



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA
Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale

Dottorato di ricerca XXIX ciclo
Biomedicina Traslazionale.
Coordinatore: Prof. Lorenzo Malatino

Metalli pesanti ed elementi in traccia
nel particolato atmosferico inferiore a 10 micron e nei capelli
in soggetti con trombosi venosa profonda e in soggetti sani
e relazione con lo stress ossidativo

—————
Tesi di Dottorato
—————

Dottorando:
Dott. Valerio Fiore

Tutor:
Prof. S. S. Signorelli

Anno Accademico 2016/2017

Indice

1. TROMBOEMBOLISMO VENOSO	3
1.1 Epidemiologia del tromboembolismo venoso	3
1.2 Sequele del tromboembolismo venoso	5
1.3 Fattori di rischio del tromboembolismo venoso	6
1.4 Correlazioni tra aterosclerosi e tromboembolismo venoso	8
2. INQUINAMENTO ATMOSFERICO, Particolato.	10
2.1 Inquinamento atmosferico	10
2.2 Inquinamento atmosferico e malattie cardiovascolari	12
2.3 Inquinamento atmosferico e tromboembolismo venoso	14
3. METALLI PESANTI	19
3.1 Tossicità dei metalli pesanti	20
3.2 Metalli pesanti e malattie cardiovascolari	22
3.3 Metalli pesanti e tromboembolismo venoso	23
4. STRESS OSSIDATIVO E TROMBOEMBOLISMO	42
5. SCOPO DELLA TESI	43
6. MATERIALI E METODI	44
7. RISULTATI	54
8. DISCUSSIONE	72
9. CONCLUSIONI	81
10. Bibliografia	82

1. TROMBOEMBOLISMO VENOSO

1.1 Epidemiologia del tromboembolismo venoso

Il tromboembolismo venoso (TEV), che comprende la trombosi venosa profonda (TVP) e l'embolia polmonare (EP), è la terza patologia più frequente tra le malattie cardiovascolari dopo la cardiopatia ischemica e l'ictus (1). L'incidenza annuale di TEV negli USA è di 108 casi per 100.000 persone-anno, con almeno 250,000 nuovi casi diagnosticati annualmente (2). E' possibile tuttavia che l'incidenza reale sia superiore considerando le recidive e i casi asintomatici o non diagnosticati.

Il gruppo europeo VITAE (Venous thromboembolism Impact Assessment Group in Europe) ha sottolineato come i casi di TEV spesso risultino asintomatici, non diagnosticati o rilevati all'autopsia e ha suggerito che l'incidenza di TEV è marcatamente sottostimata. Il gruppo ha raccolto i dati di sei nazioni europee e condotto un'analisi statistica probabilistica stimando nel territorio esaminato circa 465.000 casi annui di TVP, 295.000 casi di EP e 370.000 morti collegate al TEV, con il 59% delle morti dovuto a EP non diagnosticata (3).

Uno studio americano retrospettivo ha valutato nel periodo tra il 2002 e il 2006 la prevalenza di TEV in una casistica comprendente 12.7 milioni di pazienti evidenziando 200,007 casi. Lo studio ha dimostrato che, nel periodo esaminato, la frequenza della malattia (casi per 100.000) era aumentata del 33.1% passando da 317 nel 2002 a 422 nel 2006. L'incremento dei casi è stato rilevato soprattutto nella popolazione più anziana (>65 anni), con conseguenti potenziali risvolti economici e sociali nel prossimo futuro per il progressivo invecchiamento della popolazione (4).

I dati della letteratura nelle popolazioni europee norvegesi e francesi stimano un'incidenza annuale di 141-183 casi di TEV per 100.000 persone-anno ed evidenziano un'alta percentuale di casi nella popolazione con età maggiore di 75 anni e nei pazienti con anamnesi di ricovero ospedaliero nei tre mesi precedenti la diagnosi. Data l'elevata mortalità riscontrata a 30 giorni nei pazienti con EP (9.7%), questi studi sottolineano l'importanza di identificare tempestivamente i pazienti ad alto rischio e praticare un'efficace profilassi (5,6).

I dati di uno studio coreano, pur mostrando una ridotta incidenza di TEV nella popolazione asiatica rispetto alla popolazione caucasica, mostrano un incremento nel tempo dell'incidenza generale di TEV che appare raddoppiata negli anni tra il 2004 e il 2008. L'incremento maggiore si registra soprattutto nella popolazione con età superiore ai 60 anni (7).

Uno studio americano ha valutato l'incidenza di TEV nelle varie fasce d'età rilevando un'incidenza di < 5 casi su 100.000 persone nella popolazione con età inferiore ai 15 anni e di circa 500 casi nella popolazione con età maggiore di 80 anni. Un terzo dei pazienti presentava EP sintomatica mentre due terzi manifestava solo TVP. La mortalità ad un mese era circa il 6% nei casi di TVP e 12% nei casi di EP. Il gruppo etnico di appartenenza è risultato essere un importante fattore di rischio per TEV essendo più colpita la popolazione caucasica e afro-americana rispetto agli ispanici e agli asiatici (8).

Recenti dati di Wiener et al. dimostrano come l'incidenza di EP sia aumentata dopo l'avvento dell'angio-TC polmonare come strumento di diagnosi (+81%). L'uso di tale metodica diagnostica risulta associato ad una sostanziale riduzione dei casi di TEV mortali (numero di morti in ospedale nei pazienti affetti dalla patologia, -36%), ad una lieve diminuzione della mortalità per EP nella popolazione (numero di morti per anno per 100.000 abitanti, -3%) e ad un aumento delle complicanze da terapia anticoagulante. Secondo gli autori questi risultati (aumentata incidenza di EP, lieve riduzione della mortalità di popolazione, sostanziale diminuzione dei casi fatali) suggeriscono che la maggiore sensibilità diagnostica dell'angio-TC polmonare possa provocare sovradiagnosi e sovratrattamento (diagnosi e trattamento di casi clinicamente non significativi) (9).

I predittori clinici dell'EP fatale sono stati studiati da Laporte et al. utilizzando i dati del registro RIETE (Registro Informatizado de la Enfermedad Trombo Embolica venosa), un database internazionale, multicentrico, prospettico che raccogli i dati di pazienti con TEV acuto sintomatico. Su un campione di oltre 15.000 pazienti la mortalità complessiva e il tasso di EP fatale a 3 mesi sono risultati pari all'8.65% e al 1,68%, rispettivamente. All'analisi multivariata sono risultati a maggiore rischio i pazienti con esordio di EP sintomatica massiva e non massiva. Altri fattori indipendenti predittivi di EP fatale erano l'età maggiore di 75 anni, l'allettamento maggiore di 4 giorni dovuto a patologie neurologiche e il cancro (10).

In uno studio che ha esaminato caratteristiche cliniche, management e outcome di pazienti con EP acuta diagnosticata in 22 reparti di PS negli USA il tasso di mortalità attribuibile direttamente all'EP era pari all' 1% e la mortalità a 30 giorni per tutte le cause era del 5.4% suggerendo agli autori che la terapia precoce, anche empirica prima di una diagnosi definitiva, possa rappresentare un elemento da prendere in forte considerazione per ridurre la mortalità (11).

In Italia sono stati recentemente analizzati i dati di 452 pazienti con diagnosi di EP ricoverati in 28 Unità Operative di Medicina interna della Regione Toscana. Lo studio TUSCAN-PE (Tuscan Study on Characteristics ANd clinical management of Pulmonary Embolism in

internal medicine wards) ha valutato la mortalità per EP in una popolazione di età maggiore rispetto ad altri registri evidenziando una mortalità da tutte le cause del 25% e una mortalità correlata all'EP del 16% nei pazienti ad alto rischio (12).

I pazienti dello studio TUSCAN erano classificati ad alto, intermedio e basso rischio in base alla presenza o meno di shock o ipotensione, classe di Pulmonary Embolism Severity Index, segni di scompenso cardiaco destro e presenza di alterazione dei markers cardiaci secondo le ultime linee guida ESC (13).

1.2 Sequele del tromboembolismo venoso

Le sequele maggiori nei pazienti che sopravvivono al TEV sono l'ipertensione polmonare cronica (14) e la sindrome post trombotica (15).

L'ipertensione polmonare cronica dovuta ad embolia polmonare è definita come aumento della pressione media in arteria polmonare maggiore di 25 mmHg che persiste dopo 6 mesi dalla diagnosi di EP. È una sequela che colpisce il 2-3% dei pazienti affetti da EP e causa dispnea da sforzo e a riposo. L'aspettativa di vita è ridotta e i pazienti possono essere soggetti a morte cardiaca improvvisa. Di solito la morte è dovuta a una progressiva ipertensione polmonare che causa insufficienza ventricolare destra (14).

La sindrome post-trombotica può svilupparsi in più di un terzo dei pazienti affetti da TVP e presenta una certa variabilità nella sue manifestazioni cliniche. Dolore, senso di pesantezza, edema, comparsa di teleangectasie e varici, eczema venoso possono presentarsi nell'arto colpito precedentemente da TVP. Il 5-10% dei pazienti sviluppa una forma clinica più severa che si manifesta con la comparsa di ulcere cutanee, riduzione della qualità della vita e conseguenze socioeconomiche negative (15). La sindrome post-trombotica può manifestarsi come conseguenza di ipertensione venosa che porta all'insufficienza venosa cronica, ridotta perfusione dei muscoli della gamba e funzione anomala del microcircolo con incremento della permeabilità tissutale (15). La TVP può causare ipertensione venosa cronica se permane un'ostruzione trombotica residua e/o si sviluppa insufficienza valvolare (15). La corretta terapia anticoagulante previene infatti l'estensione del trombo e l'embolizzazione a livello polmonare (16) ma non lisa direttamente il trombo (15). La sindrome posttrombotica può essere la conseguenza di una TVP sia degli arti inferiori che, meno frequentemente, degli arti superiori (15).

1.3 Fattori di rischio del tromboembolismo venoso

La stasi venosa e il danno endoteliale predispongono al TEV soprattutto nei pazienti con stati di ipercoagulabilità (triade di Virchow) (15a). Chi ha già avuto un precedente episodio di TEV è predisposto ad un secondo episodio con una percentuale del 30% a 10 anni (TEV ricorrente) (2). In genere l'EP origina da trombi formati principalmente nelle vene profonde degli arti inferiori o nelle vene pelviche (2). I fattori predisponenti il tromboembolismo venoso comprendono sia fattori ambientali/acquisti che fattori genetici.

L'insorgenza del TEV è la conseguenza delle interazioni tra cause legate al paziente considerate non modificabili e permanenti e alcuni fattori di rischio acquisiti considerati temporanei (13).

Il TEV è considerato "provocato" in presenza di un fattore di rischio temporaneo e reversibile, come ad esempio un intervento chirurgico, un trauma, l'immobilizzazione, la gravidanza, l'utilizzo di contraccettivi orali o terapia ormonale sostitutiva, che ha agito in un periodo di tempo compreso tra sei settimane e tre mesi prima della diagnosi.

In assenza di fattori di rischio si parla di TEV "spontaneo" o non-provocato o idiopatico (17).

I traumi maggiori, la chirurgia, le fratture, gli interventi di protesizzazione ortopedica agli arti inferiori e i traumi della colonna con lesioni spinali sono considerati fattori di rischio molto forti per l'insorgenza di TEV (18,19). Le neoplasie sono associate ad aumentato rischio di TEV (20,21), in particolare le neoplasie ematologiche, polmonari, gastrointestinali, del pancreas e cerebrali (22,23). In ogni caso il cancro è un forte fattore di rischio di mortalità dopo un episodio di TEV (24). Nelle donne fertili l'utilizzo di contraccettivi orali è un fattore predisponente al TEV (25,26). Il rischio di TEV è aumentato 5 volte durante il terzo trimestre della gravidanza e 60 volte nei primi 3 mesi dopo il parto (27). La terapia ormonale sostitutiva espone le donne in menopausa ad un maggiore probabilità di TEV, con un rischio maggiore per gli estroprogestinici orali (in particolare contenenti medrossiprogesterone acetato) rispetto alla sola terapia estrogenica orale (RR= 2,07 vs 1,42). Le formulazioni di estrogeni per via transcutanea (cerotti) non sembrano conferire un aumentato rischio di malattia tromboembolica (28).

Le infezioni, le trasfusioni di sangue, l'utilizzo di eritropoietina, la chemioterapia, la presenza di cateteri venosi centrali sono stati dimostrati essere fattori predisponenti l'insorgenza di TEV nei 90 giorni antecedenti l'ammissione in ospedale per TEV (13).

Mutazioni genetiche possono portare a stati di ipercoagulabilità che vengono raggruppati nella definizione di trombofilia genetica. Le cause più frequenti di trombofilia genetica sono la

mutazione del fattore V e la mutazione del gene della protrombina che insieme rappresentano circa il 50-60% dei casi. Gli altri casi sono attribuibili al deficit di proteina C e proteina S e al deficit di antitrombina III. Rara causa di trombofilia è la disfibrinogenemia (29-31).

Le cause più frequenti di trombofilia acquisita sono l'iperomocisteinemia e la sindrome da anticorpi antifosfolipidi. L'iperomocisteinemia è associata al TEV ed è causata da un deficit nutrizionale acquisito di folati esacerbato da un inadeguato apporto di vitamina B₁₂ e B₆. Gli antagonisti della folina come metotrexate e fenitoina o gli antagonisti della vitamina B₆ come estrogeni, tabacco e teofillina possono incrementare i valori di omocisteinemia (32). Alcuni studi sembrano comunque ridimensionare il ruolo dell'iperomocisteinemia nelle patologie cardiovascolari ritenendolo un marker piuttosto che una causa (32-33). Due metanalisi hanno riscontrato un maggiore rischio di TEV in presenza di iperomocisteinemia (odds ratios da 2,5 a 2,95) (34-35). L'iperomocisteinemia può essere causata anche da fattori ereditari come le mutazioni del gene MTHFR C677T e A1298C. Alcuni studi dimostrano come la mutazione MTHFR C677T abbia solo deboli effetti sul rischio di TEV (36-37). La sindrome da anticorpi antifosfolipidi è un disordine acquisito che favorisce l'insorgenza di TEV predisponendo a trombosi estese e ricorrenti. Soprattutto in presenza di anticorpi anticardiolipina possono svilupparsi anche cardiopatia ischemica, ictus e aborti nel primo trimestre di gravidanza (38). La possibilità di sviluppare TEV dopo lunghi viaggi in aereo è conosciuta ma gli studi dimostrano che comunque si tratta di un'evenienza rara. Uno studio effettuato nell'aeroporto Charles De Gaulle di Parigi ha riscontrato una incidenza di EP pari a 4.8 casi per milione tra i viaggiatori che avevano volato per più di 10.000 Km e di 1.5 casi per milione tra quelli che avevano volato più di 5000 km rispetto a un'incidenza di 0.01 casi per milione tra quelli che avevano volato meno di 5000 km (39). Uno studio di metanalisi ha rilevato un rischio 2.0 volte maggiore di TEV nei viaggiatori rispetto ai non-viaggiatori. Gli autori identificavano una relazione dose-risposta evidenziando un incremento del rischio di TEV del 18% per ogni 2 ore di incremento della durata del viaggio (del 26% nel caso di viaggio aereo) (40).

Le ultime linee guida ESC (13) hanno suddiviso i fattori di rischio in forti moderati e deboli. Sono considerati fortemente associati al TEV (odds ratio >10): le fratture degli arti inferiori, l'ospedalizzazione per scompenso cardiaco o per fibrillazione atriale o flutter nei 3 mesi precedenti, gli interventi di protesizzazione d'anca o di ginocchio, i traumi maggiori, l'infarto del miocardio nei 3 mesi precedenti, un pregresso tromboembolismo venoso e i traumi della colonna con lesione spinale.

Sono considerati fattori di rischio moderato (con odds ratio tra 2 e 9): gli interventi di artroscopia del ginocchio, le patologie autoimmuni, le trasfusioni di sangue, gli accessi venosi

centrali, la chemioterapia, lo scompenso cardiaco o l'insufficienza respiratoria, l'utilizzo di eritropoietina, la terapia ormonale sostitutiva a seconda della formulazione, la fecondazione in vitro, le infezioni (in particolare quelle polmonari, del tratto urinario e da HIV), le malattie infiammatorie croniche intestinali, il cancro specialmente quello metastatizzato, la terapia contraccettiva orale, l'ictus con paralisi, il periodo del post-partum, la tromboflebite superficiale e la trombofilia. Fattori di rischio deboli con odds ratio <2: l'allettamento per più di 3 giorni, il diabete mellito, l'ipertensione, l'immobilità da viaggi in aereo e in macchina, l'età avanzata, gli interventi in laparoscopia, l'obesità, la gravidanza e le varici degli arti inferiori.

1.4 Correlazioni tra aterosclerosi e tromboembolismo venoso

Il TEV può essere visto almeno in parte condividere alcuni fattori di rischio con la patologia arteriosa di natura aterosclerotica come il fumo di sigaretta, l'obesità, la dislipidemia, l'ipertensione e il diabete mellito (41-48). Il TEV e l'aterosclerosi sono stati sempre considerati come due entità distinte poiché il trombo venoso si sviluppa in vasi a basso flusso ed è costituito prevalentemente da eritrociti e fibrina (trombo rosso), mentre il trombo arterioso si sviluppa nelle zone delle pareti soggette a stress emodinamico e consiste di piastrine con scarsa fibrina o globuli rossi (48a).

Il primo lavoro ad evidenziare una possibile correlazione tra patologia venosa e aterosclerosi risale al 2003 quando Prandoni et al (49) dimostrarono che la probabilità di riscontrare placche aterosclerotiche asintomatiche nelle carotidi di pazienti con TEV era doppia (odds ratio=2,3) rispetto ai controlli. Studi successivi hanno dimostrato che il rischio di infarto acuto del miocardio (50) e di ictus (51) era più elevato nei pazienti con pregresso TEV.

Uno studio di metanalisi (44) ha evidenziato che l'obesità, fattore di rischio per aterosclerosi, è correlata ad un rischio doppio di sviluppare TEV. Le donne obese hanno un rischio di TVP maggiore rispetto agli uomini (52-53). L'ipertensione predispone sia all'aterotrombosi che al TEV. L'ipertensione aumenta il rischio di TEV del 50% (44) ed è associata ad un rischio due volte maggiore di sviluppare EP non provocata (53). I valori di colesterolo HDL risultano significativamente più bassi nei pazienti che hanno avuto un episodio di TEV e il diabete mellito è stato associato con un incrementato rischio del 42% di sviluppare TVP o EP (44). Comunque, nello studio ARIC (Atherosclerosis Risk in Communities) un basso valore di colesterolo HDL non sembra essere un importante fattore di rischio per TEV (54). La sindrome metabolica è emersa essere un potente fattore aterotrombotico che colpisce più del

45% della popolazione americana (55). Esistono dati che segnalano che la sindrome metabolica incrementa dell'84% la probabilità il rischio di TEV (56).

In uno studio prospettico su circa 15.000 pazienti un maggiore consumo di pesce, frutta e verdura con un minore consumo di carne rossa è risultato essere associato ad una riduzione del rischio di TEV (57). Il fumo di sigaretta è risultato essere un potente fattore di rischio per TEV raddoppiando il rischio di EP non provocata nei fumatori di 25-34 sigarette e triplicandolo nei fumatori di 35 sigarette rispetto ai non fumatori (53).

I meccanismi fisiopatologici potenzialmente responsabili della correlazione tra TEV e aterosclerosi appaiono non del tutto chiariti (49). L'aterosclerosi ha la potenzialità di promuovere lo sviluppo di disordini trombotici del sistema venoso attivando le piastrine e i fattori della coagulazione nel sistema a lento flusso venoso (49). Da un altro lato le due patologie potrebbero condividere meccanismi patogenetici comuni scatenati dagli stessi fattori di rischio (49). Esistono molti fattori che favoriscono sia i disordini trombotici arteriosi che venosi come l'iperomocisteinemia, il fattore V Leiden, la mutazione del gene della protrombina, gli anticorpi antifosfolipidi, il fattore VIII:C, i disordini mieloproliferativi, gli effetti collaterali della chemioterapia, l'emoglobinuria parossistica notturna, le infezioni da *Clamydia Pneumoniae* e l'infezione da HIV (58-69). L'effetto di associazione può essere almeno in parte mediato da patologia coronarica e, nel caso del fumo, dal cancro (70-73). L'infarto del miocardio e lo scompenso cardiaco aumentano il rischio di EP (72,73) e i pazienti con TEV hanno un aumentato rischio di avere infarto del miocardio e ictus (51).

2. INQUINAMENTO ATMOSFERICO: MICROPARTICOLATO

2.1 Inquinamento atmosferico

La storia del '900 è stata influenzata da eventi che hanno creato un forte impatto sulla salute pubblica modificando la politica sanitaria e mettendo in luce gli effetti dannosi dell'inquinamento ambientale (74). A Londra nel 1952 alcuni fattori climatici associati a un livello elevato di inquinamento dell'aria causarono un incremento di mortalità nella popolazione. I dati esatti dell'impatto di quei giorni sulla salute pubblica sono stati sempre oggetto di contestazioni tra la comunità scientifica e i politici poiché inizialmente il governo inglese sostenne che l'incremento di mortalità nella popolazione in quel periodo fosse da attribuire ad un picco influenzale piuttosto che all'inquinamento ambientale. Il dibattito è stato acceso per diversi anni e una analisi retrospettiva del 2004 ha dimostrato l'impatto decisivo sulla mortalità che lo smog creò in quelle giornate di Dicembre e nei mesi successivi, smentendo quella che fu la versione ufficiale del governo inglese (75).

Si definisce **inquinamento atmosferico** “ogni modificazione dell'aria atmosferica, dovuta all'introduzione nella stessa di una o più sostanze in quantità e con caratteristiche tali da ledere o da costituire un pericolo per la salute umana o per la qualità dell'ambiente oppure tali da ledere i beni materiali o compromettere gli usi legittimi dell'ambiente” (come definito all'Art. 268 del D.Lgs 3 aprile 2006 n°152).

L'inquinamento atmosferico è il risultato di una miscela complessa di centinaia di componenti. Gli elementi rilevanti per la salute pubblica includono il particolato (PM, particulate matter) e i gas inquinanti come l'ozono, il diossido di azoto (NO_2), i composti organici volatili (COV, includenti il benzene), il monossido di carbonio (CO) e il diossido di zolfo (SO_2) (76,77).

In riferimento alle modalità di formazione, si fa la seguente distinzione:

Gli inquinanti primari, come le particelle di fuliggine, il biossido di zolfo (SO_2), il monossido di carbonio (CO), gli ossidi di azoto (NO_x), l'etilene (C_2H_4), il metano (CH_4), il benzene (C_6H_6), gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), l'acido fluoridrico (HF), l'ammoniaca (NH_3) e i composti organici volatili (VOC); queste specie chimiche sono emesse da fonti identificabili.

Sono emessi direttamente nell'aria dalla combustione dei carburanti fossili. La maggiore fonte di NO_2 è rappresentata dal traffico delle strade, dai prodotti dell'industria e dal riscaldamento delle case (77).

Inquinanti secondari: non vengono emessi dalle sorgenti tal quali, ma derivano dalla reazione in atmosfera tra più inquinanti primari tramite catalizzatori chimico-fisici. Molti inquinanti secondari costituiscono lo “smog fotochimico”: O_3 , PAN (perossiacilnitrato), HNO_3 e H_2SO_4 . Queste specie derivano dalla trasformazione chimica di quelli primari. Generalmente gli effetti negativi sono maggiormente imputabili agli inquinanti secondari. (77).

Il particolato è formato da particelle di origine di ampia varietà che differisce in dimensioni e composizione. Sono inalabili tutte le particelle aero-disperse che attraversano le vie superiori dell'apparato respiratorio durante l'atto inspiratorio fino alla zona degli scambi gassosi (bronchioli e alveoli polmonari):

- le particelle con diametro superiore ai $10\ \mu m$ si fermano nelle prime vie respiratorie;
- le particelle con diametro tra i 5 e i $10\ \mu m$ raggiungono la trachea e i bronchi;
- le particelle con diametro inferiore ai $5\ \mu m$ possono raggiungere gli alveoli polmonari.

Si classifica il PM in genere in tre gruppi maggiori (77):

- particolato grossolano con dimensioni <10 e $\Rightarrow 2.5\ \mu m$ (PM_{10}),
- particolato fine con dimensioni <2.5 e $\Rightarrow 0.1\ \mu m$ ($PM_{2.5}$)
- particolato ultrafine con dimensioni inferiori a $0.1\ \mu m$.

Il PM_{10} origina dalle polveri del terreno e delle strade trasportate dal vento, dalle emissioni autoveicolari così come i cantieri di costruzione e le emissioni industriali (77).

Il $PM_{2.5}$ ha un'importante fonte emissiva nel traffico veicolare urbano, nelle centrali elettriche e nel riscaldamento industriale e domestico che utilizza carbone, legna o petrolio. Il $PM_{2.5}$ è composto da sostanze organiche di varia natura, metalli di transizione, solfato e azoto, con i composti che successivamente si vengono a formare nell'atmosfera come SO_2 e NO_2 (77).

Il $PM_{2.5}$ può essere immesso anche a grandi distanza ($>100\ km$) risultandone un impatto ambientale significativo per un'ampia zona (77). Le condizioni climatiche possono favorire la dispersione degli inquinanti alterando le concentrazioni medie stimate di molti inquinanti atmosferici in alcune località coinvolte dalle fonti emissive. I fattori sicuramente più influenti sono rappresentati dalla direzione del vento e dalla stabilità termica atmosferica che possono determinare singolarmente o complessivamente importanti variazioni locali delle concentrazioni degli inquinanti anche all'interno della stessa giornata. Le reazioni

fotochimiche, dovute alla banda dell'ultravioletto solare possono influenzare i livelli dell'ozono (78).

Il D.Lgs 155/2010 conferma tutti gli obiettivi e limiti per gli stessi inquinanti della precedente normativa ma risulta innovativa, perché introduce importanti novità per il PM_{2,5}, per il quale sono stabiliti un valore limite, un valore obiettivo e un obbligo di concentrazione all'esposizione.

Per il PM₁₀ la normativa stabilisce un valore limite giornaliero di **50 µg/m³**, da non superare per più di 35 volte in un anno, e un valore limite medio annuale di **40 µg/m³**: inoltre la direttiva 2008/80/CE pone un valore medio annuale per il PM_{2,5} pari a **25 µg/m³** da raggiungere entro il 2015 (all'entrata in vigore del decreto è ammesso un margine di tolleranza di **5 µg/m³** che anno dopo anno sarà proporzionalmente ridotto a zero) e un valore obiettivo di esposizione media pari a **18 µg/m³** da raggiungere entro il 2020.

2.2 Inquinamento atmosferico e malattie cardiovascolari

L'inquinamento atmosferico aumenta significativamente la morbilità e la mortalità nella popolazione generale (79-82). Gli effetti dell'inquinamento atmosferico sull'apparato respiratorio sono ben noti e da tempo oggetto di studi (83, 83b). L'interesse sanitario e legislativo è stato richiamato negli ultimi anni dalle cosiddette PM₁₀, a causa della loro inalabilità. Ancora più interessanti sotto l'aspetto tossicologico sono le PM_{2,5} in quanto respirabili sino ai distretti polmanari più profondi. Infatti, una volta inalate, superando la barriera tracheo-bronchiale, raggiungono la zona alveolare.

Nei vari studi gli **effetti a breve termine** delle esposizioni al PM sono: ospedalizzazioni, ricorsi al pronto soccorso o utilizzo di dispositivi medici per problemi respiratori o cardiovascolari, assenteismo da lavoro/scuola, sintomi acuti (affanno, tosse, produzione di catarro, infezioni respiratorie) e cambiamenti fisiologici (funzionalità respiratoria). Decisamente più complicato ancora oggi è valutare quali siano gli **effetti a lungo termine** di esposizioni a dosi croniche e subcroniche. Gli studi epidemiologici condotti finora hanno evidenziato vari effetti sulla salute, come riduzione della funzionalità respiratoria, comparsa di sintomi a carico dell'apparato respiratorio, bronchite cronica ostruttiva, incremento relativo del cancro al polmone e della mortalità per patologie cardiorespiratorie, ritardo nell'accrescimento intrauterino e basso peso alla nascita.

L'interesse dei ricercatori si è spostato negli ultimi anni sulla valutazione dell'associazione tra inquinamento atmosferico e malattie cardiovascolari.

Diversi studi mostrano che una breve esposizione ad aumentati valori di microparticolato nell'aria si associa ad un aumentato rischio di morbidità e mortalità cardiovascolare (84-90) potendo innescare infarti del miocardio (91,92) e aritmie (93-95) e causando riacutizzazioni di scompenso cardiaco (96-98). Gli effetti cardiovascolari causati dal microparticolato sono stati analizzati da un gruppo di esperti dell'American Heart Association che attraverso la revisione della letteratura hanno ipotizzato 3 meccanismi biologici responsabili (99).

Il primo meccanismo consiste nel rilascio di mediatori proinfiammatori (ad esempio, citochine, cellule dell'immunità attivate o piastrine) o di molecole vasoattive da parte delle cellule polmonari (99).

Il secondo meccanismo comprende una alterazione del sistema nervoso autonomo e del ritmo cardiaco causato dall'interazione con i recettori polmonari o mediato da nervi (99).

Infine, la terza possibilità biologica prevede la potenziale traslocazione del microparticolato o dei costituenti delle particelle (composti organici o metalli) a livello circolatorio (99). In tutti questi meccanismi sembra coinvolto il ruolo dei radicali liberi come mediatori del danno vascolare e dello sviluppo accelerato dell'aterosclerosi sia dopo esposizione acuta che cronica (99).

Altri lavori (100,101) hanno suggerito che i possibili effetti dell'inquinamento ambientale sull'apparato cardiovascolare siano mediati dallo stress ossidativo e dall'infiammazione che possono causare progressione della placca aterosclerotica fino alla rottura associata a disfunzione endoteliale con vasocostrizione e ad aumentata reattività piastrinica protrombogena e possono innescare stimoli aritmogeni. La traslocazione diretta nel torrente circolatorio di piccole nanoparticelle inquinanti è ripresa da Mills et al. (100) che suggeriscono che gli stessi inquinanti possano determinare direttamente stress ossidativo e rilascio di fattori proinfiammatori attraverso interazione con l'endotelio. Tale possibilità potrebbe essere responsabile della rottura della placca con scatenamento di sindromi coronariche acute. Un aumento dei radicali liberi dell'ossigeno è stato correlato a necrosi miocardica, stunning, disfunzione vascolare e apoptosi, effetti che vengono contrastati dai radicali liberi scavengers (102,103). Uno studio condotto a Boston in una comunità per anziani con età media di 73.3 anni ha dimostrato come l'esposizione al PM_{2.5} era associato ad una riduzione della frequenza cardiaca (104). Di contro un aumento nell'ambiente della concentrazione di PM₁₀ di circa 100 micron per metro cubo si correlava con la probabilità di aumento della frequenza cardiaca tra 5 e 10 battiti al minuto (105). Questi studi sembrano quindi mettere in correlazione i valori di PM e la disfunzione del sistema nervoso autonomo.

I dati provenienti da 62 ambulatori di riabilitazione cardiologica indicano che 120 ore di esposizione a livelli di PM_{2.5} sopra 10.5 micron/metro cubo sono associati con incremento della pressione sistolica e diastolica rispettivamente di 2.7 e 2.8 mm Hg (106). Il tono vascolare valutato in pazienti volontari sani dopo 2 ore di inalazione di un concentrato di particolato e ozono veniva alterato con una riduzione del calibro dell'arteria brachiale di 0.09 mm (107). Binde et al. (108) hanno studiato in una coorte di 704 pazienti anziani gli effetti a breve e a lungo termine dell'esposizione di diversi inquinanti atmosferici su alcuni markers di infiammazione, coagulazione e funzione endoteliale. I risultati hanno dimostrato che elevati valori di ozono correlavano con un incremento della proteina C reattiva e della molecola di adesione intercellulare ICAM-1. Il numero di particelle, carbone nero, monossido di carbonio e PM_{2.5} e i solfati erano correlati con i livelli di ICAM-1 e della molecola di adesione vascolare VCAM-1 (108).

Uno studio ha valutato gli effetti protrombotici del micro particolato inalabile attraverso la misurazione del tempo di protrombina (PT), del tempo di tromboplastina parziale attivato (aPTT) e della proteina C reattiva dimostrando variazioni non significative nel breve periodo ma più indicative a lungo termine (109).

L'inquinamento atmosferico può colpire multipli meccanismi epigenetici che si manifestano in alterazioni della metilazione del DNA, modifiche di istoni e espressioni di micro RNA (78).

L'esposizione ad inquinanti ambientali correla con alterazioni di metilazioni del DNA (110,111) che, a loro volta, sono in grado di predire una maggiore probabilità di eventi cardiovascolari (cardiopatía ischemica e stroke) e morte a 5 anni (112).

Negli animali è stato dimostrato che alcuni inquinanti ambientali sono in grado di causare alterazioni epigenetiche che possono essere trasmesse per multiple generazioni (113).

2.3 Inquinamento atmosferico e tromboembolismo venoso

In letteratura esistono solo pochi lavori che hanno valutato l'associazione tra inquinamento ambientale e TEV. Il primo lavoro a correlare il TEV e l'inquinamento ambientale risale al 2008 quando Baccarelli et al (114) decisero di indagare se un'esposizione di lunga durata al PM₁₀ fosse associata ad un'aumentata suscettibilità trombotica e a più alto rischio di TVP con o senza EP in un'ampia popolazione della Lombardia (casi 871 controlli 1210). Una prima parte dello studio era rivolta ad indagare l'associazione tra l'esposizione al PM₁₀ con i valori

di PT e di aPTT con il riscontro di un accorciamento del PT statisticamente significativo ma non del aPTT sia nei controlli che nei casi dopo almeno 1 anno di esposizione a PM₁₀ (114). L'analisi statistica dimostrava che ogni incremento di 10 µg/m³ in PM₁₀ era associato ad un incremento del 70% del rischio di TVP (odds ratio=1,70). L'associazione tra PM₁₀ e rischio di TVP era più debole nelle donne e scompariva in quelle che assumevano contraccettivi orali o terapia ormonale sostitutiva (114). Nell'analisi statistica fu utilizzata una regressione lineare con l'obiettivo di limitare l'errore statistico considerando la stagionalità della TVP, l'età, il sesso, le mutazioni genetiche trombofiliche, l'utilizzo di contraccettivi orali e di ormoni, il BMI e la temperatura ambientale (114). Gli autori forniscono la seguente spiegazione della mancata associazione tra PM₁₀ e TVP nelle donne in terapia contraccettiva e ormonale.

Le terapie ormonali rappresentano un fattore di rischio indipendente per sviluppo di TVP (115), dato che è confermato nello studio dalla più alta prevalenza di donne in terapia ormonale sostitutiva o contraccettiva tra i casi piuttosto che tra i controlli (114).

L'utilizzo di contraccettivi orali e di terapia ormonale sostitutiva induce cambiamenti nei fattori della coagulazione con incremento dei fattori procoagulanti VII, IX, X, XII, fattore di von Willebrand e fibrinogeno e riduzione delle proteine anticoagulanti antitrombina e proteina S (116-118), effetti che sono simili ai cambiamenti riscontrati in seguito ad esposizione all'inquinamento ambientale (119-124). Gli autori suggeriscono che essendo i fattori protrombotici già attivati dall'assunzione di terapia contraccettiva o ormonale sostitutiva l'effetto pro trombotico indotto dall'inquinamento ambientale sia ininfluenza (114).

Nel 2009 il gruppo di lavoro di Baccarelli et al. (125), partendo dall'assunto che il traffico è una delle maggiori fonti di inquinamento urbano (126-127) e che vivere in prossimità di strade molto trafficate è associato ad un aumentato rischio di patologie cardiovascolari e respiratorie (126-134), ha voluto valutare se chi vive in zone maggiormente trafficate ha un rischio di TVP maggiore rispetto a chi vive in zone meno trafficate. Lo studio ha riguardato un gruppo di 663 pazienti con TVP esaminati nel periodo 1995-2005 e un gruppo di controllo di 859 persone sane. L'analisi statistica dimostrava che il rischio di TVP era aumentato (odds ratio=1,33) nei soggetti che vivevano vicino a strade trafficate rispetto a quelli che vivevano più lontano da queste.

Lo studio confermava inoltre un'associazione tra vicinanza a strade trafficate e TVP più forte negli uomini (odds ratio=1,67) rispetto alle donne (odds ratio=1,30) e l'assenza di relazione traffico-TVP nelle donne che utilizzavano terapia ormonale sostitutiva e contraccezione orale (125).

I dati venuti alla luce in questi due studi hanno suscitato l'interesse della comunità scientifica ponendo per la prima volta all'attenzione dei ricercatori l'associazione tra TVP e inquinamento ambientale anche se sono emersi alcuni limiti tra cui la considerazione che questi primi dati si riferivano ad una popolazione residente in una singola area di studio (Lombardia, Italia) (135).

Uno studio cileno (136) ha voluto analizzare gli effetti acuti dell'inquinamento ambientale sulla ospedalizzazione per TVP e EP nella città di Santiago in Cile che risulta avere valori di inquinamento dell'aria maggiori rispetto al Nord America e all'Europa (137). Scopo dello studio era quello di analizzare la media degli inquinanti atmosferici gassosi e particolato e i dati statistici di ricovero per TVP ed EP. Lo studio dimostra una correlazione tra i livelli di inquinanti e il TEV soprattutto nei pazienti con età maggiore di 65 anni rispetto ai giovani senza differenze tra il sesso o la stagione dell'anno. Gli autori suggeriscono l'ipotesi che l'inquinamento atmosferico possa aumentare la coagulabilità a livello venoso o che il TEV abbia con l'inquinamento una relazione di tipo indiretto. Poiché l'inquinamento atmosferico aumenta la coagulabilità a livello arterioso esso può portare all'ospedalizzazione per problemi respiratori e cardiovascolari. L'ospedalizzazione e la relativa immobilità potrebbero così contribuire all'aumentato rischio di TEV, anche se nello studio la diagnosi di TEV era secondaria solo nel 10% dei pazienti. Un'altra ipotesi è che l'incremento di inquinamento atmosferico aumenti l'accesso negli ospedali e che possa essere diagnosticato un maggior numero di casi di TEV per l'aumentata sorveglianza medica.

Il particolato di piccole dimensioni è risultato essere l'indiziato principale tra gli inquinanti, ma non sempre è facile stabilire con esattezza l'effetto del singolo inquinante e quale parte di esso (metalli, composti organici) sia più tossica (138).

Una metanalisi (139) ha analizzato l'incidenza stagionale del TEV in diversi studi dimostrando su un campione di oltre 35.000 pazienti un picco in inverno e specie nel mese di gennaio. I fattori che sono stati implicati in tale stagionalità sono l'ipercoagulabilità esacerbata dalla bassa temperatura e gli alti livelli di PM nell'aria.

Poiché, a differenza della maggior parte delle città europee e asiatiche, la concentrazione atmosferica di PM mostra il suo picco in estate in molte città degli USA, Chiu et al. hanno valutato la distribuzione temporale e l'associazione del TEV con il PM in una città fredda con picco estivo del PM come Detroit (140). L'obiettivo dello studio era analizzare la stagionalità dell'incidenza del TEV in base ai valori di PM, per dimostrare che il picco di TEV invernale osservato in molti studi era dovuto ad aumentati valori di PM. I risultati hanno mostrato un picco di incidenza dei casi acuti di TEV in estate in coincidenza col picco del PM, indicando

che la bassa temperatura non riveste un ruolo importante nella patogenesi del TEV e confermando il ruolo del PM atmosferico.

Uno studio italiano di Martinelli et al. (141) ha valutato la frequenza di accesso ai dipartimenti di emergenza da parte di pazienti affetti da TEV in relazione ai livelli di PM nell'aria nel distretto di Verona (Italia) nel periodo 2007-2009.

I livelli di PM_{10-2.5} sono risultati essere associati al TEV indipendentemente dall'età, dal sesso e da altri parametri atmosferici. Durante i giorni con alti livelli di PM_{10-2.5} il rischio di accesso ai dipartimenti di emergenza per TEV aumentava del 69% (odds ratio=1,69). Coerentemente con questi risultati, in un'altra coorte di soggetti senza TEV fu riscontrata una correlazione inversa tra PM_{10-2.5} e TP. Lo studio sembra indicare che l'esposizione anche per breve tempo ad alte concentrazioni di PM_{10-2.5} può favorire un aumentato tasso di accesso ai dipartimenti di emergenza per TEV attraverso l'induzione di uno stato pro-trombotico.

Shih et al (142) hanno esaminato l'effetto della terapia ormonale postmenopausale sull'associazione tra PM e TEV in una popolazione femminile di circa 26.000 pazienti senza precedente storia di TEV non praticanti terapia anticoagulante durante il trial Women's Health Initiative Hormone Therapy in 40 centri clinici degli USA. In contrasto con le ricerche di Baccarelli et al., i risultati di questo studio non hanno dimostrato la presenza di un'associazione tra esposizione a breve o lungo termine al PM e TEV o modificazioni clinicamente importanti prodotte dalla terapia estrogenica.

Per spiegare la conflittualità di questi risultati con quelli di studi precedenti effettuati in altri paesi, gli autori ipotizzano differenze nelle caratteristiche della popolazione studiata o nella composizione chimica del PM o anche una diversa suscettibilità genetica di popolazione al PM (142).

In contrasto con i lavori di Baccarelli et al. appare anche lo studio di Kan et al (143) che hanno analizzato prospetticamente l'associazione tra esposizione a lungo termine al traffico e incidenza di TEV. Lo studio non conferma l'esistenza di una relazione tra esposizione all'aria contaminata o la prossimità residenziale a strade trafficate e il rischio di TEV.

Spiezia et al. (144) hanno esaminato in uno studio caso-controllo di tipo retrospettivo la eventuale presenza di una relazione tra l'esposizione a breve termine (un mese) a elevati livelli di differenti contaminanti atmosferici (ad esempio, PM₁₀, CO, ossidi di azoto, ozono, SO₂, benzene, benzopirene, nickel, piombo, arsenico) e lo sviluppo di EP acuta isolata (senza TVP). I casi comprendevano 33 pazienti ospedalizzati per EP acuta idiopatica isolata mentre il gruppo controllo consisteva di 72 pazienti con EP acuta provocata e isolata. I risultati evidenziavano che i soggetti che erano esposti a elevati livelli di PM₁₀, ossidi di azoto,

benzene, benzopirene, cadmio e piombo mostravano un significativo aumento del rischio di EP non provocata. Nel caso del PM_{10} e del benzopirene i valori di odds ratio erano 5,24 e 3,95, rispettivamente.

Un recentissimo studio prospettico (145) di Pun et al. ha esaminato l'associazione tra esposizione a lungo termine a $PM_{2.5}$, $PM_{2.5-10}$ e PM_{10} , e vicinanza residenziale a strade trafficate con l'incidenza di EP su un campione di 115.745 donne americane.

Lo studio ha mostrato che le concentrazioni di PM 1 mese e 12 mesi prima del TEV erano associate al rischio di EP e che le donne con patologie sottostanti erano più suscettibili a sviluppare TEV dopo esposizione al PM. Nell'analisi dei sottotipi di EP solo l'associazione tra $PM_{2.5}$ e EP non idiopatica risultava significativa. Lo studio non dimostrava la presenza di correlazione tra TEV e vicinanza a strade trafficate.

3. METALLI PESANTI

In chimica l'espressione metalli pesanti fa riferimento ad un gruppo particolare di elementi della tavola periodica che presenta densità superiore a 5 g/cm^3 . Probabilmente, il termine è stato adottato in quanto evoca il concetto di tossicità e permanenza nei sistemi biologici, oltre che il lungo periodo di residenza o persistenza nell'ambiente che li ha caratterizzati.

Generalmente rientrano in questa categoria un insieme di metalli e metalloidi considerati tossici ed inquinanti, tuttavia includono anche elementi indispensabili per gli organismi, sebbene in concentrazioni molto basse.

I circa 40 elementi che possono definirsi tali si comportano usualmente come cationi e sono caratterizzati da diversi stati di ossidazione (elementi metallici di transizione), da bassa solubilità dei loro ossidi, da grande attitudine a formare complessi, da grande affinità per i solfuri nei quali tendono a concentrarsi, e hanno, infine, diversi stati di ossidazione a seconda del pH e Eh.

Da un punto di vista biologico gli elementi si dividono in essenziali (macroelementi e microelementi) e non essenziali. Un elemento è definito essenziale per la crescita e lo sviluppo di un organismo se rispetta i tre criteri riportati di seguito: l'organismo non si sviluppa senza un adeguato apporto dell'elemento, l'elemento non può essere sostituito da un altro, l'elemento ha una diretta influenza sull'organismo e sullo sviluppo del suo metabolismo.

I macroelementi sono quelli che partecipano in modo massiccio al metabolismo cellulare e vanno a costituire in piccola percentuale la materia vivente (ad esempio Ca, Na, K, Mg). I **microelementi**, presenti in quantità minori, sono essenziali per una regolare funzione del patrimonio enzimatico. Essi comprendono: Co, Cu, Fe, Mo, Se, Zn, Mn, As.

Gli elementi non essenziali, come Hg, Be, Cd, Pb, Al non hanno una funzione biologica e non sono indispensabili per l'organismo; la loro presenza all'interno degli esseri viventi è correlata alla disponibilità ambientale. I metalli sono presenti naturalmente nell'ambiente e si ridistribuiscono sia tramite cicli geologici sia biologici; il particolato sospeso nell'atmosfera può depositarsi al suolo o nelle acque sia dolci che salate, l'acqua piovana liscivia il terreno, trasportando il materiale ai fiumi e agli oceani dove può precipitare come sedimento o tornare all'atmosfera per essere trasportato anche nei luoghi più remoti della Terra. Il ciclo biologico comprende invece la bio-concentrazione di piante ed animali e l'inclusione nelle catene alimentari. A questi cicli naturali si sono aggiunti, soprattutto nell'ultimo secolo, massicci apporti antropogenici, come dimostrato, per esempio, dall'aumento di 200 volte della

concentrazione del piombo nei ghiacci della Groenlandia, a partire dai livelli "naturali" dell'800 a.C. (Patterson, 1981).

Le fonti naturali dei metalli pesanti, dunque, possono essere: l'erosione naturale, gli impianti di combustione, l'estrazione mineraria.

Le principali fonti antropogeniche sono: le Vernici (Pb, Hg, Cd), gli insetticidi/rodenticidi/fungicidi (Me, Hg, As, Cd, Tl), gli utensili da cucina (Al, Cu), i prodotti di protezione del legno, gli impianti elettrici (Hg, As, Tl), l'inquinamento da circolazione di autoveicoli (Cd), il motori diesel (Ni), le industrie metallurgiche/fonderie (Pb, As, Cu, Al, Co, Zn, Fe), l'agricoltura (Cu, As, Al, Zn,...), i disinfettanti (Cu, Hg, Ag), i vaccini (Hg, Al), materiali medici e odontoiatrici (Hg, Au, Ag, Ni), i sistemi di smaltimento dei rifiuti/inceneritori (Hg, Cd, Pb, As,...). Inoltre, i prodotti cosmetici e le creme estetiche sono potenziali fonti di esposizione a metalli pesanti. La presenza di piombo è stata riportata in cosmetici oculari tradizionali come Kohl e Surma; Henna, un prodotto applicato come temporanea vernice sui tatuaggi, è noto per essere molto ricco in metalli pesanti quali mercurio e piombo. Altre fonti possono includere rimedi popolari etnici, giocattoli, caramelle importate e spezie. La "Bottled Zam zam", un'acqua santa che veniva venduta ai pellegrini, è stata tolta dal mercato da poco in quanto conteneva alti livelli di arsenico.

Inoltre, le piante di tabacco hanno una particolare capacità di assorbire il cadmio dal terreno e ad accumularsi nella foglia, mentre il fumo di sigarette e Shisha (narghilè), risultano essere vie di esposizione al cadmio.

3.1 Tossicità dei metalli pesanti

Gli effetti tossici dei metalli si esplicano per lo più attraverso i seguenti meccanismi:

Inibizione enzimatica diretta - la maggior parte dei metalli tossici presenta un'elevata affinità nei confronti di gruppi funzionali presenti nelle catene laterali di aminoacidi (gruppi sulfidrilici -SH, carbossilici -COOH, amminici -NH₂, ecc.). In alcuni casi questi gruppi funzionali sono fondamentali per il normale svolgimento dell'attività enzimatica delle proteine cui appartengono o per la loro stabilità strutturale; se tali gruppi vengono impegnati in legami con altri metalli risulta alterata la funzionalità dell'enzima.

Effetti metabolici indiretti - in alcuni casi i metalli possono reagire con molecole biologiche che svolgono un fondamentale ruolo biochimico o come cofattori enzimatici o come substrati, impedendo di fatto reazioni enzimatiche attraverso un meccanismo non diretto sull'enzima.

Sostituzione di metalli essenziali - molti metalli giocano un ruolo essenziale in numerose e

fondamentali attività biologiche dell'organismo (attività enzimatica, processi di trasporto di membrana, bilancio osmotico, ecc), la loro sostituzione con metalli che hanno comportamento simile provoca un'inibizione di tali attività.

Squilibri delle concentrazioni di metalli essenziali - un eccesso di un dato metallo può provocare la riduzione dei livelli di concentrazione di un metallo essenziale; questo può avvenire sia per una competizione con i siti di assorbimento che per una competizione per le proteine che svolgono un ruolo di riserva. I metalli pesanti sono tossici anche perché possono avere effetti deleteri cumulativi che possono causare modifiche degenerative croniche, in particolare al sistema nervoso, al fegato, ai reni, e, in alcuni casi, hanno anche effetti teratogeni e cancerogeni. Il meccanismo di tossicità di alcuni metalli pesanti rimane ancora sconosciuto, anche se **l'inibizione enzimatica, l'alterazione del metabolismo antiossidante e lo stress ossidativo possono giocare un ruolo cruciale nella patogenesi.**

Inoltre i metalli pesanti generano molti dei loro effetti nocivi sulla salute attraverso la **formazione di radicali liberi**, con conseguente danno al DNA, perossidazione lipidica, e l'esaurimento di proteine sulfidrilici, ad esempio, il glutathione. I metalli sono relativamente poco assorbiti nel corpo, ma una volta avvenute, vengono lentamente escreti e si accumulano nel corpo causando danni d'organo, così, la loro tossicità è in gran parte a causa del loro accumulo in tessuti biologici, compresi gli animali alimentari come pesce e bovini.

Nell'uomo la maggior parte dei metalli pesanti hanno un tasso di escrezione lento dal corpo rispetto al loro tasso di assorbimento, come indicato dal loro lungo tempo di emivita (per esempio, l'emivita del piombo è 27 anni nell'osso corticale e 16 anni in spongioso, l'emivita di cadmio è 10-30 anni).

La distribuzione dei metalli pesanti nel corpo si basa sul suo legame con molecole carrier; le metallotioneine sono piccole proteine ricche di residui di cisteina, rappresentano l'unica proprietà "metalbinding" e svolgono un ruolo importante nella distribuzione dei metalli pesanti nel corpo.

Si accumulano anche nei capelli e nelle unghie e le loro concentrazioni possono essere usate come indicatori a lungo termine di esposizione.

Ci sono anche numerosi fattori esogeni che incidono sulla tossicità individuale: l'età, la dieta, l'interazione con altre sostanze tossiche, lo stile di vita (come il fumo o il consumo di alcool) e fattori aggravanti la patologia (Nordberg et al., 1978); I bambini e le persone anziane sono ritenute le categorie più a rischio.

In qualsiasi caso però tutti i metalli, anche quelli essenziali, possono rivelarsi tossici se presenti negli organismi in concentrazioni troppo basse o troppo alte; esiste cioè un

intervallo di essenzialità al di sopra e al di sotto del quale l'elemento provoca effetti tossici fino ad arrivare alla soglia di letalità.

Alcuni metalli pesanti come Cd, Pb, e Hg sono considerati distruttori endocrini e presentano una tossicità per il sistema riproduttivo documentata da anni: incremento del rischio di aborti spontanei, morte fetale intrauterina, parti pretermine per la popolazione femminile (Shakara et al., 1998), induzione di oligospermia e riduzione della motilità degli spermatozoi per quella maschile.

Comunque, per alcuni metalli, le cellule hanno sviluppato dei meccanismi di difesa, che si basano sulla formazione di complessi intracellulari proteina-metallo e che determinano l'accumulo prima e l'escrezione poi del potenziale tossico.

3.2 Metalli pesanti e malattie cardiovascolari

L'associazione tra l'esposizione cronica di metalli pesanti e le malattie cardiovascolari (CVD) è molto discussa. Sebbene il sistema cardiovascolare non sia visto come un bersaglio primario della tossicità dei metalli pesanti, in realtà questi possono esplicare la propria azione tossica nei seguenti modi: mediante lo squilibrio dei meccanismi protettivi antiossidanti (condizione che porta a stress ossidativo nelle cellule), attraverso l'espressione del gene alterato da influenze ambientali e per mezzo di componenti dietetici che agiscono sulla regolazione genica.

A questo proposito, a Pechino, è stato condotto uno studio su un gruppo di 40 studenti universitari sani, a cui è stato prelevato il sangue 12 volte, ogni 2 settimane, prima e dopo il loro trasferimento da un campus suburbano a un campus urbano con un tasso di inquinamento dell'aria molto alto (Shaowei Wu et al).

Sono stati misurati biomarcatori ad alta sensibilità come la proteina C reattiva, il TNF- α , il fibrinogeno, il PAI-1, il t-PA, il fattore di von Willebrand (vWF), la selectina piastrinica solubile (sP-selectina) e l'omocisteina totale (tHcy).

Lo studio ha fornito un'analisi completa sugli effetti a breve termine di costituenti chimici vari del PM_{2.5} (compresi frazioni carboniose, ioni, metalli, metalli di transizione e metalloidi), sull'infiammazione, sulla coagulazione e sull'omocisteina, relativamente all'esposizione agli inquinanti ambientali.

Dai risultati ottenuti si evince una forte associazione tra fibrinogeno, PAI-1, t-PA e diversi costituenti del PM_{2.5}.

Aumenti di fibrinogeno sono associati a Ca, Na, Mg, Ba, Fe, Ti, Co e Cd ($p < 0,05$); per PAI-1, l'associazione è riscontrata con Ti, Co e Mn ($p < 0,05$); aumenti del t-PA sono associati a Cd e Se ($p < 0,05$); mentre associazioni inverse del vWF sono associate a Na, Zn, Pb e Sb.

Tra i componenti esaminati in questo studio, Fe e Zn sono i due metalli di transizione hanno la più grande capacità di ridurre il tempo di coagulazione. Infatti la biodisponibilità di metalli di transizione e le loro proprietà redox sono considerati molto importante per gli effetti tossici al sistema cardiopolmonare. Fe e Zn sono in grado di stimolare la produzione di specie reattive dell'ossigeno e quindi indurre lesioni alle vie aeree e flogosi, seguita da una serie di risposte cardiopolmonari.

3.3 Metalli pesanti e tromboembolismo venoso

Di seguito sono riportate le principali caratteristiche chimiche e tossicologiche degli elementi potenzialmente in grado di indurre uno stato di tromboembolismo venoso.

Arsenico

L'arsenico è un metalloide del gruppo V della tavola periodica degli elementi che mostra la sua tossicità sotto le forme trivalenti e pentavalenti. I più comuni composti inorganici sono l'ossido di arsenico trivalente (As_2O_3 , arsenico bianco) e l'ossido di arsenico pentavalente (As_2O_5). In acqua gli ossidi danno gli acidi corrispondenti, acido arsenioso (H_3AsO_3) e acido arsenico (H_3AsO_4).

La tossicità dell'arsenico e dei suoi composti è in relazione alle forme chimiche dell'elemento: i composti inorganici sono i più tossici, seguiti da quelli organici ed infine dal gas arsina (Buck, 1978).

Malgrado la relativa notorietà come veleno mortale, è un oligoelemento essenziale per gli organismi viventi. Secondo alcune ricerche sembra infatti prendere parte al metabolismo della metionina (Uthus, 1992). Dal punto di vista chimico, l'arsenico è molto simile al suo omologo, il fosforo, al punto che lo sostituisce parzialmente in alcune reazioni biochimiche, da cui il suo effetto tossico. Questa abilità nell'imitazione è stata dimostrata in numerosi tessuti di molte specie animali.

L'arsenico si trova naturalmente sulla terra in piccole concentrazioni cristallizzato in concrezioni grigie. I minerali che lo contengono sono il realgar (As_4S_4) di colore rosso rubino, l'orpimento (As_2S_3) di colore giallo limone e l'arsenopirite, l'unico sfruttato industrialmente.

Nell'atmosfera proviene da varie fonti: i vulcani ne liberano circa 3000 tonnellate all'anno ed i microorganismi liberano metilarsine volatili nella misura di 20.000 tonnellate all'anno, ma l'attività umana ne è ancora più responsabile: 80,000 tonnellate di arsenico all'anno sono liberate dalla combustione dei combustibili fossili. Le fonti ambientali antropogeniche dell'arsenico sono: l'uso dei suoi composti come erbicidi (arseniato di piombo, arseniato di calcio, arseniato cromato di rame); la liberazione durante i processi di estrazione dell'oro, piombo, rame e nickel, nei cui minerali è presente (il percolato di miniere è ancora oggi una fonte di inquinamento da arsenico dei sistemi idrici); processi di produzione del ferro e dell'acciaio; combustione del carbone di cui è contaminante. Gli esseri umani possono quindi essere esposti ad arsenico attraverso cibo, acqua ed aria.

L'esposizione può anche avvenire attraverso il contatto della pelle con terreno o acqua contenente arsenico. I livelli di arsenico negli alimenti sono ragionevolmente bassi ma si possono trovare livelli elevati di arsenico in pesci e frutti di mare, poiché i pesci assorbono l'arsenico dall'acqua in cui vivono. Fortunatamente questa è principalmente una forma organica ragionevolmente inoffensiva, ma i pesci che contengono quantità significative di arsenico inorganico possono essere un pericolo per la salute umana. L'arsenico inorganico viene ben assorbito dall'apparato gastroenterico e a livello polmonare generalmente oltre il 50% della dose assunta.

Differenti sono i composti di arsenicali organici, generalmente considerati poco assorbibili dato che il loro assorbimento è relativo alla loro idrosolubilità. Tali composti, una volta assorbiti, vengono facilmente eliminati con le feci e le urine infatti, sono soggetti a biometilazione epatica detossificante; pertanto gli arsenicali organici sono meno tossici e più facilmente escreti. Si ipotizza che l'assorbimento di quantità specifiche di arsenico inorganico possa intensificare le probabilità di sviluppo del cancro, soprattutto la probabilità di sviluppo di cancro della pelle, di cancro polmonare, di cancro al fegato e di cancro linfatico. Un'esposizione molto alta ad arsenico inorganico può causare sterilità e false gestazioni nelle donne, può determinare danni al feto e può causare disturbi alla pelle, bassa resistenza alle infezioni, disturbi al cuore e danni al cervello sia negli uomini che nelle donne.

Uno dei meccanismi suggeriti con cui l'arsenico esercita il suo effetto tossico è attraverso una compromissione della respirazione cellulare tramite l'inibizione di alcuni enzimi carboidrati (ad esempio, la gluconeogenesi e glicolisi percorsi) e il disaccoppiamento della fosforilazione ossidativa. Questo potrebbe spiegare il legame tra esposizione acuta da arsenico e il rischio diabetico attraverso la sua influenza sull'espressione di fattori di trascrizione genici che sono legati a percorsi di insulina, ad esempio, il fattore a monte dell'insulina (IUF-1). L'arsenico

potrebbe anche influenzare lo sviluppo del diabete con altri meccanismi, tra cui lo stress ossidativo, l'infiammazione, o l'apoptosi, meccanismi non specifici che sono stati implicati nella patogenesi del diabete melliti di tipo 2. I dati disponibili suggeriscono un ruolo importante dell'arsenico su una serie di effetti correlati allo stress ossidativo e **all'infiammazione vascolare**. Queste osservazioni sono coerenti con gli studi che illustrano aumentati espressione di linfociti circolanti negli esseri umani esposti ad arsenico. Lo stress ossidativo indotto da alte esposizioni di arsenico è stato implicato nella fisiopatologia dell'aterosclerosi. I lipidi ossidati sono presenti in tutte le fasi della aterogenesi, e generano diverse molecole bioattive tra cui perossidi, isoprostani, aldeidi (malondialdeide) e 4-idrossi-trans-2-nonenale). Poiché gli aldeidi lipidici sono altamente reattivi e possono indurre la produzione di citochine è concepibile che un'eccessiva generazione di questi aldeidi o una diminuita disintossicazione in seguito all'esposizione all'arsenico aggrava la lesione aterosclerotica. (146, 147, 148)

Cadmio

Il cadmio è un elemento piuttosto raro in natura (circa 0,2 ppm nella crosta terrestre) dove non esiste libero, ma si trova nei minerali dello zinco, soprattutto nella blenda (come solfuro), in quantità variabili tra lo 0,1 e il 2% circa. Esistono anche alcuni rari minerali del cadmio quali il solfuro (greenockite) e il carbonato basico (otavite). La forma predominante con cui il cadmio si trova nell'ambiente è quella ionica (Cd^{++}), È solubile in acidi ma non in alcali. È simile per molti aspetti allo zinco ma si presta a composti più complessi. La presenza ambientale del metallo è andata progressivamente aumentando negli ultimi anni in conseguenza delle sue molteplici applicazioni. La contaminazione da cadmio deriva principalmente dagli scarichi dell'industria dello zinco e della galvanoplastica, dagli scarichi delle industrie delle vernici e degli smalti, dagli inceneritori dei rifiuti e dall'impiego dei concimi fosfatici spesso contaminati. L'impiego nell'industria della plastica, nella produzione di leghe, di coloranti (il solfuro di cadmio, CdS , è usato come pigmento) e di batterie (come il nitrato di cadmio $[Cd(NO_3)_2]$, il solfato ($CdSO_4$) e il cloruro) accresce la possibile contaminazione globale. I sali di cadmio trovano impiego in campo fotografico e nella fabbricazione di fuochi artificiali, gomme, vernici fluorescenti, vetri e porcellane. Dopo essere utilizzato, questo metallo entra attraverso il terreno nella catena alimentare tramite le acque e le deposizioni sul suolo e vegetali.

Negli ultimi tempi numerose ricerche hanno attestato un progressivo aumento del carico di cadmio nell'organismo umano (Ghidini et al., 2000) e si pensa che questa evoluzione derivi

dall'inquinamento atmosferico e dell'acqua, dalla contaminazione degli alimenti e dal fumo di sigaretta. Comunque l'assorbimento di cadmio da parte degli esseri umani avviene in larga parte attraverso il cibo. Le produzioni alimentari ricche in cadmio possono notevolmente aumentare la concentrazione di esso nel corpo umano. Alcuni esempi sono fegato, funghi, crostacei, mitili, polvere di cacao ed alghe secche. Il cadmio presente nel fumo di tabacco contribuisce ulteriormente alla sua esposizione, i fumatori, infatti, hanno circa il doppio del carico corporeo di cadmio rispetto a un non fumatore. Il cadmio è trasportato al fegato principalmente tramite il sangue. Nel fegato si lega alle proteine per formare complessi che sono trasportati ai reni nei quali si accumula, danneggiando i meccanismi di filtrazione. Ciò causa l'escrezione di proteine essenziali e di zuccheri dal corpo ed un ulteriore danno renale, dato che occorre molto tempo prima che il cadmio accumulato in essi sia espulso dal corpo umano (Reilly, 1991).

Oltre alle sue proprietà cumulative, il cadmio è anche un metallo altamente tossico che può interrompere un numero di sistemi biologici, generalmente a dosi che sono molto inferiori rispetto alla maggior parte dei metalli tossici. Una valutazione del rischio europeo propone che si possono verificare effetti deleteri di cadmio a livelli più bassi di 0,5 mg /g.

Ancora più importante, questi dati mostrano che il cadmio può esercitare effetti sul sistema cardiovascolare a livelli estremamente bassi di esposizione.

Gli effetti cardiovascolari del cadmio sono stati osservati negli studi in vitro ed in modelli sperimentali animali. Il cadmio può esercitare i suoi effetti cardiovascolari avversi promuovendo l'aterosclerosi, inducendo svantaggiosi cambiamenti cardiaci funzionali e metaboliche e attraverso una serie di meccanismi, come il parziale agonismo per i canali del calcio, l'azione diretta vasocostrittore e l'inibizione di sostanze vasodilatatrici come NO.

Un meccanismo primario di tossicità del cadmio è il suo effetto sulle cellule che è stato attribuito allo stress ossidativo e soprattutto alla deplezione di glutatione.

La riduzione delle attività di varie proteine antiossidanti (catalasi, glutatione reduttasi, totale glutatione), mediata dal cadmio, può causare l'accumulo di specie reattive dell'ossigeno nelle cellule. Il Cadmio, inoltre, induce necrosi endoteliale che, oltre a danneggiare l'integrità dell'endotelio vascolare, contribuisce all' infiammazione vascolare.

Altri effetti sulla salute causati dal cadmio sono: fratture alle ossa, problemi riproduttivi e persino possibilità di infertilità, danneggiamento del sistema nervoso centrale, danneggiamento del sistema immunitario, disordini psicologici, possibilità di danni al DNA e sviluppo del cancro.

L'effetto dell'esposizione cronica al cadmio sul sistema anticoagulante nei ratti suggerisce la

presenza di uno stato di ipercoagulabilità durante l'intossicazione da cadmio, infatti, i parametri del sistema emolitico risultano alterati, provocando la diminuzione della proteina C e dell'attività antitrombinica e l'accorciamento del tempo di protrombina e tempo di tromboplastina.

Allo stesso modo, l'esposizione al Cd causa un significativo aumento del numero di globuli bianchi ($P < 0.05$) che indica la presenza di infiammazione sistemica. Pertanto, si può affermare che la tossicità cronica del cadmio pone le basi per l'ipercoagulazione e aumenta il rischio di trombosi. (146, 147, 149, 150)

Cobalto

Il cobalto è relativamente poco abbondante nella crosta terrestre e nelle acque naturali. Esso non è solitamente estratto in quanto tale, isolato, ma è ottenuto come sottoprodotto dell'attività di estrazione mineraria di nichel e rame. Noto come costituente della vitamina B12 (cianocobalamina) e del coenzima B12, il cobalto attiva un numero rilevante di reazioni enzimatiche; agisce come sostituto del manganese nell'attivare una serie di enzimi come la dipeptidasi; sostituisce lo zinco in alcuni enzimi e ne attiva altri. Interviene nel metabolismo del ferro stimolando l'eritropoiesi e permettendo così che tale metallo sia incorporato nella protoporfirina. Favorisce la sintesi della timidina, componente del DNA, nonché della colina e della metionina, fattori lipoproteici ed agenti epatoprotettori, capaci di fissarsi in modo selettivo sul tessuto adiposo. Sembra essenziale per la comparsa dei caratteri sessuali e per lo sviluppo di alcune ghiandole. Il cobalto è un oligoelemento immagazzinato soprattutto nel fegato. Un eccesso di cobalto può causare policitemia (proliferazione della linea eritropoietica), ipertrofia della tiroide e ipertrofia cardiaca. Dosi elevate di cobalto possono interferire con reazioni di decarbossilazione, impedire il metabolismo del piruvato e degli acidi grassi e favorire l'assorbimento del ferro e la sintesi della globina. (146, 147, 151)

Cromo

Gli studi condotti per delineare le concentrazioni ambientali del metallo ne definiscono una presenza pari a 200 ppm nella crosta terrestre e a 1-2.5 ppb nelle acque marine, quando invece nelle zone superficiali del terreno e nei vegetali è rinvenibile solo in tracce (Venugopal e Luckey, 1978). Il cromo trivalente presenta una bassa attitudine ad attraversare le membrane e per questo viene scarsamente assorbito; il cromo esavalente, in ambiente gastrico, viene rapidamente e spontaneamente ridotto a cromo trivalente con una velocità che varia in funzione dell'acidità gastrica e della quantità di alimento presente. Nell'organismo il cromo

riveste un ruolo essenziale per il trasporto di metaboliti cellulari attraverso le membrane e per il metabolismo dei carboidrati (Preston et al., 1976). Il substrato in grado di accumulare un'importante percentuale del cromo circolante è rappresentato dal tessuto osseo e la distribuzione, a tale livello, risulta analoga a quella del calcio e dello stronzio, elementi costitutivi del tessuto osseo stesso; altri distretti di accumulo del metallo possono essere fegato, rene e milza. Il cromo è un elemento che, pur essendo in grado di svolgere un ruolo essenziale nel metabolismo dei glicidi in numerose specie animali, risulta altresì caratterizzato da attività cancerogena e capace per concentrazioni elevate, di indurre importanti effetti tossici; mentre il cromo trivalente non sembra presentare particolari effetti tossici per gli organismi, lo ione esavalente si comporta, al contrario, da agente potenzialmente dannoso. Il cromo esavalente desta, infatti, un maggiore interesse dal punto di vista prettamente tossicologico perché capace di indurre alterazioni comportamentali, modificazioni delle attività enzimatiche e dei parametri ematochimici, oltre che una minore resistenza agli agenti infettivi (Eisler 1986). In particolare, i composti esavalenti sono responsabili di effetti neurotossici, genotossici, tossici sul sistema immunitario. Numerosi studi hanno dimostrato che il cromo esavalente induce stress ossidativi, danno al DNA, apoptosi cellulare ed alterata espressione genica (Proietti et al., 2005). (146, 147)

Ferro

E' il quarto elemento, in abbondanza, della crosta terrestre dopo silicio, ossigeno e alluminio; esso è uno degli elementi il cui ciclo biologico-chimico ha subito notevoli modificazioni a seguito delle attività umane; è il metallo predominante nel nucleo terrestre (90%) e nei minerali più importanti da cui si estrae è in forma di ossidi (magnetite $Fe_3O_4 \cdot H_2O$), solfuri (pirite FeS_2) e carbonati (siderite $FeCO_3$), negli ecosistemi è presente prevalentemente in forma ossidata come Fe^{2+} o Fe^{3+} e ha grande affinità con ossigeno e acqua. Il ferro è, insieme allo zinco, il metallo pesante più rappresentato nelle matrici biologiche; è presente in concentrazioni elevate soprattutto nei tessuti molto vascolarizzati, è infatti, un oligoelemento necessario agli esseri viventi.

Il ferro è necessario per la sintesi di emoglobina, di mioglobina e di collagene; è inoltre indispensabile nei processi di respirazione cellulare e nel metabolismo degli acidi nucleici.

La fonte principale di ferro non è costituita dall'alimentazione, bensì dai depositi organici e dai prodotti dei processi emocateretici. La quota che si origina dalla distruzione degli eritrociti può essere immediatamente riutilizzata in forma di ferro attivo, piuttosto che essere depositata come ferro di riserva. Allo stesso tempo, tuttavia, a causa della sua capacità di cambiare

rapidamente stato di ossidazione, il ferro può rivelarsi tossico, per cui la sua concentrazione deve essere mantenuta costante; questo processo viene attuato da una proteina plasmatica, la transferrina, e da una proteina citosolica delle cellule del sistema reticoloendoteliale, la ferritina (Gutteridge, 1987). Uno dei meccanismi con cui il ferro esplica la sua azione tossica a livello cellulare consiste nella capacità di catalizzare la produzione di radicali idrossilici, potenti agenti ossidanti, capaci di determinare perossidazione delle membrane lisosomiali e depolimerizzazione dell'acido ialuronico con gravi danni all'organismo. In più, il metallo libero o sotto forma di aggregati di ferritina, esplica la sua azione tossica attraverso la produzione di radicali ossigeno e perossidi lipidici. L'elemento può causare l'inattivazione degli enzimi del ciclo di Krebs portando ad un accumulo di acido lattico e altri acidi nel sangue e nei tessuti e diminuendo contemporaneamente il volume plasmatico in ragione di un'aumentata permeabilità capillare.

C'è una forte associazione tra carenza ed eccesso di ferro plasmatico con stati di trombosi venosa e arteriosa.

Livelli bassi di ferro sierico portano ad un aumento del fattore VIII della coagulazione, indipendentemente dai livelli di vWF, sua proteina vettrice.

Inoltre, l'anemia da carenza di ferro può causare trombosi portando un aumento del numero di piastrine e quindi ad uno stato di trombocitosi che favorisce l'ipercoagulabilità. In terzo luogo, uno stato di microcitosi rende il globulo rosso poco deformabile, ne aumenta la viscosità e aumenta il rischio di trombosi venosa. Tuttavia, anche un accumulo eccessivo di ferro nel plasma è responsabile di TEV.

In condizioni normali, coaguli di fibrina vengono gradualmente degradate dal sistema enzimatico fibrinolitico, quindi senza che depositi insolubili permanenti rimangano nella circolazione. Lo ione ferro trivalente (Fe^{III}) genera, in soluzioni acquose, potenti radicali idrossilici, che successivamente modificano le molecole del fibrinogeno, convertendoli in polimeri di fibrina insolubile, notevolmente resistenti alla dissoluzione proteolitica, promuovendo la sua deposizione intravascolare e l'infiammazione indotta dai coaguli proteolisi-resistenti.

Questo processo patologico può essere impedito da sostanze che chelano il ferro, rimuovono i radicali idrossilici e inibiscono le interazioni idrofobiche nelle proteine. (146, 147, 152-156)

Mercurio

Il mercurio è un elemento in traccia non essenziale, l'unico che si trova allo stato liquido a temperatura ambiente. È il più volatile fra tutti i metalli ed i suoi vapori presentano un'elevata

tossicità. Il mercurio è un metallo che si presenta naturalmente nell'ambiente; entra come risultato della naturale rottura dei minerali in rocce e del terreno attraverso esposizione a vento e ad acqua. Il rilascio di mercurio da sorgenti naturali è rimasto più o meno lo stesso nel corso degli anni.

La sua concentrazione nell'ambiente sta ancora aumentando, ma ciò si attribuisce all'attività umana. Le emissioni nell'atmosfera sono sia naturali (evaporazione dalla crosta terrestre, emissioni vulcaniche) che antropogeniche (uso di combustibili fossili, fungicidi, insetticidi e utilizzo industriale dei metalli in generale). La maggior parte del mercurio liberato dalle attività umane è scaricato nell'aria, attraverso il combustibile fossile, l'estrazione mineraria, la fusione e la combustione dei rifiuti solidi. Alcune forme di attività umana scaricano mercurio direttamente nel terreno o nell'acqua, per esempio l'applicazione dei fertilizzanti agricoli e lo scarico di acque reflue industriali.

I più importanti sali di mercurio sono il cloruro mercurico $HgCl_2$, (sublimato corrosivo - un potente veleno), il cloruro mercurioso Hg_2Cl_2 (calomel, occasionalmente ancora usato in medicina), il fulminato di mercurio $Hg(O_2C)_2$, (un detonatore usato in esplosivi) e il solfato mercurico $HgSO_4$ (un pigmento per la pittura di grande diffusione commerciale).

Veniva estesamente usato in termometri, grazie al suo alto tasso di espansione termica che è abbastanza costante in un'ampia fascia di temperature. La sua facilità nell'amalgamarsi con l'oro è sfruttata nel recupero di quest'ultimo dai suoi minerali. In soluzione acquosa il mercurio esiste contemporaneamente in tutti e tre gli stati di ossidazione (Hg , Hg^{2+} e Hg_2^{2+}). Il catione Hg^{2+} è più stabile di Hg_2^{2+} ed è generalmente associato a molecole inorganiche quali solfuri (nel cinabro), cloruri (cloruro mercurico), ossigeno e ioni ossidrilici. Lo Hg^{2+} si trova anche all'interno di composti organici sotto forma di dimetilmercurio, $Hg(CH_3)_2$. Il processo di formazione di quest'ultimo avviene nei sedimenti fangosi, soprattutto in presenza di condizioni anaerobiche, quando i batteri anaerobi trasformano Hg^{2+} in $Hg(CH_3)_2$.

La specie chimica più attiva dal punto di vista biologico è lo ione CH_3Hg^+ che presenta la capacità di legarsi in modo abbastanza stabile a complessi organici ed in particolare a gruppi tiolici di amminoacidi e proteine, dando luogo a fenomeni di bioconcentrazione (Camuso e Borsani, 2004). Il mercurio viene accumulato principalmente nel fegato e nel rene.

Il mercurio è fortemente tossico; l'introduzione nell'organismo può avvenire sia per ingestione, sia per inalazione dei vapori, sia per semplice contatto (è in grado di attraversare la pelle). Per quanto riguarda il mercurio elementare (il metallo liquido), il rischio maggiore di intossicazione acuta è legato ai vapori, in quanto l'assorbimento cutaneo è trascurabile, così

come anche quello intestinale. Discorso diverso invece per i sali di mercurio, facilmente accumulabili attraverso la catena alimentare.

La fonte principale di assunzione di mercurio è formata dal cibo, oltre agli impieghi negli antisettici, nelle vernici, nelle cere per pavimenti, nei lucidanti per mobili, negli ammorbidenti e nei filtri per i condizionatori di aria.

Il metilmercurio renderebbe l'organismo incapace di provvedere alla disintossicazione dei metalli pesanti, che si accumulerebbero così nell'organismo con grave effetto neurotossico; l'attività di alcuni enzimi verrebbe seriamente compromessa e si originerebbero così gravi scompensi metabolici ed inoltre induce atassia, insonnia, parestesie, restringimento del campo visivo, disartria, ipoacusia.

Il consumo di pesce è la più importante causa di esposizione all'ingestione di mercurio negli animali e negli esseri umani. Alcuni grandi pesci, come il tonno e il pesce spada, possono contenere alti livelli del metallo per il fenomeno del bioaccumulo, in conseguenza del fatto che si tratta di pesci in cima alla catena alimentare marina; un grande consumo di questi prodotti ittici può comportare l'instaurarsi di avvelenamento da mercurio. In caso di ingestione acuta di mercurio si possono avere: gastroenterite, sindrome nefrosica, ipertensione arteriosa, tachicardia, collasso cardiocircolatorio e danno cerebrale, soprattutto a gangli della base, sostanza grigia e cervelletto.

Un'esposizione cronica comporta eretismo mercuriale alterazioni delle funzionalità renale, della memoria, alterazioni della coordinazione e del movimento.

L'esposizione di mercurio durante l'età infantile può comportare uno stato di acrodinia mentre in gravidanza può comportare, con alte dosi, ritardo mentale grave del nascituro, con dosi più basse, alterazioni dello sviluppo psicomotorio.

Il mercurio ha un ruolo critico nella genesi di uno stato ipercoagulante, infatti, l'esposizione prolungata a basse dosi di ioni di mercurio (Hg^{2+} ; 0,25-5 mM per 1-48 ore) induce cambiamenti di forma degli eritrociti (discociti, echinociti, sferociti) accompagnato dalla formazione di microvescicole (MV). Ciò comporta una iper espressione di fosfatidilserina (PS), un importante mediatore di attivazione procoagulante.

Coerentemente con questi cambiamenti, la trombosi, mediata da Hg, è potenziata da una maggiore aggregazione piastrinica, aumenti del fattore VIII, del fattore piastrinico 4, della trombina e riduzione della proteina C. (146, 147, 157-159)

Piombo

Le concentrazioni medie di piombo presenti nella crosta terrestre sono piuttosto basse, circa

15-16 mg/kg; l'elemento si rinviene in numerosi minerali, come la galena, che rappresenta la fonte primaria di piombo allo stato naturale. Il piombo è pressoché ubiquitario ed è utilizzato in una grande varietà di prodotti (Ensley S., 2003). Le concentrazioni di piombo nella flora e nella fauna marine evidenziano una diminuzione di circa il 5% annuo, in linea con il graduale abbandono dell'uso della benzina al piombo. Fonti di esposizione ambientali sono: l'aria attraverso il traffico veicolare (Pb tetra-etile e tetra- metile delle benzine), gli alimenti, il cui Pb è ceduto dai contenitori, l'acqua (Pb dall'aria, dal suolo, dalle tubature) e le vernici murarie.

Le fonti di esposizioni lavorative riguardano la produzione di oggetti con contenuto di Pb (proiettili, pallini da caccia, ecc.), costruzione o demolizione di accumulatori, l'Industria meccanica, ceramica e plastica, oggetti in peltro, bronzo, ottone e tecnologie agrarie.

Il piombo è un elemento che può agire come veleno esplicando interferenza con diversi sistemi metabolici in particolar modo nelle forme di intossicazione ad andamento cronico e come agente mutageno, cancerogeno e teratogeno, mentre non esiste alcuna segnalazione, reperibile in letteratura, che ne indichi un ruolo fisiologico. La distribuzione tissutale del metallo inizialmente, grazie alla frazione plasmatica libera, è pari ad un 60% nel tessuto osseo, ad un 25% in quello epatico e ad un 4% in quello renale. Successivamente, la quantità di piombo nelle ossa ammonta al 90%, dimostrando che la distribuzione iniziale è oggetto di una successiva ridistribuzione verso il tessuto osseo; si tratta del cosiddetto "steady state level". Il fenomeno dell'assorbimento del piombo risulta, da un punto di vista quantitativo, influenzato dall'età dell'animale. Una volta assorbito il piombo si riversa nel torrente circolatorio, inizialmente a livello plasmatico per poi penetrare rapidamente negli eritrociti, dove si lega all'emoglobina e ad altri componenti cellulari (Raghavan et al., 1980).

Il piombo tetraetile, grazie alla sua liposolubilità ed alla sua elevata diffusibilità, presenta un rapido assorbimento gastroenterico, respiratorio e cutaneo. Il composto, nell'organismo, viene in piccola parte metabolizzato, con rilascio del metallo e successivo accumulo nei tessuti molli, mentre, in funzione della sua lipofilia, si accumula prevalentemente nel tessuto cerebrale (Venugopal e Luckey, 1978).

L'intossicazione cronica da piombo, prevalentemente professionale, viene chiamata saturnismo, può dar luogo a svariate manifestazioni: anemia, colica intestinale, ipertensione arteriosa, alterazione dell'abilità manuale, aumento dei tempi di reazione, nefropatia, neuropatia.

L'intossicazione acuta, oggi estremamente rara, può portare all'encefalopatia e al coma.

Il piombo può inibire l'attivatore tissutale del plasminogeno ed aumentare la produzione dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) portando ad un accumulo di plasminogeno, riducendo la fibrinolisi e dunque favorire il TEV. (146, 147, 160)

Rame

Il rame è una sostanza molto comune che si presenta naturalmente in ambiente e si diffonde in esso attraverso fenomeni naturali. Si trova sotto forma di ione bivalente (Cu^{++}), idrossidi, carbonati e ha la tendenza a formare complessi con la materia organica ed il materiale particolato. La maggior parte del rame è usata per produrre materiale elettrico (60%), altri utilizzi sono nel campo delle costruzioni, come tetti e impianti idraulici (20%), nei macchinari industriali, come gli scambiatori di calore (15%) e nelle leghe (5 %). Questo metallo trova inoltre utilizzo in agricoltura e preservante del legno delle imbarcazioni. In atmosfera la concentrazione è variabile, nelle acque il rame si trova comunemente a concentrazioni inferiori a 0.3 mg/L, ma solo una piccola frazione è presente in forma libera, data la sua notevole tendenza a formare complessi con numerosi leganti organici. La concentrazione media in un suolo non inquinato è di 20-30 mg/Kg, ma alte concentrazioni negli strati superficiali di un suolo possono derivare da fertilizzanti, rifiuti di fonderia, battericidi e fungicidi. Gli scarichi derivanti dall'attività di estrazione mineraria rappresentano il principale apporto del metallo nelle acque marine e fluviali. La precipitazione dei carbonati influenza la concentrazione del metallo a valori elevati di pH. Quantità elevate di cloruri comportano inoltre un aumento della mobilità del rame in seguito alla formazione degli ioni complessi ed un minor grado di assorbimento all'interno del sedimento (Bourg, 1988). Pur essendo un micronutriente essenziale per molti organismi risulta tossico se presente in dosi eccessive, molte specie acquatiche mostrano infatti sensibilità a concentrazioni nell'arco di 1-10 mg/l (Bryan, 1976).

Le concentrazioni più alte si trovano nei crostacei decapodi, nei gasteropodi e nei cefalopodi, nei quali l'emocianina del pigmento respiratorio contiene rame. L'eccesso di rame è immagazzinato di solito nel fegato, in generale però il metallo non si accumula lungo la catena alimentare, non è quindi soggetto a processi di biomagnificazione.

Per l'uomo la quantità giornaliera necessaria è di 2-5 mg per gli adulti, 0.5-0.7 mg per i bambini nei loro primi anni di vita. Il rame, anche se presente in tracce, è essenziale per la crescita e lo sviluppo del corpo umano. Gioca un ruolo importante all'interno del metabolismo: dalla normale attività del cervello, del sistema nervoso e cardiovascolare, al

trasporto del ferro e alla protezione delle cellule contro l'ossidazione. È importantissimo anche per rafforzare le ossa e assicurare il funzionamento del sistema immunitario. Ha un ruolo nella respirazione perché partecipa alla sintesi dell'emoglobina. È presente in molti enzimi funzionali dell'organismo umano.

L'assorbimento del metallo avviene nello stomaco e nella parte alta dell'intestino tenue, dove il rame si lega alle metallotioneine nelle cellule epiteliali. L'eliminazione del rame avviene prevalentemente a livello biliare, ma anche attraverso le feci, le urine, i capelli, la desquamazione e il sudore. A dosi elevate, il rame può diventare pericoloso; Il meccanismo tramite il quale il rame esprime la sua tossicità è abbastanza complesso. Esso implica un aumento della permeabilità cellulare negli eritrociti con conseguente emolisi, inibizione della glutatione-reduttasi e diminuzione del glutatione intracellulare ridotto e un'agglutinazione dei globuli rossi. Questo porta ad uno stress ossidativo dei globuli rossi e ad una accelerata perdita del glutatione ridotto intracellulare. Contemporaneamente gli ioni rameici inducono il rigonfiamento dei mitocondri e inibiscono il consumo di ossigeno (Bowler e Duncan, 1970).

L'affinità del rame $2+$ per i gruppi tiolici dell'emoglobina aumenta la permeabilità e la lisi dei globuli rossi. Infine il rame aumenta la fragilità delle membrane lisosomiali, facilitando il rilascio di enzimi litici che provocano degenerazione cellulare (Chvapil et al., 1972). Non si può stabilire con precisione un livello soglia di tossicità del rame, poiché questo dipende anche dalle concentrazioni di altri metalli come molibdeno, zinco e ferro che competono con il rame nell'assorbimento.

Il rame è un componente essenziale del fattore V della coagulazione, la cui mutazione può portare ad uno stato trombotico. (146, 147, 161)

Zinco

Lo zinco è un metallo non facilmente reperibile in natura, tuttavia, nelle matrici biologiche, dopo il ferro, è il metallo che raggiunge le più alte concentrazioni, trovandosi stabilmente legato ad enzimi o proteine come catione bivalente. Lo zinco possiede una discreta biodisponibilità a partire da numerose fonti, compreso lo zinco elementare ed i sali insolubili; questi ultimi, infatti, vengono solubilizzati dalla mucosa gastrica. L'assorbimento gastrointestinale varia grandemente a seconda dei composti ingeriti e della concentrazione di metallo nell'alimento. La presenza nel cibo di elevate aliquote di calcio, fosforo e rame riduce l'assorbimento di zinco, così come il cadmio compete con esso per gli stessi meccanismi di trasporto (Becker and Hoekstra, 1971). Negli organismi viventi lo zinco presenta distribuzione ubiquitaria, ma tende a concentrarsi soprattutto in muscoli, ossa e tegumento

(Venugopal e Luckey, 1978). Lo zinco compare in moltissime classi di enzimi e cofattori biologici: ossidoreduttasi, transferasi, idrolasi, isomerasi e ligasi. Oltre ai suddetti composti, lo zinco entra a far parte di metallotioneine, implicate anche nei fenomeni di disintossicazione, e di proteine regolatrici di geni, che facilitano o impediscono la trascrizione di un gene. Lo zinco è in grado di legarsi anche con i nucleotidi e in conseguenza di ciò lo si può ritrovare negli acidi nucleici; possiede, inoltre, affinità per i gruppi tiolici (Venugopal e Luckey, 1978). Lo zinco è pure implicato nella modulazione del sistema immunitario, infatti, numerosi studi dimostrano che carenze di zinco provocano ridotta risposta immunitaria cellulo-mediata e diminuzione dell'intensità delle reazioni di ipersensibilità ritardata, a cui consegue maggiore suscettibilità a infezioni e patologie (Adams, 1999). Molti degli effetti tossici dello zinco derivano dalle sue complesse interazioni con altri nutrienti fondamentali, come Cu, Fe, Mg e Ca. Dosi elevate provocano effetti antagonisti sul metabolismo. Un'intossicazione da zinco altera il metabolismo del Fe favorendone il suo turnover e diminuendo il tempo di vita degli eritrociti e l'accumulo del Fe come ferritina nel fegato (Settlemyre e Matrone, 1967 a, b). Lo zinco è tossico per gli organismi a concentrazioni molto più elevate rispetto agli altri metalli; i meccanismi che ne regolano l'assorbimento, la distribuzione e l'escrezione sono, infatti, molto efficienti. Tuttavia si possono avere alterazioni dell'omeostasi di questo metallo con accumulo di quantità tossiche per un eccessivo apporto con la dieta o per malnutrizione con scarsa assunzione di proteine.

Vi sono sempre più prove che lo zinco è un importante mediatore dell'emostasi e della trombosi. Spinti dalla constatazione che la carenza di zinco è associata a sanguinamento e anomalie della coagulazione, vi è ora l'evidenza che lo zinco funge da effettore della coagulazione, anticoagulazione e fibrinolisi. Una volta attivate, le piastrine secernono zinco, che fornisce un meccanismo a feedback positivo essenziale per la propagazione della coagulazione. Lo zinco stimola ulteriormente la coagulazione potenziando l'aggregazione piastrinica e la formazione di coaguli di fibrina. Lo zinco, dall'altra parte, legandosi alle proteine e alterando l'attività enzimatica, limita i processi coagulativi attivando le vie inibitorie della coagulazione. L'attività procoagulante dello zinco è particolarmente rilevante anche sull'azione nei confronti del legame eparina-fibrina; aumentando l'affinità di eparina per la fibrina, lo Zn²⁺ promuove la formazione di un complesso ternario eparina-trombina-fibrina che protegge la trombina dall'inibizione dell'antitrombina; da ciò si spiega perché la trombosi ricorrente può verificarsi nonostante il trattamento con eparina. (146, 147, 162-165)

Manganese

Il manganese è uno dei metalli più abbondanti nel terreno, in cui si presenta sottoforma di ossidi e idrossidi passando attraverso i suoi vari stati di ossidazione. È un componente chiave delle produzioni a basso costo di acciaio inossidabile e di certe leghe di alluminio molto usate. Il Biossido di manganese, inoltre, è usato come catalizzatore. Il manganese è utilizzato anche per decolorare il vetro e produrre vetro viola. Il permanganato di potassio è un potente ossidante ed è usato come disinfettante in chimica ed in medicina. Altri composti che trovano impiego sono l'ossido di manganese (MnO) ed il carbonato di manganese (MnCO₃): il primo è usato nei fertilizzanti e nella ceramica, il secondo è un materiale di avvio per la produzione di altri composti di manganese. Il manganese è presente in tutti i tessuti animali e vegetali, nell'acqua e nel pulviscolo atmosferico; si è rivelato elemento essenziale in ogni specie animale studiata. L'elemento è noto come attivatore di diversi enzimi in vitro. Nell'animale, in seguito a carenza indotta sperimentalmente, si evidenziano rallentamento della crescita, deformità scheletriche, diminuzione della capacità riproduttiva e difetti nel metabolismo di carboidrati e lipidi. Svolge un ruolo molto importante come antiossidante e si ritiene che possa avere un ruolo nel processo degenerativo di invecchiamento. Il suo ruolo nei sistemi vegetali ed animali è fondamentale, infatti, nella forma 2+ è un agente attivante degli enzimi responsabili della sintesi delle glicoproteine e lo si ritrova come costituente di molti metalloenzimi, come ad esempio la piruvato carbossilasi. L'assorbimento è influenzato negativamente dalla presenza di alcuni metalli, come ferro e cobalto e dall'elevato contenuto di calcio e fosforo presenti negli alimenti. Il manganese, dopo essere entrato nel circolo sanguigno, viene in gran parte captato dal fegato. Anche le ossa ne sono abbastanza ricche ed a causa della loro massa contengono la percentuale dell'elemento più elevata del corpo. A dispetto della sua essenzialità, l'eccessiva esposizione al manganese provoca fenomeni di tossicità al sistema nervoso centrale. L'effetto più comune della tossicità da manganese è la carenza secondaria di ferro; ciò è dovuto ad una competizione tra Fe e Mn per i comuni sistemi di trasporto. La tossicità acuta porta a crescita stentata, alterazioni del metabolismo dei carboidrati, alterazioni delle funzioni cerebrali e anomalie comportamentali; la neurotossicità può verificarsi anche con esposizioni a concentrazioni del metallo basse. Prove di laboratorio hanno indicato che un grave avvelenamento da manganese potrebbe essere in grado di causare lo sviluppo di tumori negli animali.

Ioni magnesio e manganese accelerano il fattore VII tissutale della coagulazione indipendentemente dal fattore IX (van den Besselaar A). (146, 147)

Nichel

La maggior parte del nichel presente sulla terra è inaccessibile perché intrappolato nel nucleo fuso ferro-nichel del pianeta. Il materiale organico ha una notevole capacità di assorbimento del metallo e questo spiegherebbe le considerevoli quantità ritrovate in sostanze quali il carbone e l'olio. Il nichel è un minerale in traccia considerato essenziale. Le ricerche eseguite dimostrano che l'elemento copre ruoli importanti nel metabolismo degli ormoni, dei lipidi e nell'integrità della membrana cellulare. E' un attivatore di alcuni enzimi come arginasi, tripsina e carbossilasi e partecipa al metabolismo del glucosio. Se ne trovano quantità importanti nel DNA e nell'RNA e può agire come stabilizzatore di questi acidi nucleici. La carenza di nichel può influenzare il metabolismo di zinco e ferro. Negli animali l'avvelenamento da nichel si manifesta con esaurimento dei grassi e dell'ossigeno nel fegato. L'elemento si accumula nel fegato e nelle ossa. Gli ioni bivalenti come il calcio, il magnesio e lo zinco possono agire in una certa misura da antagonisti. La tossicità dell'elemento aumenta quando il minerale si combina con ossido di carbonio liberando nichel carbonile. Per quanto riguarda i meccanismi della cancerogenesi indotta da nichel, tale elemento esercita un'azione repressiva sul numero delle cellule natural-killer, una subpopolazione di linfociti. In secondo luogo il nichel ed i suoi sali agiscono attraverso la lipido-perossidazione e i metaboliti altamente reattivi prodotti, come il 4-idrossialchenale, provocando danni al DNA e inducendo la formazione di tumori. (146, 147)

Vanadio

L'elemento è presente principalmente nel petrolio e nei materiali carboniferi e bituminosi, dove è associato alla frazione pesante. Il contenuto di vanadio nei suoli varia considerevolmente (3-310 mg/kg) in relazione al tipo di roccia madre che lo origina. I livelli di vanadio nell'acqua possono arrivare a 220 mg/l; le diversità geografiche sono dovute a differenze di piovosità od alla presenza di effluenti industriali. Gli studi in vitro e sugli animali indicano che il vanadato e gli altri composti del vanadio fanno incrementare l'attività di trasporto del glucosio (Barceloux, 2000). Il vanadio assorbito viene trasportato dal sangue, prevalentemente legato alle transferrine del siero; in presenza di alcuni fattori biologici nel plasma e nel citoplasma, avviene un lento scambio del vanadio tra transferrina e ferritina. La forma pentavalente (vanadato) predomina nei fluidi corporei extracellulari mentre la forma tetravalente è la più comune forma intracellulare (WHO, 1988).

Il vanadio si lega fortemente al citoplasma, al nucleo ed ai mitocondri. L'accumulo del vanadio nell'organismo dipende dalla specie, dall'età, dal composto del vanadio, dalla dose e

dalla durata dell'esposizione. In generale la tossicità dei composti del vanadio è bassa, con aumento in relazione all'incremento della valenza, i composti pentavalenti, infatti, sono quelli più tossici (Barceloux, 2000). I principali effetti osservati della tossicità del vanadio sono: alterazioni ematologiche, alterazioni renali, alterazioni del sistema immunitario, mutagenicità, danni alla sfera riproduttiva e danni allo sviluppo (Barceloux, 2000).

Gli effetti tossici sono in gran parte la conseguenza delle marcate proprietà ossidative del metallo. E' stata trovata una correlazione diretta tra l'estesa perossidazione lipidica e gli effetti epatotossici e neurotossici. (146, 147)

Selenio

Il selenio è fra gli elementi più rari sulla superficie del nostro pianeta. È un elemento chimico non metallico, che presenta allotropie e si trova in un certo numero di forme, compresa una polvere amorfa rossa, un materiale cristallino rosso ed una forma cristallina grigia del simile al metallo chiamata selenio "metallico". A causa delle sue proprietà fotovoltaiche e fotoconduttive, il selenio è estesamente usato in elettronica, per fotocellule, esposimetri e pile solari; il secondo più grande uso di selenio è nell'industria del vetro.

È presente nell'atmosfera come derivati di metile. Il selenio si presenta naturalmente nell'ambiente, liberato sia nei processi naturali che attraverso attività umane. Terreni agricoli ben fertilizzati contengono circa 400 mg/ton di selenio dal momento che l'elemento è naturalmente presente nei fertilizzanti al fosforo ed è normalmente aggiunto come nutriente. Nella sua forma naturale non può essere prodotto o distrutto, ma ha la capacità di cambiare forma da mobile ad immobile e viceversa; quando il selenio è più mobile, le probabilità di esposizione ai suoi composti aumentano notevolmente. Temperature del suolo, umidità, concentrazioni di selenio solubile in acqua, stagione dell'anno, contenuto di materia organica e attività microbica determinano quanto velocemente il selenio si muove attraverso il terreno. L'esposizione al selenio avviene principalmente attraverso gli alimenti, perché è naturalmente presente nel grano, cereali e carne. Gli esseri umani devono assorbire giornalmente determinate quantità di selenio per mantenere una buona salute. Quando l'assorbimento del selenio è troppo alto, è probabile che si manifestino effetti sulla salute. Una sovrapposizione a vapori di selenio può produrre accumulazione di liquido nei polmoni, bronchite, polmonite, asma bronchiale, nausea, freddo, febbre, emicrania, la congiuntivite e fegato ingrossato. Il comportamento del selenio nell'ambiente dipende molto dalle sue interazioni con altri composti e dalle condizioni ambientali in un determinato punto e in un determinato istante. Esiste evidenza che il selenio può accumularsi nei tessuti del corpo degli organismi e che può

quindi essere trasmesso attraverso il ciclo alimentare. Il Selenio, inoltre, partecipa alla sintesi di ormoni tiroidei (Arthur,1991) e ai processi che proteggono contro lo stress ossidativo (Zhou et al., 2009). Un altro ruolo attribuito al Se è quello di ridurre la tossicità di alcuni contaminanti, in particolare il Hg. Questo effetto protettivo è dato dalla formazione di complessi Se-Hg (Raymond and Ralston,2004). È quindi di fondamentale importanza che il rapporto molare Hg:Se si mantenga < 1 , corrispondente al rapporto stechiometrico dei due elementi nel composto.

Questo starebbe a significare che il Se nell'organismo è sufficiente ad eliminare il Hg, abbassando da un lato il rischio di neurotossicità apportato dal Hg, e dall'altro le capacità antiossidanti di talune selenio-proteine.

L'apporto nutrizionale fornito da cibi ad alto contenuto di Selenio è dunque importante quando l'organismo subisce un accumulo significativo di Hg (Ralston, 2008). (146, 147, 166)

Palladio

Il palladio, insieme a rodio, rutenio, osmio, iridio ed al platino forma un gruppo degli elementi noti come i metalli del gruppo del platino (PGM). Il palladio è trovato come metallo libero insieme a platino ed altri metalli del gruppo del platino in Australia, Brasile, Russia, Etiopia ed in Nord e Sud America, come pure in giacimenti di rame e nichel (da quale è commercialmente recuperato) nel Canada e Sud Africa. A causa della relativa resistenza della corrosione, un importante impiego del palladio è in leghe usate in contatti elettrici a bassa tensione. Quando è finemente diviso, il palladio forma un buon catalizzatore ed è usato per accelerare le reazioni di deidrogenazione e di idrogenazione. Il palladio è usato estesamente in gioielleria in certe leghe chiamate "oro bianco". Può essere legato al platino o sostituirsi ad esso. È usato in cuscinetti di protezione, molle e rotelle delle bilance ed anche per gli specchi in strumenti scientifici. Nel 1990, la maggior parte delle marmitte catalitiche contavano su platino per ridurre le emissioni degli scarichi delle automobili ma, sebbene questo metallo sia ancora importante, il palladio è ora il principale ingrediente in quanto è ancora più efficiente nel rimuovere gli idrocarburi incombusti e parzialmente combustibili. Il palladio al giorno d'oggi sempre più è usato in apparecchiature elettriche come televisioni a schermo piatto, calcolatori e telefoni cellulari, sotto forma di sottili condensatori in ceramica multi-strato, di cui più di 400 miliardi sono prodotti ogni anno. Può causare irritazione di pelle, occhi, tratto respiratorio, può anche portare a sensibilizzazione della pelle.

I composti di palladio sono trovati abbastanza raramente dalla maggior parte delle persone. Tutti i composti di palladio dovrebbero essere ritenuti altamente tossici e cancerogeni. Il

cloruro di palladio è tossico, dannoso se ingoiato, inalato o assorbito attraverso la pelle. Causa noduli nelle ossa, danni a fegato e polmoni negli animali da laboratorio. Comunque il palladio veniva usato per trattare la tubercolosi (circa 1 mg/kg) senza troppi effetti negativi. (146, 147)

Platino

Il platino è un metallo bianco-argenteo brillante, malleabile, duttile. È resistente quanto l'oro alla corrosione ed all'appannamento, inoltre, il platino non si ossida in aria. Il platino è un metallo nobile. Le concentrazioni di platino nel suolo, nell'acqua e nell'aria sono minime. In alcune zone si possono trovare depositi che sono molto ricchi di platino, soprattutto in sud Africa in Unione Sovietica e negli Stati Uniti. Il platino è usato come componente di molti prodotti metallici, come elettrodi, e può essere usato come catalizzatore in numerose reazioni chimiche. Il platino ha molti usi, le sue caratteristiche di resistenza all'appannamento e all'usura lo rendono ben adatto per fare gioielli fini. Il platino e le sue leghe sono usati in attrezzi chirurgici, negli utensili da laboratorio, nei cavi elettrici di resistenza e nei punti di contatto elettrico. È usato come catalizzatore nelle marmitte catalitiche, un componente opzionale del sistema di scarico della benzina-esausta delle automobili. Il maggiore uso del platino è per gioielleria, circa il 20% è usato nell'industria: il platino è usato nell'industria aeronautica chimica, elettrica e del vetro, ciascuna delle quali consuma circa il 10 tonnellate del metallo all'anno. L'industria del vetro usa il platino per le fibre ottiche ed il vetro degli schermi a cristalli liquidi, particolarmente per i computer portatili. La fonte primaria di platino è con altri minerali metallici connessi con le rocce eruttive di base. Le pepite del platino si presentano naturalmente come metallo non legato, o come una lega platino-iridio. I legami del platino sono spesso applicati come medicina nelle cure per il cancro. Gli effetti del platino sulla salute sono fortemente dipendenti dal tipo di legami che si formano, e dal livello di esposizione e di immunità delle persone che vi sono esposte. Il platino come metallo non è molto pericoloso, ma i sali di platino possono avere parecchi effetti sulla salute, come: alterazioni di DNA, cancro, reazioni allergiche a pelle e membrane mucose, danni agli organi, come intestini, reni e midollo osseo, danni all'udito.

Infine, un pericolo del platino è che può causare aumento della tossicità di altre sostanze chimiche pericolose per il corpo umano, come il selenio.

Il platino è emesso nell'aria attraverso gli scarichi delle automobili che usano la benzina al piombo. Di conseguenza, i livelli di platino in aria possono essere più elevati in certe zone, per esempio in garage, in trafori e sui terreni di aziende di trasporto su camion. (146, 147)

Rodio

Il rodio metallo è bianco argenteo, ha un punto di fusione più alto ed una densità più bassa rispetto al platino. Ha un'alta riflessione ed è duro e durevole. A seguito di riscaldamento si trasforma in ossido rosso e a temperature più alte si trasforma di nuovo nell'elemento. La maggior parte del metallo si utilizza nelle marmitte catalitiche delle automobili. L'uso principale del metallo è in leghe con platino ed iridio; conferisce una maggiore resistenza a temperature elevate ed una migliore resistenza all'ossidazione. Queste leghe sono usate nelle bobine delle fornaci, nelle punte di penne, negli aghi fonografici, nelle termocoppie ad elevata temperatura elevata, nei cavi ad elevata resistenza, in elettrodi per velivoli, nei cuscinetti e nei contatti elettrici. Il metallo in se, a causa della relativa luminosità e resistenza all'appannamento, è usato per placcare i gioielli ed nei riflettori. È inoltre un catalizzatore molto utile in un certo numero di processi industriali. Tutti i composti di rodio dovrebbero essere considerati altamente tossici e cancerogeni. La sostanza può essere assorbita nel corpo attraverso inalazione del suo aerosol. Gli effetti sulla salute di esposizione alla sostanza sono stati poco studiati. (146, 147)

4. STRESS OSSIDATIVO E TROMBOEMBOLISMO

Una reazione chimica in cui uno o più elettroni vengono trasferiti da una sostanza ad un'altra che si ossida si definisce ossidazione. Questo processo può anche portare alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS: superossido, perossinitriti, radicale idrossile) lasciando elettroni spaiati nelle molecole ossidate, e specie non radicaliche (perossido di idrogeno). Le reazioni di ossidoriduzione avvengono normalmente senza determinare patologia nell'organismo. Ma quando il rapporto tra agenti ossidanti supera la capacità di un sistema di neutralizzare queste specie reattive, il sistema interessato subisce uno stress ossidativo e può generarsi patologia. Lo stress ossidativo può determinare a livello vasale disfunzione endoteliale. Si parla di **disfunzione endoteliale** nel momento in cui viene meno la capacità di regolare il tono vascolare, e le proprietà antinfiammatorie ed anticoagulanti dell'endotelio stesso (167, 168).

Reazioni ossidoriduttive avvengono durante la normale attivazione piastrinica, ma un eccesso di ROS, o un deficit di difese antiossidanti, può portare ad uno **stato protrombotico**, determinando danno endoteliale e alterazioni della attivazione piastrinica. Il ruolo dello stress ossidativo nella patologia tromboembolica non è ancora oggi ben compreso. Il superossido viene prodotto in seguito ad attivazione piastrinica ed esso è un noto amplificatore della aggregazione piastrinica (169-171).

E' inoltre dimostrato come in presenza di plasma con ridotta concentrazione di perossido di idrogeno si possa inibire la aggregazione piastrinica; mentre in presenza di alte concentrazioni di perossido di idrogeno la aggregazione possa essere stimolata. L'attivazione piastrinica è strettamente regolata e mentre ROS possono avere azione protrombotica, specie reattive dell'azoto possono inibire la funzione piastrinica. Il nitrossido (NO) può di fatto inibire l'attivazione e la adesione piastrinica, prevenendo la trombosi. L'anione superossido svolge la sua azione protrombotica sia direttamente, sia **inibendo l'attività biologica del NO, generando una disfunzione endoteliale**. E' possibile che l'attività biologica del NO possa essere modulata dallo stato antiossidante delle piastrine. **Le piastrine possiedono difese antiossidanti** quali la superossidodismutasi (SOD), in particolare Cu/Zn-SOD per il 77% e la restante parte costituita da Mn-SOD. La SOD gioca un ruolo importante nella normale funzione piastrinica e nella prevenzione della trombosi. La dismutazione del superossido potrebbe attenuare la formazione piastrinodipendente di trombi attraverso il potenziamento della bioattività del NO (172). Inoltre la produzione di ROS a livello vasale può determinare attraverso lo stress ossidativo lipoperossidazione lipidica, attivazione cellulare, promuovendo la disfunzione vascolare.

Lo stress ossidativo può essere valutato misurando sia le concentrazioni circolanti dei sistemi di difesa antiossidante (Glutazione perossidasi, Superossidodismutasi, Catalasi...) che i prodotti di degradazione derivanti dalla lipoperossidazione (MDA, Isoprostani, 4-HNE...). Ad oggi il tromboembolismo è stato valutato sotto vari aspetti, in ognuno dei tre elementi della triade di Virchow (stasi, ipercoagulabilità, lesione vasale). Negli ultimi anni è stato chiarito, almeno in parte, il ruolo patogenetico della flogosi nella patologia tromboembolica. Nel presente studio abbiamo voluto valutare il tromboembolismo sotto un ulteriore aspetto, del quale ancora si conosce poco, ovvero la relazione tra inquinamento atmosferico, carenza/tossicità da metalli pesanti, stress ossidativo e tromboembolismo.

5. SCOPO DELLA TESI

Obiettivi della ricerca e della presente tesi sono: valutare le concentrazioni dei metalli pesanti nei capelli, come indice di accumulo corporeo e correlarle con i valori riscontrati nel PM_{10} .

Valutare la concentrazione dei metalli nell'organismo in soggetti con trombosi venosa profonda degli arti inferiori (DVT) e in soggetti che non presentano tale patologia per studiare se tali metalli tossici, o una carenza di metalli essenziali possano avere un ruolo nel DVT.

Valutare alcuni indicatori surrogati dello stress ossidativo, nei pazienti con TVP e nei soggetti sani di controllo per evidenziare eventuali squilibri nel bilancio ossidoriduttivo.

Correlare con le concentrazioni dei metalli pesanti presenti nel PM_{10} nelle aree urbane ed extraurbane della città di Catania e studiarne eventuali differenze, in modo da poter considerare se, e quanto, l'inquinamento atmosferico attraverso l'accumulo di metalli nell'organismo possa avere rilevanza nel fenomeno DVT.

6. MATERIALI E METODI

Metodologia dello studio:

L'individuazione del campione di popolazione è stata realizzata attraverso l'adozione di rigorosi criteri di selezione, ovvero in base: al tipo di esposizione ipotizzato, fascia di età, sesso, area geografica, stato generale di salute, sintomi clinici, uso di medicinali, anti-aggreganti e ormoni, uso di prodotti cosmetici e prodotti per capelli, assunzione di alcool, caffè e tabacco, abitudini alimentari e attività sportive, al fine di tenere sotto controllo eventuali fattori confondenti l'esposizione al composto chimico in esame, e permettere la stratificazione dei dati per riscontrare differenze nella suscettibilità in sottogruppi della popolazione. I soggetti esaminati sono stati reclutati dai pazienti afferenti alla UO di Angiologia Medica dell'ARNAS Garibaldi di Catania. Sia i soggetti con diagnosi di DVT che i soggetti sani. A causa dell'esiguo numero di volontari partecipanti al progetto, della prevalenza piuttosto ridotta della patologia (2-4% della popolazione), della sua frequente asintomaticità, lo studio si è basato su 24 casi e 46 controlli, maschi e femmine di età compresa tra i 43 e i 71 anni, provenienti dalla città e dalla provincia di Catania. I casi sono stati reclutati tenendo conto della seguente definizione di caso:

-Soggetto con diagnosi clinica di Trombosi venosa profonda degli arti inferiori (DVT), ovvero che presenta uno dei seguenti sintomi: arto aumentato di volume, colorito eritematoso (talvolta cianotico), cute "lucida", calda, segno della fovea, dolore spontaneo o dopo stiramento muscolare, confermata strumentalmente;

-Soggetto a cui è stata diagnosticata una trombosi venosa profonda strumentalmente in soggetti asintomatici.

I dati socio-demografici, clinici e quelli relativi ad abitudini e stili di vita sono stati raccolti tramite apposito questionario somministrato dal personale del Laboratorio di Igiene Ambientale e degli Alimenti dell'università di Catania.

Criteri di inclusione: soggetti maschili e femminili di età compresa tra 18 e 75 anni che abitano in ambito urbano ed extraurbano, con esposizione ambientale differente (breve \pm 30 min al giorno, media \pm qualche ora al giorno, lunga $>$ 3-4 ore al giorno)

Criteri di esclusione: soggetti di età $>$ 75 anni, affetti da patologie croniche attive (insufficienza renale cronica con FGR $<$ 30 ml/min, epetopatia cronica attiva, scompenso di cuore classe da 3° NYHA, cerebrovasculopatie con sequele motorie, croniche invalidanti neoplasie attive ed in trattamento) con recenti procedure chirurgiche, soggetti con anamnesi

positiva per trombofilia congenita, soggetti portatori di tatuaggi, piercing, protesi articolari metalliche, protesi dentarie metalliche.

Consenso informato e questionario

A tutti i soggetti arruolati, è stato richiesto il loro consenso scritto per: acquisire i loro dati personali fisiologici e patologici, per l'esecuzione di un prelievo ematico e di capelli, per la esecuzione di un test diagnostico con gli US.

Ai soggetti arruolati, è stato somministrato un questionario per l'acquisizione di dati personali, anamnestici generali e peculiari relativi a patologie venose croniche (insufficienza venosa cronica) o acute (episodi di DVT o di EP), ricoveri o follow-up presso strutture specialistiche.

Ultrasuoni

Ai soggetti arruolati, è stato eseguito un test con gli US del circolo venoso degli arti inferiori, valutando sia la eventuale presenza di insufficienza venosa che la comprimibilità (CUS) vasale. L'ecografo utilizzato è stato un sistema US Esaote Mylab Twice, equipaggiato con sonda lineare 7-10 MHz LA 332, presso la UO di Angiologia Medica dell'Ospedale Garibaldi di Catania. L'esame US, è stato eseguito prendendo in considerazione le vene femorali comuni, femorali superficiali, poplitee, gemellari , tibiali posteriori, safena interna ed esterna. Per la diagnosi di DVT abbiamo ricercato la presenza di struttura ecogenica intraluminale nel letto vascolare venoso (segno diretto) e/o la positività al test di compressione ultrasonografica CUS (segno indiretto).

VALUTAZIONE DEI METALLI PESANTI NEI CAPELLI

Il campione di capelli è stato analizzato presso il Laboratorio di igiene ambientale e degli alimenti (LIAA), Dip. di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie Avanzate “GF Ingrassia” Igiene e Sanità Pubblica.

I capelli sono usati con successo per misurare l'esposizione a una grande varietà di inquinanti organici e inorganici e, in funzione della velocità di crescita mensile (circa un centimetro), riflettono l'esposizione temporale all'inquinante nel corso dei mesi o addirittura anni (esposizioni a medio e lungo termine). Il capello è materiale biologico facilmente accessibile, disponibile in quantità sufficiente, il cui campionamento risulta essere non invasivo e, comunque, non presenta rischi per la salute del donatore; è un materiale da biopsia stabile che non richiede particolari trattamenti, i livelli dei minerali nel corpo sono circa 10 volte maggiori di quelli del sangue (maggiore accuratezza nel responso), inoltre i minerali non si deteriorano né scompaiono dopo che il capello è stato prelevato, infatti, esso rimane stabile nel tempo. Una possibile limitazione all'uso dei capelli è la difficoltà di distinguere l'origine endogena (deposizione attraverso il sangue) e esogena del contaminante (deposizione da particolato atmosferico e/o da prodotti cosmetici utilizzati). Sebbene alcune procedure di pretrattamento e lavaggio siano state ottimizzate e standardizzate non è stata totalmente eliminata la possibilità di contaminazione esterna da impiego di prodotti per la cura e il trattamento dei capelli (shampoo e tinture). Eccezione è il metilmercurio per il quale la contaminazione esterna del capello non è ipotizzabile e l'esposizione è primariamente dovuta a dieta e amalgami dentali. La Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) americana ha organizzato un panel di esperti per discutere l'uso dei capelli nel BM e ha sottolineato la stringente necessità di procedure operative standard (POS) per la raccolta (lunghezza del capello e zona del prelievo), la preparazione (lavaggio e mineralizzazione) e l'analisi, al fine di produrre VR che siano confrontabili internazionalmente. La regione di prelievo del capello può creare differenze nel risultato, dunque, il campione di capelli deve essere prelevato nella zona retro-nucale sinistra, centrale e destra (tre ciocche); è consigliabile prelevare il campione di capelli dopo 24 ore dal loro lavaggio, è accettabile anche due giorni dopo il lavaggio purché ovviamente non sia sporco o unto e, soprattutto, esente da ogni trattamento come permanente o colore. Si seleziona una ciocca di capelli (circa 3 mm di diametro) tra la nuca ed il collo, quindi si taglia (senza strappare) i capelli il più vicino possibile al cuoio capelluto. I capelli corti (fino a 3,0-3,5 cm) possono essere usati completamente. Per i capelli lunghi, invece, si usufruisce solo dei primi 3,5 cm, tenendo in considerazione la parte più prossima allo scalpo; la parte rimanente viene scartata. Ripetere la

stessa operazione nella zona centrale e nella zona a destra del retro nucale. Questo assicura la scelta di un campione medio rappresentativo ed eviterà di modificare in modo antiestetico il taglio.

Trattamento preliminare dei campioni.

Per il trattamento dei campioni in laboratorio è stato utilizzato materiale da dissezione (pinzette e forbici) in acciaio inossidabile per evitare possibili contaminazioni. Per ogni campione, mediante l'utilizzo di una bilancia analitica, sono stati pesati 0,5 g di capelli, immediatamente conservati in appositi contenitori, in plastica sterile monouso, prima del successivo lavaggio in acqua bidistillata, fondamentale per eliminare contaminanti come shampoo e prodotti chimici che potrebbero interferire con i reali risultati.

Estrazione e determinazione dei metalli.

Mineralizzazione acida con sistema a microonde

Il metodo prevede la digestione totale del capello, con miscela di acidi forti, a caldo, in recipienti chiusi, per portare in soluzione tutti i metalli presenti. Si tratta, in particolare, di un sistema chiuso a microonde che prevede l'utilizzo di contenitori in PTFE con coperchio, alloggiati in piastre multiple, nei quali sono state trasferite le aliquote di tessuto muscolare. Ai campioni presenti nei contenitori sono stati successivamente aggiunti 10 ml di HNO₃ al 65%; i contenitori sono stati chiusi e dopo circa 15 minuti è stata eseguita la mineralizzazione in forno a microonde adottando un preciso programma termico appositamente costruito. Per ogni tornata di campioni sono stati preparati anche dei bianchi contenenti solo la soluzione digestiva. Terminato il ciclo di mineralizzazione, i contenitori sono stati aperti sotto cappa dopo averli lasciati raffreddare a temperatura ambiente per una notte; successivamente i campioni digeriti sono stati trasferiti in provette di plastica sterile e portati ad un volume di 50 ml con acqua bidistillata.

I contenitori utilizzati per la mineralizzazione sono stati sottoposti a lavaggi con acqua acidulata (HNO₃ 1:5 e HCl) dopo ogni ciclo digestivo.

Analisi quali-quantitativa dei metalli mediante ICP-MS (Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry).

La tecnica ICP-MS è una tipologia di spettrometria di massa altamente sensibile e in grado di effettuare determinazioni di tipo quali-quantitativo su molteplici sostanze inorganiche, metalliche e non metalliche, presenti anche in concentrazioni inferiori a una parte per trilione.

In ICP-MS, il plasma è utilizzato per atomizzare e ionizzare gli atomi del campione. Gli ioni, ottenuti, vengono quindi fatti passare, attraverso un sistema di aperture (coni), nell'analizzatore di massa, nell'ambito di un sistema che lavora sotto vuoto. Gli isotopi degli elementi vengono identificati in base al rapporto massa/carica (m/z), tramite un analizzatore a quadrupolo, e l'intensità di ogni picco è proporzionale alla quantità del particolare isotopo dell'elemento nel campione.

Ionizzazione

Una bobina di metallo, alimentata da un generatore di radiofrequenze (RF) genera un intenso campo magnetico. Nel centro di questo avvolgimento è posta la torcia che consiste di 3 tubi concentrici, in quarzo, che contengono 3 flussi separati di Ar. Il plasma è indotto dal flusso di Ar. Il campione, introdotto come fine aerosol o gas, viene trasportato attraverso il tubo più interno. La torcia dell'ICP è costruita in modo tale da permettere l'iniezione del campione direttamente nel cuore del plasma, dove esso collide con elettroni liberi, atomi di Ar e ioni Ar⁺ subendo i processi di atomizzazione e ionizzazione. Gli ioni che si formano sono prevalentemente monocationici (M^+) anche se possono formarsi specie M^{++} . Inoltre nel plasma alcuni di questi ioni possono ricombinarsi con altre specie producendo specie molecolari stabili (es. $M\text{Ar}^+$, M_2^+ , MO^+ , ecc.), molte delle quali, essendo cariche positivamente, potrebbero essere trasmesse all'analizzatore di massa insieme agli ioni M^+ e M^{++} . Ai fini dell'analisi si preferisce avere la forma monocationica M^+ , pertanto si scelgono le condizioni sperimentali che ne aumentino la produzione a scapito delle altre.

Campionamento degli ioni

La zona critica dello strumento è quella dell'interfaccia tra il plasma, che opera a pressione ambiente, e lo spettrometro di massa, che necessita di alto vuoto (circa 10^{-7} mBa). L'interfaccia consiste di due coni con la punta rivolta verso il plasma, il sampler cone (cono di campionamento) più prossimo al plasma e lo skimmer cone (cono di scrematura) localizzato qualche millimetro dietro il sampler. Subito dietro ai coni, il sistema di lenti focalizza gli ioni verso la regione del quadrupolo, attraverso il passaggio in un cilindro metallico carico che agisce da lente focalizzatrice; infatti dal momento che la carica della lente è la stessa degli ioni, essi sono respinti indietro andando a formare un fascio di ioni definito.

Separazione degli ioni – Il quadrupolo

Lo spettrometro di massa separa i singoli ioni carichi in base alla massa, agendo come un filtro. Il quadrupolo consiste di quattro barre orizzontali parallele che vanno a delimitare uno spazio a sezione quadrata; alle coppie agli antipodi vengono applicate correnti continue di segno opposto. Questo campo elettrico fa muovere gli ioni, consentendo solo a quelli di una data massa di attraversare l'intero quadrupolo e giungere al rivelatore. Il quadrupolo, quindi, smista gli ioni sulla base del rapporto massa-carica.

Il detector

Gli ioni provenienti dallo spettrometro di massa colpiscono la superficie attiva del detector, generando un segnale elettronico misurabile. Tale superficie attiva, costituita da un dinodo, emette un elettrone ogni volta che risulta colpita da uno ione dando così vita ad un segnale amplificato; l'elettrone rilasciato dal primo dinodo colpisce il secondo che a sua volta emette più elettroni. La cascata di elettroni continua fin quando non si ottiene un impulso misurabile.

VALUTAZIONE DEI METALLI PESANTI NEL PM₁₀

Tra gli obiettivi dello studio ritroviamo quello di determinare il tenore di metalli atmosferici, nella frazione PM₁₀ del particolato atmosferico per poterli poi confrontare con i valori degli stessi metalli riscontrati nei capelli, in modo da poter valutare l'influenza dell'inquinamento atmosferico sull'accumulo di tali metalli nell'organismo.

I metodi analitici adottati seguenti hanno seguito le indicazioni presenti nel Metodo UNI EN 14902:2005; "Metodo normalizzato per la misurazione di Pb, Cd, As e Ni nella frazione PM₁₀ del particolato in sospensione". L'analisi è stata effettuata presso il Laboratorio di igiene ambientale e degli alimenti (LIAA), Dip. di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie Avanzate "GF Ingrassia" Igiene e Sanità Pubblica.

Strumentazione per il campionamento del PM₁₀

La strumentazione utilizzata, per l'esecuzione dei campionamenti del materiale particolato è costituita dal sistema SWAM 5a Dual Channel Monitor che è un sistema di campionamento e

misura di massa del materiale particolato aerodisperso su membrane filtranti. La misura di massa viene effettuata utilizzando una sorgente interna di radiazioni β a bassa attivita.

SWAM 5a Dual Channel Monitor è un sistema di campionamento automatico sequenziale di materiale particolato su mezzi filtranti che opera con due linee di prelievo indipendenti, progettato e realizzato come fondamentale supporto per studi volti a caratterizzare lo stato della qualità dell'aria in relazione all'inquinamento da materiale particolato PM_x. La misura di massa dei campioni prelevati è effettuata contestualmente grazie all'implementazione di una tecnica innovativa, basata sulla metodologia dell'attenuazione β , che permette di raggiungere un'incertezza sul dato di misura di massa dell'ordine di 10 μg .

L'accumulo sulle membrane filtranti avviene con il trasferimento del campione a una temperatura prossima a quella ambiente dalla testa di prelievo al filtro. La linea di prelievo è dotata di una camera coassiale nella quale transita aria ambiente, prelevata da un aspiratore ausiliario, assicurando così un buon effetto termostatico sulla linea. La strumentazione misura e memorizza i valori delle principali variabili utili a descrivere la fase di campionamento, fornendo così tutte le informazioni necessarie a caratterizzare il trasferimento e l'accumulo del campione sul mezzo filtrante.

Campioni

I filtri campionati sono quelli attraversati dal flusso di aria aspirata dal campionatore. Ciascun filtro è esposto al flusso di aria per circa 24 ore, per un volume di circa 55 m³.

I filtri "bianchi di laboratorio", sono filtri vergini conservati in laboratorio appartenenti al medesimo lotto di produzione dei filtri utilizzati in campo. I filtri bianchi da laboratorio subiscono il medesimo processo analitico dei campioni. Tale analisi permette di verificare l'idoneità o meno dei filtri utilizzati per i campionamenti, ovvero essi devono risultare sufficientemente esenti dagli analiti che si andranno a determinare nei campioni.

Analisi dei campioni di particolato

Le determinazioni analitiche sul particolato atmosferico, vengono eseguite dal laboratorio chimico, il quale provvede ad emettere i certificati delle analisi effettuate. Il filtro viene quindi mineralizzato in un sistema di digestione in vaso aperto che utilizza acido nitrico e perossido di idrogeno. La soluzione acida proveniente dalla mineralizzazione e il filtrato acidificato vengono analizzati mediante ICP/MS, impiegando la procedura descritta nella Norma UNI EN 14902.

Mineralizzazione e analisi

Il filtro viene trasferito in un contenitore di PTFE insieme a 6 mL di HNO₃ e 2 ml di H₂O₂. La funzione del perossido di idrogeno è quella di assorbire i fumi acidi di ossidi di azoto, provenienti dalla riduzione dell'acido nitrico. La mineralizzazione del filtro e l'analisi sia del filtro che del filtrato combinato acidificato vengono effettuate secondo la Norma UNI EN 14902:2005 (*Qualità dell'aria ambiente – Metodo normalizzato per la misurazione di Pb, Cd, As e Ni nella frazione PM10 del particolato in sospensione*). La procedura è effettuata in un mineralizzatore in vaso aperto, alla temperatura di 130°C per 60 minuti. Una volta raffreddati i campioni, questi vengono portati al volume di 50 mL con acqua bidistillata ultrapura. Al fine di eliminare eventuali impurità dovute allo sfaldamento del filtro nella soluzione acida, condizione che potrebbe inficiare l'analisi all'ICP-MS, i campioni vengono filtrati in provette da 10 ml, con filtri monouso Ministart RC 25 in polipropilene (con un volume interno di 100 µl e membrana di cellulosa), con l'aggiunta di 50 ppb di ittrio (Y) e renio (Re) come standard interno. L'analisi del campione deve consentire la determinazione della deposizione totale di Pb, Cd, As, V, Cr, Co, Se e Ni. Il metodo non consente la determinazione del Hg.

VALUTAZIONE DELLO STRESS OSSIDATIVO

I soggetti eleggibili sono stati sottoposti a prelievo ematico per la valutazione dello stress ossidativo. Il campione è stato quindi analizzato al Laboratorio di igiene ambientale e degli alimenti (LIAA), Dip. di Scienze Mediche, Chirurgiche e Tecnologie Avanzate “GF Ingrassia” Igiene e Sanità Pubblica.

Tra le varie strutture, cellulari ed extracellulari, suscettibili all'azione dei radicali liberi (acidi nucleici, proteine, carboidrati, lipidi), abbiamo valutato gli effetti dello stress ossidativo sulle strutture lipidiche, in particolare degli acidi grassi polinsaturi (che rappresentano una fondamentale componente dei fosfolipidi delle membrane cellulari) attraverso il meccanismo della perossidazione lipidica.

Tra i prodotti della perossidazione lipidica troviamo la malonildialdeide (MDA) e il 4-Hydroxynonenal (4-HNE), i quali reagiscono con i lipidi e le proteine della membrana cellulare, con conseguente perdita della fluidità di membrana.

Dosaggio di MDA e 4-HNE:

Il dosaggio più comune è il test di TBARS (ThioBarbituric Acid Reactive Substances). In questo test il cromogeno è formato dalla reazione di una molecola di MDA con due molecole di TBA. Il metodo necessita del riscaldamento del campione in condizioni di acidità e successiva lettura mediante cromatografia ad alta pressione (HPLC). Il campione di 100 µl di plasma viene incubato per un'ora a 95°C per la MDA e a 45°C per il 4-HNE. Successivamente il campione viene raffreddato in un bagno di ghiaccio. Ciò allo scopo di promuovere la formazione del complesso MDA-TBA/4-HNE-TBA, composti rilevabili tramite detector a fluorescenza. La colonna utilizzata per la determinazione del complesso MDA-TBA/4-HNE-TBA è una Lichrospher 100 RP-18 che sfrutta la cromatografia a fase inversa. Il sistema HPLC utilizzato è della Perkin Elmer. Il detector a fluorescenza ha un'onda di eccitazione di 532 nm e un'onda di emissione di 553 nm. La calibrazione è stata eseguita con i seguenti standard: TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropan) della MERCK per la MDA; e con 4_hydroxy Nonenal (CAY 32100) della Cayman per quanto concerne il 4-HNE. Le prove di recupero su matrice spiked hanno evidenziato un recupero medio di 92% per l'MDA e 103% per il 4HNE.

Dosaggio della Superossidodismutasi:

La Superossido dismutasi è stata dosata in campioni plasmatici usando un kit certificato della Cayman Chemicals Company (Ann Arbor, MI 48108), Il kit utilizza il sale tetrazolium per la determinazione dei radicali superossidi generati dalla xantine ossidasi e dalla hypoxantine. Una unità di SOD è definita come la quantità di enzima necessario per dismutare il 50% del radicale superossido. La SOD determinata è quella citosolica. Il kit utilizzato prevede una determinazione in microcolorimetrica con lettura della piastra a 440 nm mediante un lettore ELISA thermo scientific.

Dosaggio degli Isoprostani Plasmatici:

L'analisi degli 8- isoprostani plasmatici totali è stata condotta utilizzando un kit Elisa di tipo competitivo della Cayman Chemicals Research Company. Il campione è stato preparato e purificato prima dell'analisi quantitativa in accordo alle istruzioni del produttore.

Brevemente il campione è stato incubato a 40°C per 60 minuti in una soluzione al 15% di KOH, quindi è stato neutralizzato con un tampone potassio fosfato (1M) a ph 7.0-7.4. Successivamente il campione è stato purificato con l'utilizzo di colonnine SPE e dunque eluito in esano on grado di purezza per HPLC. L'eluato è stato asciugato in corrente di azoto

sino a secchezza e quindi ricostituito con 500ul di EIA buffer. I campioni così preparati sono stati piastrati in una piastra da 92 micropozzetti e dopo lo sviluppo della stessa, secondo le istruzioni del produttore, la piastra è stata letta 405 nm con uno spettrofotometro per piastre ELISA della Thermo Fisher instruments .

ANALISI STATISTICA

I dati ottenuti tramite apposito questionario sono stati sottoposti ad analisi statistica descrittiva, in particolare le variabili qualitative sono state sintetizzate tramite la frequenza relativa mentre la frequenza delle categorie delle singole variabili stratificata per casi e controlli è stata studiata tramite tavole di contingenza. Su ognuna delle variabili qualitative è stato altresì effettuato il test del *Chi quadrato* per valutare l'associazione di ogni singola variabile tra casi e controlli.

Le variabili quantitative (età, peso corporeo, altezza, consumo giornaliero di acqua, metalli pesanti ed essenziali, MDA, SDO, isoprostani) sono state sintetizzate tramite la mediana e l'intervallo interquartile. Le p-value relative all'esito del confronto di ognuna di queste variabili fra il gruppo dei casi e quello dei controlli, effettuato tramite il *Test U di Mann Whitney*, sono state riportate in apposite tabelle.

Le singole variabili quantitative sono state rappresentate graficamente da grafici a scatola.

Le concentrazioni dei metalli analizzati nel particolato atmosferico di zone urbane ed extraurbane sono state confrontate tramite il *Test U di Mann Whitney* e rappresentate graficamente con grafici a barre riportanti il log₁₀ delle concentrazioni mediane dei singoli metalli. L'elaborazione statistica dei dati è stata effettuata con il software IBM SPSS 20.0.

7. RISULTATI

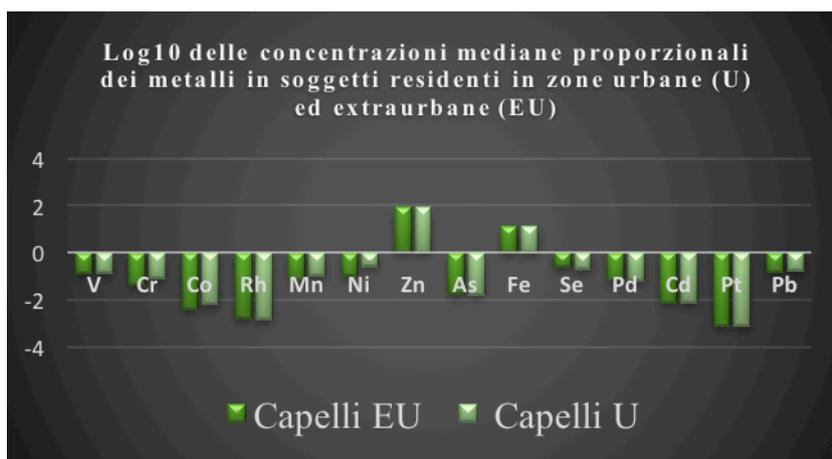
I soggetti sottoposti allo studio (casi e controlli) sono stati inizialmente separati in due gruppi, residenti in zone urbane (U) e residenti in zone extraurbane (EU) secondo il criterio della densità abitativa nei comuni di campionamento della provincia di Catania. In particolare i comuni con una densità abitativa < 1000 abitanti per Km² sono stati considerati aree extraurbane (Acitrezza, Adrano, Viagrande, Acicastello, Pedara, Bronte, Nicolosi, Giarre, Belpasso), tutti gli altri aree urbane (Catania, Aci Catena, San Gregorio, Misterbianco, Tremestieri Etneo, Mascalucia ed Aci Sant'Antonio)

In questa suddivisione sono stati presi in considerazione solo i metalli per i quali avevamo anche l'analisi dei campioni di particolato atmosferico (PM), anch'esso campionato sia in zone urbane ed extraurbane del comune di Catania.

Sono state calcolate le percentuali delle mediane dei livelli dei singoli metalli e il loro Log10, quindi i dati così ottenuti sono stati riportati in un diagramma a barre allo scopo di confrontare i soggetti residenti in aree urbane con quelli residenti in aree extraurbane. Come si evince dal grafico (Fig 1), quasi tutti gli elementi indagati presentano lo stesso ordine di grandezza sia nell'area urbana che nell'area extraurbana ad eccezione del Nichel (Ni), maggiore nell'area urbana.

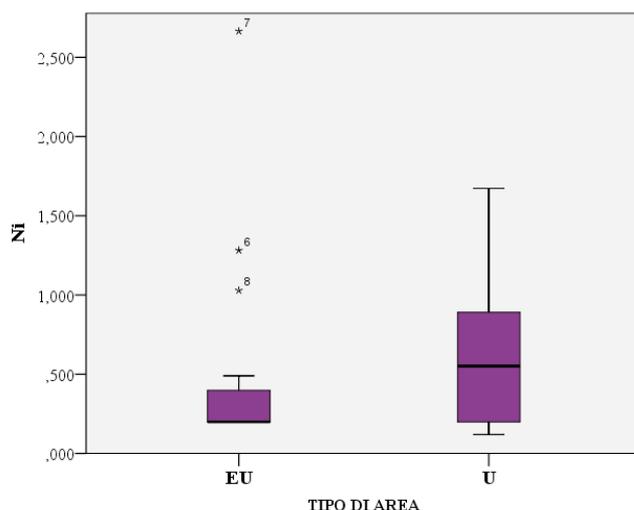
Metalli Capelli mg/kg	V	Cr	Co	Rh	Mn	Ni*	Zn	As	Fe	Se	Pd	Cd	Pt	Pb
Mediana EU	0,259	0,087	0,008	0,003	0,137	0,199	164,191	0,034	27,281	0,447	0,132	0,015	0,002	0,297
Mediana U	0,292	0,160	0,013	0,003	0,205	0,551	181,887	0,034	27,281	0,418	0,132	0,015	0,002	0,342

Figura 1



Eseguendo il test U di Mann-Whitney tra i metalli delle due aree a confronto è emersa infatti una concentrazione significativamente più alta del nichel nelle aree urbane ($p = 0.034$) (Fig 2).

Figura 2

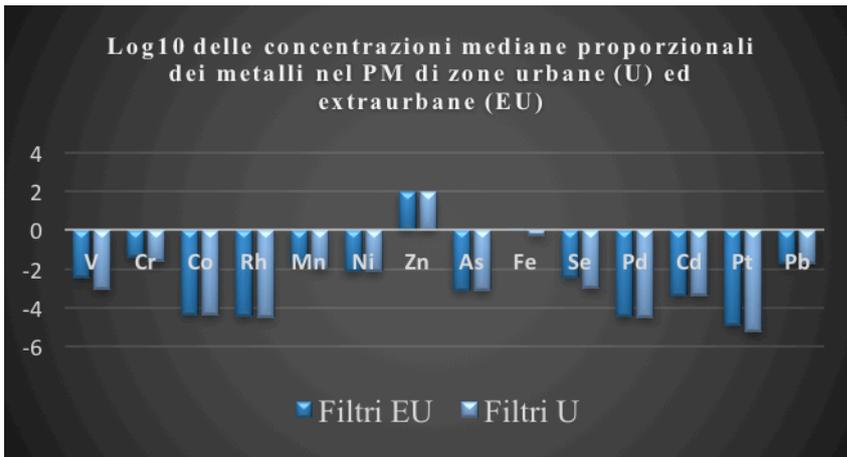


Diversi studi ormai mostrano come l'esposizione al microparticolato disperso nell'aria atmosferica è correlato a trombosi venosa ed arteriosa e come tale esposizione rappresenti un fattore di rischio per patologia cardiovascolare, tra cui anche cardiopatia ischemica ed ictus. Un recente studio ha dimostrato che il particolato può supportare l'attivazione del Fattore XII in vitro e che le particelle di microparticolato possono in vivo indurre generazione di trombina attraverso una via mediate da contatto (173). Metalli come Nichel e Zinco possono riscontrarsi in alte concentrazioni nel particolato e questo può correlarsi positivamente con la mortalità cardiovascolare e respiratoria. Questi metalli idrosolubili infatti possono traslocare verso tessuti extrapolmonari passando dal torrente circolatorio. (174-180).

La stessa rappresentazione grafica è stata costruita con i dati relativi alle concentrazioni dei metalli sul particolato atmosferico. Anche qui la maggior parte degli elementi mostrano lo stesso ordine di grandezza in entrambe le aree con l'eccezione del vanadio (V) e del selenio (Se) che mostrano delle concentrazioni relative leggermente superiori nelle aree extraurbane (Fig 3). Dal confronto delle mediane però tale differenza non risulta statisticamente significativa.

Mediane PM ng/mc	V	Cr	Co	Rh	Mn	Ni	Zn	As	Fe	Se	Pd	Cd	Pt	Pb
Mediana EU	0,642	6,552	0,008	0,006	3,304	1,270	16919	0,135	174	0,621	0,006	0,079	0,002	3,400
Mediana U	0,152	4,360	0,008	0,006	2,066	1,270	17423	0,135	93	0,179	0,006	0,079	0,001	3,400

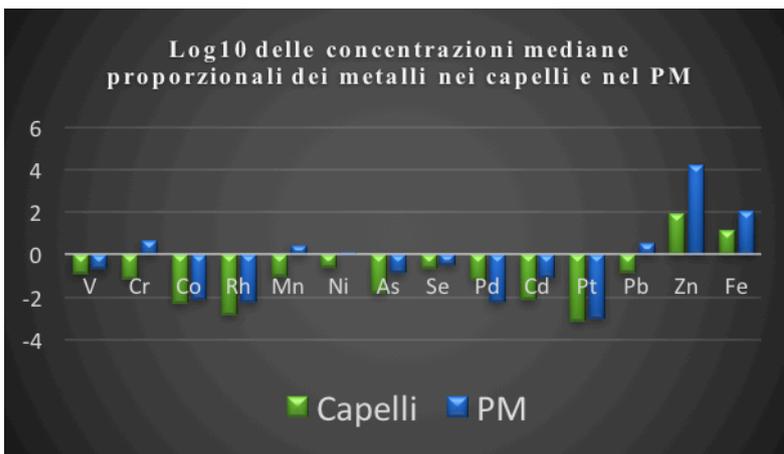
Figura 3



Non essendo emersa una differenza tra le aree urbane ed extraurbane, ascrivibile probabilmente anche all'esiguo numero di campioni di capelli e polveri, abbiamo deciso di elaborare insieme i dati delle due aree allo scopo di valutare l'andamento dei rapporti delle concentrazioni relative degli elementi indagati nelle due matrici.

Anche in questo caso sono state calcolate le percentuali relative delle mediane dei singoli elementi e poi il loro Log10, quindi è stato confrontato il loro andamento nei capelli e nel particolato (Fig 4).

Figura 4

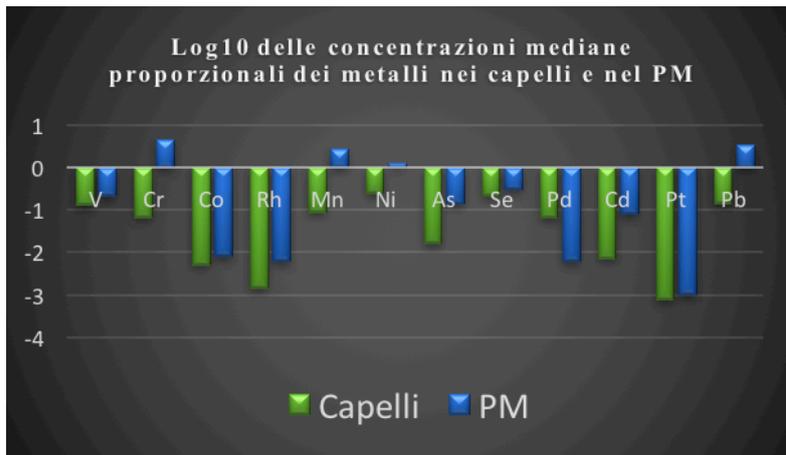


Dal grafico si può osservare come metalli essenziali come Zn e Fe, si accumulano nei capelli con percentuali maggiori rispetto a tutti gli altri metalli meglio noti elementi in tracce. Nel particolato atmosferico le percentuali di questi metalli sono proporzionali a quelle dei capelli sebbene più alte, quindi tali da poter esporre la popolazione a dosi troppo elevate tali da

determinare livelli di tossicità. E' probabile che tali percentuali nel PM sia maggiori rispetto a quelle dei capelli perché in tessuti biologici si trovano altri metalli essenziali non indagati in questo studio, come Na, K, Ca e Mg che contribuirebbero in massima parte nella composizione di un mineralogramma.

Rigenerando il grafico eliminando i metalli a concentrazioni più elevati diventano più chiari i rapporti relativi degli elementi in tracce analizzati per la maggior parte tossici (Fig 5).

Figura 5



Dalla rielaborazione si vede come tutti gli elementi in tracce sono in rapporti percentuali più elevati nel PM rispetto ai capelli. Alcuni metalli pesanti presenti nel PM rappresentano una fonte di esposizione strettamente correlabili al traffico autoveicolare come il rodio (Rh), il palladio (Pd) ed il platino (Pt). Tra tutti gli elementi analizzati i contributi principali del PM sono però quelli dati dal cromo (Cr), manganese (Mn), nichel (Ni), arsenico (As), cadmio (Cd) e piombo (Pb), che mostrano un trend simile nelle due matrici analizzate, ad eccezione del Cr, Mn, Ni e Pb che hanno rapporti percentuali nettamente superiori nel PM.

I metalli idrosolubili del particolato atmosferico possono essere responsabili dell'aumento dei tempi di coagulazione che si osserva in seguito ad esposizione al particolato. Eccetto il Nickel tutti i metalli solfati hanno dimostrato in studi clinici di poter accorciare i tempi della coagulazione, in particolare ferro e zinco (181).

Ma dal confronto della esposizione dei casi e dei controlli al particolato, non sono emerse differenze significative tra i due gruppi nelle concentrazioni dei metalli analizzate nel particolato.

RISULTATI DAI QUESTIONARI SULLE CARATTERISTICHE GENERALI

Tabella 1. Tavola di contingenza delle variabili categoriche separate per casi e controlli e chi-quadrato di Pearson

VARIABILI	CASI n(%)	CONTROLLI n(%)	p value
GENERE			0,03
Maschi	17 (70,8))	20 (43,5)	
Femmine	7 (29,2)	26 (56,5)	
HOBBIES SPORT			0,764
Si	8 (33,3)	17 (37)	
No	16 (66,7)	29 (63)	
FUMO			0,252
Si	6 (25)	13 (28,3)	
No	9 (37,5)	24 (52,2)	
Ex Fumatore	9 (37,5)	9 (19,6)	
TIPOLOGIA ACQUA CONSUMATA			0,277
Minerale	14 (58,3)	32 (69,6)	
Rubinetto	10 (41,7)	12 (26,1)	
Entrambe	0	2 (4,3)	
FRUTTA			0,4
Si	16 (66,7)	35 (76,1)	
No	8 (33,3)	11 (23,9)	
VERDURE			<i>p<0,001</i>
Si	9 (37,5)	39 (84,8)	
No	15 (62,5)	7 (15,2)	
PESCE REGOLARE			0,314
Si	10 (41,7)	25 (54,3)	
No	14 (58,3)	21 (45,7)	
ALCOLICI			0,1
Si	7 (29,2)	6 (13)	
No	17 (70,8)	40 (87,0)	
INTEGRATORI MINERALI			0,874
Si	4 (16,7)	7 (15,2)	
No	20 (83,3)	39 (84,8)	
PRODOTTI DI ERBORISTERIA			0,304
Si	2 (8,3)	8 (17,4)	
No	22 (91,7)	38 (82,6)	
PRODOTTI PER CAPELLI			0,229
Si	11 (45,8)	28 (60,9)	
No	13 (54,2)	18 (39,1)	
CREME PELLE			<i>p<0,02</i>
Si	8 (33,3)	29 (63)	
No	16 (66,7)	17 (37)	
COSMETICI			0,126
Si	7 (29,2)	21 (45,7)	
No	17 (70,8)	22 (47,8)	

Tabella 2. Statistiche di frequenza delle variabili quantitative separate per casi e controlli e Mann-Whitney Test.

VARIABILI	CASI mediana (IQR)	CONTROLLI mediana (IQR)	p value
ETA' anni	64 (52 - 71)	54 (43 - 66,8)	0,201
PESO Kg	74 (59,5 - 89,3)	71,5 (61,8 - 77,3)	0,31
ALTEZZA metri	1,65 (1,57 - 1,75)	1,65 (1,60 - 1,71)	0,598
ACQUA BEVUTA AL GIORNO litri	1 (1 - 2)	1 (1 - 2)	0,702

Tabella 3. Tavola di contingenza riferita ai comuni di residenza

CONTEGGI NEI COMUNI DI RESIDENZA		CONTROLLI	CASI
ACI CASTELLO	Conteggio	5	2
	% entro Campioni	10,90%	8,30%
ACI CATENA	Conteggio	9	1
	% entro Campioni	19,60%	4,20%
ACI SANT'ANTONIO	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
ACITREZZA	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
ADRANO	Conteggio	2	1
	% entro Campioni	4,30%	4,20%
BELPASSO	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
BRONTE	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
CANNIZZARO	Conteggio	2	0
	% entro Campioni	4,30%	0,00%
CATANIA	Conteggio	18	11
	% entro Campioni	39,10%	45,90%
GIARRE	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
MASCALUCIA	Conteggio	3	1
	% entro Campioni	6,50%	4,20%
MISTERBIANCO	Conteggio	2	1
	% entro Campioni	4,30%	4,20%
NICOLOSI	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
NISCEMI	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
PEDARA	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
SAN GREGORIO	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
TREMESTIERI ETNEO	Conteggio	1	1
	% entro Campioni	2,20%	4,20%
VIAGRANDE	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
Totale	Conteggio	46	24
	% entro Campioni	100,00%	100,00%

Comuni di Residenza	Valore	df	Sig. asint. (2 vie)	Sig. esatta (2 vie)
Chi-quadrato di Pearson	19,666 ^a	18	0,352	0,325
Rapporto di verosimiglianza	23,723	18	0,164	0,393
N. di casi validi	70			

Tabella 4. Tavola di contingenza riferita alle professioni

CONTEGGI TRA LE PROFESSIONI		CONTROLLI	CASI
AGENTE DI COMMERCIO	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
AUTOTRASPORTATORE	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
BRACCIANTE AGRICOLO	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
CASALINGA	Conteggio	10	6
	% entro Campioni	21,70%	25,00%
COLLABORATRICE SCOLASTICA	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
COMMESSA	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
DOCENTE	Conteggio	2	0
	% entro Campioni	4,30%	0,00%
EX CAMIONISTA	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
IMPIEGATA	Conteggio	2	3
	% entro Campioni	4,30%	12,50%
IMPIEGATA FARMACIA	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
IMPIEGATO	Conteggio	2	0
	% entro Campioni	4,30%	0,00%
IMPRENDITORE	Conteggio	1	1
	% entro Campioni	2,20%	4,20%
IMPRENDITORE AGRICOLO	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
ISTRUTTRICE FITNESS	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
LIBERO PROFESSIONISTA NELL'EDILIZIA	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
MAGAZZINIERE	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
MEDICO	Conteggio	4	0
	% entro Campioni	8,70%	0,00%
OPERAIO	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
PENSIONATO	Conteggio	14	8
	% entro Campioni	30,4 %	33,30%
RAPPRESENTANTE	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
SEGRETARIA	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
SOTTOUFFICIALE MARINA MIITARE	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
STUDENTESSA	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,00%	4,20%
TECICO RIPARATORE	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,20%	0,00%
Totale	Conteggio	46	24
	% entro Campioni	100,00%	100,00%

Professioni	Valore	df	Sig. asint. (2 vie)	Sig. esatta (2 vie)
Chi-quadrato di Pearson	25,254 ^a	24	0,392	0,381
Rapporto di verosimiglianza	33,47	24	0,095	0,262
N. di casi validi	70			

Tabella 5. Tavola di contingenza dei campioni riferita ai titoli di studio

CONTEGGI TRA I TITOLI DI STUDIO		CONTROLLI	CASI
DIPLOMA	Conteggio	18	7
	% entro Campioni	39,10%	29,20%
LAUREA	Conteggio	9	1
	% entro Campioni	19,6%	4,2%
LICENZA ELEMENTARE	Conteggio	2	2
	% entro Campioni	4,30%	8,30%
LICENZA MEDIA	Conteggio	17	12
	% entro Campioni	37,00%	50,00%
NESSUNO	Conteggio	0	2
	% entro Campioni	0,00%	8,30%
Totale	Conteggio	46	24
	% entro Campioni	100,00%	100,00%

Titoli di studio	Valore	df	Sig. asint. (2 vie)	Sig. esatta (2 vie)
Chi-quadrato di Pearson	7,976 ^a	4	0,092	0,084
Rapporto di verosimiglianza	8,977	4	0,062	0,083
N. di casi validi	70			

Tabella 6. Tavola di contingenza dei campioni riferita allo stato civile

CONTEGGI TRA LE CATEGORIE DI STATO CIVILE		CONTROLLI	CASI
9999	Conteggio	1	0
	% entro Campioni	2,2%	0,0%
CONIUGATO	Conteggio	35	18
	% entro Campioni	76,1%	75,0%
DIVORZIATO	Conteggio	0	1
	% entro Campioni	0,0%	4,2%
NUB CEL	Conteggio	6	4
	% entro Campioni	13,0%	16,7%
SEPARATO	Conteggio	2	1
	% entro Campioni	4,3%	4,2%
VEDOVO	Conteggio	2	0
	% entro Campioni	4,3%	0,0%
Totale	Conteggio	46	24
	% entro Campioni	100,0%	100,0%

Stato civile	Valore	df	Sig. asint. (2 vie)	Sig. esatta (2 vie)
Chi-quadrato di Pearson	3,630 ^a	5	,604	,700
Rapporto di verosimiglianza	4,805	5	,440	,661
N. di casi validi	70			

CORRELAZIONI TRA LE CONCENTRAZIONI DI METALLI NEI CAPELLI TRA I CASI ED I CONTROLLI

Tabella 7. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Vanadio** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Vanadio	
	CONTROLLI	CASI
Media	0,313	0,332
Mediana	0,283	0,263
Deviazione std.	0,191	0,241
Significatività esatta a 2 code	0,694	

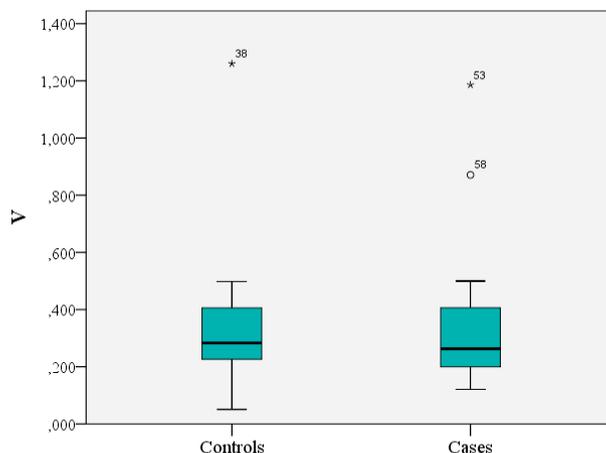


Tabella 8. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Cromo** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Cromo	
	CONTROLLI	CASI
Media	0,431	0,144
Mediana	0,291	0,084
Deviazione std.	0,440	0,183
Significatività esatta a 2 code	,000	

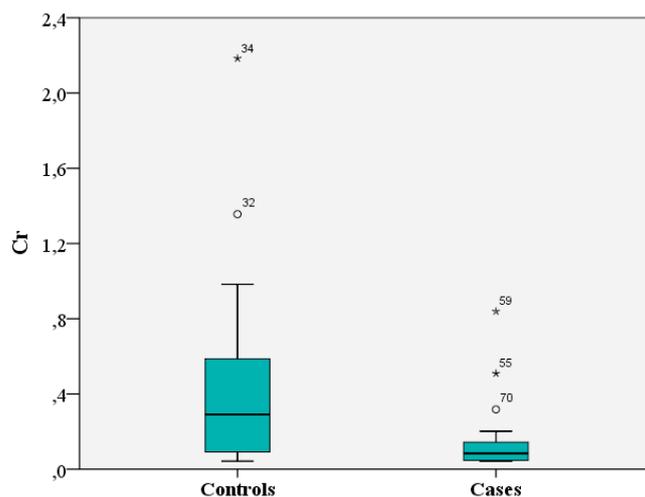


Tabella 9. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Cobalto** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Cobalto	
	CONTROLLI	CASI
Media	0,089	0,090
Mediana	0,021	0,004
Deviazione std.	0,165	0,335
Significatività esatta a 2 code	,087	

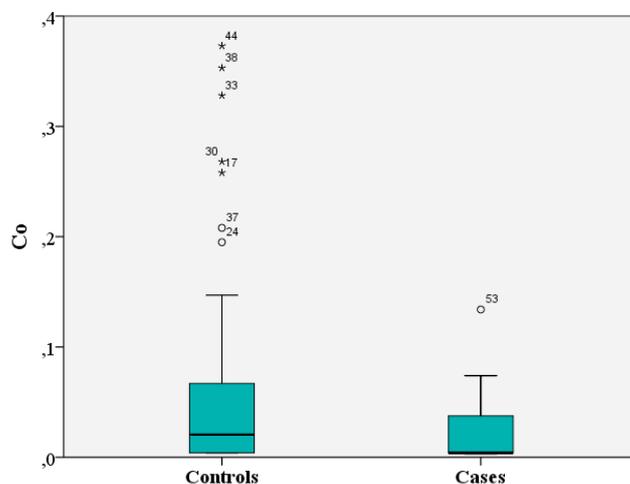


Tabella 10. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Manganese** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Manganese	
	CONTROLLI	CASI
Media	0,377	0,171
Mediana	0,227	0,090
Deviazione std.	0,473	0,160
Significatività esatta a 2 code	,011	

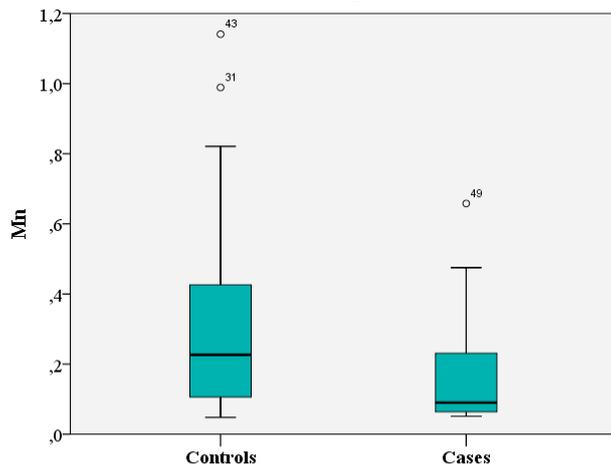


Tabella 11. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Nichel** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Nickel	
	CONTROLLI	CASI
Media	0,807	0,836
Mediana	0,549	0,210
Deviazione std.	0,951	1,525
Significatività esatta a 2 code	,069	

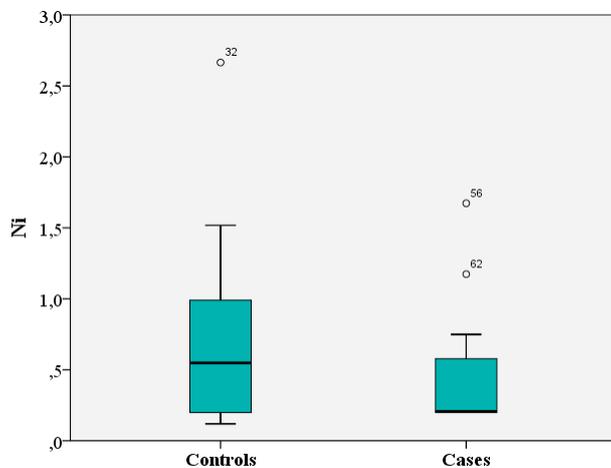


Tabella 12. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Zinco** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Zinco	
	CONTROLLI	CASI
Media	186,172	171,829
Mediana	182,517	172,031
Deviazione std.	52,679	55,431
Significatività esatta a 2 code	,182	

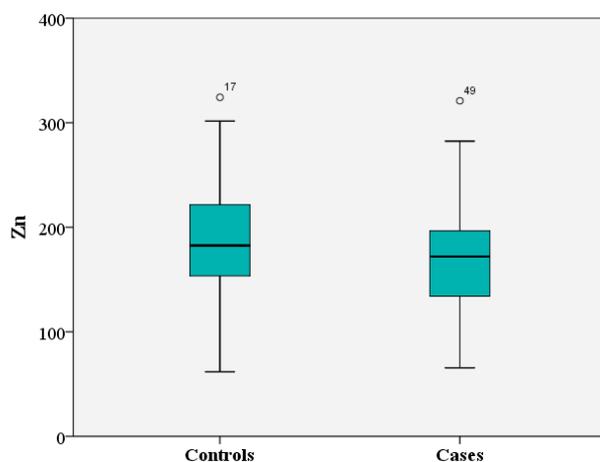


Tabella 13. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Rame** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Rame	
	CONTROLLI	CASI
Media	13,181	12,294
Mediana	11,945	9,517
Deviazione std.	4,984	6,357
Significatività esatta a 2 code	,145	

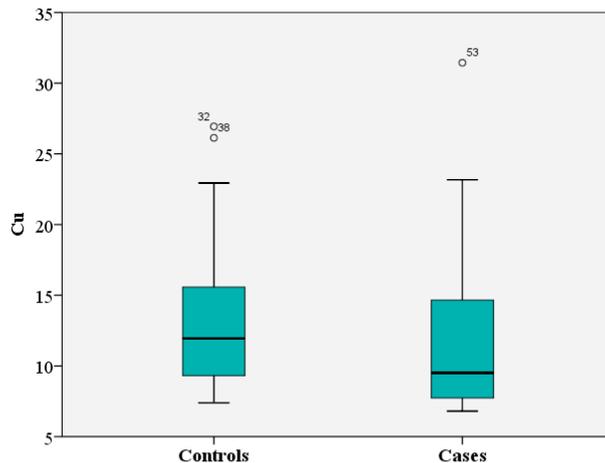


Tabella 14. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Arsenico** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Arsenico	
	CONTROLLI	CASI
Media	1,440	0,234
Mediana	0,034	0,034
Deviazione std.	3,614	0,969
Significatività esatta a 2 code	,662	

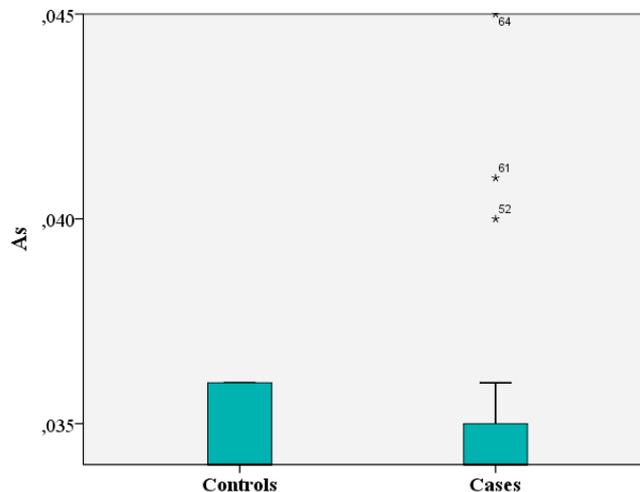


Tabella 15. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Ferro** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Ferro	
	CONTROLLI	CASI
Media	30,168	30,480
Mediana	27,281	27,281
Deviazione std.	5,272	6,465
Significatività esatta a 2 code	,710	

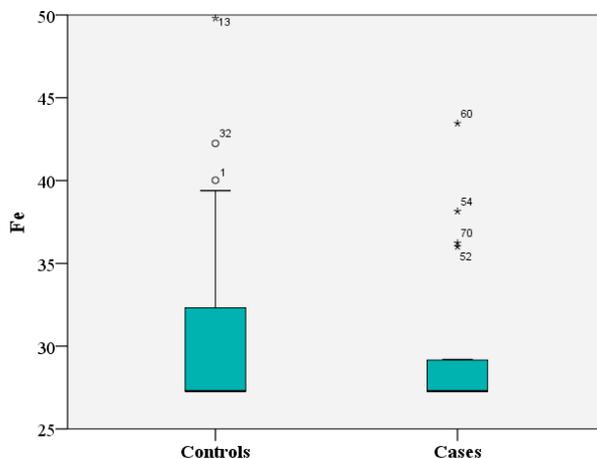


Tabella 16. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Selenio** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Selenio	
	CONTROLLI	CASI
Media	0,554	0,458
Mediana	0,461	0,479
Deviazione std.	0,458	0,114
Significatività esatta a 2 code	0,902	

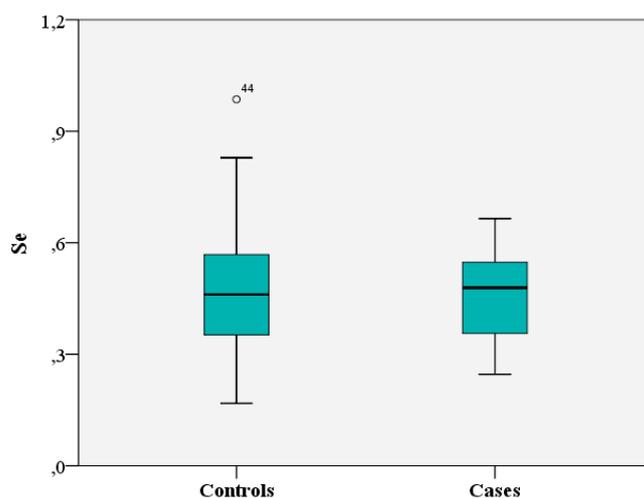


Tabella 17. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Palladio** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Palladio	
	CONTROLLI	CASI
Media	0,240	0,190
Mediana	0,132	0,132
Deviazione std.	0,287	0,121
Significatività esatta a 2 code	0,602	

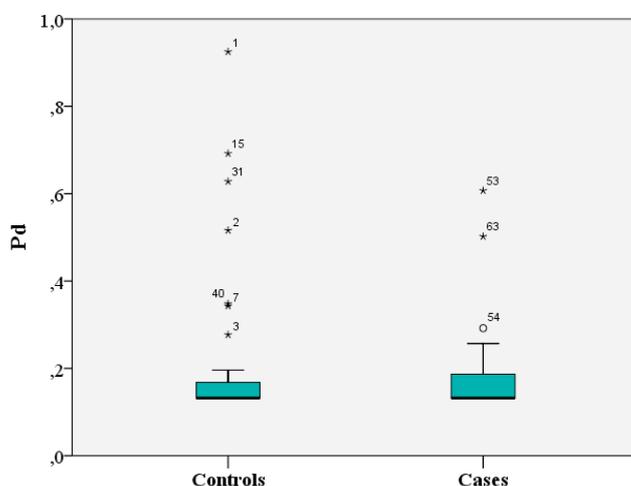


Tabella 18. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Rodio** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Rodio	
	CONTROLLI	CASI
Media	0,004	0,003
Mediana	0,003	0,003
Deviazione std.	0,002	0,001
Significatività esatta a 2 code	,329	

Tabella 19. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Platino** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Platino	
	CONTROLLI	CASI
Media	0,003	0,002
Mediana	0,002	0,002
Deviazione std.	0,003	0,000
Significatività esatta a 2 code	0,658	

Tabella 20. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Cadmio** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Cadmio	
	CONTROLLI	CASI
Media	0,049	0,020
Mediana	0,015	0,015
Deviazione std.	0,083	0,012
Significatività esatta a 2 code	0,176	

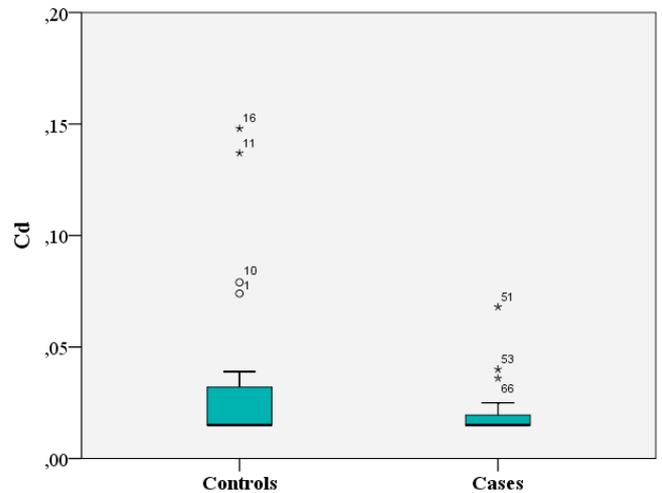
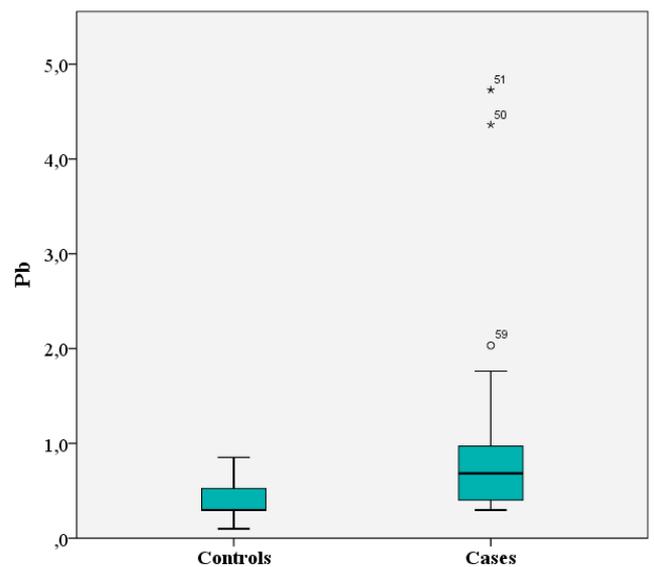


Tabella 21. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Piombo** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Statistiche	Piombo	
	CONTROLLI	CASI
Media	0,415	1,055
Mediana	0,297	0,684
Deviazione std.	0,175	1,178
Significatività esatta a 2 code	0,042	



MARCATORI DI STRESS OSSIDATIVO

Tabella 21. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **MDA** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Campioni	Parametro	N.	Media	D.S.	Min	Max	25°	Mediana	75°	U di Mann Whitney
Controlli	MDA $\mu\text{M-L}$	46	1,85	3,39	0,01	20,68	0,17	1,01	1,72	p<0,001
Casi	HPLC	24	3,40	2,56	1,06	12,07	1,86	2,49	3,76	

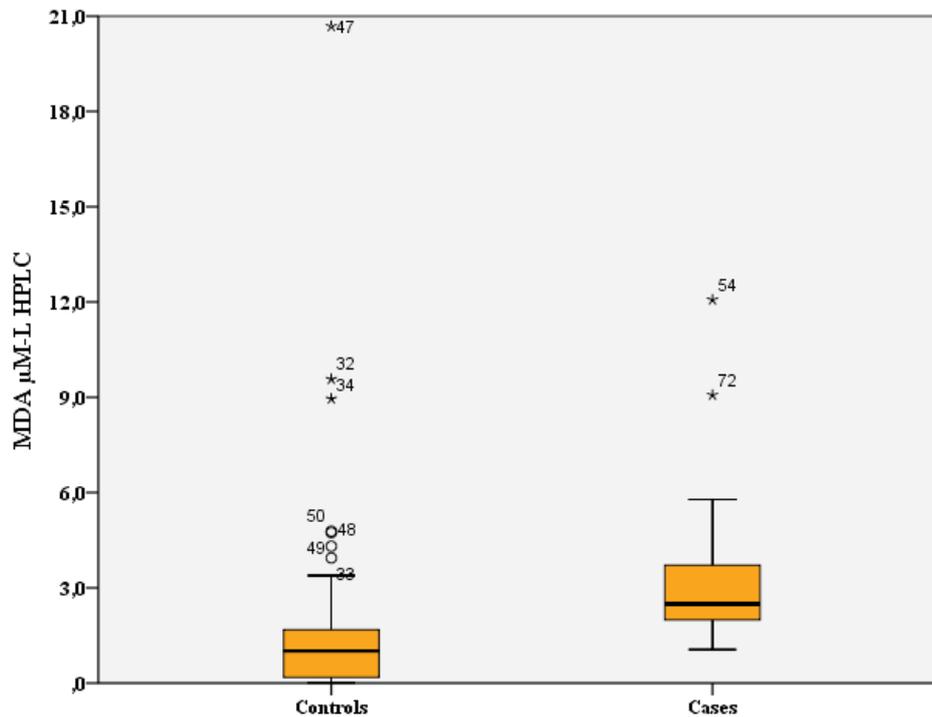


Tabella 22. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **4-HNE** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Campioni	Parametro	N.	Media	D.S.	Min	Max	25°	Mediana	75°	U di Mann
----------	-----------	----	-------	------	-----	-----	-----	---------	-----	-----------

										Whitney
Controlli	4HNE $\mu\text{M-L}$	46	0,22	0,22	0,00	1,05	0,10	0,15	0,26	p=0,084
Casi	HPLC	24	0,27	0,17	0,00	0,65	0,12	0,26	0,42	

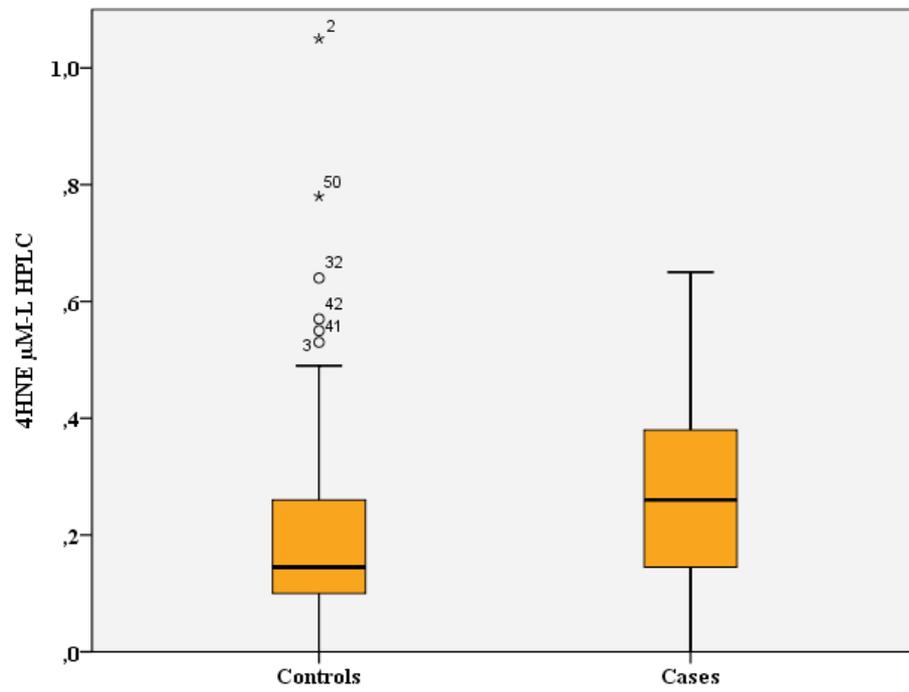


Tabella 23. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni della **somma di TBARS** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Campioni	Parametro	N.	Media	D.S.	Min	Max	25°	Mediana	75°	U di Mann Whitney
Controlli	SOMMA TBARS	46	1,97	2,62	0,01	12,40	0,30	1,22	2,07	p<0,001
Casi	μM-L HPLC	24	3,88	4,12	0,25	20,87	2,01	2,90	3,93	

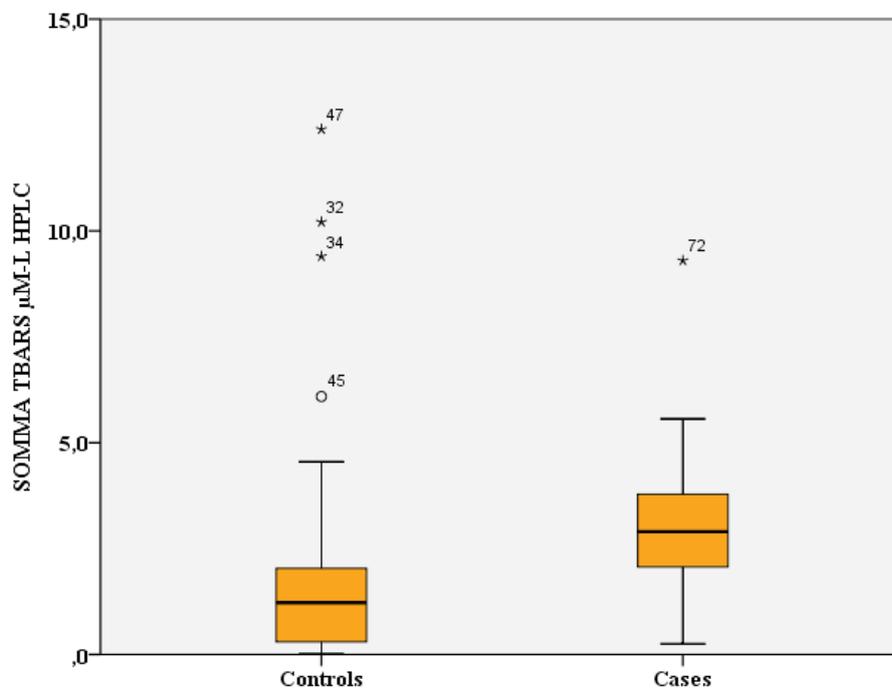


Tabella 24. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **Isoprostani totali** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Campioni	Parametro	N.	Media	D.S.	Min	Max	25°	Mediana	75°	U di Mann Whitney
Controlli	ISOPROSTANI TOT	46	594	577	7,82	2159	101	386	922	p=0,330
Casi	pg/ml ELISA	24	524	647	6,75	2500	45,62	282	904	

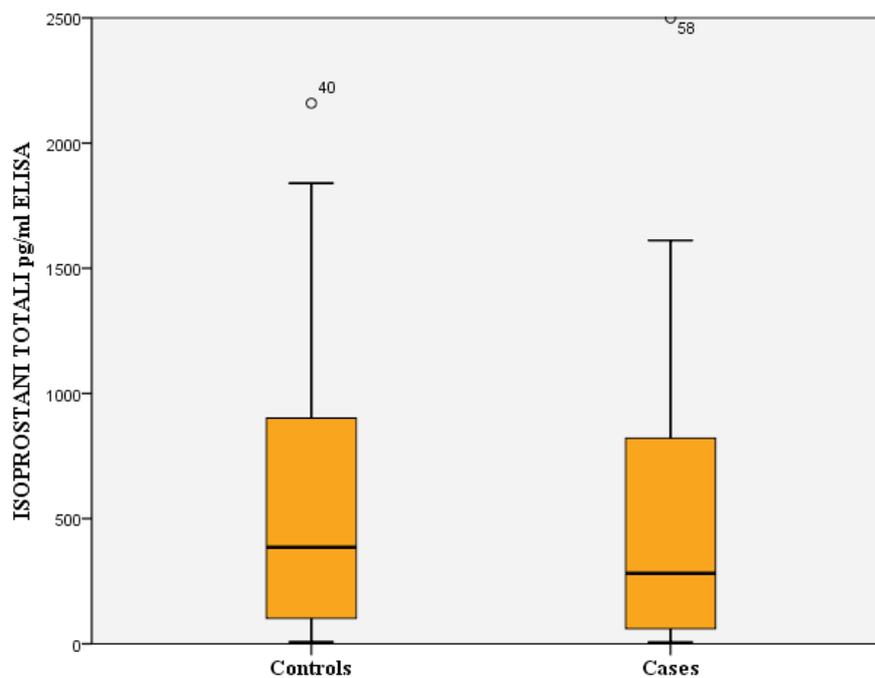
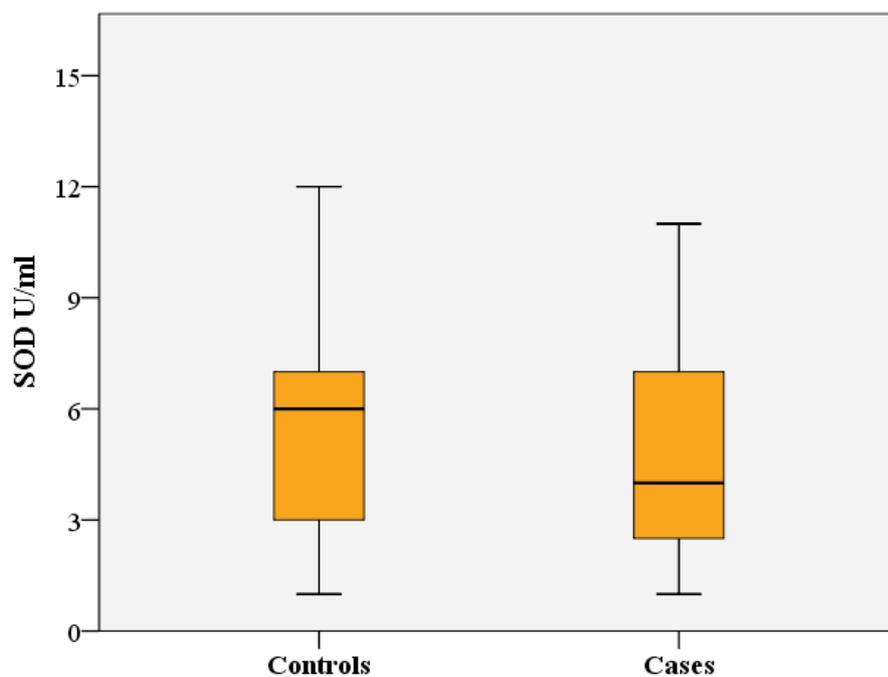


Tabella 25. Statistica descrittiva e di frequenza delle concentrazioni di **SOD** nei casi e nei controlli e Mann-Whitney Test.

Campioni	Parametro	N.	Media	D.S.	Min	Max	25°	Mediana	75°	U di Mann Whitney
Controlli	SOD U/ml	46	6,60	6,26	0,69	46	3,62	5,92	7,59	p<0,117
Casi	ELISA	24	4,75	2,81	1,04	10,81	2,07	4,37	7,36	



8. DISCUSSIONE

Nella presente ricerca si è pertanto voluto valutare:

- **le concentrazioni dei metalli pesanti nei capelli, come indice di accumulo corporeo e correlarle con i valori riscontrati nel PM₁₀ distinguendo la popolazione residente nelle aree Urbane da quella residente nelle aree Extraurbane.** Studiarne eventuali differenze, in modo da poter considerare se, e quanto, l'inquinamento atmosferico attraverso l'accumulo di metalli nell'organismo possa avere rilevanza nel fenomeno DVT.

Da tale confronto, analizzando sia i metalli del PM₁₀, sia i metalli nei capelli, non sono emerse differenze significative tra i due gruppi (U ed EU). Quindi sia la popolazione urbana che extraurbana sembrerebbero egualmente esposte al particolato ed ai metalli in esso contenuto. Una possibile spiegazione di tale risultato potrebbe essere quella che una quota significativa della popolazione residente nelle aree extraurbane si sposta per motivi lavorativi, di istruzione, presso l'area urbana per una quota significativa della giornata.

- **la concentrazione dei metalli nell'organismo in soggetti con trombosi venosa profonda degli arti inferiori (DVT) e in soggetti che non presentano tale patologia** per studiare se un eccesso di tali metalli tossici, o una carenza di metalli essenziali possano avere un ruolo nel DVT. Da tale confronto è emerso come nei soggetti patologici, sia evidente una carenza di metalli essenziali utili per lo svolgimento delle normali funzioni biologiche, tra cui quelle di difesa antiossidante. Nei soggetti patologici inoltre si è evidenziato un livello significativamente più elevato di Pb nell'organismo, il quale costituisce un noto agente tossico. Il piombo dimostra di avere un ruolo sia diretto nella patogenesi del DVT, tramite la capacità di determinare alterazioni della membrana eritrocitaria e della loro adesività verso l'endotelio, sia indiretto, determinando una riduzione dei meccanismi di difesa antiossidante, esponendo l'endotelio all'insulto radicalico e ingenerando pertanto disfunzione endoteliale.
- **Valutare alcuni indicatori surrogati dello stress ossidativo, nei pazienti con TVP e nei soggetti sani di controllo per evidenziare eventuali squilibri nel bilancio ossidoriduttivo.** Da tale confronto è emerso nei soggetti patologici rispetto ai controlli una tendenza (non significativa però, $p=0.11$) ad uno stato di carenza nel sistema di difesa ossidoriduttivo, in particolare valori di SOD tendenzialmente più bassi nei casi rispetto ai controlli.

Inoltre gli indicatori di stress ossidativo sono più elevati nei casi rispetto ai controlli, raggiungendo la significatività statistica nel caso di MDA ($p < 0.001$) e TBARS ($p < 0.001$). Anche i valori di 4-HNE risultano più tendenzialmente più alti nei casi rispetto ai controlli, ma senza raggiungere la significatività statistica ($p = 0.084$). Il valore degli isoprostani plasmatici invece è risultato essere tendenzialmente più elevato nei controlli rispetto ai casi, ma senza raggiungere valori significativi ($p = 0.330$).

Vediamo quindi maggiormente in dettaglio quanto sopra sintetizzato:

CORRELAZIONE TRA METALLI NEL PM₁₀ E NEI CAPELLI

Dai risultati del nostro studio sulla intera popolazione studiata (casi più controlli) emerge come: analizzando le differenze di concentrazione dei metalli nei capelli *non si evidenzia una sostanziale differenza all'esposizione dei metalli pesanti dell'intera popolazione in esame (casi + controlli) tra soggetti che abitano nelle zone urbane U (densità abitativa > 1000 ab/km²) ed extraurbane EU (densità abitativa < 1000 ab/km²) della città e provincia di Catania. Fa eccezione per il Nichel che risulta maggiore nelle aree urbane (Mediana 0,199mg/kg area EU; Mediana 0,551mg/kg area U; $p = 0,034$), il quale però in letteratura non mostra proprietà procoagulanti. (Fig. 1 e 2 capitolo 7)*

Tale differenza (Ni) però non si mette in luce nell'analisi dei metalli del PM₁₀ delle due aree U ed EU. Evidentemente pertanto la differenza di concentrazione di Ni nella popolazione U ed EU non è verosimilmente correlata soltanto all'inquinamento atmosferico, ma anche ad altre cause (alimentari, acque...). (Fig. 3 capitolo 7)

Analizzando insieme la popolazione studiata (casi e controlli) senza suddividerla per area abitativa (U + EU) si osserva come nei capelli si accumulino nei capelli in percentuale maggiore Zn e Fe rispetto gli altri metalli. Nel PM le percentuali di questi metalli, sebbene più alte, sono proporzionali a quelle dei capelli, quindi tali da poter ritenere quindi che la popolazione può essere esposta, a causa della loro presenza del particolato atmosferico, a dosi elevate di questi metalli. (Fig. 4 capitolo 7) Bisogna tenere conto però, che sono stati analizzati solo i metalli che siano analizzabili sia nei capelli che nel PM e che il mineralogramma esprime la concentrazione percentuale dei metalli esaminati. Per cui un limite dello studio, che potrebbe essere determinante nel fare emergere questa differenza, è che nel mineralogramma dei capelli non vengono considerati altri metalli quali Na, K, Ca e Mg che contribuirebbero in massima parte nella composizione del mineralogramma stesso dei capelli.

Eliminando dal mineralogramma i metalli a concentrazioni più elevate, diventano più chiari i rapporti relativi ai metalli in traccia tossici analizzati. Rodio, Palladio e Platino si riscontrano in percentuali molto basse, rappresentando una fonte di esposizione strettamente correlata al traffico veicolare. Tra tutti gli altri elementi analizzati nel PM, i contribuenti principali sono Cr, Mn, Ni, As, Cd e Pb che mostrano un trend simile nelle due matrici analizzate (capelli e PM), ad eccezione di Cr, Mn, Ni e Pb che hanno rapporti percentuali superiori nel PM, questi ultimi pertanto non vedono l'inquinamento atmosferico come unica fonte di esposizione nella popolazione. (Fig. 5 capitolo 7)

DEFICIT DI METALLI ESSENZIALI

Gli elementi in traccia (Cr, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Se, Zn) sono quegli elementi che devono essere introdotti con la dieta per mantenere le normali funzioni fisiologiche. I livelli degli elementi in traccia possono presentare un rischio per la salute sia quando sono presenti nell'organismo a livelli troppo elevati, determinando tossicità; sia quando i loro livelli sono troppo bassi, determinando uno stato carenziale. Molti di essi, sono cofattori e componenti di enzimi coinvolti nella omeostasi ossidoriduttiva dell'organismo. La loro attività biologica è fortemente associata alla presenza di elettroni spaiati che consentono la loro partecipazione nelle reazioni ossidoriduttive (182).

Il Cromo trivalente (la forma normalmente presente negli alimenti) è essenziale per la omeostasi glicidica e una sua carenza può portare iperglicemia, dislipidemia, glicosuria iperinsulinemia; effetti tossici, possibili a dosaggi veramente alti, possono determinare danni renali ed epatici.

Il Rame è presente in numerose proteine ed enzimi. In corso di carenza di Cu, diversi elementi del sistema di difesa antiossidante possono essere compromessi. La CuZn-SOD e la ceruloplasmina sono dipendenti dal Cu in quanto ne costituisce un cofattore catalitico. Inoltre la deficienza di Cu può determinare anche la riduzione dell'attività di alcuni enzimi antiossidanti non contenenti Cu quali catalasi e glutatione perossidasi selenio dipendente (Se-GPx). Deficit di Cu non comportano deficit di ceruloplasmina, ma rendono la stessa (dotata di effetti sia pro che antiossidanti) meno stabile. Una sua carenza può determinare anemia, alterazioni scheletriche, del sistema nervoso, infertilità. Un'intossicazione acuta (200mg/kg-die) è letale. Un suo eccesso, come nel M.di Wilson per deficit di ceruloplasmina comporta

per accumulo di Cu danni cerebrali e renali. In animali con deficit di Cu sono inoltre stati riscontrati elevati livelli di omocisteina i quali si sono poi riequilibrati in seguito a diete con supplemento di rame (182).

Altri elementi in traccia come il **Manganese lo Zinco e il Selenio** sono componenti di alcuni enzimi tra cui è contenuto in enzimi tra i quali la piruvatocarbossilasi e la superossidodismutasi (enzima antiossidante). La CuZn-SOD si riscontra prevalentemente nel nucleo, nel citosol e nello spazio intermembrana mitocondriale, ed anche nel plasma e nel liquido cerebrospinale (SOD3) Mentre la Mn-SOD (SOD2) si ritrova prevalentemente nella matrice mitocondriale. Alcune Selenoproteine regolano lo stato ossidoriduttivo della vitamina C.

Il Ferro è un costituente della emoglobina, della mioglobina, e di numerosi enzimi. La sua deficienza comporta come è noto anemia. Una tossicità acuta severa può portare a morte, o meno drammaticamente vomito, diarrea, conseguenze neurologiche, cardiovascolari, renali.

Il Cobalto è un costituente della Vitamina B12 (cobalamina). Un suo eccesso è piuttosto raro. Una carenza invece può associarsi ad un deficit di Vit.B12, la quale è un cofattore della metionina sintasi, enzima che riconverte la omocisteina in metionina, contribuendo pertanto a tenere sotto controllo i livelli della omocisteina (aminoacido protrombogeno che favorisce l'adesione piastrinica, l'ossidazione delle lipoproteine LDL e promuove lo stress ossidativo).

Fe, Cu, Cr, Co e altri metalli, possono però anche intervenire in reazioni redox, in virtù della loro capacità di produrre radicali reattivi come l'anione superossido e ossido nitrico (184). L'alterazione quindi della omeostasi di tali metalli nell'organismo con un loro accumulo (che comunque non è stato osservato nella presente ricerca), così come la loro carenza, può determinare una condizione di stress ossidativo, nella quale si determina la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS), travolgendo i meccanismi di protezione antiossidante dell'organismo inducendo conseguentemente danni genetici, lipoperossidazione, modifiche proteiche ed enzimatiche, determinando così patologie quali cancro, diabete, patologie cardiovascolari, infiammazione cronica, patologie neurologiche e altre.

Alcuni metalli, quali **cadmio, arsenico, piombo** mostrano il loro effetto tossico legandosi ai gruppi sulfidrilici di proteine e determinando deplezione di glutatione. L'arsenico può anche mostrare un meccanismo d'azione pro-ossidante alternativo basato sulla formazione di

perossido di idrogeno.(182, 185). Quindi sia la carenza che l'eccesso di alcuni metalli, può determinare uno sbilancio dell'equilibrio ossidoriduttivo e danni da radicali.

Dai risultati ottenuti del presente studio, in seguito al confronto tra i soggetti sani e i soggetti con patologia tromboembolica venosa, si evidenzia come **i livelli di metalli essenziali quali Zn, Co, Mn, Cu, Cr, risultino tendenzialmente più bassi nei capelli (quindi nell'organismo) dei soggetti con tromboembolismo**, rispetto ai soggetti sani, raggiungendo anche la significatività statistica per microelementi come il Manganese ($p = 0,011$) e il Cromo(III) ($p < 0,001$). Non sono emerse differenze significative invece per altri metalli quali il Se, il V, il Fe, l'As. (Tabelle 11-20)

Il deficit di alcuni metalli, pertanto potrebbe essere la determinante della riduzione della attività di enzimi antiossidanti quali la SOD, la NADH:ubiquinone-ossidoreduttasi, la catalasi, contribuendo all'incremento di produzione di ROS, come dimostrato in studi su animali (183).

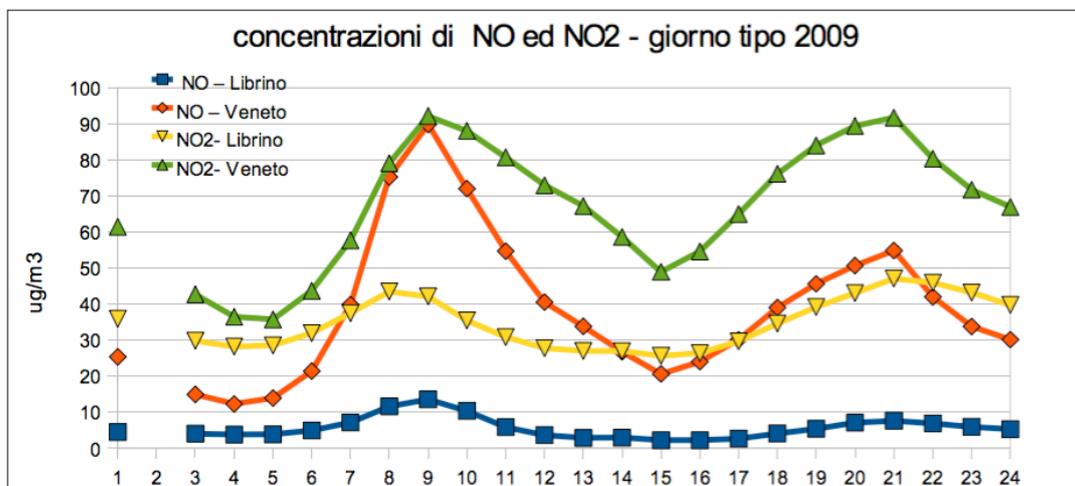
In Tab.1 (cap.7) si può evidenziare, come i controlli facciano un uso significativamente più alto ($p < 0.001$) di verdure rispetto ai soggetti con DVT. E le verdure rappresentano una nota sorgente di minerali per l'organismo. I controlli inoltre presentano in anamnesi anche un maggior consumo di creme per la pelle ($p < 0.02$), anch'esse possibile fonte di minerali essenziali.

TOSSICITA' DA METALLI PESANTI

Dalla valutazione dei metalli pesanti con azione prevalentemente tossica (Pb, Rh, Pl, Cd, Ni, As) si evidenzia un significativo incremento dei livelli nei campioni di **capelli**, soltanto del **piombo**, con differenza che raggiunge la significatività statistica tra i casi e i controlli, con valori più elevati nei casi (**$p = 0,042$**). (Tabelle 21-25)

I livelli di rodio, palladio e platino, che provengono essenzialmente dall'inquinamento atmosferico dovuto al traffico veicolare, sono sostanzialmente uguali nei capelli tra casi e controlli. Anche in precedenti studi (143, 145) è emerso come non vi sia una maggior

prevalenza di tromboembolismo tra soggetti che abitano vicino zone con elevato traffico veicolare, rispetto zone a basso traffico. Inoltre non emerge la stessa differenza proporzionale tra i valori dei metalli nel PM e nei capelli che invece si evidenzia per gli altri metalli. Ciò confermerebbe che probabilmente il traffico veicolare rappresenta l'unica fonte importante di esposizione a tali metalli. Inoltre per questi metalli non si evidenzia una sostanziale differenza nemmeno tra gli abitanti delle zone urbane che extraurbane, siano essi casi che controlli. Questi elementi (unica fonte il traffico veicolare, assente differenza tra l'area urbana ed extraurbana), in prima analisi farebbero pensare ad una eguale esposizione al traffico veicolare tra l'area urbana ed extraurbana della città; inoltre molti soggetti che risiedono in aree extraurbane, si recano poi per lavoro nelle aree urbane. Bisogna tenere conto però di una particolarità della città di Catania, ovvero del paradosso che si può osservare durante le ore del primo pomeriggio, in cui l'inquinamento atmosferico subisce un decremento dei suoi valori. Ciò a causa della brezza marina che si alza in questa parte della giornata e che contribuisce a ridurre paradossalmente l'inquinamento atmosferico in città nonostante in quel momento il traffico veicolare risulta più elevato (Dati del Comune di Catania, Direzione Ecologia ed Ambiente). Questo potrebbe in parte spiegare la mancata maggiore esposizione dei residenti in città rispetto ai residenti delle aree extraurbane al particolato.



Comune di Catania – Direzione Ecologia e Ambiente – P.O. Prevenzione Inquinamento – La qualità dell'aria 2008-2010

Gli elevati livelli di piombo riscontrati nei casi rispetto ai controlli possono avere un ruolo determinante nella spiegazione di una più elevata esposizione all'inquinamento atmosferico. Nei capelli dei soggetti con tromboembolismo abbiamo rilevato una più elevata concentrazione di Pb rispetto che nei controlli. Il piombo è uno dei metalli pesanti più abbondanti presenti nella Terra. L'avvelenamento da piombo può causare diverse patologie,

tra cui neuropatia periferica, insufficienza renale cronica, ma anche patologie cardiovascolari quali ipertensione arteriosa. Inoltre è noto come il piombo possa indurre uno stato procoagulante attraverso la inibizione del rilascio dell'attivatore tissutale del plasminogeno da parte delle cellule endoteliali e l'aumento della produzione di inibitore dell'attivatore del plasminogeno PAI-1. Ne deriva pertanto una *riduzione della attività fibrinolitica* (188).

Circa il 95% del Pb circolante nel sangue umano si accumula negli eritrociti. Questo suggerisce come gli eritrociti possano rappresentare un importante bersaglio della tossicità cardiovascolare da piombo. Negli eritrociti il Pb può determinare degenerazione di lipidi e proteine, soppressione della sintesi di emoglobina, perossidazione lipidica, *inibizione della superossidodismutasi*, riduzione dei livelli di glutatione. Inoltre può determinare alterazione della tipica forma da biconcava a sferica dei globuli rossi, processo mediato dall'incremento dei livelli intracellulari di calcio e dalla deplezione di ATP. A differenza del passato in cui gli eritrociti sembravano non avere un ruolo nel mantenimento della omeostasi coagulativa, recenti studi hanno evidenziato come essi invece ne siano parte attiva attraverso la loro interazione con le cellule endoteliali, con le piastrine ed i macrofagi. Le alterazioni della membrana eritrocitaria possono determinare esposizione extracellulare della fosfatidilserina (PS) e generazione di microvescicole di PS, rendendo partecipi quindi gli eritrociti nel processo di formazione del trombo. *La PS così esposta fornisce un sito per la generazione di trombina e quindi del trombo*. Inoltre gli eritrociti così modificati presentano una *maggiore adesività nei confronti dell'endotelio*, contribuendo così alla occlusione vasale. Queste stesse alterazioni non sono state riscontrate nelle piastrine, suggerendo che proprio gli eritrociti siano il bersaglio primario del piombo nella patogenesi della formazione del trombo Pb indotta. Questo in associazione alla azione antifibrinolitica del piombo sottolinea il ruolo patogenetico del piombo nel tromboembolismo da tossicità mediata da metalli pesanti (189).

EFFETTI DELLA ALTERAZIONE DELL'OMEOSTASI DEI METALLI SUL BILANCIO OSSIDORIDUTTIVO

Le patologie cardiovascolari costituiscono la principale causa di mortalità nel mondo. Dopo la cardiopatia ischemica e l'ictus cerebrale, il tromboembolismo (VTE) occupa il terzo posto per incidenza. La disfunzione endoteliale gioca un ruolo chiave già nei primi momenti patogenetici della patologia, sia nella trombosi venosa profonda (DVT) che nella embolia

polmonare (PE). I casi del nostro studio erano composti soltanto da individui con DVT che rappresenta la forma clinica più frequente di VTE. E' noto come la genesi del trombo e la sua propagazione sono correlati ad alterazioni della viscosità ematica, del suo flusso e della parete vasale (triade di Virchow). La superficie endoteliale normalmente è costituita da una interfaccia di contatto col flusso ematico non trombogenica. Questa integrità può però essere compromessa in seguito ad anossia, stress meccanico, radicali liberi, citochine che possono culminare in attivazione piastrinica e della coagulazione.

Si parla di stress ossidativo nel momento in cui il bilancio tra la produzione di ROS e il sistema di difesa antiossidante viene meno. Questo sbilancio può determinare diverse patologie, tra cui quelle cardiovascolari, incluso il VTE. L'integrità endoteliale di cui sopra, può quindi venir meno in caso di eccesso di ROS o di carenza di difese antiossidanti (tra cui superossidodismutasi che catalizza la trasformazione di anione superossido in perossido di idrogeno; catalasi che accelera la trasformazione di quest'ultimo in acqua; glutatione). Questi enzimi, riducendo l'attività dei ROS, fanno sì che vengano mantenuti a livello vasale gli effetti vasodilatatori ed anticoagulanti del nitrossido (NO). L'anione superossido è una importante fonte di stress ossidativo e può limitare l'attività biologica del NO.(190)

Nella presente ricerca si sono voluti valutare alcuni biomarcatori di stress ossidativo nei soggetti con DVT. Nello specifico abbiamo valutato i valori di SOD (enzima antiossidante), Isoprostani, MDA, 4-HNE e i livelli dei TBARS (indicatori di stress ossidativo da perossidazione lipidica). (Tabelle 27-31)

Si è evidenziato che anche il bilancio dello stress ossidativo mostra delle differenze tra i casi e i controlli. In particolare con **livelli di SOD tendenzialmente più bassi nei casi rispetto ai controlli** anche se all'analisi statistica però non si è raggiunta la significatività ($p=0.11$). Ciò potrebbe rappresentare un indice di deplezione dei sistemi di difesa antiossidanti nei soggetti patologici, causato sia da una carenza di quei metalli, cofattori enzimatici di tali sistemi di protezione antiossidante, sia dai valori più elevati di Pb riscontrati nei casi. Esperimenti su coniglio (Meng et al) e su cani (Ikeda et al) hanno evidenziato come si possa sperimentalmente attenuare il meccanismo patogenetico mediato dalle piastrine nella trombosi, attraverso la infusione endovenosa di SOD e CAT, sottolineando così come un incremento invece dello stress ossidativo possa predisporre a tromboembolismo venoso.

Inoltre **gli indicatori di stress ossidativo sono più elevati nei casi rispetto ai controlli**, raggiungendo la significatività statistica nel caso di **MDA ($p<0.001$)** e **TBARS ($p<0.001$)**. Anche i valori di 4-HNE risultano più tendenzialmente più alti nei casi rispetto ai controlli,

ma senza raggiungere la significatività statistica ($p=0.084$). Il valore degli isoprostani plasmatici invece è risultato essere tendenzialmente più elevato nei controlli rispetto ai casi, ma senza raggiungere valori significativi ($p=0.330$).

Potrebbe quindi mettersi in luce una correlazione tra la carenza di metalli essenziali, la tossicità di alcuni altri metalli e lo squilibrio ossidoriduttivo, evidenziato nella presente ricerca dalla carenza di sistemi di difesa enzimatica antiossidante e dall'eccesso di indicatori di danno ossidativo nei soggetti con DVT rispetto ai controlli. Sicuramente però, per dare maggiore potenza allo studio effettuato si necessita di un ampliamento del campione di popolazione esaminato.

Diversi studi in precedenza, come già enunciato nei primi paragrafi della presente tesi, hanno evidenziato come l'esposizione cronica ma anche acuta delle vie respiratorie all'inquinamento atmosferico, possano portare ad uno stato procoagulativo attraverso uno stato flogistico cronico. Nel presente studio abbiamo voluto rimarcare tale aspetto patogenetico secondo cui, gli inquinanti atmosferici, possano giungere nel torrente circolatorio attraverso l'ingresso nelle vie aeree, dove localmente possono innescare uno stato flogistico e determinare uno squilibrio ossidoriduttivo che con i meccanismi sopra evidenziati, può essere implicato, se alterato, nella induzione di uno stato procoagulativo.

9. CONCLUSIONI

Da quanto fino a questo momento analizzato nella presente ricerca, si può evidenziare come numerose evidenze scientifiche indicano che l'inquinamento atmosferico è correlato alla mortalità cardiovascolare, alle ospedalizzazioni per malattie cardiovascolari e agli eventi ischemici cardiaci. L'esposizione ai contaminanti atmosferici è stata associata ad alterazioni di funzioni fisiologiche correlate con la salute cardiovascolare come infiammazione sistemica, ipercoagulabilità, **trombosi**, disfunzione vascolare e del sistema nervoso autonomo e aterosclerosi. I dati sperimentali degli studi fino ad oggi svolti da altri autori suggeriscono che l'esposizione a lungo termine (anni o decenni) agli inquinanti atmosferici contribuisce allo stress ossidativo polmonare e sistemico, all'infiammazione, all'aterosclerosi e all'aumentato rischio di cardiopatia ischemica e morte. L'esposizione a breve termine (pochi giorni o settimane) favorisce lo scatenamento di sindromi coronariche acute attraverso un aumento del rischio di rottura della placca aterosclerotica e di trombosi. Inoltre l'inquinamento atmosferico è stato associato a insufficienza cardiaca, stroke, aritmie e arresto cardiaco.

Alcuni recenti studi suggeriscono che l'inquinamento atmosferico possa anche contribuire al rischio di TEV. La trombosi arteriosa e quella venosa sono state tradizionalmente considerate finora come entità distinte. Tuttavia un crescente numero di evidenze suggerisce che possano esserci correlazioni fisiopatologiche tra trombosi arteriosa e venosa e che esse possano condividere fattori di rischio comuni come età, obesità, diabete mellito, ipertensione, iperlipemia, fumo e potenzialmente esposizione a contaminanti atmosferici.

Dato che l'inquinamento atmosferico può contribuire all'infiammazione polmonare e sistemica e all'ipercoagulabilità, è plausibile che esista un legame epidemiologico tra inquinamento ambientale e trombosi sia arteriosa che venosa.

Tuttavia, mentre l'evidenza che l'inquinamento atmosferico contribuisce alle malattie arteriose è robusta, le prove che esso svolga un ruolo nelle malattie trombotiche venose sono ancora insufficienti e controverse seppure suggestive. Poiché tale relazione avrebbe importanti implicazioni mediche e di salute pubblica a causa dell'enorme numero di persone coinvolte, una maggiore quantità di dati sperimentali di elevata qualità scientifica è necessaria per confermarla e per fornire una stima più precisa degli effetti. I risultati della ricerca svolta rappresentano pertanto un tassello in più nella comprensione della relazione tra inquinamento ambientale e tromboembolismo venoso, approfondendone le conoscenze sul loro legame attraverso lo studio dello stress ossidativo.

10. Bibliografia

1. Goldhaber SZ. Pulmonary embolism thrombolysis: a clarion call for international collaboration. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:246–247.
2. Heit JA. The epidemiology of venous thromboembolism in the community. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008;28:370–2.
3. Cohen AT, Agnelli G, Anderson FA, Arcelus JI, Bergqvist D, Brecht JG, Greer IA, Heit JA, Hutchinson JL, Kakkar AK, Mottier D, Oger E, Samama MM, Spannagl M. Venous thromboembolism (VTE) in Europe. The number of VTE events and associated morbidity and mortality. *Thromb Haemost* 2007;98:756–764.
4. Deitelzweig SB, Johnson BH, Lin J, Schulman KL. Prevalence of clinical venous thromboembolism in the USA: Current trends and future projections. *Am J Hematol* 2011;86:217–220.
5. Oger E. Incidence of venous thromboembolism: a community-based study in Western France. EPI-GETBP Study Group. Groupe d'Etude de la Thrombose de Bretagne Occidentale. *Thromb Haemost* 2000;83:657–660.
6. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad P, Cannegieter SC, Rosendaal FR, Hammerstrom J. Incidence and mortality of venous thrombosis: a population-based study. *J Thromb Haemost* 2007;5:692–699.
7. Jang MJ, Bang SM, Oh D. Incidence of venous thromboembolism in Korea: from the Health Insurance Review and Assessment Service database. *J Thromb Haemost* 2011; 9:85–91.
8. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation* 2003; 107:14–18.
9. Wiener RS, Schwartz LM, Woloshin S. Time trends in pulmonary embolism in the United States: evidence of overdiagnosis. *Arch Intern Med* 2011;171:831–7.
10. Laporte S, Mismetti P, Décousus H, et al. Clinical predictors for fatal pulmonary embolism in 15,520 patients with venous thromboembolism: findings from the Registro Informatizado de la Enfermedad TromboEmbolica venosa (RIETE) Registry. *Circulation* 2008;117: 1711–16.
11. Pollack CV, Schreiber D, Goldhaber SZ, et al. Clinical characteristics, management, and outcomes of patients diagnosed with acute pulmonary embolism in the emergency department: initial report of EMPEROR (Multicenter Emergency Medicine Pulmonary Embolism in the Real World Registry). *J Am Coll Cardiol* 2011;57: 700–06
12. Masotti L, Pieralli F, Panigada G, Corradi F, Migliacci R, Lenti S, Tafi A, Nozzoli C, Landini G, for the TUSCAN-PE Investigators. Characteristics and clinical management of acute pulmonary embolism in real world: findings from TUSCAN-PE Study. *Ital J Med* 2015;9:125–133.
13. Konstantinides SV, Torbicki A, Agnelli G, Danchin N, Fitzmaurice D, Galiè N, Gibbs JS, Huisman MV, Humbert M, Kucher N, Lang I, Lankeit M, Lekakis J, Maack C, Mayer E, Meneveau N, Perrier A, Pruszczyk P, Rasmussen LH, Schindler TH, Svitil P, Vonk Noordegraaf A, Zamorano JL, Zompatori M; Task Force for the Diagnosis and Management of Acute Pulmonary Embolism of the European Society of Cardiology (ESC). 2014 ESC guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. *Eur Heart J* 2014;35:3033–69, 3069a–3069k.
14. Piazza G, Goldhaber SZ. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2011;364: 351–60.
15. Kahn SR. The post-thrombotic syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Prog* 2010;2010:216–20.
- 15a. Piazza G. Beyond Virchow's triad: does cardiovascular inflammation explain the recurrent nature of venous thromboembolism? *Vasc Med* 2015;20:102–4.
16. Goldhaber SZ. Pulmonary embolism. *Lancet* 2004;363:1295–305.
17. Kearon C, Akl EA. Duration of anticoagulant therapy for deep vein thrombosis and pulmonary embolism. *Blood* 2014;123:1794–801.
18. Anderson FA Jr., Spencer FA. Risk factors for venous thromboembolism. *Circulation* 2003;107(23 Suppl 1):I9 – I16.
19. Rogers MA, Levine DA, Blumberg N, Flanders SA, Chopra V, Langa KM. Triggers of hospitalization for venous thromboembolism. *Circulation* 2012;125:2092– 9.
20. Ku GH, White RH, Chew HK, Harvey DJ, Zhou H, Wun T. Venous thromboembolism in patients with acute leukemia: incidence, risk factors, and effect on survival. *Blood* 2009;113:3911–7.
21. Chew HK, Wun T, Harvey D, Zhou H, White RH. Incidence of venous thromboembolism and its effect on survival among patients with common cancers. *Arch Intern Med* 2006;166:458–64.
22. Blom JW, Doggen CJ, Osanto S, Rosendaal FR. Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *JAMA* 2005;293:715 – 22.
23. Timp JF, Braekkan SK, Versteeg HH, Cannegieter SC. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. *Blood* 2013;122:1712–23.
24. Gussoni G, Frasson S, La Regina M, Di Micco P, Monreal M. Three-month mortality rate and clinical predictors in patients with venous thromboembolism and cancer. Findings from the RIETE registry. *Thromb Res* 2013;131:24–30.

25. Blanco-Molina A, Rota LL, Di Micco P, Brenner B, Trujillo-Santos J, Ruiz-Gamietea A, Monreal M. Venous thromboembolism during pregnancy, post-partum or during contraceptive use. *Thromb Haemost* 2010;103:306–311.
26. Blanco-Molina A, Trujillo-Santos J, Tirado R, Can˜ as I, Riera A, Valde´ s M, Monreal M. Venous thromboembolism in women using hormonal contraceptives. Findings from the RIETE Registry. *Thromb Haemost* 2009;101:478–82.
27. Pomp ER, Lenselink AM, Rosendaal FR, Doggen CJ. Pregnancy, the postpartum period and prothrombotic defects: risk of venous thrombosis in the MEGA study. *J Thromb Haemost* 2008;6:632 – 637.
28. Sweetland S, Beral V, Balkwill A, Liu B, Benson VS, Canonico M, Green J, Reeves GK. Venous thromboembolism risk in relation to use of different types of post- menopausal hormone therapy in a large prospective study. *J Thromb Haemost* 2012;10:2277–86.
29. Mateo J, Oliver A, Borrell M, Sala N, Fontcuberta J. Laboratory evaluation and clinical characteristics of 2,132 consecutive unselected patients with venous thromboembolism--results of the Spanish Multicentric Study on Thrombophilia (EMET-Study). *Thromb Haemost.* 1997;77:444-51.
30. Margaglione M, Brancaccio V, Giuliani N, D'Andrea G, Cappucci G, Iannaccone L, Vecchione G, Grandone E, Di Minno G. Increased risk for venous thrombosis in carriers of the prothrombin G-->A20210 gene variant. *Ann Intern Med* 1998;129:89-93.
31. Crowther MA, Kelton JG. Congenital thrombophilic states associated with venous thrombosis: a qualitative overview and proposed classification system. *Ann Intern Med* 2003;138:128-34.
32. Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999;354: 407–13.
33. Faeh D, Chioloro A, Paccaud F. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *Swiss Med Wkly* 2006;136:745–56.
34. Ray JG. Meta-analysis of hyperhomocysteinemia as a risk factor for venous thromboembolic disease. *Arch Intern Med* 1998;158:2101-6.
35. den Heijer M, Rosendaal FR, Blom HJ, Gerrits WB, Bos GM. Hyperhomocysteinemia and venous thrombosis: a meta-analysis. *Thromb Haemost* 1998;80:874-7.
36. Bezemer ID, Doggen CJ, Vos HL, Rosendaal FR. No association between the common MTHFR 677C->T polymorphism and venous thrombosis: results from the MEGA study. *Arch Intern Med* 2007;167:497-501.
37. Naess IA, Christiansen SC, Romundstad PR, Cannegieter SC, Blom HJ, Rosendaal FR, Hammerstrøm J. Prospective study of homocysteine and MTHFR 677TT genotype and risk for venous thrombosis in a general population--results from the HUNT 2 study. *Br J Haematol* 2008;141:529-35.
38. Levine JS, Branch DW, Rauch J. The antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* 2002;346: 752–63.
39. Lapostolle F, Surget V, Borron SW, et al. Severe pulmonary embolism associated with air travel. *N Engl J Med* 2001;345:779–83.
40. Chandra D, Parisini E, Mozaffarian D. Meta-analysis: travel and risk for venous thromboembolism. *Ann Intern Med* 2009;151:180–90.
41. Piazza G, Goldhaber SZ. Venous thromboembolism and atherothrombosis: an integrated approach. *Circulation* 2010;121:2146 – 2150.
42. Severinsen MT, Kristensen SR, Johnsen SP, Dethlefsen C, Tjønneland A, Overvad K. Smoking and venous thromboembolism: a Danish follow-up study. *J Thromb Haemost* 2009;7:1297–1303.
43. Steffen LM, Cushman M, Peacock JM, Heckbert SR, Jacobs DR Jr., Rosamond WD, Folsom AR. Metabolic syndrome and risk of venous thromboembolism: Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. *J Thromb Haemost* 2009;7:746– 751.
44. Ageno W, Becattini C, Brighton T, Selby R, Kamphuisen PW. Cardiovascular risk factors and venous thromboembolism: a meta-analysis. *Circulation* 2008;117:93–102.
45. Montecucco F, Mach F. Should we focus on “venous vulnerability” instead of “plaque vulnerability” in symptomatic atherosclerotic patients? *Thromb Haemost* 2011;106:995–6.
46. Piazza G, Goldhaber SZ, Lessard DM, Goldberg RJ, Emery C, Spencer FA. Venous thromboembolism in patients with symptomatic atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2011;106:1095–1102.
47. Gresele P, Momi S, Migliacci R. Endothelium, venous thromboembolism and ischemic cardiovascular events. *Thromb Haemost* 2010;103:56–61.
48. Fox EA, Kahn SR. The relationship between inflammation and venous thrombosis. A systematic review of clinical studies. *Thromb Haemost* 2005;94:362–5.
- 48a. Prandoni P. Venous and arterial thrombosis: Two aspects of the same disease? *Clin Epidemiol* 2009;1:1-6.
49. Prandoni P, Bilora F, Marchiori A, Bernardi E, Petrobelli F, Lensing AW, Prins MH, Girolami A. An association between atherosclerosis and venous thrombosis. *N Engl J Med* 2003;348:1435–41.
50. Spencer FA, Ginsberg JS, Chong A, Alter DA. The relationship between unprovoked venous thromboembolism, age, and acute myocardial infarction. *J Thromb Haemost* 2008;6:1507–13.
51. Sorensen HT, Horvath-Puho E, Pedersen L, Baron JA, Prandoni P. Venous thromboembolism and subsequent hospitalisation due to acute arterial cardiovascular events: a 20-year cohort study. *Lancet* 2007;370:1773–79.
52. Stein PD, Beemath A, Olson RE. Obesity as a risk factor in venous thromboembolism. *Am J Med*

2005;118:978–80.

53. Goldhaber SZ, Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC, Hennekens CH. A prospective study of risk factors for pulmonary embolism in women. *JAMA* 1997;277:642–45.
54. Chamberlain AM, Folsom AR, Heckbert SR, Rosamond WD, Cushman M. High-density lipoprotein cholesterol and venous thromboembolism in the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology (LITE). *Blood* 2008;112:2675–80.
55. Dentali F, Squizzato A, Ageno W. The metabolic syndrome as a risk factor for venous and arterial thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2009;35:451–7.
56. Steffen LM, Cushman M, Peacock JM, Heckbert SR, Jacobs DR Jr, Rosamond WD, Folsom AR. Metabolic syndrome and risk of venous thromboembolism: Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. *J Thromb Haemost* 2009;7:746–51.
57. Steffen LM, Folsom AR, Cushman M, Jacobs DR Jr, Rosamond WD. Greater fish, fruit, and vegetable intakes are related to lower incidence of venous thromboembolism: the Longitudinal Investigation of Thromboembolism Etiology. *Circulation*. 2007;115:188–95.
58. Guthikonda S, Haynes WG. Homocysteine: role and implications in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2006; 8:100–6.
59. Oger E, Lacut K, Le Gal G, Couturaud F, Guénet D, Abalain JH, Roguedas AM, Mottier D; EDITH COLLABORATIVE STUDY GROUP. Hyperhomocysteinemia and low B vitamin levels are independently associated with venous thromboembolism: results from the EDITH study: a hospital-based case-control study. *J Thromb Haemost* 2006;4:793–9.
60. Gaustadnes M, Rüdiger N, Møller J, Rasmussen K, Bjerregaard Larsen T, Ingerslev J. Thrombophilic predisposition in stroke and venous thromboembolism in Danish patients. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1999;10: 251–9.
61. Ye Z, Liu EH, Higgins JP, Keavney BD, Lowe GD, Collins R, Danesh J. Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66 155 cases and 91 307 controls. *Lancet* 2006; 367: 651–8.
62. Foley PW, Irvine CD, Standen GR, Morse C, Smith FT, McGrath C, Baird RN, Lamont PM. Activated protein C, factor V Leiden and peripheral vascular disease. *Cardiovasc Surg* 1997; 5:157–60.
63. Erkan D, Lockshin MD. Antiphospholipid syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2006; 18:242–8.
64. Bank I, Libourel EJ, Middeldorp S et al. Elevated levels of FVIII:C within families are associated with an increased risk for venous and arterial thrombosis. *J Thromb Haemost* 2005; 3:79–84.
65. Michiels JJ, Berneman Z, Van Bockstaele D, van der Planken M, De Raeye H, Schroyens W. Clinical and laboratory features, pathobiology of platelet-mediated thrombosis and bleeding complications, and the molecular etiology of essential thrombocythemia and polycythemia vera: therapeutic implications. *Semin Thromb Hemost* 2006;32:174–207.
66. Levine MN. Prevention of thrombotic disorders in cancer patients undergoing chemotherapy. *Thromb Haemost* 1997;78:133–6.
67. Omine M, Kinoshita T, Nakakuma H, Maciejewski JP, Parker CJ, Socie G. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 2005;82:417–21.
68. Maraha B, Peeters MF, van Aken BE, den Heijer M. Chlamydia pneumoniae, systemic inflammation and the risk of venous thrombosis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002;42:153–7.
69. Lijfering WM, ten Cate MK, Sprenger HG, van der Meer J. Absolute risk of venous and arterial thrombosis in HIV-infected patients and effects of combination antiretroviral therapy. *J Thromb Haemost* 2006;4:1928–30.
70. Enga KF, Braekkan SK, Hansen-Krone IJ, Le Cessie S, Rosendaal FR, Hansen JB. Cigarette smoking and the risk of venous thromboembolism: the Tromsø Study. *J Thromb Haemost* 2012;10:2068–74.
71. Wattanakit K, Lutsey PL, Bell EJ, Gornik H, Cushman M, Heckbert SR, Rosamond WD, Folsom AR. Association between cardiovascular disease risk factors and occurrence of venous thromboembolism. A time-dependent analysis. *Thromb Haemost* 2012;108:508–15.
72. Sørensen HT, Horvath-Puho E, Lash TL, Christiansen CF, Pesavento R, Pedersen L, Baron JA, Prandoni P. Heart disease may be a risk factor for pulmonary embolism without peripheral deep venous thrombosis. *Circulation* 2011;124:1435–41.
73. Prandoni P, Pesavento R, Sorensen HT, Gennaro N, Dalla VF, Minotto I, Perina F, Pengo V, Pagnan A. Prevalence of heart diseases in patients with pulmonary embolism with and without peripheral venous thrombosis: findings from a cross-sectional survey. *Eur J Intern Med* 2009;20:470–3.
74. Bell ML, Davis DL. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environ Health Perspect* 2001;109 (Suppl 3):389–94.
75. Bell ML, Davis DL, Fletcher T. A retrospective assessment of mortality from the London smog episode of 1952: the role of influenza and pollution. *Environ Health Perspect* 2004;112:6–8.
76. Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, Boon NA, MacNee W, Cassee FR, Sandström T, Blomberg A, Newby DE. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009;6:36–44.
77. Uzoigwe JC, Prum T, Bresnahan E, Garelnabi M. The emerging role of outdoor and indoor air pollution in

cardiovascular disease. *N Am J Med Sci* 2013;5:445–453.

78. Newby DE, Mannucci PM, Tell GS, Baccarelli AA, Brook RD, Donaldson K, Forastiere F, Franchini M, Franco OH, Graham I, Hoek G, Hoffmann B, Hoylaerts MF, Künzli N, Mills N, Pekkanen J, Peters A, Piepoli MF, Rajagopalan S, Storey RF; ESC Working Group on Thrombosis, European Association for Cardiovascular Prevention and Rehabilitation; ESC Heart Failure Association. Expert position paper on air pollution and cardiovascular disease. *Eur Heart J* 2015;36:83-93b.

79. Pope CA III, Schwartz J, Ransom MR. Daily mortality and PM10 pollution in Utah Valley. *Arch Environ Health* 1992;47:211–7.

80. Dockery DW, Pope CA 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, Ferris BG Jr, Speizer FE. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *New Eng J Med* 1993;329:1753–9.

81. Schwartz J. Air pollution and daily mortality: a review and meta- analysis. *Environ Res* 1994;64:36–52.

82. Schwartz J. What are people dying of on high air pollution days? *Environ Res* 1994;64:26 –35.

83. Dockery DW, Pope CA III. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annual Rev Public Health* 1994;15:107–32.

83b. Ghanbari Ghazikali, M.ab, Heibati, B.c, Naddafi, K.b, Kloog, I.d, Oliveri Conti, G.e , Polosa, R.f, Ferrante, M.e Evaluation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) attributed to atmospheric O3, NO2, and SO2 using Air Q Model (2011-2012 year) . *Environmental Research Volume 144, January 01, 2016, Pages 99-105*

84. Samet JM, Dominici F, Curriero FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. Cities, 1987–1994. *N Engl J Med* 2000;343:1742–1749.

85. Samet JM, Zeger SL, Dominici F, Curriero F, Coursac I, Dockery DW, Schwartz J, Zanobetti A. The National Morbidity, Mortality, and Air Pollution Study. Part II: morbidity and mortality from air pollution in the United States. *Res Rep Health Eff Inst* 2000;94:5–70.

86. Schwartz J. Air pollution and hospital admissions for heart disease in eight U.S. counties. *Epidemiology* 1999;10:17–22.

87. Pope CA III, Muhlestein JB, May HT, Renlund DG, Anderson JL, Horne BD. Ischemic heart disease events triggered by short-term exposure to fine particulate air pollution. *Circulation* 2006;114:2443–8.

88. Larrieu S, Jusot JF, Blanchard M, Prouvost H, Declercq C, Fabre P, Pascal L, Tertre AL, Wagner V, Riviere S, Chardon B, Borrelli D, Cassadou S, Eilstein D, Lefranc A. Short term effects of air pollution on hospitalizations for cardiovascular diseases in eight French cities: the PSAS program. *Sci Total Environ* 2007;387:105–12.

89. Peel JL, Metzger KB, Klein M, Flanders WD, Mulholland JA, Tolbert PE. Ambient air pollution and cardiovascular emergency department visits in potentially sensitive groups. *Am J Epidemiol* 2007;165:625–633.

90. Zanobetti A, Schwartz J. Air pollution and emergency admissions in Boston, MA. *J Epidemiol Community Health* 2006;60:890–5.

91. Peters A, Dockery DW, Muller JE, Mittleman MA. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. *Circulation* 2001;103:2810–15.

92. D’Ippoliti D, Forastiere F, Ancona C, Agabiti N, Fusco D, Michelozzi P, Perucci CA. Air pollution and myocardial infarction in Rome: a case-crossover analysis. *Epidemiology* 2003;14:528–35.

93. Peters A, Liu E, Verrier RL, Schwartz J, Gold DR, Mittleman M, Baliff J, Oh JA, Allen G, Monahan K, Dockery DW. Air pollution and incidence of cardiac arrhythmia. *Epidemiology* 2000;11:11–17.

94. Luttmann-Gibson H, Gold DR, Link M, Mittleman MA, Rich DQ, Schwartz J, Verrier RL, Dockery DW. Daily air pollution effects on cardiac arrhythmias in patients with implanted cardioverter defibrillators. *Epidemiology* 2002;13:S170.

95. Dockery DW, Luttmann-Gibson H, Rich DQ, Link MS, Mittleman MA, Gold DR, Koutrakis P, Schwartz JD, Verrier RL. Association of air pollution with increased incidence of ventricular tachyarrhythmias recorded by implanted cardioverter defibrillators. *Environ Health Perspect* 2005;113:670–4.

96. Schwartz J, Morris R. Air pollution and hospital admissions for cardiovascular disease in Detroit, Michigan. *Am J Epidemiol* 1995;142:23–35.

97. Morris RD, Naumova EN. Carbon monoxide and hospital admissions for congestive heart failure: evidence of an increased effect at low temperatures. *Environ Health Perspect* 1998;106:649–53.

98. Wellenius GA, Bateson TF, Mittleman MA, Schwartz J. Particulate air pollution is associated with hospital admissions for congestive heart failure among the elderly in Pittsburgh, PA. *Epidemiology* 2003;14:S83.

99. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA 3rd, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, Holguin F, Hong Y, Luepker RV, Mittleman MA, Peters A, Siscovick D, Smith SC Jr, Whitsel L, Kaufman JD; American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention, Council on the Kidney in Cardiovascular Disease, and Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2010;121:2331-78..

100. Mills NL, Donaldson K, Hadoke PW, Boon NA, MacNee W, Cassee FR, Sandström T, Blomberg A, Newby DE. Adverse cardiovascular effects of air pollution. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2009;6:36–44.

101. Forastiere F, Agabiti N. Assessing the link between air pollution and heart failure. *Lancet* 2013;382:1008–10.
102. Przyklenk K, Kloner RA. “Reperfusion injury” by oxygen-derived free radicals? Effect of superoxide dismutase plus catalase, given at the time of reperfusion, on myocardial infarct size, contractile function, coronary microvasculature, and regional myocardial blood flow. *Circ Res* 1989;64:86–96.
103. Bolli R, Zughaib M, Li XY, Tang XL, Sun JZ, Triana JF, McCay PB. Recurrent ischemia in the canine heart causes recurrent bursts of free radical production that have a cumulative effect on contractile function. A pathophysiological basis for chronic myocardial stunning. *J Clin Invest* 1995;96:1066–84.
104. Gold DR, Litonjua A, Schwartz J, Lovett E, Larson A, Nearing B, Allen G, Verrier M, Cherry R, Verrier R. Ambient pollution and heart rate variability. *Circulation* 2000;101:1267–73.
105. Pope CA III, Dockery DW, Kanner RE, Villegas GM. Oxygen saturation, pulse rate, and particulate air pollution. A daily time-series panel study. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:365–72.
106. Zanobetti A, Canner MJ, Stone PH, Schwartz J, Sher D, Eagan-Bengston E, Gates KA, Hartley LH, Suh H, Gold DR. Ambient air pollution and blood pressure in cardiac rehabilitation patients. *Circulation* 2004;110:2184–9.
107. Brook RD, Brook JR, Urch B, Vincent R, Rajagopalan S, Silverman F. Inhalation of fine particulate air pollution and ozone causes acute arterial vasoconstriction in healthy adults. *Circulation* 2002;105:1534–6.
108. Bind MA, Baccarelli A, Zanobetti A, Tarantini L, Suh H, Vokonas P, Schwartz J. Air pollution and markers of coagulation, inflammation, and endothelial function: associations and epigenome-environment interactions in an elderly cohort. *Epidemiology* 2012;23:332–40.
109. Bonzini M, Tripodi A, Artoni A, Tarantini L, Marinelli B, Bertazzi PA, Apostoli P, Baccarelli A. Effects of inhalable particulate matter on blood coagulation. *J Thromb Haemost* 2010;8:662–8.
110. Baccarelli A, Wright RO, Bollati V, Tarantini L, Litonjua AA, Suh HH, Zanobetti A, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J. Rapid DNA methylation changes after exposure to traffic particles. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:572–8.
111. Madrigano J, Baccarelli A, Mittleman MA, Wright RO, Sparrow D, Vokonas PS, Tarantini L, Schwartz J. Prolonged exposure to particulate pollution, genes associated with glutathione pathways, and DNA methylation in a cohort of older men. *Environ Health Perspect* 2011;119:977–82.
112. Baccarelli A, Wright R, Bollati V, Litonjua A, Zanobetti A, Tarantini L, Sparrow D, Vokonas P, Schwartz J. Ischemic heart disease and stroke in relation to blood DNA methylation. *Epidemiology* 2010;21:819–28.
113. Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* 2005;308:1466–9.
114. Baccarelli A, Martinelli I, Zanobetti A, Grillo P, Hou LF, Bertazzi PA, Mannucci PM, Schwartz J. Exposure to particulate air pollution and risk of deep vein thrombosis. *Arch Intern Med* 2008;168:920–7.
115. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet* 1999;353:1167–73.
116. van Rooijen M, Silveira A, Thomassen S, Hansson LO, Rosing J, Hamsten A, Bremme K. Rapid activation of haemostasis after hormonal emergency contraception. *Thromb Haemost* 2007;97:15–20.
117. Rosendaal FR, Van Hylckama Vlieg A, Tanis BC, Helmerhorst FM. Estrogens, progestogens and thrombosis. *J Thromb Haemost* 2003;1:1371–80.
118. Rabbani LE, Seminario NA, Sciacca RR, Chen HJ, Giardina EG. Oral conjugated equine estrogen increases plasma von Willebrand factor in postmenopausal women. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1991–9.
119. Rückerl R, Ibald-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 Med* 2006;173:432–41.
120. Baccarelli A, Zanobetti A, Martinelli I, Grillo P, Hou L, Giacomini S, Bonzini M, Lanzani G, Mannucci PM, Bertazzi PA, Schwartz J. Effects of exposure to air pollution on blood coagulation. *J Thromb Haemost* 2007;5:252–60.
121. Schwartz J. Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ Health Perspect* 2001;109(suppl 3):405–9.
122. Ghio AJ, Hall A, Bassett MA, Cascio WE, Devlin RB. Exposure to concentrated ambient air particles alters hematologic indices in humans. *Inhal Toxicol* 2003; 15:1465–78.
123. Riediker M, Cascio WE, Griggs TR, Herbst MC, Bromberg PA, Neas L, Williams RW, Devlin RB. Particulate matter exposure in cars is associated with cardiovascular effects in healthy young men. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:934–40.
124. Liao D, Heiss G, Chinchilli VM, Duan Y, Folsom AR, Lin HM, Salomaa V. Association of criteria pollutants with plasma hemostatic/inflammatory markers: a population-based study. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2005;15:319–28.
125. Baccarelli A, Martinelli I, Pegoraro V, Melly S, Grillo P, Zanobetti A, Hou L, Bertazzi PA, Mannucci PM, Schwartz J. Living near major traffic roads and risk of deep vein thrombosis. *Circulation* 2009;119:3118–24.
126. Hoek G, Brunekreef B, Goldbohm S, Fischer P, van den Brandt PA. Association between mortality and indicators of traffic-related air pollution in the Netherlands: a cohort study. *Lancet* 2002;360:1203–9.

- 127 Medina-Ramon M, Goldberg R, Melly S, Mittleman MA, Schwartz J. Residential exposure to traffic-related air pollution and survival after heart failure. *Environ Health Perspect* 2008;116:481–5.
128. Tonne C, Melly S, Mittleman M, Coull B, Goldberg R, Schwartz J. A case-control analysis of exposure to traffic and acute myocardial infarction. *Environ Health Perspect*. 2007;115:53–7.
129. Schikowski T, Sugiri D, Ranft U, Gehring U, Heinrich J, Wichmann HE, Kramer U. Long-term air pollution exposure and living close to busy roads are associated with COPD in women. *Respir Res* 2005;6:152.
130. Garshick E, Laden F, Hart JE, Caron A. Residence near a major road and respiratory symptoms in U.S. Veterans. *Epidemiology* 2003;14:728–36.
131. Gauderman WJ, Vora H, McConnell R, Berhane K, Gilliland F, Thomas D, Lurmann F, Avol E, Kunzli N, Jerrett M, Peters J. Effect of exposure to traffic on lung development from 10 to 18 years of age: a cohort study. *Lancet* 2007;369:571–7.
132. Bayer-Oglesby L, Schindler C, Hazenkamp-von Arx ME, Braun-Fahrlander C, Keidel D, Rapp R, Kunzli N, Braendli O, Burdet L, Sally Liu LJ, Leuenberger P, Ackermann-Liebrich U. Living near main streets and respiratory symptoms in adults: the Swiss Cohort Study on Air Pollution and Lung Diseases in Adults. *Am J Epidemiol* 2006;164: 1190–8.
133. Maheswaran R, Elliott P. Stroke mortality associated with living near main roads in England and Wales: a geographical study. *Stroke* 2003; 34:2776–80.
134. Hoffmann B, Moebus S, Stang A, Beck EM, Dragano N, Mohlenkamp S, Schmermund A, Memmesheimer M, Mann K, Erbel R, Jockel KH. Residence close to high traffic and prevalence of coronary heart disease. *Eur Heart J* 2006;27:2696–2702.
135. Pope CA 3rd. The expanding role of air pollution in cardiovascular disease: does air pollution contribute to risk of deep vein thrombosis? *Circulation* 2009;119:3050-2.
136. Dales RE, Cakmak S, Vidal CB. Air pollution and hospitalization for venous thromboembolic disease in Chile. *J Thromb Haemost* 2010;8:669-74.
137. Kavouras IG, Koutrakis P, Cereceda-Balic F. Source apportionment of PM10 and PM 25 in five Chilean cities using factor analysis. *J Air Waste Manage Assoc* 2001;51: 451–64.
138. Delfino RJ, Sioutas C, Malik S. Potential role of ultrafine particles in association between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect* 2005;113:934–46.
139. Dentali F, Ageno W, Rancan E, Donati AV, Galli L, Squizzato A, Venco A, Mannucci PM, Manfredini R. Seasonal and monthly variability in the incidence of venous thromboembolism. A systematic review and a meta-analysis of the literature. *Thromb Haemost* 2011;106:439-47.
140. Chiu HH, Whittaker P. Venous thromboembolism in an industrial north american city: temporal distribution and association with particulate matter air pollution. *PLoS One* 2013;8:e68829.
141. Martinelli N, Girelli D, Cigolini D, Sandri M, Ricci G, Rocca G, Olivieri O. Access rate to the emergency department for venous thromboembolism in relationship with coarse and fine particulate matter air pollution. *PLoS One* 2012;7:e34831.
142. Shih RA, Griffin BA, Salkowski N, Jewell A, Eibner C, Bird CE, Liao D, Cushman M, Margolis HG, Eaton CB, Whitsel EA. Ambient particulate matter air pollution and venous thromboembolism in the Women's Health Initiative Hormone Therapy trials. *Environ Health Perspect* 2011;119:326-31.
143. Kan H, Folsom AR, Cushman M, Rose KM, Rosamond WD, Liao D, Lurmann F, London SJ. Traffic exposure and incident venous thromboembolism in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *J Thromb Haemost* 2011;9:672-8.
144. Spiezia L, Campello E, Bon M, Maggiolo S, Pelizzaro E, Simioni P. Short-term exposure to high levels of air pollution as a risk factor for acute isolated pulmonary embolism. *Thromb Res* 2014;134:259-63.
145. Pun VC, Hart JE, Kabrhel C, Camargo CA Jr, Baccarelli AA, Laden F. Prospective study of ambient particulate matter exposure and risk of pulmonary embolism in the Nurses' Health Study cohort. *Environ Health Perspect* 2015 May 8.
146. Eman M. Alissa and Gordon A. Ferns., 2011. HeavyMetal Poisoning and Cardiovascular Disease.
147. L. Cantonea, L. Angelicia, V. Bollatia, M. Bonzinib, P. Apostolic, A. Tripodid, P.A. Bertazzia, and A.A. Baccarellie., 2014. Extracellular histones mediate the effects of metal-rich air particles on blood coagulation.
148. E. Dopp, A. Kligerman, and R. Diaz-Bone, “Organoarsenicals. Uptake, metabolism, and toxicity,” *Metal Ions in Life Sciences*, vol. 7, pp. 231–265, 2010.
149. IPCS (International Programme on Chemical Safety), “Cadmium—Environmental Health Criteria 134,” World Health Organization, Geneva, Switzerland, 1992,
150. Fahim MA1, Nemmar A, Dhanasekaran S, Singh S, Shafiullah M, Yasin J, Zia S, Hasan MY. Acute cadmium exposure causes systemic and thromboembolic events in mice. *Physiol Res*. 2012;61(1):73-80. Epub 2011 Dec 20.
151. Svyatova NV1, Sitdikov FG, Egerev ES. Effect of cobalt on parameters of the cardiovascular system in elementary school children. *Bull Exp Biol Med*. 2013 Jul;155(3):312-3.
152. Boguslaw Lipinski, Ethersia Pretorius, Hester M. Oberholzer, and Wendy J. van der Spuy., 2012. Interaction of Fibrin with Red Blood Cells: The Role of Iron.

153. Boguslaw Lipinski and Ethersia Pretorius.,2013. Iron-Induced Fibrin in Cardiovascular Disease.
154. Toshiyasu Ogata., 2014. Cerebral Venous Thrombosis Associated With Iron Deficiency Anemia.
155. Massimo Franchini & Giovanni Targher & Martina Montagnana & Giuseppe Lippi., 2007. Iron and thrombosis.
156. John A Livesey et all. 2007. Low serum iron levels are associated with elevated plasma levels of coagulation factor VIII and pulmonary emboli/deep venous thromboses in replicate cohorts of patients with hereditary haemorrhagic telangiectasia.
157. S. Diez, "Human health effects of methylmercury exposure," *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 198, pp. 111–132, 2009.
158. Kyung-Min Lim, Sujin Kim, Ji-Yoon Noh, Keunyoung Kim, Won-Hee Jang, Ok-Nam Bae, Seung-Min Chung, and Jin-Ho Chung., 2007. Low-Level Mercury Can Enhance Procoagulant Activity of Erythrocytes: A New Contributing Factor for Mercury-Related Thrombotic Disease.
159. Mark C. Houston., 2011. Role of Mercury Toxicity in Hypertension, Cardiovascular Disease, and Stroke.
160. N. C. Papanikolaou, E. G. Hatzidaki, S. Belivanis, G. N. Tzanakakis, and A. M. Tsatsakis, "Lead toxicity update. A brief review," *Medical Science Monitor*, vol. 11, no. 10, pp. RA329–RA336, 2005.
161. Ling Ren, Lu Xu, Jingwen Feng, Yang Zhang, Ke Yang., 2011. In vitro study of role of trace amount of Cu release from Cu-bearing stainless steel targeting for reduction of instent restenosis.
162. Trang T. James C. Fredenburgh; Jeffrey I. Weitz1., 2015. Zinc: An important cofactor in haemostasis and thrombosis.
163. Heyns Adu P, Eldor A, Yarom R, Marx G. Zinc-induced platelet aggregation is mediated by the fibrinogen receptor and is not accompanied by release or by thromboxane synthesis.
164. Trang T. James C. Fredenburgh; Jeffrey I. Weitz1., 2015. Zinc: An important cofactor in haemostasis and thrombosis.
165. Heyns Adu P, Eldor A, Yarom R, Marx G. Zinc-induced platelet aggregation is mediated by the fibrinogen receptor and is not accompanied by release or by thromboxane synthesis.
166. Carol.J.Eisenmann and Miller. The effect of Selenium compounds on the production of thromboxane.
167. Santhakumar A.B., Bulmer A.C. & Singh I. A review of the mechanisms and effectiveness of dietary polyphenols in reducing oxidative stress and thrombotic risk. *J Hum Nutr Diet.* (2014)
168. Bagatini, M.D., Martins, C.C., Battisti, V., Gasparetto, D., Da Rosa, C.S., Spanevello, R.M., Ahmed, M., Schmatz, R., Schetinger, M.R. & Morsch, V.M. (2011) Oxidative stress
169. Jane E. Freedman. Oxidative Stress and Platelets. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:s11-s16
170. Handin RI, Karabin R, Boxer GJ. Enhancement of platelet function by superoxide anion. *J Clin Invest.* 1977;59:959–965.
171. Stuart MJ, Holmsen H. Hydrogen peroxide, an inhibitor of platelet function: effect on adenine nucleotide metabolism, and the release reaction. *Am J Hematol.* 1977;2:53-63
172. Meng YY, Trachtenburg J, Ryan US, Abendschein DR. Potentiation of endogenous nitric oxide with superoxide dismutase inhibits platelet-mediated thrombosis in injured and stenotic arteries. *J Am Coll Cardiol.* 1995;25:269–275.
173. Kilinc E, van Oerle R, Borissoff JI, Oschatz C, Gerlofs-Nijland ME, Janssen NA, Cassee FR, Sandstrom T, Renne T, Ten Cate H, Spronk HM. Factor XII activation is essential to sustain the procoagulant effects of particulate matter. *J Thromb Haemost.* 2011
174. Ripanucci G, Grana M, Vicentini L, Magrini A, Bergamaschi A. Dust in the underground railway tunnels of an Italian town. *J Occup Environ Hyg.* 2006; 3:16–25.
175. Seaton A, Cherrie J, Dennekamp M, Donaldson K, Hurley JF, Tran CL. The London Underground: dust and hazards to health. *Occup Environ Med.* 2005; 62:355–62.
176. Moreno T, Querol X, Alastuey A, de la Rosa J, Sanchez de la Campa AM, Minguillon M, Pandolfi M, Gonzalez-Castanedo Y, Monfort E, Gibbons W. Variations in vanadium, nickel and lanthanoid element concentrations in urban air. *Sci Total Environ.* 2010; 408:4569–79.
177. Cao J, Xu H, Xu Q, Chen B, Kan H. Fine particulate matter constituents and cardiopulmonary mortality in a heavily polluted Chinese city. *Environ Health Perspect.* 2012; 120:373–8.
178. Zhang Z, Chau PY, Lai HK, Wong CM. A review of effects of particulate matter-associated nickel and vanadium species on cardiovascular and respiratory systems. *Int J Environ Health Res.* 2009; 19:175–85.
179. Wallenborn JG, McGee JK, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Kodavanti UP. Systemic translocation of particulate matter-associated metals following a single intratracheal instillation in rats. *Toxicol Sci.* 2007; 98:231–9.
180. N.J. Mutch, E.K. Waters, and J. H. Morrissey. Immobilized transition metals stimulate contact activation and drive factor XII-mediated coagulation. *J Thromb Haemost.* 2012 October ; 10(10): 2108–2115
181. Sangani RG¹, Soukup JM, Ghio AJ. Metals in air pollution particles decrease whole-blood coagulation time. *Inhal Toxicol.* 2010 Jul;22(8):621-6.

182. Susan B. Goldhaber. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 38 (2003) 232–242
183. Janet Y. Uriu-Adams, Carl L. Keen. Copper, oxidative stress, and human health. *Molecular Aspects of Medicine* 26 (2005)268–298
184. Halliwell, B., *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York. 1999.
185. Fraga CG. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol Aspects Med.* 2005 Aug-Oct;26(4-5):235-44.)
186. Shin JH¹, Lim KM, Noh JY, Bae ON, Chung SM, Lee MY, Chung JH. Lead-induced procoagulant activation of erythrocytes through phosphatidylserine exposure may lead to thrombotic diseases. *Chem Res Toxicol.* 2007 Jan;20(1):38-43.
187. Barman T, Kalahasthi R, Rajmohan HR. Effects of lead exposure on the status of platelet indices in workers involved in a lead-acid battery manufacturing plant. *J Expo Sci Environ Epidemiol.* 2014 Nov;24(6):629-33
188. Kaji, T., Yamamoto, C., Sakamoto, M., and Kozuka, H. (1992) Inhibitory effect of lead on the release of tissue plasminogen activator from human vascular endothelial cells in culture. *Toxicology* 73, 219-227)
189. Jung-Hun Shin, Kyung-Min Lim, Ji-Yoon Noh, Ok-Nam Bae, Seung-Min Chung, Moo-Yeol Lee, and Jin-Ho Chung. Lead-Induced Procoagulant Activation of Erythrocytes through Phosphatidylserine Exposure May Lead To Thrombotic Diseases. *Chem. Res. Toxicol.* 2007, 20, 38-43)
190. Selma Bereksi Reguig, Samira Bouanane, Hafida Merzouk, Nabila Soufi, Sid Ahmed Merzouk. Oxidative Stress and Thrombotic Disorders: Study in Patients with Venous Thromboembolism. *International Journal of Health Sciences & Research* (www.ijhsr.org) Vol.6; Issue: 1; January 2016