

P. Pedata, E.M. Garzillo, N. Sannolo

Particolato ultrafine ed effetti sull'organismo: revisione della letteratura

Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Medicina del Lavoro, Igiene e Tossicologia Industriale. Seconda Università degli Studi di Napoli

RIASSUNTO. Le azioni regolatrici a livello legislativo e i miglioramenti tecnologici hanno determinato una situazione che vede gli attuali livelli di inquinamento ambientale al di sotto di quelli che si registravano fino ad anni relativamente recenti. Tuttavia anche a tali livelli di inquinamento si registrano effetti avversi per la salute che hanno portato ad un aumento della morbosità e della mortalità. Nel corso degli anni la tipologia dell'inquinamento è cambiata: in seguito alla trasformazione degli impianti di riscaldamento, alle innovazioni motoristiche e all'abbattimento delle emissioni si è registrata una riduzione nella concentrazione in aria di alcuni inquinanti tradizionali (biossido di zolfo, monossido di carbonio, benzene), mentre non si è registrata una significativa riduzione delle concentrazioni del particolato atmosferico. Sulla base di tali considerazioni, in questo lavoro sono state interrogate numerose banche dati elettroniche di letteratura scientifica utilizzando un algoritmo di selezione contenente espressioni relative alle seguenti tematiche: "particolato ultrafine", "effetti sulla salute umana", "esposizione ambientale e lavorativa". Complessivamente sono stati analizzati 200 articoli, progressivamente ridotti a 88, selezionati per keywords, anno di pubblicazione e tematiche affrontate; i principali argomenti trattati dagli articoli riguardavano le caratteristiche chimico-fisiche del particolato ultrafine, l'esposizione al particolato ambientale, la legislazione europea inerente ai valori delle concentrazioni di particolato nell'atmosfera, la tossicocinetica, gli effetti su apparati quali l'apparato respiratorio, il sistema cardio-vascolare, il sistema nervoso centrale ed il meccanismo d'azione intracellulare. Dall'analisi della letteratura è emerso che le particelle ultrafini ($PM_{0.1}$: diametro aerodinamico medio inferiore a $0.1 \mu m$) sono più potenti rispetto alle particelle della frazione *coarse* ($2.5-10 \mu m$) e *fine* ($0.1-2.5 \mu m$) nell'indurre effetti dannosi alla salute umana. Purtroppo, lo studio dei meccanismi d'azione di queste particelle presenta particolari difficoltà a causa dell'elevato numero di reazioni chimiche e meccanismi biologici che entrano in gioco nell'organismo in seguito ad esposizione a particelle ultrafini.

Parole chiave: particolato ultrafine, effetti sulla salute, esposizione ambientale.

ABSTRACT. *The International laws and the technology developments led to a situation where the current levels of environmental pollution are below those that existed at the beginning of the century: however, these pollution levels produce harmful effects to health linked to an increase in morbidity and mortality. Over the years the pollution has changed: following the transformation of heating, motor innovation and emissions reducing, has been a reduction in air concentration of some conventional pollutants (sulfur dioxide, carbon monoxide, benzene), while there wasn't a significant reduction of particulate*

air pollution. In this work have been questioned several electronic databases of scientific literature based on a selection algorithm that contains expressions for the following topics: "ultrafine particles", "effects on human health", "occupational and environmental exposure". We analyzed 200 articles, progressively reduced to 88, selected for keywords, year of publication and arguments; the main topics covered by the articles were related to chemical and physical UFP properties, UFP exposure, European legislation relating to the values of particle concentrations in the atmosphere, toxicokinetics and effects on various organs such as, in particular, the respiratory system, cardiovascular system, central nervous system and the intracellular mechanism of action. Analysis of the literature showed that ultrafine particles ($PM_{0.1}$ aerodynamic diameter less than $0.1 \mu m$) are more powerful than the coarse particle fraction ($2.5-10 \mu m$) and fine ($0.1-2.5 \mu m$) in inducing adverse effects to human health. Unfortunately, the study of mechanisms of action of these particles presents particular difficulties because of the large number of chemical and biological mechanisms that come into play in the body after exposure to ultrafine particles.

Key words: ultrafine particles (UFP), health effects, environmental exposure.

Introduzione

Negli ultimi anni, l'interesse della comunità scientifica internazionale nel campo della ricerca si è incentrato sullo studio degli effetti del particolato ultrafine sulla salute umana. Le particelle ultrafini ($PM_{0.1}$: diametro aerodinamico medio inferiore a $0.1 \mu m$) sono complesse miscele di sostanze organiche ed inorganiche, dotate di intrinseca tossicità. Le loro piccole dimensioni le rendono degne di particolare attenzione in quanto sono in grado di penetrare fino alle vie aeree più profonde, sfuggendo ai normali meccanismi di difesa polmonare, ed entrare nel circolo sanguigno (1-6).

Esperimenti condotti su animali hanno dimostrato che le particelle ultrafini sono più potenti delle particelle di maggiori dimensioni nell'indurre infiammazione polmonare, danno ai tessuti e tumore (7, 8). Inoltre, studi epidemiologici condotti sulla popolazione generale e su lavoratori esposti a particelle ultrafini hanno mostrato l'insorgenza di patologie polmonari di tipo ostruttivo, decrementi della funzionalità polmonare e fibrosi nei lavoratori (9, 10).

Esistono sufficienti basi tossicologiche per ipotizzare che, tra tutti gli inquinanti aerodispersi, il particolato ultrafine abbia il più alto potere proinfiammatorio, presumibilmente a seguito delle piccole dimensioni, della più ampia area di superficie che permette a un maggior numero di atomi e di molecole di essere esposte e della maggiore reattività chimica (11).

In ragione della distribuzione sistemica, inoltre, le polveri ultrafini sembrano essere responsabili non solo di effetti respiratori e cardiovascolari ma anche di alterazioni a carico del SNC e SNA, di alterazioni pre e post-partum (ritardo dell'accrescimento intrauterino, prematurità e basso peso alla nascita), di alterazioni dello sviluppo e della funzionalità dei polmoni nei bambini e negli adolescenti residenti in aree urbane ed, infine, dello sviluppo di malattie tumorali (12).

Per quanto riguarda il meccanismo d'azione diversi studi sperimentali *in vivo* e *in vitro* e dati epidemiologici suggeriscono che il particolato ultrafine sia da considerare uno dei principali veicoli di sostanze pericolose nell'aria, quali ad esempio idrocarburi policiclici aromatici e metalli, in grado di indurre espressione policlonale di citochine e chemochine nell'epitelio respiratorio. Si ipotizza, infatti, che la compresenza di particolato ultrafine, metalli di transizione e composti organici possa provocare la produzione di radicali liberi responsabili di stress ossidativo, il quale, a sua volta, causerebbe un incremento della produzione dell'NFkB e della trascrizione di citochine e proteine di fase acuta (13, 14).

Materiale e Metodi

La ricerca della letteratura scientifica è stata condotta consultando siti specifici, quali ad esempio PubMed, Medscape, EPA. Abbiamo utilizzato gruppi di termini che facevano riferimento alla problematica in esame, quali "ultrafine particles" [All Fields] AND "health effects" [All Fields] AND "environmental exposure" [MeSH Terms] OR "environmental" [All Fields] AND "exposure" [All Fields] OR "occupational and environmental exposure" [All Fields]. Non abbiamo posto particolari limiti temporali alla ricerca, prendendo in analisi la letteratura pubblicata fino alla fine dell'anno 2007. Sono stati analizzati 200 articoli, progressivamente ridotti ad 88 in funzione delle tematiche affrontate. Gli articoli, infatti, sono stati selezionati al fine di approfondire cinque tematiche principali: caratteristiche del particolato ultrafine, esposizione ambientale ed occupazionale, legislazione, tossicocinetica e tossicodinamica (con particolare attenzione all'apparato cardiopolmonare, il sistema circolatorio ed il sistema nervoso), meccanismi di tossicità cellulare.

Caratteristiche del particolato atmosferico

I parametri che determinano le proprietà chimico-fisiche del particolato atmosferico sono rappresentati da: dimensione, forma, stato di aggregazione, area superficiale, composizione chimica, densità e carica di superficie. La

dimensione rappresenta uno dei parametri più importanti in quanto influenza la composizione chimica delle particelle, la loro rimozione e il tempo di permanenza nell'atmosfera, così come le modalità di penetrazione delle particelle nell'organismo. L'aerosol atmosferico è costituito da particelle con densità (rapporto massa/volume) variabile e spesso di forma non sferica, di conseguenza, quando si parla di "dimensione particellare" ci si riferisce ad un diametro "equivalente", il cosiddetto diametro aerodinamico. Questo è definito come il diametro di una particella sferica con una densità di 1 g/cm^3 e velocità di sedimentazione uguale a quella della particella in questione. La velocità di deposizione delle particelle in atmosfera (e quindi il loro tempo di permanenza nell'ambiente) è direttamente proporzionale al loro diametro aerodinamico (15). Le particelle che costituiscono le polveri atmosferiche hanno un diametro aerodinamico che spazia approssimativamente da 0.001 a 100 μm . L'analisi del numero e del volume delle particelle in funzione del loro diametro aerodinamico mostra che il particolato ultrafine costituisce più dell'80% del numero totale di particelle presenti nell'aerosol atmosferico; viceversa la maggior parte della massa è dovuta alle frazioni più grandi di 0.1 μm .

L'aerosol atmosferico è comunemente classificato, in base alle dimensioni delle particelle che lo compongono, in quattro intervalli (16). Particelle di diametro compreso tra 2 e 100 μm costituiscono la frazione "coarse". La composizione chimica di questa frazione, essenzialmente di tipo inorganico, dipende dalla posizione geografica (zone costiere, deserti ecc.). Particelle di dimensioni comprese tra 0.1 μm e 1-2 μm costituiscono il cosiddetto intervallo di accumulazione e si formano per coagulazione di particelle più piccole o per condensazione di composti volatili presenti nell'atmosfera su particelle preesistenti. Le particelle dell'intervallo di accumulazione costituiscono il "particolato fine", hanno una componente organica significativa oltre a contenere composti inorganici solubili (solfati e nitrati). Particelle con diametro nell'intervallo da 10 a 100 nm sono definite nuclei di Aitken; derivano da meccanismi di nucleazione a bassa temperatura a partire da vapori sovrasaturi o si formano nei sistemi di combustione. Queste particelle agiscono da nuclei di condensazione favorendo così la formazione di particelle nell'intervallo di accumulazione. Esse sono costituite essenzialmente da carbonio di tipo elementare ed organico e costituiscono il cosiddetto "particolato ultrafine" (diametro aerodinamico $<0.1 \mu\text{m}$). Lo sviluppo di tecniche di misura di particelle con diametri inferiori a 10 nm ha mostrato la presenza di particelle in un intervallo definito di nucleazione. Esse sono denominate "nanoparticelle" e si formano a partire da precursori gassosi emessi in atmosfera che, in seguito, crescono ulteriormente in dimensioni mediante processi di coagulazione, condensazione e accumulazione (17, 18).

La concentrazione in aria delle particelle, che in genere, in assenza di inquinamento, è dell'ordine di 1-1,5 $\mu\text{g/m}^3$, viene limitata dalla naturale tendenza alla deposizione per effetto della gravità e/o per deposizione secca o umida (19). La permanenza del particolato in atmosfera è fortemente condizionata, inoltre, dalle precipitazioni e dalla natura dei venti, oltre che dalle dimensioni delle parti-

celle stesse. Infatti, le particelle con un diametro superiore a 50 μm , visibili in aria, sedimentano piuttosto velocemente, causando fenomeni di inquinamento su scala molto ristretta, mentre le più piccole possono rimanere in sospensione per molto tempo, fin quando gli urti casuali e la reciproca attrazione le fanno collidere e riunire assieme, raggiungendo in tal modo dimensioni tali da acquistare una velocità di caduta sufficiente a farle depositare al suolo.

La composizione chimica del particolato è abbastanza complessa e dipende dall'area di provenienza, dalla tipologia delle sorgenti di emissione dominanti (cioè dal tipo di insediamenti presenti nella zona) e dal clima. Anche nello stesso luogo la composizione dell'aerosol può variare tra un anno e l'altro, tra una stagione e l'altra, tra un giorno e l'altro. Il particolato atmosferico è, in genere, costituito da solfati, nitrati, ammonio, carbonio organico, carbonio elementare, minerali, sali, acqua. Di queste specie, il solfato, l'ammonio e il carbonio organico predominano nelle particelle fini ed ultrafini, la cui formazione è principalmente legata a fonti secondarie; tuttavia, nella frazione fine ed ultrafine si trovano anche composti di origine primaria, come il carbonio elementare, metalli e idrocarburi policiclici aromatici (20).

La componente carboniosa presente nel particolato atmosferico è costituita da una frazione organica, nota come carbonio organico, e da una frazione resistente all'ossidazione ad una temperatura al di sotto dei 400⁰ C. Se le due frazioni vengono distinte secondo le proprietà termiche, questa seconda frazione è chiamata carbonio elementare, mentre se vengono prese in considerazione le loro proprietà ottiche, la seconda frazione, che mostra un forte potere assorbente della luce, è chiamata carbone nero (carbon black). Il carbonio organico particolato è una miscela di idrocarburi e di composti ossigenati ed ha sia un'origine primaria sia secondaria (16-21). Circa il 30% del $\text{PM}_{2,5}$ è costituito da carbonio organico ed elementare, che insieme costituiscono il particolato totale organico. La frazione di particolato totale organico aumenta se si analizzano le frazioni di particolato totale sospeso con dimensioni inferiori, fino a raggiungere circa il 55% nella frazione con dimensioni < a 1 μm (PM_1) e più del 60-65% nella frazione con dimensioni inferiori a 0.1 μm ($\text{PM}_{0,1}$) (16). In quest'ultima classe di dimensioni il contributo prevalente al particolato totale organico è costituito dal carbonio organico (circa il 90% del particolato totale organico).

Esposizione al particolato ultrafine

Sebbene il particolato prodotto per cause naturali sia preponderante (circa il 94%) rispetto a quello derivante da attività umane, le sorgenti antropiche sono in grado di immettere in atmosfera una maggior quantità di particelle ultrafini, ritenute tossicologicamente rilevanti per la salute e per l'ambiente. La presenza in aria di particelle di origine naturale è connessa a processi chimici e fotochimici in atmosfera, processi biologici, sia in ambiente terrestre che acquatico, eruzioni vulcaniche, attività tettonica ed azione erosiva dei venti. Il contributo antropico è, invece, attribuibile alle diverse attività industriali, alla produzione di energia, al riscaldamento domestico e ai mezzi di trasporto. La

fonte predominante di polveri sospese nelle aree urbane è rappresentata dal traffico veicolare che, mediante l'immissione di particolato fine ed ultrafine, determina il 50-60% del livello complessivo dell'inquinamento atmosferico (22).

Alcuni studi dimostrano che le concentrazioni di particolato ultrafine sono molto alte nei pressi delle strade ad alto scorrimento e decrescono significativamente solo a centinaia di metri di distanza dalla strada. Un'importante fonte di esposizione al particolato ultrafine è data non solo dal tempo speso all'interno dei veicoli ma anche da quello trascorso in zone trafficate (23, 24). Oltre alla densità del traffico veicolare fattori meteorologici e stagionali influenzano la concentrazione del particolato atmosferico, ad esempio è stato dimostrato che il numero di particelle con dimensioni comprese nell'intervallo tra 6 e 12 nm aumenta significativamente in inverno (25).

I lavoratori maggiormente esposti a particelle ultrafini risultano, quindi, quelli impegnati nel settore dei trasporti e, in linea generale, in tutte le attività che comportano esposizione ad emissioni veicolari (vigili urbani, benzinai, etc.). Inoltre, l'esposizione professionale a particelle ultrafini avviene anche in attività che prevedono processi di combustione, saldatura, emissioni diesel, trattamento a caldo di metalli, o manipolazione di materiali con dimensioni ultrafini, come nero di carbone ed alcuni ossidi metallici (Si, Ti, Zn, Mg) (26-28).

Legislazione

I valori limite di concentrazione in aria del particolato ambientale sono definiti nel Decreto Ministeriale n.60 del 2 aprile 2002 che, dal 1 gennaio 2005, non prevede margini di tolleranza. Tale decreto attua le disposizioni del D. Lgs. n.351 del 4 agosto 1999 e recepisce, insieme con quest'ultimo, le norme europee di riferimento per questo inquinante, ossia le Direttive 96/62/CE9 e 1999/30/CE. Dal 1 gennaio 2005 sono, quindi, entrati in vigore limiti più stringenti in particolare per quanto riguarda le concentrazioni del particolato atmosferico con diametro inferiore a 10 μm (PM_{10}). La concentrazione media annua da non superare è di 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ dal 2010), mentre la media giornaliera di 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ non deve essere superata per più di 35 giorni all'anno (29-32).

Il 21 settembre 2005 è stata emanata la nuova Direttiva del Parlamento Europeo che rimanda al 2010 (con ampia tolleranza) l'applicazione dei valori limite per il PM_{10} già previsti dalla Direttiva del 1999 che innalza il valore limite annuale per il PM_{10} a 40 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (con un 20% di tolleranza senza una specifica data di scadenza) e lascia fissato a 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ il valore limite del PM_{10} per le 24, con 35 eccedenze ma con il 50% di tolleranza.

Nel 2006 l'OMS, riconoscendo la correlazione fra esposizione alle polveri ultrafini e insorgenza di malattie cardiovascolari e avendo verificato un incremento del danno arrecato all'aumentare della finezza delle polveri, ha indicato anche il $\text{PM}_{2,5}$ quale misura aggiuntiva di riferimento per valutare i livelli di inquinamento da polveri in aria e ha abbassato i livelli di concentrazione massimi consigliati a 20 e 10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, rispettivamente per PM_{10} e $\text{PM}_{2,5}$.

La normativa attuale riferita al controllo della qualità dell'aria prevede, quindi, il monitoraggio delle concentrazioni in massa di PM_{10} e $PM_{2,5}$; dall'analisi della letteratura scientifica si evidenzia, tuttavia, alla luce di quanto esposto in termini di effetti sulla salute umana, l'importanza di incrementare gli studi ed il monitoraggio dell'aerosol di dimensioni inferiori fino ad arrivare alle particelle ultrafini ($PM_{0,1}$).

Tossicocinetica del particolato ultrafine

Gli effetti biologici del particolato atmosferico sono attribuibili alla capacità delle particelle di penetrare nell'organismo, soprattutto attraverso l'apparato respiratorio. L'entità della penetrazione e il sito di deposizione degli aerosol all'interno del tratto respiratorio varia in relazione alle dimensioni delle particelle. Le particelle di diametro maggiore o uguale a $5\ \mu m$ (frazione coarse) si depositano, di norma, nelle vie aeree superiori (naso, faringe, laringe, trachea e bronchi); quelle più piccole, di diametro compreso tra 1 e $5\ \mu m$ (frazione fine), raggiungono la porzione terminale dell'albero respiratorio (bronchioli terminali, alveoli). Le particelle ultrafini, di diametro inferiore a $1\ \mu m$, si concentrano nella zona alveolare del polmone, dove possono essere rapidamente assorbite. In questa zona il flusso dell'aria è prossimo a zero e la velocità e l'entità di deposizione delle particelle ultrafini aumenta a causa dell'elevata efficienza di deposizione per diffusione. Tuttavia, recenti studi hanno evidenziato che la deposizione delle particelle non può essere espressa semplicemente in base alle sole dimensioni (33): le particelle della frazione ultrafine si depositano in modo significativo sia nelle regioni alveolari che tracheobronchiali, anche se in quest'ultima zona la deposizione avviene in percentuale inferiore. Nonostante ciò, occorre tener conto che la densità di particelle ivi depositate è considerevolmente maggiore di quella alveolare, in quanto l'area superficiale disponibile nella regione tracheobronchiale è minore di quelle della regione alveolare (da 50 a $100\ m^2$).

Uno studio condotto dall'International Commission on Radiological Protection (ICRP), riguardante la deposizione polmonare delle particelle di dimensioni comprese tra 5 e $20\ nm$, ha mostrato che le particelle di dimensioni inferiori a $20\ nm$ si distribuiscono per il 50% nella regione alveolare, mentre solo il 10% si deposita nella regione naso-faringea o tracheobronchiale. Le particelle di dimensione comprese tra 5 e $10\ nm$, invece, si distribuiscono in ugual misura in tutte e tre le regioni; ciò sembra attribuibile al fatto che minori sono le dimensioni maggiori sono le capacità di ricircolo all'interno del polmone (34).

La rimozione delle particelle depositate all'interno del tratto respiratorio è dovuta essenzialmente a due meccanismi: clearance chimica e traslocazione fisica.

La clearance delle particelle dagli alveoli avviene in opera dei macrofagi, la cui attività è facilitata dalla attrazione chemiotattica dei macrofagi stessi verso i siti di deposizione. La chemiotassi è mediata dalla proteina del

complemento C5a, che deriva dall'attivazione delle proteine sieriche presenti sulla superficie alveolare. I macrofagi alveolari fagocitano rapidamente le particelle che si depositano nelle vie aeree, ma la loro capacità fagocitaria diminuisce all'aumentare del numero delle particelle stesse (35). La cascata di eventi legata all'attivazione dei macrofagi alveolari dipende non solo dalla massa totale di particelle inalate, ma anche dalla dimensione delle particelle, come confermato da studi effettuati in vivo (36-39). In uno di questi studi, sono stati somministrati ad animali da esperimento (ratti) particelle di diverse dimensioni (da $15\ nm$ a $10\ \mu m$), mediante instillazione intratracheale. Dopo lavaggio bronco-alveolare (BAL) sono state ritrovate nel BAL, insieme ai macrofagi, circa l'80% delle particelle di dimensioni tra $0,5$ e $10\ \mu m$ e solo il 20% delle particelle di dimensioni comprese tra 15 e $20\ nm$. Questo indica che le nanoparticelle sono capaci di sfuggire alla fagocitosi dei macrofagi alveolari, penetrando così nell'interstizio polmonare, incluso l'endotelio vascolare.

Distribuzione nel sistema circolatorio

Numerosi studi sono stati realizzati per studiare il meccanismo di traslocazione delle particelle ultrafini: Berry et al. (40, 41), dopo instillazione intratracheale di particelle di oro ($30\ nm$) nei ratti, hanno osservato che già a 30 minuti dall'instillazione, le particelle si ritrovano nelle piastrine e nei capillari polmonari. Successivamente alle osservazioni effettuate da Berry et al nel 1977, numerose ricerche hanno analizzato la traslocazione dei differenti tipi di particelle (Kreyling et al. 2002, Oberdörster et al. 2002, Nemmar et al. 2002, Mehta et al. 2004, Heckel et al. 2004). Dall'analisi dei risultati di questi studi si può affermare che i fattori influenti la traslocazione sono rappresentati dalla grandezza, dalla composizione e dal numero delle particelle. È stato, inoltre, osservato che le particelle possono essere veicolate da molecole quali la caveolina, l'albumina, la lecitina ed i fosfolipidi.

I meccanismi di accumulo delle particelle sono stati studiati da Nemmar et al. su volontari sani (42): sono state somministrate particelle di dimensioni inferiori a $100\ nm$ marcate con ^{99m}Tc . Dopo 1 minuto dalla somministrazione, le particelle marcate con tecnecio erano uniformemente distribuite nel sangue, raggiungendo la massima concentrazione tra i 10 e i 20 minuti, per poi diminuire dopo circa 60 minuti.

Una volta traslocate nel sistema circolatorio, le particelle vengono accumulate principalmente nel fegato e nella milza oltre che nel midollo osseo, a livello del cuore e dei reni.

Distribuzione nel sistema nervoso centrale

Le particelle ultrafini, oltre a penetrare nel sangue ed accumularsi negli organi target, possono raggiungere direttamente il SNC mediante la risalita attraverso il bulbo olfattorio. I primi studi recanti informazioni circa la traslocazione delle particelle ultrafini nel SNC sono stati effettuati nel lontano 1941 da Bodian e Howe (43, 44), i quali dimostrarono che virus di dimensioni di circa $30\ nm$, dopo instillazione nasale, erano capaci di attraversare il nervo e il bulbo olfattorio e risalire al SNC.

La velocità di risalita dei polio-virus attraverso gli assoni è stata stimata pari a circa 2,4 mm/ora, velocità equivalente alle capacità di trasporto assonale per molecole fino a 500 nm, così come osservato da Adams e Bray (45) e da de Lorenzo (46) per particelle di oro della grandezza di 50 nm. Inoltre, le particelle d'oro sembrano in grado di attraversare anche le sinapsi dei dendriti e di accumularsi all'interno dei mitocondri. Altri studi hanno poi confermato la capacità delle particelle ultrafini di penetrare nelle cellule neuronali, capacità che invece non è stata osservata per particelle di dimensioni maggiori (47, 48).

È quindi evidente che nella valutazione dell'esposizione ambientale ed occupazionale dell'uomo a particolato ultrafine bisogna considerare come organo target anche il SNC. Tuttavia bisogna tenere in considerazione che finora sono stati condotti prevalentemente studi su ratti e che vi è una sostanziale differenza tra la mucosa olfattoria dell'uomo e quella del ratto. Infatti, nell'uomo questa occupa il 5% del totale della mucosa nasale, contro il 50% di quelle dei ratti.

Tossicodinamica delle particelle ultrafini

La letteratura, sempre più frequentemente, riporta dati scientifici che evidenziano l'incremento delle patologie respiratorie in relazione all'inquinamento atmosferico. Negli ultimi dieci anni, ricerche tossicologiche ed epidemiologiche hanno dimostrato che le particelle ultrafini sono responsabili di effetti dannosi per la salute umana, sia a breve termine (effetti acuti) che a lungo termine (effetti cronici).

Tra i principali effetti dell'esposizione a breve termine vi sono le patologie infiammatorie a carico del sistema respiratorio (faringiti, bronchiti, asma) e delle mucose (allergie, congiuntiviti) in aggiunta a patologie a carico del sistema cardiovascolare (aumento della frequenza cardiaca e dei valori pressori, IMA). I principali indicatori sanitari che quantificano tali effetti sono l'incremento della richiesta di cure mediche, dei ricoveri ospedalieri e della mortalità. L'esposizione nel lungo tempo al particolato è, invece, associata ad un aumento delle patologie polmonari ostruttive croniche e ad una riduzione della funzionalità polmonare sia nei bambini che negli adulti; significativo è anche l'incremento di patologie cancerose, primo fra tutti il tumore al polmone. I decessi legati a questa patologia, assieme alla mortalità per cause cardiopolmonari, rappresentano i principali contributi ad una sostanziale riduzione dell'aspettativa di vita associata all'esposizione al particolato atmosferico.

Apparato Polmonare

Studi epidemiologici nella popolazione generale hanno mostrato associazioni tra livelli atmosferici di particelle fini ed ultrafini ed incrementi di morbilità e mortalità per patologie respiratorie e cardiovascolari (49, 50). Inoltre, è stato documentato un aumento di incidenza di cancro polmonare nei lavoratori esposti a particelle ultrafini emesse dai motori diesel e fumi di saldatura (51-54). Numerose indagini sono state condotte per valutare l'asso-

ciazione tra variazione giornaliera dei sintomi respiratori o della funzione polmonare ed inquinamento atmosferico in popolazioni di asmatici (18, 49, 50, 52). Il grado di associazione osservato è risultato maggiore per i sintomi di interesse bronchiale. Si è registrato, inoltre, un aumento dell'uso di broncodilatatori conseguentemente ai giorni di maggiore inquinamento ambientale (55). Osservazioni condotte negli Stati Uniti hanno messo in evidenza un aumento del numero delle assenze (giornate lavorative per gli adulti e giorni di scuola per i bambini) a seguito degli effetti sulla salute dovuti all'esposizione a particelle fini ed ultrafini (56). Nella valutazione dell'effetto sulla funzionalità polmonare, si è osservato una diminuzione dei valori spirometrici con un tempo di latenza dall'esposizione fino a 7 giorni. In particolare, sono state documentate alterazioni della funzionalità e dello sviluppo dei polmoni nei bambini e negli adolescenti residenti in aree urbane (57, 58). I bambini e le persone affette da malattie respiratorie e cardiovascolari, a parità di esposizione, risultano più suscettibili degli altri agli effetti dannosi del particolato ultrafine. I bambini sono esposti a maggior rischio di sviluppo di patologie a causa delle minori dimensioni del polmone, dell'imaturità dell'apparato respiratorio rispetto agli adulti e della ridotta capacità di clearance delle particelle.

Le persone affette da malattie polmonari di tipo infiammatorio (asma) o da infezioni respiratorie possono essere predisposte a sviluppare, in seguito ad esposizione al particolato, una risposta proinfiammatoria esagerata, in grado di produrre un aggravamento della malattia preesistente. Recenti studi, condotti su animali hanno evidenziato la capacità da parte di particelle ultrafini (TiO₂ e polistirene) di accedere direttamente alle strutture intracellulari (proteine, organelli, DNA) tramite meccanismi diffusivi e adesivi, evitando i consueti processi endocitici (59). Il meccanismo alla base degli effetti respiratori sembra essere riconducibile all'induzione di stress ossidativo da parte delle particelle depositate sulla superficie delle cellule polmonari (60). I radicali liberi generati inducono l'attivazione dei macrofagi con conseguente rilascio di specie reattive dell'ossigeno e molecole pro-infiammatorie, le quali danno inizio alla risposta infiammatoria acuta nel polmone.

Le cellule epiteliali polmonari, anch'esse in grado di fagocitare le particelle, amplificano la risposta infiammatoria e rispondono allo squilibrio nel bilancio redox cellulare indotto dai radicali liberi con l'attivazione di fattori di trascrizione (NFκB, AP-1 e AP-2) e il rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL 6, IL 8, TNFα), chemochine, molecole di adesione cellulare e recettori per i mediatori dell'infiammazione. Le particelle ultrafini, penetrando nelle regioni interstiziali del polmone, entrano in contatto con i macrofagi interstiziali ed inducono la liberazione di mediatori dell'infiammazione che possono entrare nel circolo sanguigno e produrre una risposta infiammatoria sistemica. Il perpetuarsi dello stimolo nocivo, secondario all'accumulo delle particelle, determina infiammazione polmonare cronica, con conseguente trasformazione patologica dell'epitelio (metaplasma mucosa) sino a giungere alla fibrosi polmonare e/o al cancro.

Evidenze sperimentali ottenute in studi condotti su volontari, su animali e in vitro, suggeriscono che il particolato ultrafine ha la capacità di aumentare le risposte immunitarie agli allergeni e di indurre reazioni infiammatorie delle vie aeree anche a seguito di esposizioni relativamente brevi a concentrazioni relativamente basse di particolato (61). Il meccanismo ipotizzato per l'esacerbazione dell'asma nei soggetti esposti ad ultraparticolato sembra riconducibile all'attivazione del recettore della capsacina, responsabile della contrazione della muscolatura liscia bronchiale, che determina riduzione del diametro alveolare. Tali effetti sembrano essere cumulativi ed irreversibili. Uno studio condotto da Frampton et al. mostra una diminuzione del numero dei granulociti polimorfonucleati nel sangue di volontari sani esposti ad ultraparticolato e una riduzione dell'espressione di molecole di adesione (CD54, CD11B E CD18), con conseguente alterazione della difesa immunitaria polmonare (62).

In conclusione, il danno polmonare indotto dal particolato ultrafine sembra essere riconducibile ad un danno diretto da parte delle particelle, all'alterazione della funzionalità polmonare, all'esacerbazione di malattie polmonari preesistenti e all'alterazione della difesa immunitaria polmonare.

Apparato Cardiovascolare

Negli ultimi dieci anni, ricerche tossicologiche ed epidemiologiche hanno mostrato una stretta associazione tra inquinamento da particolato fine ed ultrafine ed aumento della ospedalizzazione e della mortalità dovute ad eventi cardiovascolari. In soggetti adulti sani, in coincidenza di episodi acuti di inquinamento atmosferico, sono stati osservati: incremento della viscosità del plasma, aumento della frequenza cardiaca e dei valori pressori, abbassamento della variabilità della frequenza cardiaca ed aumento in circolo dei markers di trombosi ed infiammazione (63). Un recente studio italiano, condotto da D'Ippoliti e coll., ha rapportato i livelli di inquinanti dell'aria alle ospedalizzazioni giornaliere per infarto miocardico acuto (IMA) nella popolazione di Roma; utilizzando un'analisi case-crossover, lo studio ha messo in luce un'associazione positiva tra i livelli di particolato totale ed il rischio di infarto miocardico acuto (64). Altri studi sull'uomo hanno osservato un legame tra i livelli di particolato ultrafine e la variabilità della frequenza cardiaca soprattutto nei soggetti anziani con preesistente malattia cardiovascolare (65).

L'esposizione a particolato ambientale è stata associata, inoltre, ad un incremento della frequenza cardiaca, tuttavia le evidenze disponibili in letteratura a questo riguardo appaiono meno robuste rispetto a quelle che dimostrano l'associazione tra esposizione a particolato ed alterazione della variabilità della frequenza cardiaca (66, 67).

Oltre a quanto detto finora, sono state documentate depressioni del tratto ST, aumento di runs sopraventricolari e tachicardia ventricolare in soggetti affetti da patologie cardiovascolari (68, 69). Studi su animali, infine, suggeriscono che l'esposizione al particolato ambientale, oltre a provocare reazioni infiammatorie a livello respiratorio e sistemico, sia associata ad alterazioni dei livelli circolanti di parametri correlati alla coagulazione. Queste alterazioni sono

state correlate con una aumentata ipercoagulabilità sistemica osservata negli stessi modelli animali. Nell'uomo, sono disponibili dati che dimostrano un'associazione dei livelli sierici di fibrinogeno, fattore di von Willebrand, fattore VIII e proteina-C reattiva con l'esposizione a particolato atmosferico (70, 71). Le spiegazioni sui meccanismi biologici in grado di giustificare i dati sopracitati sono, per il momento, solo delle ipotesi. Quelle maggiormente accreditate sono focalizzate su due punti:

- le particelle depositate negli alveoli causano reazioni infiammatorie nel polmone che inducono il rilascio di mediatori in grado di influenzare la coagulazione ed altri parametri cardiovascolari.
- le particelle ultrafini si trasferiscono dal polmone direttamente al torrente circolatorio, dove influenzano la funzione cardiaca ed i processi di coagulazione aumentando il rischio di trombosi e infarto. Recenti studi, inoltre, ipotizzano che l'attivazione di riflessi nervosi in seguito ad interazione con recettori polmonari potrebbe provocare modificazioni dell'attivazione del sistema nervoso autonomo e contribuire all'iniziazione di aritmie cardiache o alla instabilità di placche vascolari (71-74).

Meccanismi di tossicità cellulare

In funzione delle piccole dimensioni e dell'alta reattività di superficie, le particelle ultrafini possiedono la capacità di attraversare le membrane cellulari ed accumularsi in differenti tipi cellulari, distribuendosi sia nel citosol che nel nucleo cellulare. Oltre a studi in vivo, esperimenti in vitro hanno fornito informazioni dettagliate circa i meccanismi molecolari di uptake e penetrazione delle particelle ultrafini (75-80). Savic et al., mediante microscopia confocale con tecnica di scansione (CLSM), hanno dimostrato la presenza di particelle di dimensioni comprese tra 20 e 45 nm, all'interno degli organelli citoplasmatici; le particelle ultrafini sono state, infatti, ritrovate nel reticolo endoplasmatico, nell'apparato di Golgi, nei lisosomi e nei mitocondri (81).

Nel tentativo di definire la grandezza delle particelle che possiedono la capacità di raggiungere il nucleo cellulare, Pantè e Kann, mediante tecniche di microscopia elettronica, hanno mostrato che particelle di oro, con un diametro di 39 nm, possono liberamente traslocare all'interno dei nuclei cellulari. Al contrario, particelle fini e coarse di SiO₂ (0,2 e 5 µm), sono state ritrovate all'interno delle cellule, accumulate nel citosol ma non nel nucleo (82). Le piccole dimensioni sono, quindi, essenziali per la penetrazione delle particelle all'interno della cellula. Si ipotizza, però, che altri fattori, quali le modificazioni della superficie particellare, giocano un ruolo importante nei meccanismi di endocitosi. Infatti, è stato dimostrato che particelle di CdTe (green cationic cadmium telluride), pur se di dimensioni piccolissime (2.2 nm), non possiedono la capacità di raggiungere il nucleo cellulare (83).

Il meccanismo di penetrazione delle particelle ultrafini all'interno della cellula è estremamente complesso e sembra essere dipendente da processi di endocitosi, mediati da

molecoli quali clatrina e caveolina. Una volta raggiunte le cellule, le particelle vengono concentrate in corrispondenza di regioni della membrana plasmatica che successivamente si invaginano per costituire le vescicole di endocitosi. Queste regioni della membrana plasmatica, dette fossette rivestite, sono costituite per la maggior parte da clatrina, una proteina di circa 180000 dalton. Le particelle, quindi, vengono inglobate nelle fossette rivestite, che si staccano dalla membrana plasmatica ed affondano nel citoplasma sottostante sotto forma di vescicole di endocitosi (84).

Raggiunto il citosol, le nanoparticelle possono seguire una delle tre seguenti vie: legarsi ai "late endosomi" per essere degradate; legarsi ai recettori perinucleari; muoversi lungo i microtubuli per raggiungere il reticolo endoplasmatico. Negli ultimi due casi, il passaggio delle particelle all'interno del nucleo è facilitato dalla vicinanza al nucleo cellulare. L'endocitosi mediata dalla caveolina previene la formazione di vescicole, i caveosomi, che si muovono lungo il reticolo endoplasmatico liscio; per mezzo della continuità del lume del reticolo endoplasmatico con la membrana nucleare, le particelle penetrano direttamente nel nucleo cellulare. È stato, inoltre, dimostrato che l'uptake delle particelle può essere mediato da altri microdomini della membrana plasmatica, che sono responsabili della formazione di vescicole all'interno del citosol, permettendo così il passaggio delle particelle nella cellula in modo indipendente dal trasporto mediato dalla caveolina e dalla claritina (85). La citotossicità, secondaria alla penetrazione delle particelle all'interno della cellula, può esprimersi con l'apoptosi e/o la necrosi cellulare, fenomeni dovuti a meccanismi di stress ossidativo, danno al DNA e a liberazione di mediatori dell'infiammazione.

La produzione di radicali liberi e l'aumento del calcio intracellulare, secondari all'ingresso delle particelle all'interno della cellula, sembrano responsabili dell'attivazione di fattori di trascrizione (NFκB, AP-1 e AP-2) e del rilascio di citochine pro-infiammatorie (IL6, IL8, TNFα), chemochine, molecole di adesione cellulare e recettori per i mediatori dell'infiammazione.

Le particelle ultrafini sembrano, inoltre, agire direttamente sul nucleo cellulare determinando alterazioni strutturali e funzionali di questo sino ad inibizione della proliferazione cellulare.

La produzione di radicali liberi e l'azione diretta del particolato sembrano essere responsabili di alterazioni della membrana plasmatica, riduzione del metabolismo cellulare e danno mitocondriale (86).

Xia et al, hanno mostrato che sospensioni di particelle urbane ultrafini, quali le particelle di "diesel exhaust", sono capaci di ridurre il potenziale di membrana delle cellule ed indurre sia perdita di massa della membrana mitocondriale che apoptosi (87). Le alterazioni della membrana mitocondriale seguono un'ordinata sequenza di eventi che comincia con cambiamenti di potenziali di membrana e si conclude con perdita del citocromo C e sviluppo di asimmetrie. Il danno strutturale della membrana interna mitocondriale è stato evidenziato attraverso la diminuzione della massa cardiopolipinica e meccanismi di fosforilazione ossidativa (88).

Conclusioni

La valutazione unicausale dell'azione del particolato ultrafine sulla salute è resa complicata da una innumerevole serie di problematiche, quali ad esempio le difficoltà tecniche presentate dal monitoraggio ambientale e la difficoltà nell'interpretare gli ipotetici effetti additivi o sinergici che tali particelle possono avere con altri inquinanti presenti nell'aria. Lo studio dei meccanismi d'azione di queste particelle, inoltre, presenta particolari difficoltà a causa dell'elevatissimo numero di reazioni chimiche e meccanismi biologici che entrano in gioco nell'organismo a seguito dell'esposizione a particolato ambientale.

Dall'analisi della letteratura emerge che le particelle ultrafini sono più potenti delle particelle di maggiore dimensioni nell'indurre effetti dannosi alla salute umana. A livello cellulare, la produzione di radicali liberi, l'immissione in circolo di citochine ed il danno diretto del particolato ultrafine causerebbero alterazione della membrana plasmatica, del nucleo cellulare, danno mitocondriale e riduzione del metabolismo cellulare con successiva morte cellulare per necrosi e/o apoptosi. Numerosi studi epidemiologici e sperimentali *in vivo* hanno mostrato inoltre la forte correlazione tra esposizione ad ultraparticolato ed effetti sulla salute umana, in particolare sull'apparato respiratorio e cardiovascolare.

Ringraziamenti

Si ringrazia il gruppo di lavoro del Dipartimento di Ingegneria Chimica dell'Università degli Studi di Napoli Federico II, coordinato dal compianto Prof. D'Alessio, per il contributo nello sviluppo di questa review.

Bibliografia

- 1) Dominici F, McDermott A, Daniels D, et al. Mortality among residents of 90 cities. In: Special Report: Revised Analyses of Time-Series Studies of Air Pollution and Health. Boston, Mass: Health Effects Institute 2003; 9-24.
- 2) Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, et al. Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 Project. *Epidemiology* 2001; 12: 521-531.
- 3) Biggeri A, Bellini P, Terraccini B. Meta-analysis of the Italian studies on short-term effect of air pollution. *Epidemiol Prev* 2004; 25 (2): 1-100.
- 4) Brook RD, Franklin B, Cascio W et al. Air pollution and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American heart association. *Circulation* 2004; 109: 2655-2671.
- 5) Pearson TA, Blair SN, Daniels SR, et al, for the American Heart Association Science Advisory and Coordinating Committee. AHA guidelines for primary prevention of cardiovascular disease and stroke: 2002 update: consensus panel guide to comprehensive risk reduction for adult patients without coronary or other atherosclerotic vascular diseases. *Circulation* 2002; 106: 388-391.
- 6) Pope CA, Burnett RT, Thun MJ, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 2002; 287: 1132-1141.
- 7) Renwick LC, Brown D, Clouter A, Donaldson K. Increased inflammation and altered macrophage chemotactic response caused by two ultrafine particle type. *Occup Environ Med* 2004; 61: 442-447.

- 8) Heinrich U, Fuhrst R, Rittinghausen S, Creutzenberg O, Bellman B, Koch W, Levsen K. Chronic inhalation exposure of wistar rats and two different strains of mice to dieselengine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhal Toxicol* 1995; 7(4): 533-556.
- 9) Gardiner K, van Tongeren M, Harrington M. Respiratory health effects from exposure to carbon black: results of the phase 2 and 3 cross sectional studies in the European carbon black manufacturing industry. *Occup Environ Med* 2001; 58 (8): 496-503.
- 10) Antonini JM, Lewis AB, Roberts JR, Whaley DA. Pulmonary effects of welding fumes: review of worker and experimental animal studies. *Am J Ind Med* 2003; 43: 350-360.
- 11) Sioutas C, Delfino RJ et al. Exposure Assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiologic. *Environmental Health Perspectives* 2005; 113 (8): 947-955.
- 12) Froines J R et al. Ultrafine particle health effects. Goods ovment task force meeting. May 2006; 17.
- 13) Oberdörster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* 2001; 74: 1-8.
- 14) Nel AE, Diaz-Sanchez D, Li N. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7: 20-26.
- 15) Hidy GM, Mueller PK, Grosjean D, Appel BR, Wesolowski J. The character and origins of smog aerosols: a digest of results from the California Aerosol Characterization Experiment (ACHEX). New York, NY: John Wiley & Sons, Inc.; Advances in environmental science and technology 2005; 20: 477-517.
- 16) D'Alessio A, D'Anna A et al. Caratteristiche del particolato fine ed ultrafine formato in combustione. *Chimica e Industria* 2005; 87 (1): 34-38.
- 17) Geller MD, Sardar S, Fine PM, Siontas C. Measurements of particle number and mass concentrations and size distribution in a tunnel environment. *Environ Sci Technol* 2005; 39: 8653-8663.
- 18) Peters A et al. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997; 155: 1376-1383.
- 19) Rauch S, Hemond HF, Peucker-Ehrenbrink B, Barbante C, Owari M, Wass UG, Morrison M. Regional and global transport of platinum group elements from automobile catalysts. *Analytic, Environmental Assessment and Health Effects* 2005.
- 20) Rodríguez S, Van Dingenen R, Putaud JP, Dos Santos SM, Roselli D. Nucleation and growth of new particles in the rural atmosphere of Northern Italy-relationship to air quality monitoring. *Atmospheric Environment* 2005; 39 (36): 6734-6746.
- 21) Lepore L, Brocco D e Avino R. Carbonio organico e carbonio elementare nelle particelle atmosferiche. *Ann Ist Super Sanità* 2003; 39(3): 365-369.
- 22) Koeber R, Bayona JM, Niessner R. Environmental science and technology 1999; 10: 1552-1558.
- 23) Sioutas C, Delfino R J; *Environmental Health Perspect* 2005; 113: 942-950.
- 24) Shi JP, Evans E et al. *Atmos Environ* 2001; 35: 1193-1199.
- 25) Zhu Y, Hinds WC. *Aerosol Sci Technol* 2004; 38: 5-11.
- 26) International Standardization Organisation (ISO) (2005). Workplace Atmospheres- Ultrafine, nanoparticle and nano-structured aerosol-Exposure characterization and assessment. Working document ISO/TC 146/SC 2 N 399, 15.12.2005.
- 27) Zimmer AT. The influence of metallurgy on the formation of welding aerosols. *J Environ Monit* 2002; 4: 628-632.
- 28) Kim S, Shen S, Sioutas C, Zhu Y, Hinds W. Size distribution and diurnal and seasonal trends of ultrafine particles in source and receptor sites of the Los Angeles Basin. *J Air Waste Manag Assoc* 2002; 52: 297-307.
- 29) D.M. 60/02: recepimento della direttiva 1990/30/CE del Consiglio del 22 aprile del 1999 concernente i valori limite di qualità dell'aria ambiente per il biossido di zolfo, il biossido di azoto, gli ossidi di azoto, le particelle e il piombo e della direttiva 2000/69/CE relativa ai valori limite della qualità dell'aria ambiente per il benzene ed il monossido di carbonio.
- 30) D.Lgs. 351/99: attuazione della direttiva 96/62/CE in materia di valutazione e gestione della qualità dell'aria.
- 31) Direttiva 96/62/CE del Consiglio del 27 settembre 1996 in materia di valutazione e di gestione della qualità dell'aria ambiente.
- 32) Direttiva 99/30/CE del Consiglio del 22 aprile del 1999 concernente i valori limite di qualità dell'aria ambiente per il biossido di zolfo, il biossido di azoto, gli ossidi di azoto, le particelle e il piombo.
- 33) Oberdörster G et al. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particle. *Environmental health perspect* 2005; 113: 823-836.
- 34) International Commission on Radiological Protection. Annals of the ICRP, human respiratory tract model for radiological protection. A report of a task group of the ICRP. Oxford: Pergamon Press; 1994. (ICRP Publication, 66).
- 35) Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GAM, Webb TR. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci* 2004; 77: 117-125.
- 36) Oberdörster G. Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. *Philos Trans R Soc Lond A* 2002; 358: 2719-2740.
- 37) Kreyling WG, Semmer M, Erbe FJ. *Toxicol Env Health Part A* 2001; 65: 1513-1522.
- 38) Oberdörster G, Ferin J. *Exper Lung Res* 1992; 18: 87-99.
- 39) Semmer M, Ferin J, Erbe F. *Inhal Toxicol* 2004; 16: 453-466.
- 40) Berry JP, Arnoux B, Stanislas G, Galle P, Chretien J. A microanalytic study of particles transport across the alveoli: role of blood platelets. *Biomedicine* 1977; 27: 354-357.
- 41) Nemmar, Vanquickenborne, *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1665-1675.
- 42) Nemmar, Vanquickenborne, Dinsdale, Thomeer, Hoylaerts, Vanbilloen, Mortelmans, Nemery. Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation* 2002; 105: 411-414.
- 43) Bodian D, Howe HA. Experimental studies on intraneural spread of poliomyelitis virus. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1941; 69: 248-267.
- 44) Bodian D, Howe HA. The rate of progression of poliomyelitis virus in nerves. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1941; 69: 79-85.
- 45) Adams RJ, Bray D. Rapid transport of foreign particles microinjected into crab axons. *Nature* 1983; 303: 718-720.
- 46) De Lorenzo AJ. The olfactory neuron and the blood-brain barrier. In: Taste and Smell in Vertebrates (Wolstenholme G, Knight J, eds). Churchill 1970; 151-176.
- 47) Feikert T, Mercer P, Corson N, Gelein R, Opanashuk L, Elder A, et al. Inhaled solid ultrafine particles (UFP) are efficiently translocated via neuronal naso-olfactory pathways. *Toxicologist* 2004; 78 (1): 435-436.
- 48) Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol*. 2004; 16 (6/7): 437-445.
- 49) Wichmann HE, Peters A. Epidemiological evidence of the effects of ultrafine particle exposure. *Phil Trans R Soc* 2000; 358: 2751-2769.
- 50) Penttinen P, KL Timonen, P Tittanen, A Mirme, J Ruuskanen, J Pekkanen. Ultrafine particles in urban air and respiratory health among adult asthmatics. *Eur Respir J* 2001; 17: 428-435.
- 51) Vineis P, Forastiere F, Hoek G, Lipsett M. Outdoor air pollution and lung cancer: recent epidemiologic evidence. *Int J Cancer* 2004; 111: 647-652.
- 52) Steenland K, Deddens J, Stayner L. Diesel exhaust and lung cancer in the trucking industry: exposure-response analyses and risk assessment. *Am J Ind Med* 1998; 34 (3): 220-228.
- 53) Garshick E, Laden F, Hart JE, Rosner B, Smith TJ, Dockery DW, Speizer FE. Lung cancer in railroad workers exposed to diesel exhaust. *Environ Health Perspect* 2004; 112 (15): 1539-1543.
- 54) Kim JY, Chen JC, Boyce PD, Christiani DC. Exposure to welding fumes is associated with acute systemic inflammatory response. *Occup Environ Med* 2005; 62: 157-163.
- 55) Von Klot S, Wolke G, Tuch T, Heinrich J, Dockery DW, Schwartz J, Kreyling WG, Wichmann HE, Peters A. Increased asthma medication use in association with ambient fine and ultrafine particles. *Eur Respir J* 2002; 20: 691-702.
- 56) Ostro BD. Air pollution and acute respiratory morbidity: an observational study of multiple pollutants. *Environ. Res* 1999; 50: 238-247.
- 57) Stone V. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 44-47.
- 58) Brunekreef B, Holgate ST. *Lancet* 2002.
- 59) Geiser M, Rothen-Rutishauser B, Kapp N, Schoch S, Kreyling W, Schulz H, Semmler M, Im Hof M, Heyder J, Gehr P. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and cultured cells. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 1555-1560.

- 60) Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutation Research* 2005; 592: 119-137.
- 61) Brunekreef B. Asthma, rhinitis and air pollution. Is the traffic to blame? *Eur Respir J* 2003; 21: 913-915.
- 62) Frampton MW, Stewart JC, Oberdörster G, Morrow PE, Chalupa D, Pietropaoli AP, Frasier LM, Speers DM, Cox C, Li-Shan Huang, Utell MJ. Inhalation of ultrafine particles alters blood leukocyte expression of adhesion molecules in humans. *Environ Health Perspect* 2006; 114: 51-58.
- 63) Ralph JD, Sioutas C, Malik S. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect* 2005; 113: 934-946.
- 64) D'Ippoliti D, Forastiere F, Stafoggia M, Picciotto S, Bellander T, Lanki T, von Klot S, Nyberg F, Paatero P, Peters A, Pekkanen J, Sunyer J, Peduzzi CA. A case-crossover analysis of out of hospital coronary deaths and air pollution in Rome, Italy. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172: 1549-1555.
- 65) Timonen KL, Vanninen E, de Hartog J, Ibalid-Mulli A, Brunekreef B, Gold DR, Heinrich J, Hoek G, Lanki T, Peters A, Tarkkiainen T, Tiittanen P, Kreyling W, Pekkanen J. Effects of ultrafine and fine particulate and gaseous air pollution on cardiac autonomic control in subjects with coronary artery disease: the ULTRA study. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2006; 16(4): 332-412.
- 66) Liao D, Creason J, Shy C, Williams R, Watts R, Zweidinger R. Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Environ Health Perspect* 1999; 107: 521-532.
- 67) Pope CA, Verrier RL, Lovett EG. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J* 1999; 138: 890-930.
- 68) Berger A, Zareba W, Schneider A, Ruckerl R, Ibalid-Mulli A, Cyrus J, Wichmann HE, Peters A. Runs of ventricular and supraventricular tachycardia triggered by air pollution in patients with coronary heart disease. *J Occup Environ* 2006; 48 (1): 34-44.
- 69) Pekkanen J, Peters A, Hoek G, Tiittanen P, Brunekreef B, de Hartog J, Heinrich J, Ibalid-Mulli A, Wolfgang G, Kreyling G, Lanki T, Timonen KL, Vanninen E. Particulate air pollution and risk of ST-segment depression during repeated submaximal exercise tests among subjects with coronary heart disease. *Circulation* 2002; 106: 933.
- 70) Ruckerl R, Ibalid-Mulli A, Koenig W, Schneider A, Woelke G, Cyrus J, Heinrich J, Marder V, Frampton M, Wichmann HE, Peters A. Air pollution and markers of inflammation and coagulation in patients with coronary heart disease. *Am J Respir Crit Care* 2006; 173: 432-441.
- 71) Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate S, Frew A. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 702-709.
- 72) Ruckerl R, Phipps RP, Schneider A, Frampton M, Cyrus J, Oberdörster G, Wichmann HE, Peters A. Ultrafine particles and platelet activation in patients with coronary heart disease- results from a prospective panel study- *Particle and Fibre Toxicology* 2007; 41: 2217-2414.
- 73) Schulz H et al. Cardiovascular effects of fine and ultrafine particle. *Journal of aerosol medicine* 2005; 18(1): 34-42.
- 74) Zareba W, Schneider A, Ruckerl R, Ibalid-Mulli A, Cyrus J, Wichmann HE, Peters A. Runs of ventricular and supraventricular tachycardia triggered by air pollution in patients with coronary heart disease. *J Occup Environ Med* 2006; 48(1).
- 75) Panyam J, Zhou WZ, Prabha S, Sahoo SK, Labhasetwar V. *FABES J* 2002; 16: 1217.
- 76) Godbey WT, Wu KK, Mikos AG. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 5177.
- 77) Chen M, Von Mikecz A. *Exp Cell Res* 2005; 305: 51.
- 78) De la Fuente JM, Berry CC. *Bioconj Chem* 2005; 16: 1176.
- 79) Thomas M, Klibanow. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 9138.
- 80) Carlisle RC, Bettinger T, Ogris M, Hale S, Mautner V, Seymour LW. *Mol Ther* 2001; 4: 437.
- 81) Savic R, Luo L, Eisenberg A, Maysinger D. *Science* 2003; 300: 615.
- 82) Pantè N, Kann M. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 425.
- 83) Lovric J, Bazzi HS, Cuie Y, Fortin GR, Winnik FM, Maysinger DJ. *Mol Med* 2005; 83: 377.
- 84) Antonin W, Mattaj IW. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 10.
- 85) Chook YM, Blobel G. *Curr Opin Struct Biol* 2001; 11: 703.
- 86) Chen M, Von Mikecz A. *Nanotoxicology* 2007; 5: 74.
- 87) Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1347.
- 88) Halliwell A, Gutteridge JM. *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Cary, NC (1999).

Richiesta estratti: Paola Pedata - Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Medicina del Lavoro, Igiene e Tossicologia Industriale. Seconda Università degli Studi di Napoli, Via Luigi De Crecchio n. 7, Napoli, Italy - Tel. 081-5665902/03, E-mail: paola.pedata@unina2.it