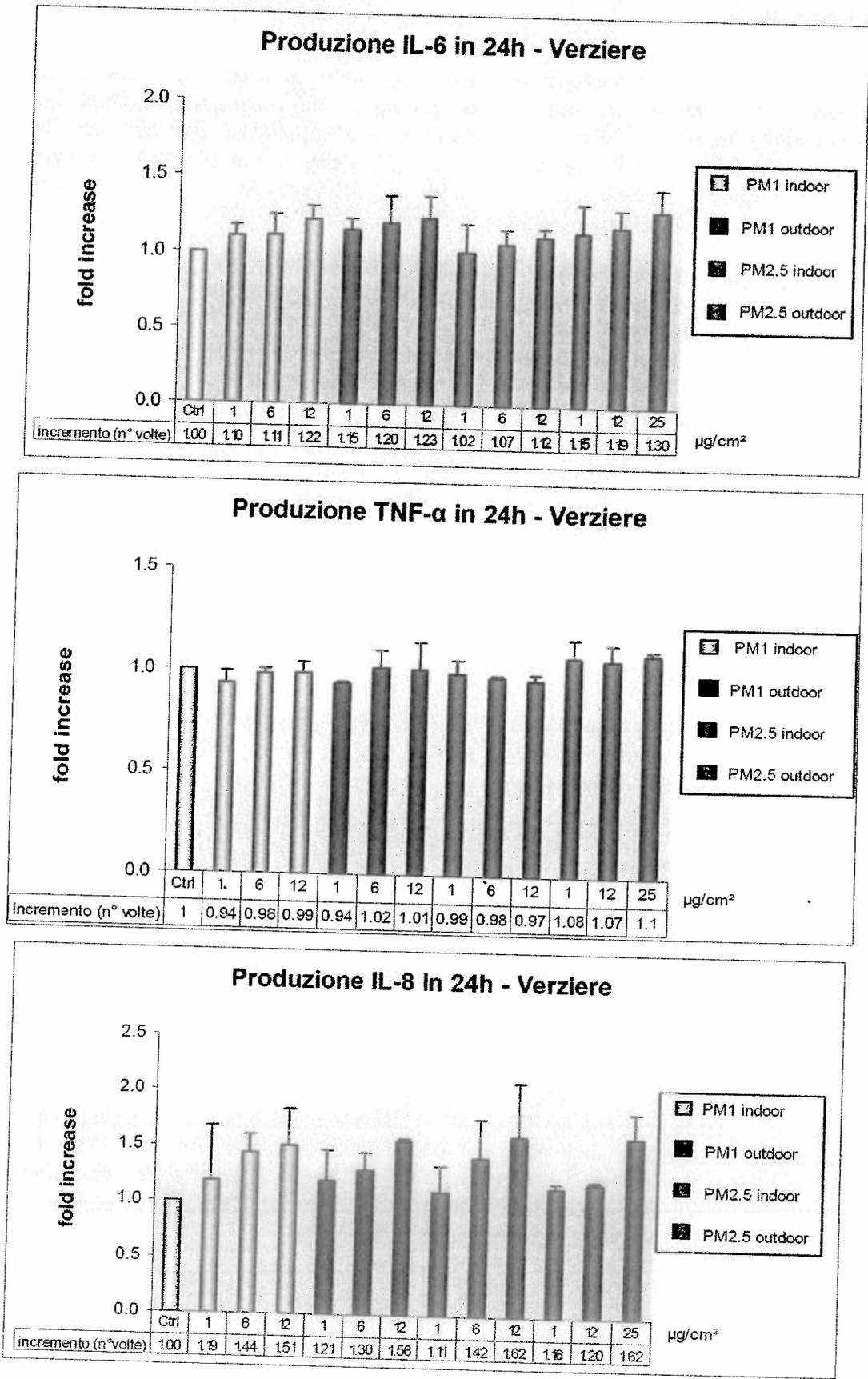


FIG. 29 Espressione di IL-6, TNF- α , e IL-8 in A549 per PM2.5 e PM1 nel sito di Verziere, campagna estiva

4.6 Genotossicità

Il danno al DNA è correlato a diverse componenti normalmente presenti nel particolato atmosferico: la componente organica, ad esempio, può interagire direttamente con questa macromolecola formando addotti, intercalandosi o sostituendosi alle basi del DNA. Tuttavia molecole inorganiche, quali i metalli, possono provocare danno al DNA interagendo in modo indiretto con questo, incrementando il livello di ROS intracellulari. I radicali liberi reagiscono difatti con le molecole in grado di donare elettroni e il DNA con suoi doppi legami è un target primario.

Per la valutazione del danno al DNA è stato utilizzato il test *Comet Assay*. Tale test viene utilizzato per valutare le rotture a singola e doppia elica del DNA e trova molteplici settori di applicazione, in quanto, oltre a un monitoraggio su sistemi *in vivo* e *in vitro* di danno al DNA, consente di verificare l'esistenza di possibili meccanismi di riparo (Calini et al., 2002; Gualtieri et al., 2004).

Il campo principale di applicazione del test, nella sua versione alcalina, è sicuramente quello della tossicologia genetica: numerosi studi *in vivo* e *in vitro* hanno utilizzato questa tecnica per l'identificazione dell'attività genotossica di un vasto numero di composti, utilizzando differenti linee cellulari (Wasson et al., 2008; Zhang et al., 2007; Gualtieri et al., 2004; Calini et al., 2002).

Si è realizzata un'analisi statistica dei valori di danno al DNA, in quanto sebbene il numero di cellule danneggiate sia un parametro di evidente importanza, è di grande importanza anche la valutazione dell'entità del danno in seguito a esposizione alle classi di PM. Pertanto è stato valutato il parametro "momento della cometa", che permette di quantificare il danno di ogni singola cellula.

4.6.1. Metodo di analisi

Per la valutazione del danno al DNA è stato utilizzato il test *Comet Assay* in versione alcalina seguendo il protocollo di Singh (Singh et al., 1988). Brevemente, le cellule vengono scongelate e sottoposte a vari passaggi:

- inclusione in agarosio
- lisi cellulare
- srotolamento del DNA
- elettroforesi
- neutralizzazione
- colorazione
- osservazione al microscopio a fluorescenza e analisi dei risultati
- determinazione del momento della cometa.

Tale test rappresenta un valido screening per gli effetti delle componenti del PM. Nella FIG. 30 sono rappresentate le immagini che corrispondono a una cellula controllo senza danni e conseguente frammentazione del DNA (A), cellula esposta alla dose $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di PM_{2.5}, dove è evidente la frammentazione di parte del DNA (B) e cellula trattata con $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ dello stesso composto, dove la frammentazione del DNA è maggiore e origina una coda lunga e ricca di frammenti (C). Si ottengono quindi immagini simili alle comete astronomiche. Da questa somiglianza deriva il nome dato comunemente a questo test.



FIG. 30 : Aspetto di cellula con DNA integro (A), parzialmente frammentato (B), con ingenti danni (C)

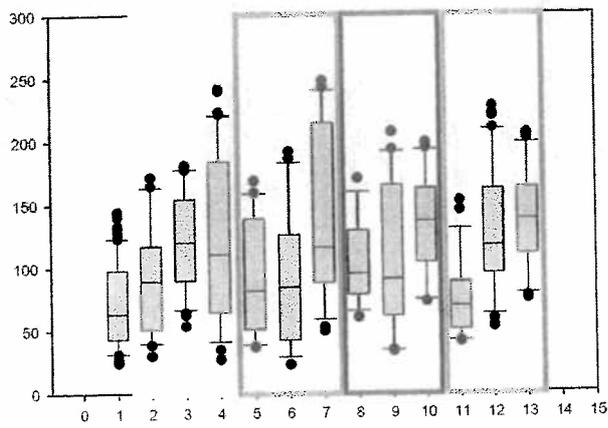
Nella FIG. 31 sono riportati i box plot del momento della cometa degli esperimenti per i diversi siti. Il momento della cometa è l'integrale della curva sottesa dalla trasformazione dell'intensità di fluorescenza nella curva che descrive questo parametro in toni di grigio. Per effettuare tale conversione è stato utilizzato il software Casp 1.3.

I risultati ottenuti mediante Comet assay vengono riportati mediante Box Plot ossia un metodo di indagine statistica che permette di evidenziare in un unico grafico la mediana degli esperimenti, il valore minimo, il valore massimo (definiti da pallini pieni nel grafico sottostante), il primo ed il terzo quartile della distribuzione statistica dei dati (area rettangolare di colore grigio sul grafico) e gli intervalli di confidenza dei dati (definiti dalle barre di errore). Per interpretare i dati si consideri di voler confrontare la distribuzione dei valori di un campione 'controllo' con quelli di un campione 'trattato'. Una differenza statistica tra i due campioni esiste tanto più i valori dei rettangoli che definiscono la distribuzione dei dati sono diversi.

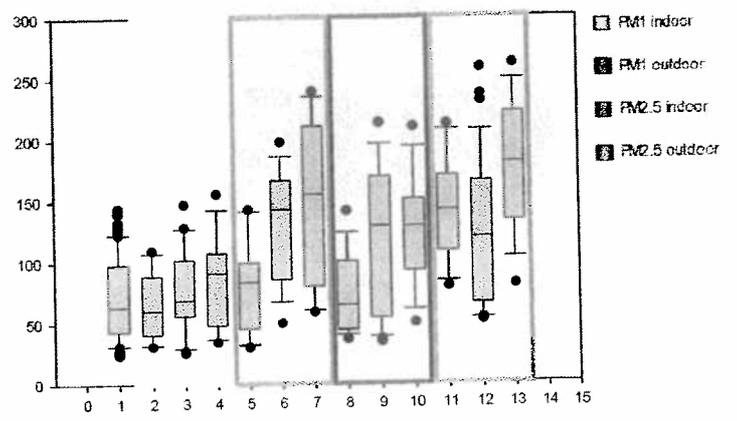
4.6.2. Principali risultati

- In estate è risultato evidente un incremento del parametro 'momento della cometa' (indice di danno al DNA) proporzionale alla dose, in tutti i siti, con alcune eccezioni. Tali differenze nella risposta sono da imputare alla variabilità intrinseca delle risposte biologiche in sistemi esposti a miscele complesse. Ad ogni modo l'incremento di danno è risultato sempre significativo alle dose maggiori di trattamento.
- In inverno il danno al DNA è presente, dose dipendente e particolarmente significativo, per tutte le classi di PM, alla dose più elevata di trattamento. Risulta inoltre correlabile alla più elevata concentrazione di IPA.
- la genotossicità è evidente in entrambi i periodi di campionamento, è dose dipendente e risulta statisticamente significativa alle dosi più elevate, anche se è presente in alcuni siti anche alle dosi più basse. Questo risultato si può spiegare con la presenza di metalli (che generano ROS che indirettamente agiscono sul DNA) e dalla presenza di IPA (il cui effetto sul DNA è diretto).

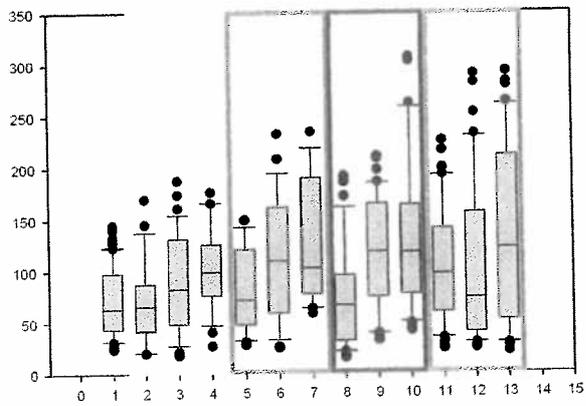
Si riportano, quale esempio, i risultati (FIG. 31) dell'analisi di genotossicità condotta sui quattro siti oggetto della ricerca nella campagna invernale.



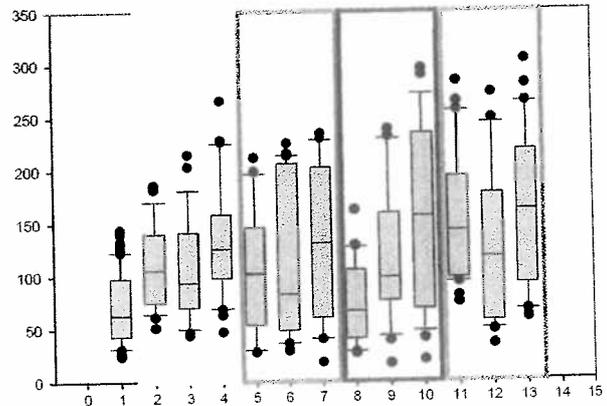
Verziere



Tibaldi



Ponzio



Cermentate

FIG. 31 Quantificazione del danno al DNA attraverso il momento della cometa per la campagna invernale

5. RELAZIONI TRA I PARAMETRI DI TOSSICITA' INDIVIDUATI E LA COMPOSIZIONE CHIMICA E/O FISICA DEL PARTICOLATO ATMOSFERICO RACCOLTO

Al fine di correlare le risposte biologiche alle proprietà chimiche del PM è stata effettuata l'analisi delle componenti principali (PCA - *Principal Component Analysis*). Lo studio ha preso in considerazione tutte le caratteristiche chimiche del particolato e gli effetti biologici: IL-6, IL-8, danno al DNA (il momento della cometa) e la mortalità (ottenuta mediante la formula "mortalità = 1 - valore di vitalità"). I valori di TNF- α non subendo nessuna modulazione dopo trattamento non possono essere considerati parametri significativi. Nella lettura dei risultati dell'analisi PCA sono stati considerate le seguenti variabili, quali più rappresentative per ciascuna classe di composti cui appartengono:

- $\text{SO}_4^{=}$, NO_3^- e NH_4^+ , Mg^{2+} e Ca^{2+} per gli ioni;
- As, Fe, Al, Cu, Zn, Fe, Pb per i metalli;
- BaA, BaP e somma di tutti gli IPA analizzati (Σ 9IPA) per la classe degli idrocarburi policiclici aromatici.

Nel seguito si riportano i principali risultati ottenuti dall'analisi.

Per il **PM invernale** (PM1 e PM2.5, indoor e outdoor) le risposte biologiche risultano correlabili alla presenza di IPA e metalli, mentre solo in maniera minore alla presenza di ioni secondari quali $\text{SO}_4^{=}$, NO_3^- e NH_4^+ .

I dati riferiti al **PM estivo** (PM1 e PM2.5, indoor e outdoor) evidenziano come, per le risposte biologiche siano fondamentali le concentrazioni di elementi e di IPA presenti nel particolato, ma sottolineano anche come non possa essere sottovalutata la presenza di molecole derivanti da processi fotochimici in atmosfera. Infatti, a differenza del PM invernale, per il PM estivo la parte solubile, identificabile con gli ioni inorganici, assume particolare importanza nella spiegazione del danno al DNA. Questo potrebbe essere correlato alla presenza, nella frazione solubile appunto, di molecole derivanti da reazione fotochimica non considerate nel presente studio (degradazione fotochimica di IPA, per esempio).

Analizzando le correlazioni tra **PM indoor** (PM1 e PM2.5, estate ed inverno) ed effetti biologici si evidenzia l'importanza relativa che assumono gli elementi e gli IPA nella determinazione degli effetti biologici. La parte di elementi risulta particolarmente importante sul parametro vitalità cellulare, mentre gli IPA appaiono il fattore determinante sul danno al DNA.

Per il **PM outdoor** (PM1 e PM2.5, estate ed inverno) gli effetti biologici correlano sia con gli elementi - soprattutto per quanto riguarda mortalità e IL-8 - e con gli ioni per il danno al DNA, rendendo evidente l'influenza su questo parametro di quanto discusso per il periodo estivo; per il danno al DNA permane comunque evidente la correlazione con gli IPA.

Di interesse è notare come per il **PMI** (indoor e outdoor, estate ed inverno) diventino importanti gli IPA per la determinazione degli effetti legati ai danni al DNA mentre gli elementi per la determinazione della mortalità e della risposta infiammatoria. Gli ioni contribuiscono in modo omogeneo a tutti gli effetti biologici analizzati.

Per quanto concerne gli effetti biologici e le correlazioni alle proprietà chimiche del **PM2.5** (indoor e outdoor, estate ed inverno) si osserva che gli IPA assumono una minore importanza rispetto al PM1. Questo è facilmente spiegabile per effetto dell'importanza in peso degli IPA in queste due classi dimensionali: il PM1 è più ricco in questi elementi che il PM2.5 (FIG. 22).

6. VALUTAZIONE DEL RISCHIO CONNESSO ALL'ESPOSIZIONE AL PARTICOLATO ATMOSFERICO RACCOLTO

La 'concentrazione' di uno specifico inquinante è definita come una massa (microgrammi o nanogrammi) per unità di volume d'aria (m^3). Con 'esposizione' umana si definisce invece il contatto che ogni individuo ha con una certa concentrazione di inquinante: è quindi importante effettuare una distinzione tra concentrazione ed esposizione. La concentrazione indica una caratteristica fisica di un sistema ambientale in un dato luogo e tempo, mentre l'esposizione descrive l'interazione tra le condizioni ambientali e un organismo vivente.

Perché si possa parlare di 'esposizione personale' è necessario quindi che si verifichino due eventi contemporanei: la concentrazione di un inquinante diversa da zero e l'esposizione dell'individuo agli stessi riferimenti spaziali e temporali dell'inquinante.

Per stimare in modo corretto l'esposizione di una persona a un inquinante è necessario definire non solo la concentrazione di un inquinante ma anche il 'tempo di esposizione' di un individuo (quanto tempo una persona è esposta a una data concentrazione) e la 'frequenza' (quante volte si ripete l'esposizione a una data concentrazione).

Partendo dai dati di esposizione è quindi possibile definire poi il 'rischio potenziale' cui una popolazione o un gruppo di individui è soggetto; tuttavia per giungere a tale definizione è necessario integrare i dati di concentrazione (esposizione) con la valutazione degli effetti che questi possono avere su target cellulari specifici come, ad esempio, la linea cellulare polmonare umana A549.

Attualmente, nella letteratura scientifica analizzata, il rischio viene definito mediante formule che prendono in considerazione solamente la concentrazione di inquinanti e il tempo di esposizione. La formula definita da Hertel (2001) è la seguente:

$$E_i = \sum_j C_j t_{ij} \quad (1)$$

(1) esprime l'"esposizione totale" di una persona (E_i) a un inquinante con la relativa concentrazione C_j per un determinato tempo di residenza (t_{ij}) della persona i nell'ambiente di analisi indicato con j .

I limiti di questo tipo di approccio sono evidenti: non si considerano gli effetti che realmente potrebbero avere il o gli inquinanti sui soggetti presi in considerazione.

Per ovviare a questi problemi, considerate le informazioni raccolte nel presente studio, si propone una definizione di rischio che comprenda:

- La concentrazione di PM cui la persona è esposta;
- I diversi tipi di PM in funzione della dimensione (PM1 e PM2.5), della localizzazione (indoor e outdoor e percorsi) e della stagionalità (estate e inverno);
- Il danno prodotto alla linea cellulare A549 (espresso come la vitalità cellulare mediante MTI, che misura l'attività metabolica delle cellule, l'espressione di IL-6 e IL-8, che sono indice di processi infiammatori, il danno al DNA tramite il test Comet Assay). Tale danno risulta già pesato per il volume d'aria medio inalato in un giorno dall'uomo, per il tempo di esposizione al quale un soggetto è sottoposto durante un turno lavorativo, e per l'efficienza di deposizione del particolato atmosferico nell'apparato respiratorio (Par. 4).

6.1 Materiali e metodi

L'identificazione di un algoritmo per la determinazione dell'incremento del rischio, rispetto a un controllo non esposto a dosi di PM, è basato sull'utilizzo dei dati a disposizione del progetto inerenti:

- 1) gli effetti biologici legati alle risposte in vitro della linea cellulare polmonare alveolare A549 per quanto riguarda la mortalità cellulare², l'espressione di IL-6 e IL-8, e il danno al DNA;
- 2) le concentrazioni ambientali indoor e outdoor di PM1 e PM2.5;
- 3) le concentrazioni numeriche misurate dai contatori ottici di particelle nel range dimensionale del PM2.5.

Si evidenzia che una definizione del rischio che parta da queste premesse è basata sulle risposte in vitro della linea cellulare polmonare alveolare A549; ne consegue che un indice di rischio derivato in funzione dei parametri sopraccitati non tiene conto di altri effetti del particolato atmosferico sulla salute umana, quali quelli a carico del sistema cardiocircolatorio (Par. 1.5).

L'algoritmo utilizzato considera quindi nel dettaglio:

- Le curve dose-risposta derivate dall'esposizione a differenti dosi di particolato atmosferico PM1 e PM2.5 della linea cellulare A549; la scelta delle dosi, come già specificato nel Paragrafo 4, tiene conto del tempo di esposizione e della efficienza di deposizione del particolato atmosferico nell'apparato respiratorio. La risposta biologica totale viene calcolata come semplice sommatoria della mortalità, espressione di IL-6, IL-8 e danno al DNA. La scelta di effettuare una sommatoria di tali effetti deriva dalla impossibilità in questo progetto di svolgere ulteriori indagini inerenti la presenza, ad esempio, di eventuali sinergie degli effetti biologici riscontrati.
- Le concentrazioni di PM1, PM2.5 indoor e outdoor, campionati in ogni sito e nei diversi periodi temporali (estate-autunno e inverno);
- Il rapporto tra la concentrazione numerica delle particelle con $d_p < 2.5 \mu\text{m}$ misurate dagli strumenti OPC portatili (mod. 1.108) a cui la persona è esposta durante i percorsi, rispetto alla concentrazione misurata dagli strumenti OPC fissi (mod. 1.107) in ambiente outdoor presso i Comandi di Zona;
- La frequenza con cui avviene durante i percorsi un superamento statisticamente significativo (al 99,7% di probabilità) del 'valore di riferimento'. Come valore di riferimento si è assunto il valor medio di concentrazione misurato (nello stesso istante) in ambiente outdoor presso il rispettivo Comando di Zona, mediante lo strumento OPC fisso (mod. 1.107).

Il risultato numerico dell'algoritmo esprime il rischio di danno provocato dal PM in ambienti indoor, outdoor e durante i percorsi effettuati dagli agenti della Polizia Locale, alla linea cellulare polmonare umana A549 rispetto alle stesse cellule che non hanno subito esposizione a PM.

L'algoritmo consta di due parti fondamentali:

- 1) Calcolo dell'incremento del rischio rispetto a un controllo non esposto a dosi di particolato atmosferico per ambienti indoor e outdoor
- 2) Calcolo dell'incremento del rischio rispetto a un controllo non esposto a dosi di particolato atmosferico lungo i percorsi

1) L'incremento del rischio, rispetto a un controllo non esposto a dosi di PM, per ambienti indoor e outdoor viene calcolato secondo la seguente espressione:

² La mortalità cellulare rappresenta la frazione di cellule morte rispetto al controllo, è quindi un valore compreso tra zero e uno, e viene calcolata a partire dalla vitalità cellulare, anch'essa espressa come valore tra zero e uno, come (1-Vitalità).

$$IR = \sum_{i,j} |(a_{i,j} * C_j + b_{i,j}) - 1|$$

dove:

- IR, indica l'Incremento di Rischio;
- $a_{i,j}$, $b_{i,j}$, indicano la pendenza e l'intercetta delle curve dose-risposta di ciascun test tossicologico eseguito per ciascun sito, per ciascuna collocazione (indoor/outdoor) e periodo di campionamento;
- C_j , indica la dose j-esima di PM (PM1 o PM2.5) misurata in ciascun sito, per ciascuna collocazione e periodo di campionamento;
- 1, rappresenta il valore assunto dal controllo per ciascun parametro³.

2) L'incremento del rischio, rispetto a un controllo non esposto a dosi di PM, lungo i percorsi outdoor viene calcolato secondo la seguente espressione:

$$IR_{i-p} = IR_{i-out-PM2.5} * (1 - f_i) + IR_{i-out-PM2.5} * f_i * m_i$$

dove:

- IR_{i-p} , indica l'Incremento del Rischio lungo i percorsi dell'i-esimo sito;
- $IR_{i-out-PM2.5}$, indica l'Incremento di Rischio in ambiente outdoor fisso per l'i-esimo Comando di Zona;
- f_i , indica la frequenza di accadimento di picchi di esposizione lungo i percorsi dell'i-esimo comando rispetto al valore soglia in ambiente outdoor fisso per l'i-esimo comando di zona;
- m_i , rapporto medio dell'intensità dei picchi di esposizione, relativi alla concentrazione numerica totale misurata dagli OPC 1.108 e 1.107 con $d_p < 2.5 \mu m$, lungo i percorsi dell'i-esimo comando rispetto al valore misurato in coincidenza temporale in ambiente outdoor fisso per l'i-esimo Comando di Zona.

6.2 Risultati

In FIG. 32 e 33, e in TAB. 11 sono riportati i valori dell'incremento di rischio biologico da esposizione alle dosi di PM misurate presso i vari comandi di zona (indoor, outdoor) e lungo i percorsi rispetto a una situazione di non esposizione a PM.

Com'è possibile osservare l'incremento di rischio (IR) aumenta passando da PM1 a PM2.5, da ambienti indoor ad ambienti outdoor e passando dal periodo estivo a quello invernale, caratterizzato dai maggiori livelli di concentrazione cui i soggetti sono sottoposti. Un maggiore livello delle concentrazioni è alla base anche del raggiungimento del massimo valore di IR lungo i percorsi compiuti durante l'attività di pattuglia.

Per completezza si riportano nelle FIGG. 34-37 e in TAB. 12 i dati riferiti alle singole risposte biologiche indagate (mortalità cellulare, espressione di IL-6 e IL-8 e danno al DNA).

Occorre evidenziare come la valutazione qui compiuta non abbia potuto tenere conto per i percorsi di pattuglia della specifica composizione del PM, che può variare localmente in funzione della maggiore o minore vicinanza alle fonti emissive (in particolare alla fonte traffico lungo strade più o

³ Nel caso della vitalità cellulare, la sottrazione di 1 e l'utilizzo del modulo restituiscono il parametro 'mortalità cellulare'.

meno trafficate e presso le intersezioni). Essendo la composizione del PM (contenuto di IPA, metalli ed elementi) una variabile determinante nella valutazione delle risposte tossicologiche si ritiene opportuno evidenziare come l'impossibilità di realizzare la caratterizzazione chimica del particolato misurato lungo i percorsi (per limiti dovuti alla portata dello studio) suggerisca cautela nella valutazione dell'Indice di Rischio relativo ai percorsi.

In aggiunta a ciò si consideri il fatto che non è stato possibile misurare il particolato nella postazione solitamente adottata dal personale in servizio durante le attività di regolazione traffico presso le intersezioni, ossia al centro delle stesse. Infatti, gli Agenti volontari che hanno partecipato al campionamento personale, per questioni legate all'incolumità degli stessi, sono dovuti restare sul marciapiede più prossimo all'intersezione di interesse per tutto il tempo dell'attività di regolazione del traffico/stazionamento dell'Agente in regolare servizio. E' possibile pertanto che alcuni picchi di concentrazione di particolato, imputabili all'esposizione diretta ai gas di scarico dei veicoli, possano non essere stati inclusi nell'insieme dei dati che costituiscono la base delle analisi del presente studio.

In conclusione si evidenzia come l'incremento di rischio calcolato sia legato alla risposta biologica indotta su cellule appartenenti alla linea A 549, e quindi limitato agli effetti sull'apparato respiratorio relativi all'epitelio alveolare.

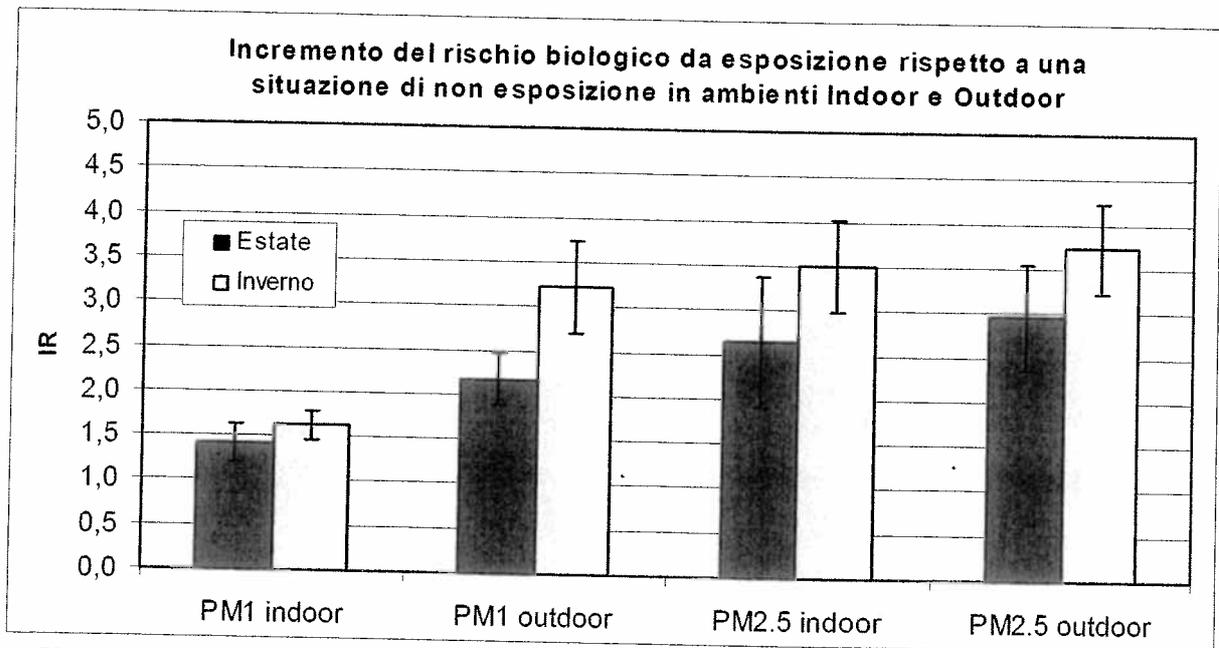


FIG. 32: Incremento medio e deviazione standard della media del rischio biologico da esposizione rispetto a una situazione non perturbata in ambienti Indoor, Outdoor (per PM1 e PM2.5)

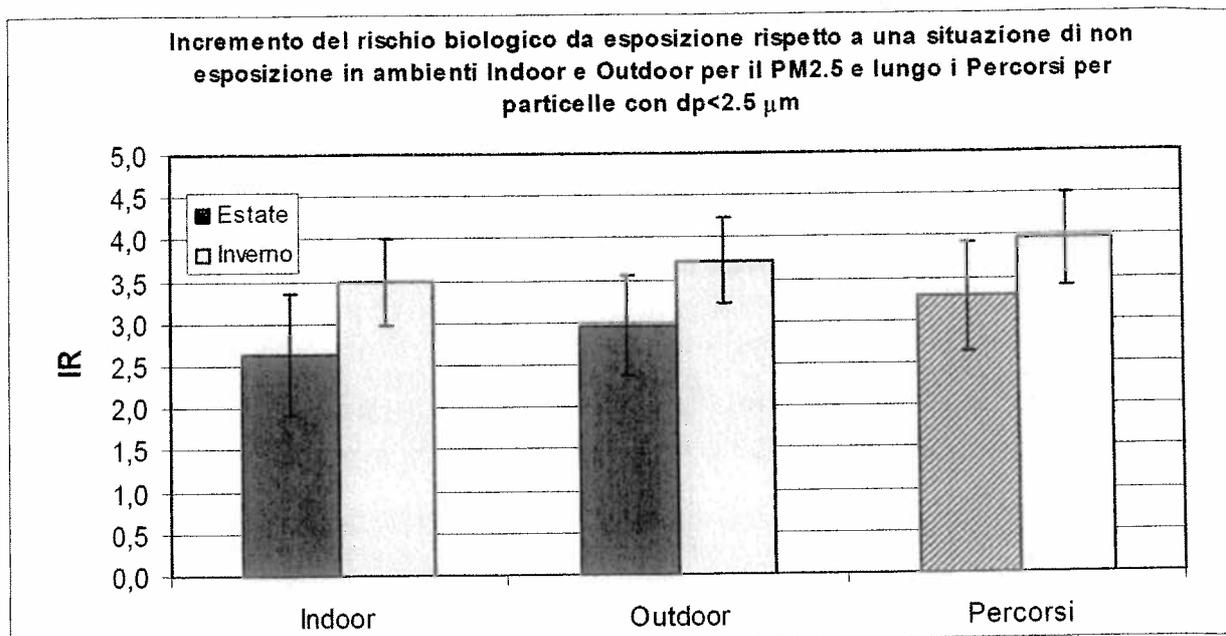


FIG. 33: Incremento medio e deviazione standard della media del rischio biologico da esposizione rispetto a una situazione non perturbata in ambienti Indoor, Outdoor per il PM2.5 e lungo i percorsi per particelle con $dp < 2.5 \mu m$

IR	ESTATE		INVERNO	
	Media	ds della media	Media	ds della media
PM1 indoor	1,41	0,22	1,62	0,16
PM2.5 indoor	2,64	0,72	3,50	0,51
PM1 outdoor	2,18	0,30	3,22	0,51
PM2.5 outdoor	2,95	0,60	3,73	0,51
PM2.5 percorsi	3,28	0,64	3,96	0,55

Tab. 11 Valori medi e deviazione standard della media dell'incremento di rischio biologico da esposizione rispetto a una situazione non perturbata in ambienti Indoor, Outdoor (per PM1 e PM2.5) e lungo i percorsi (particelle con $dp < 2.5 \mu m$)

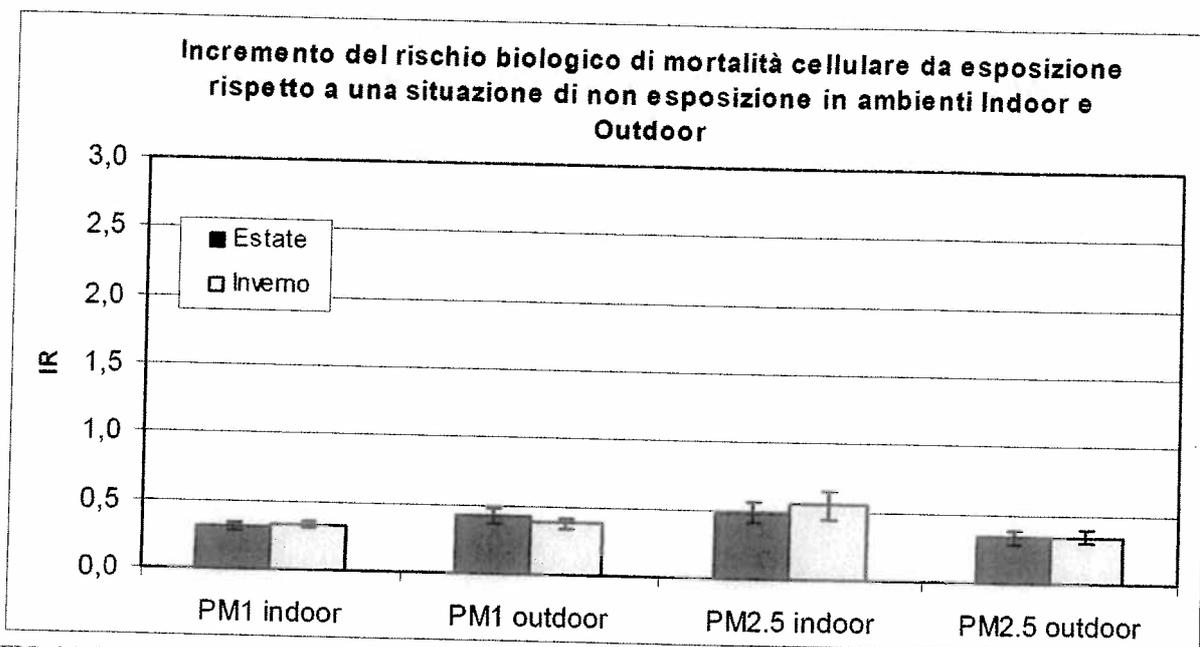


FIG. 34: Incremento medio e deviazione standard della media del rischio biologico di mortalità cellulare da esposizione rispetto a una situazione non perturbata in ambienti Indoor, Outdoor (per PM1 e PM2.5)

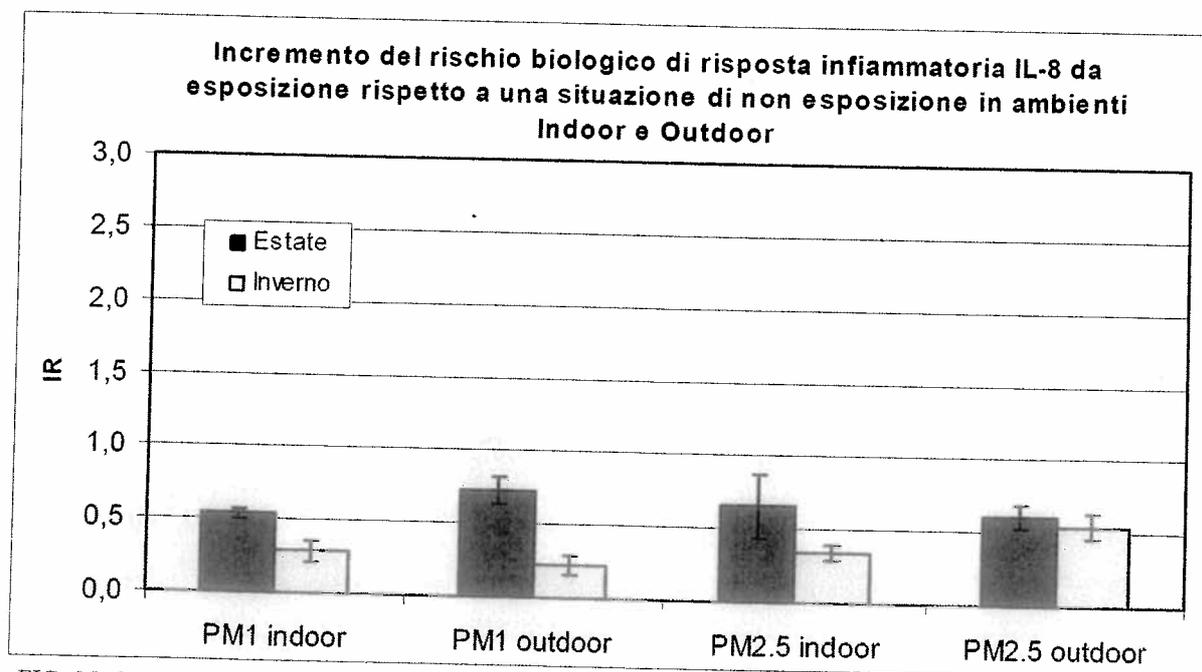


FIG. 35: Incremento medio e deviazione standard della media del rischio biologico di risposta infiammatoria IL-8 da esposizione rispetto a una situazione non perturbata in ambienti Indoor, Outdoor (per PM1 e PM2.5)

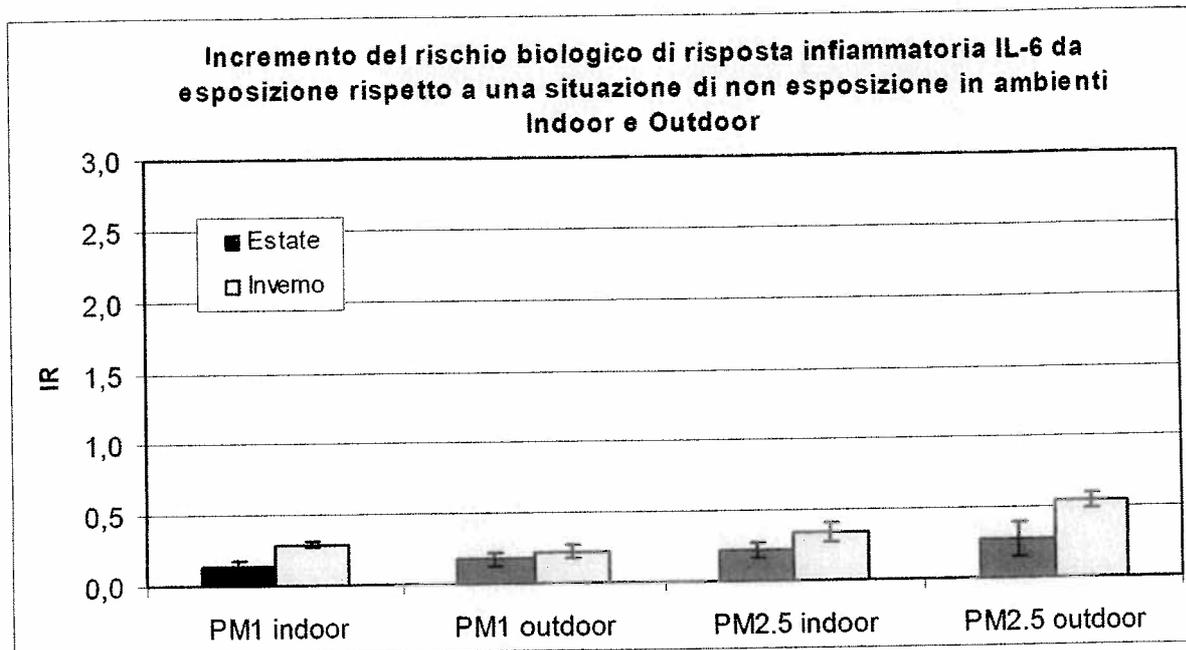


FIG. 36: Incremento medio e deviazione standard della media del rischio biologico di risposta infiammatoria IL-6 da esposizione rispetto a una situazione non perturbata in ambienti Indoor, Outdoor (per PM1 e PM2.5)

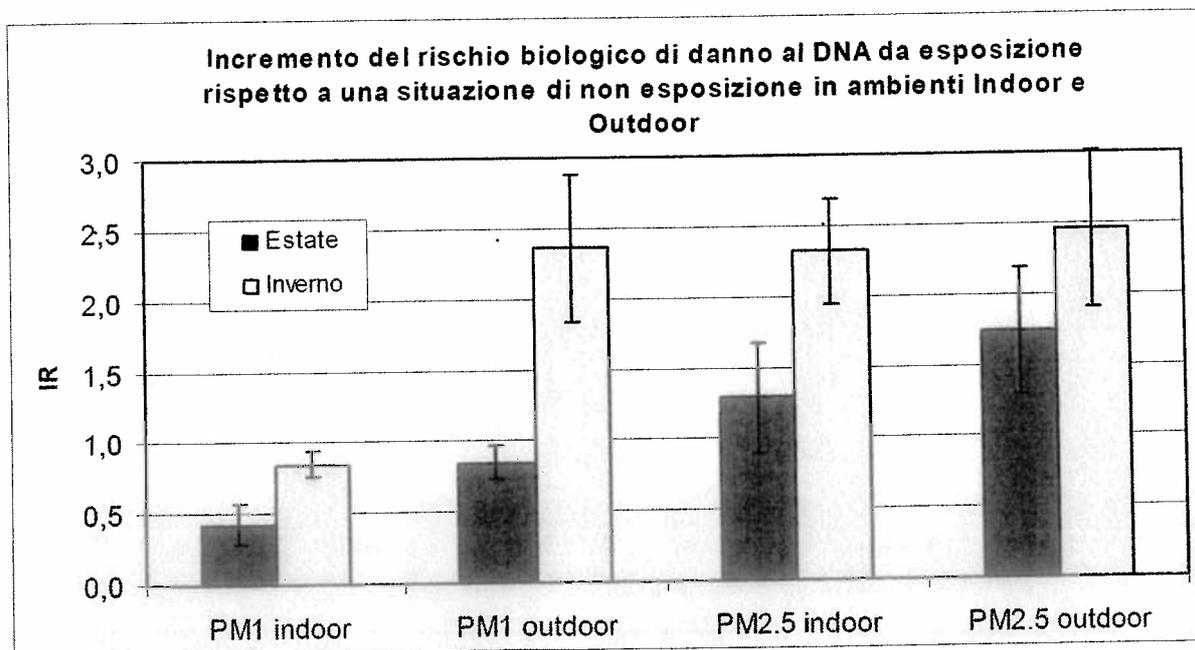


FIG. 37: Incremento medio e deviazione standard della media del rischio biologico di danno al DNA da esposizione rispetto a una situazione non perturbata in ambienti Indoor, Outdoor (per PM1 e PM2.5)

		IR_m	dev. std.	IR_IL-8	dev. std.	IR_IL-6	dev. std.	IR-DNA	dev. std.
Estate	PM1 indoor	0.32	0.03	0.54	0.04	0.14	0.04	0.43	0.15
	PM1 outdoor	0.43	0.06	0.73	0.10	0.17	0.05	0.85	0.12
	PM2.5 indoor	0.48	0.08	0.66	0.21	0.21	0.06	1.29	0.39
	PM2.5 outdoor	0.33	0.04	0.60	0.08	0.27	0.13	1.74	0.45
Inverno	PM1 indoor	0.33	0.03	0.29	0.07	0.16	0.02	0.85	0.09
	PM1 outdoor	0.38	0.04	0.22	0.07	0.26	0.05	2.36	0.52
	PM2.5 indoor	0.55	0.10	0.34	0.06	0.29	0.07	2.32	0.37
	PM2.5 outdoor	0.35	0.05	0.55	0.09	0.38	0.06	2.46	0.56

Tab. 12 Valori medi e deviazione standard della media dell'incremento di rischio biologico specifico da esposizione rispetto a una situazione non perturbata in ambienti Indoor, Outdoor (per PM1 e PM2.5) e lungo i percorsi (particelle con $dp < 2.5 \mu m$)

BIBLIOGRAFIA

- Agenzia Mobilità e Ambiente, 2007. Inventario delle emissioni atmosferiche del Comune di Milano - anno 2005. Relazione finale, Documento Sistema Qualità n. 70190007.
- Andreani-Aksoyoglu S., Prevot A.S.H., Baltensperger U., Keller J., Dommen J., 2004. Modeling of formation and distribution of secondary aerosols in the Milan area (Italy). *Journal of Geophysical Research*, vol. 109, D05306.
- Areskoung H., Persson K., Jarvohlm B. 2005. Comparative health impact assessment of local and regional particulate air pollutants in Scandinavia. *Ambio* 34: 11-19.
- Arrieta E, Ontiveros CC, Li WW, Garcí'a JH, Denison MS, McDonald JD, Burchiel SW, Shayne BW. 2003. Aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of particulate organic matter from the Paso del Norte Airshed along the U.S.-Mexico border. *Environ Health Perspect* 111:1299-1305.
- Beretta E., Gualtieri M., Botto L., Palestini P., Miserocchi G., Camatini M. 2007. Organic extract of tire debris causes localized damage in the plasma membrane of human lung epithelial cells. *Toxicology Letters* 173, 191-200.
- Bolzacchini E., Gianelle V., Grammatica P., Librando V., Perrone M.G., Bozzoli L., Rindone B., 2002. PM10 And PM2.5 In The Milan Urban Area. In *Proceeding Symposium EUROTRAC-2*, 11-15 Marzo 2002 - Garmisch-Partenkirchen (Germania).
- Bolzacchini E. et al., 2007. Concentration And The Chemical Characterization Of PM10 And PM2.5 In All The Italian Territories. Poster at *European Aerosol Conference EAC 2007*, 9-14 settembre 2007, Salisburgo (Austria).
- Bruno P. et al, 2005. Studio integrato sul territorio nazionale per la caratterizzazione ed il controllo di inquinanti atmosferici (SITECOS). *Ecomondo 05*, Atti del seminario: "Tecnologie per la Qualità dell'Aria (TecAir 2005)", in: *Tecnologie innovative per l'industrializzazione del sistema ambiente*, 595- 603, Ed. Maggioli, 2005.
- Calini, V., Urani, C., Camatini, M., 2002. Comet assay evaluation of DNA single- and double-strand breaks induction and repair in C3H10T1/2 cells. *Cell Biol. Toxicol.* 18, 369-379.
- Camatini M., Calini V. e Gualtieri M. (2003) Biological and chemical evaluation of tyre debris organic extract *Toxicology Letters* 144 (Suppl. 1), p. 182.

- Camatini, M., Crosta, G.F., Giuliani, P., Corbetta, G.M., 2000. Fractal shape analysis of tire debris particles and applications. In: *Mater. Res. Soc. Meeting*, p. 683.
- Camatini, M., Crosta, G.F., Dolukhanyan, T., Sung, C., Giuliani, P., Corbetta, G.M., 2001. Microcharacterization and identification of tire debris in heterogeneous specimens. *Mater. Charact.* 46, 271–283.
- Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D., Mitchell, J.B., 1987. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.* 47, 943–946.
- Castell J.V., Donato M.T., Gómez-Lechón M.J., Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. *Exp Toxicol Pathol.* 2005 Jul;57 Suppl 1:189-204.
- Don Porto Carero A., Hoet P.H.M., Verschaeve L., Schoeters G., Nemery B. Genotoxic effects of carbon black particles, diesel exhaust particles, and urban air particulates and their extracts on a human alveolar epithelial cell line (A549) and a human monocytic cell line (THP-1). *Environ Mol Mutagen* 2001;37:155–163.
- Du Four V.A., Larebeke N.V., Janssen C.R. 2004. Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples in Flanders, Belgium. *Mutat Res* 558:155–167.
- Environ, 2006. CAMx (Comprehensive Air Quality Model with extensions)—user's guide version 4.31. Internal Report. Environ International Corporation. www.camx.com.
- Fermo P., Piazzalunga A., Vecchi R., Valli G. and Cerini M., 2006. A TGA/FT-IR study for measuring OC and EC in aerosol samples. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 6, 255-266.
- Ferrero L., Bolzacchini E., Petraccone S., Perrone M.G., Sangiorgi G., Lo Porto C., Lazzati Z. and Ferrini B., 2007. Vertical Profiles Of Particulate Matter Over Milan During Winter 2005/2006. *Fresenius Environmental Bulletin*, vol. 16, N.6.
- Forbes B., Ehrhardt , Human respiratory epithelial cell culture for drug delivery applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005 Jul; 60(2):193-205. Epub 2005 Apr 21.
- Ghio A.J., 2004. Biological effects of Utah Valley ambient air particles in humans: a review. *J. Aerosol. Med.* 17: 157-164
- Giugliano M., Lonati G., Butelli P., Romele L., Tardivo R., Grosso M., 2005. Fine particulate (PM_{2.5}-PM₁) at urban sites with different traffic exposure. *Atmospheric Environment* 39, 2421-2431.
- Gualtieri M., Rigamonti L.M., Palestini P., Camatini M., 2004. Cytotoxicity of tire debris organic extract assessed by the MTT, the Comet assay and the ultrastructure on A549 cells. *Invitox*, 41, 2004.
- Gualtieri M., Rigamonti L., Galeotti V. e Camatini M., 2005. Toxicity of tire debris extracts on human lung cell line A549 *Toxicology in Vitro* 19(7), 1001-1008.
- Gualtieri M., Andrioletti M., Mantecca P., Vismara C., Camatini M., 2005a. Impact of tire debris on in vitro and in vivo systems. *Particles and Fiber Toxicology*, 2:1.
- Gualtieri M., Andrioletti M., Vismara C., Milani M., Camatini M. 2005b. Toxicity of tire debris leachates. *Environment International* 31, 723-730.
- Gualtieri M., Mantecca P., Cetta F. Camatini M. 2008. Organic compounds in tire particle induce reactive oxygen species and heat-shock proteins in the human alveolar cell line A549. *Environment International* 34. 437–442.
- Haase H., Maret W. 2005. Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biomaterials* 18: 333-338.
- Hannigan M, Cass G., Penman B., Crespi C.L., Lafleur A.L., Busby JR W.F., Thilly W.G., Simoneit B.R.T., 1998. Bioassay-Direct Chemical Analysis of Los Angeles Airborne Particulate Matter Using a Human Cell Mutagenicity Assay. *Environmental Science and Technology*, 32, 3502-3514.
- Hertel O., De Leeuw F.A.A.M, Raaschou-Nielsen O., Jensen S. S., Gee D., Herbarth O., Pryor S., Palmgren F. and Olsen E.2001 Human Exposure to outdoor air pollution *Pure Appl. Chem* 73/6 933-958.
- Hetland RB, Schwarze PE, Johansen BV, Myran T, Uthus N, Refsnes M. Silica induced cytokine release from A549 cells:importance of surface area versus size. *Human Exp Toxicol* 2001;20:46–55.
- Hetland RB, Cassee FR, Refsnes M, Schwarze PE, Låg M, Boere AJ, Dybing E. Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions. *Toxicol In Vitro.* 2004 Apr;18(2):203-12.

- W.L. Wendy Hsiao, Zi-Yao Mo, Ming Fang, Xin-men Shi, Fu Wang Cytotoxicity of PM2.5 and PM2.5-10 ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays *Mutation Research* 471 (2000) 45-55.
- Hjortenkras, D.S.T.; Bergbäck, B.G.; Häggerud, A.V. 2007. Metal emission from brake linings and tires: case studies of Stockholm, Sweden 1995/1998 and 2005. *Environ Sci Technol*. In press.
- Lequin RM. Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Clin Chem*. 2005 Dec;51(12):2415-8. Epub 2005 Sep 22.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 2003;111(4):455-60.
- Lonati G., Ozgen G., Giugliano M., 2007. Primary And Secondary Carbonaceous Species In PM2.5 Samples In Milan (Italy). *Atmospheric Environment* 41, 4599-4610.
- Mantecca P., Gualtieri M., Andrioletti M., Bacchetta R., Vismara C., Vailati G., Camatini M. 2007. Tire debris organic extract affects *Xenopus* development *Environment International* 33. 642-648.
- Marcazzan G.M., Vaccaro S., Valli G., Vecchi R., 2001. Characterisation of PM10 and PM2.5 particulate matter in the ambient air of Milan (Italy). *Atmospheric Environment* 35, 4639-4650.
- McClellan R.O. 1987. Health effects of exposure to diesel exhaust particles. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 27: 279-300.
- Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, Olin S, Monteiro-Riviere N, Warheit D, Yang H. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol.* 2005 Oct 6;2:8.
- Pedersen D. U., Durant J.L, Taghizadeh K., Hemond H.F., Lafleur A.L., Cass G., 2005. Human Cell Mutagens in Respirable Airborne Particles from the Northeastern United States. 2. Quantification of Mutagens and Other Organic Compounds. *Environmental Science Technology* 39, 9547-9560.
- Perrone M.G., Bolzacchini E., Gianelle V., Mognaschi G., 2004. Polycyclic Aromatic hydrocarbon in urban aerosol. *Journal of Aerosol Science*, 35 (sup. 1) S1073-S1074.
- Perrone M.G., Ferrero L., Lazzati Z., Lo Porto C., Petraccone S., Sangiorgi G., Bolzacchini E., 2006. PM10, PM2.5, PM1 and chemical composition in urban and remote sites. *Proceeding in Spatial Data Methods for Environmental and Ecological Processes*, 14-15 Settembre 2006, Foggia (Italia).
- Platt KL, Aderhold S, Kulpe K, Fickler M. Unexpected DNA damage caused by polycyclic aromatic hydrocarbons under standard laboratory conditions. *Mutat Res.* 2008 Feb 29;650(2):96-103. Epub 2007 Nov 19.
- Pope C.A., Burnett R.T., Thun M.J., Calle E.E., Krewski D., Ito K., et al. 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287: 1132-1141.
- Progetto PARFIL: Il PARTICOLATO atmosferico Fine in Lombardia. Le principali risposte del progetto PARFIL. I e II annualità. (http://www.arpalombardia.it/qaria/doc_ProgettifnCorso.asp)
- Progetto Profili Verticali: "Campionamento Del Particolato Atmosferico Lungo Il Profilo Verticale Urbano Milanese Mediante Pallone Frenato (Profili Verticali)", 2005, finanziato da Rotary Club-AERA.
- Progetto PUMI, 2003: Indagini Di Campo Ed Esperimenti Di Laboratorio Per La Caratterizzazione Chimico Fisica Del Particolato Atmosferico Urbano Milanese (Pumi). Relazione finale sintetica, Marzo 2003. (<http://www.flanet.org/index.aspx>)
- Progetto SITECOS: Studio Integrato Sul Territorio Nazionale Per La Caratterizzazione Ed Il Controllo Degli Inquinanti Atmosferici. <http://www.dcabc.uniba.it/Sitecos/SITECOShome.asp>
- Progetto QUITSAT. Studio Della Qualita' Dell'aria Mediante l'utilizzo Di Misure Integrate Da Terra e da Satellite (Quitsat), 2006 (in corso), finanziato dall'Agenzia Spaziale Italiana ASI. (<http://www.quitsat.it/>)
- Progetto VESPA: "Valutazione degli effetti biologici del particolato atmosferico sulla salute umana" (VESPA), 2007 (in corso), finanziato da Comune di Milano, Provincia di Milano e regione Lombardia.
- Salma Imre, Imre Balásházy, Renate Winkler-Heil, Werner Hofmann and Gyula Záray Effect of particle mass size distribution on the deposition of aerosols in the human respiratory system *Journal of Aerosol Science* 33, (2002) 119-132.
- Schins R.P.F., Lightbody J.H., Borm P.J.A., Shi T., Donaldson K., Stone V. 2004. Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 195: 1-11.

Schwartz J., Norris G., Larson T., Sheppard L., Claiborne C., Koenig J. 1999. Episodes of high coarse particle concentrations are not associated with increased mortality. *Environ. Health. Perspect.* 107: 339-342.

Seaton A., Soutar A., Crawford V., Elton R., McNerlan S., Cherrie J., et al. 1999. Particulate air pollution and the blood. *Thorax* 54 : 1027-1032.

Singh NP, McCoy MT, Tice RR and EL Schneider (1988) A simple technique for quantisation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175, 184-191.

Sutherland E.R., Martin R.J. 2003. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: comparison with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 112: 819-827.

Trzeciak AR, Barnes J, Evans MK. A modified alkaline comet assay for measuring DNA repair capacity in human populations. *Radiat Res.* 2008 Jan;169(1):110-21.

Vecchi R., Marcazzan G., Valli G., Cerini M., Antonazzi C., 2004. The Role Of Atmospheric Dispersion In The Seasonal Variation Of PM1 And PM2.5 Concentration And Composition In The Urban Area Of Milan (Italy). *Atmospheric Environment* 38, 4437-4446.

Vecchi R., Marcazzan G., Valli G., 2007. A Study On Nighttime_Daytime PM10 Concentration And Elemental Composition In Relation To Atmospheric Dispersion In The Urban Area Of Milan (Italy). *Atmospheric Environment* 41, 2136-2144.

Vermeylen J., Nemmar A., Nemery B., Hoyolaerts M.F. 2005. Ambient air pollution and acute myocardial infarction. *J. Thromb. Haemost.* 3: 1955-1961.

Zhang L, Yu L, Yu CA. Generation of superoxide anion by succinatecytochrome c reductase from bovine heart mitochondria. *J Biol Chem* 1998;273:33972-6.

Zhang, Z; Che, W; Liang, Y; Wu, M; Li, N; Shu, Y; Liu, F; Wu, D Comparison of cytotoxicity and genotoxicity induced by the extracts of methanol and gasoline engine exhausts *Toxicology In Vitro [Toxicol. In Vitro]*. Vol. 21, no. 6, pp. 1058-1065. Sep 2007.

Wasson, Gillian R; McKelvey-Martin, Valerie J; Downes, CStephen The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer *Mutagenesis [Mutagenesis]*. Vol. 23, no. 3, pp. 153-162. May 2008.

WHO 2000. Air Quality Guidelines for Europe. 2nd Edition. Copenhagen: World Health Organization. WHO Regional Publications, European Series No. 9.