I. Iavicoli¹, L. Fontana², V. Leso²

Monitoraggio ambientale e biologico nella valutazione del rischio dei lavoratori esposti a nanomateriali ingegnerizzati

¹ Sezione di Medicina del Lavoro, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Napoli Federico II, Napoli

² Sezione di Medicina del Lavoro, Istituto di Sanità Pubblica, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

RIASSUNTO. Negli ultimi anni lo sviluppo delle nanotecnologie ha determinato un incremento della produzione e dell'utilizzo dei nanomateriali ingegnerizzati. Il conseguente aumentato rischio espositivo ha suscitato una crescente preoccupazione in merito ai potenziali effetti avversi per la salute derivanti dall'esposizione a nanomateriali. Pertanto, per proteggere la salute dei soggetti professionalmente esposti, appare evidente la necessità di elaborare ed applicare un adeguato processo di valutazione del rischio. In tale contesto la valutazione dell'esposizione mediante l'effettuazione del monitoraggio ambientale e biologico rappresenta un elemento fondamentale. Tuttavia, l'applicazione pratica di questi strumenti è attualmente limitata da una comprensione ancora ridotta e frammentaria della tossicocinetica e tossicodinamica dei nanomateriali ingegnerizzati. Lo scopo di questo lavoro è quello di individuare le criticità che impediscono una piena realizzazione del monitoraggio ambientale e biologico dei nanomateriali nei luoghi di lavoro al fine di fornire indicazioni utili allo sviluppo di valide e condivise strategie di valutazione dell'esposizione.

Parole chiave: monitoraggio ambientale, monitoraggio biologico, nanomateriali ingegnerizzati.

ABSTRACT. ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL MONITORING IN THE RISK ASSESSMENT FOR WORKERS EXPOSED TO ENGINEERED NANOMATERIALS. In recent years, the development of nanotechnology has led to an increase in production and use of engineered nanomaterials. The subsequent increased risk of exposure has raised growing concern about the potential adverse health effects resulting from exposure to nanomaterials. Therefore, in order to protect the health of occupationally exposed subjects, it is necessary to develop and implement an adequate process of risk assessment. In this context, the exposure assessment by conducting environmental and biological monitoring is a key element. However, the limited and fragmented understanding of the toxicokinetics and toxicodynamics of engineered nanomaterials currently hinder the practical application of these evaluation tools. The aim of this review is to identify the critical issues that prevent the full implementation of environmental and biological monitoring of nanomaterials in workplaces to provide useful guidance to the development of validated exposure assessment strategies.

Key words: environmental monitoring, biological monitoring, engineered nanomaterials.

Introduzione

Negli ultimi anni i nanomateriali ingegnerizzati (NMs) sono stati sviluppati ed utilizzati in maniera crescente in numerosi settori industriali per la fabbricazione di innovativi prodotti di consumo ed applicazioni nell'ambito dell'elettronica, della cosmetica, dell'edilizia, dell'industria agroalimentare ed energetica e nella biomedicina (1). Questa rapida crescita delle nanotecnologie, la produzione di massa dei NMs e la loro conseguente ampia diffusione e distribuzione a livello globale ha inevitabilmente aumentato la probabilità di una maggiore esposizione sia dei lavoratori addetti alla produzione, manipolazione ed utilizzo di queste sostanze sia di coloro i quali impiegano i prodotti contenenti NMs (1). Il verosimile aumento dell'esposizione professionale e della popolazione generale ai NMs ha suscitato nella comunità scientifica una crescente preoccupazione in merito ai potenziali effetti avversi per la salute che potrebbero derivare da tale aumentato rischio espositivo. Infatti, i dati attualmente disponibili in letteratura suggeriscono che le risposte biologiche indotte dai NMs e le loro proprietà tossicologiche sono strettamente correlate alle peculiari caratteristiche chimico-fisiche che ne rendono tanto attraente il loro utilizzo a livello industriale. Pertanto, al fine di garantire la tutela della salute dei lavoratori esposti a NMs appare evidente la necessità di sviluppare delle efficaci strategie di valutazione e di gestione del rischio. In tale contesto, la valutazione dell'esposizione ai NMs mediante monitoraggio ambientale, rappresenta un elemento indispensabile nell'ambito del più complesso processo di valutazione del rischio (2). I dati di tale monitoraggio forniscono informazioni di tipo quantitativo relative alla distribuzione dimensionale, alla concentrazione in massa e/o numerica dei NMs, alla loro area di superficie e dati di carattere qualitativo inerenti la composizione chimica, la morfologia e la reattività di superficie dei NMs (2). D'altro canto, il monitoraggio biologico costituisce un ulteriore utile strumento di valutazione dell'esposizione in quanto arricchisce ed integra le informazioni ottenute nell'ambito del monitoraggio ambientale. Infatti, il monitoraggio biologico investigando i potenziali effetti precoci indotti dai NMs e contribuendo conseguentemente alla definizione del loro profilo tossicocinetico e tossicodinamico garantisce l'acquisizione di

informazioni che sono necessarie alla definizione di un adeguato programma di valutazione e gestione del rischio.

Pertanto, lo scopo di questa rassegna è stato quello di analizzare le conoscenze attualmente disponibili in merito al monitoraggio ambientale e biologico dei NMs al fine di individuare le criticità e le problematiche che ne limitano l'impiego e proporre contestualmente degli obiettivi strategici per implementare una efficace valutazione del rischio da esposizione a NMs.

Il monitoraggio ambientale dei NMs

Lo sviluppo e l'applicazione pratica di una corretta strategia di monitoraggio ambientale dei NMs dovrebbe tenere in debito conto i diversi parametri metrologici che sono stati correlati all'induzione di effetti tossici da parte di queste sostanze. Sfortunatamente, rimane ancora da stabilire quali siano i parametri metrologici più rappresentativi da misurare e comunque va sottolineato che attualmente non è disponibile un unico metodo di campionamento che da solo sia in grado di fornire simultaneamente informazioni utili riguardo alle diverse caratteristiche chimico-fisiche dei NMs (3). Pertanto, come suggerito dall'Istituto Nazionale Americano per la Salute e Sicurezza Occupazionale (NIOSH) qualsiasi valutazione dell'esposizione professionale a NMs si dovrebbe basare su un approccio multi-strumentale che preveda l'uso di diverse tecniche di campionamento e di analisi (3). A questo proposito il NIOSH ha proposto una strategia di campionamento, la Nanoparticle Emission Assessment Technique (NEAT), per valutare in maniera semi-quantitativa il rilascio di NMs negli ambienti di lavoro. Tale strategia si basa sull'utilizzo combinato di un contatore di particelle a condensazione e di un contatore ottico di particelle accoppiato al campionamento dell'aria ambientale su filtri per la successiva analisi chimica e microscopica del materiale campionato (3). Recentemente, la NEAT è stata modificata ed implementata (NEAT 2.0) per permettere di effettuare anche una valutazione personale dell'esposizione mediante la raccolta su filtro dell'aria ambientale campionata nella zona di respirazione dei lavoratori esposti a NMs. A prescindere dalle numerose difficoltà metodologiche e strumentali, che ne impediscono un'ampia applicazione pratica negli ambienti di lavoro, la principale problematica inerente la valutazione dell'esposizione ai NMs è rappresentata dall'interpretazione delle informazioni ottenute. Infatti, solitamente i livelli aerodispersi di un contaminante vengono confrontati con i rispettivi valori limite di esposizione occupazionale (OELs) per stabilire se le concentrazioni misurate possano rappresentare un rischio per la salute dei lavoratori. Purtroppo, questa prassi, consueta e standardizzata nell'ambito dell'igiene industriale e della medicina del lavoro, quando deve essere applicata alla valutazione dell'esposizione ai NMs diviene particolarmente complessa e laboriosa. La principale difficoltà a questo riguardo è rappresentata dal fatto che attualmente non sono disponibili OELs normati e condivisi a livello internazionale. Ciononostante, alcuni enti ed istituzioni di ricerca nazionali ed internazionali hanno proposto dei OELs per

alcuni NMs come ad esempio le nanoparticelle di biossido di titanio o i nanotubi di carbonio. La maggior parte degli OELs sino ad oggi suggeriti sono classicamente basati sulla misura della concentrazione in massa dei NMs nella frazione respirabile del particolato. Tuttavia, gli studi di nanotossicologia hanno dimostrato che gli effetti avversi dei NMs sono strettamente correlati ad altri parametri metrologici quali ad esempio la concentrazione numerica, la distribuzione dimensionale e l'area di superficie. Pertanto, dei OELs basati esclusivamente sulla concentrazione di massa potrebbero non garantire una sufficiente protezione dei lavoratori professionalmente esposti a NMs.

Appare quindi evidente, al fine di stabilire adeguati ed efficaci OELs, la necessità di incrementare i dati di esposizione a NMs nei luoghi di lavoro misurando molteplici parametri metrologici e valutando specificatamente l'esposizione personale dei lavoratori. A questo proposito, è interessante notare che recentemente sono state sviluppate alcune innovative tecniche di campionamento e di analisi che consentono di valutare l'esposizione personale a NMs mediante l'impiego di campionatori personali in grado di misurare, nella zona di respirazione dei lavoratori, la concentrazione numerica e l'area di superficie dei NMs che si depositano nei polmoni (4).

Il monitoraggio biologico dei NMs

La definizione di appropriati biomarcatori di esposizione e di effetto correlati all'esposizione a NMs è particolarmente difficoltosa in quanto l'induzione delle risposte biologiche è correlata alle numerose proprietà chimico-fisiche dei NMs, sia intrinseche che acquisite in seguito al contatto con i sistemi biologici (5). I biomarcatori di dose interna sono indicatori dell'esposizione a NMs che, in contesti occupazionali, può avvenire mediante differenti vie di assorbimento tra cui la via inalatoria, cutanea ed il tratto gastrointestinale. Diversi studi *in vivo* hanno mostrato che tra i possibili indicatori biologici di esposizione, il dosaggio del contenuto metallico elementare in differenti matrici biologiche potrebbe rappresentare un valido marcatore dell'esposizione a NMs metallici. Tuttavia, una migliore conoscenza della tossicocinetica dei NMs assorbiti dall'organismo e dei possibili meccanismi molecolari di azione che sono alla base dei loro effetti tossici appare essenziale per la definizione di appropriati indicatori di dose interna, di possibili marcatori di accumulo e di potenziali indicatori di dose efficace (5).

Numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* hanno evidenziato la capacità dei NMs di svolgere una importante azione pro-infiammatoria e pro-ossidativa. Sulla base di queste osservazioni è quindi possibile ipotizzare che differenti parametri, coinvolti nella risposta infiammatoria dell'organismo o nell'induzione dello stress ossidativo, possano essere impiegati come indicatori di effetto precoce. Infatti, recentemente diversi studi hanno investigato il possibile utilizzo come biomarcatori di effetto dei livelli sierici delle proteine della fase acuta, delle concentrazioni delle citochine pro-infiammatorie, delle variazioni nei sistemi di regolazione dello stato ossidativo o nei livelli di addotti

alle proteine o al DNA (5). Inoltre, in questo ambito sono stati studiati anche alcuni biomarcatori di genotossicità come ad esempio il dosaggio dei micronuclei o delle rotture della doppia elica del DNA che sono effetti prevalentemente correlati all'azione diretta o indiretta di danno al DNA eventualmente causato dall'esposizione ai NMs. Tuttavia, sebbene queste alterazioni siano particolarmente sensibili all'insulto indotto dai NMs, questi potenziali indicatori di effetto precoce non appaiono sufficientemente specifici per l'azione tossica di tali xenobiotici e pertanto il loro utilizzo necessita di ulteriori approfondimenti. Infine, è necessario sottolineare che in futuro sarà assolutamente necessario acquisire un sempre maggior numero di informazioni utili a identificare e chiarire quali alterazioni genetiche, genotossiche o epigenetiche, correlate all'esposizione ai NMs, possano essere considerate come potenziali indicatori di suscettibilità. Tale specifico ambito della ricerca necessita di ulteriori ed importanti approfondimenti per identificare le popolazioni a maggior rischio di sviluppare effetti avversi in seguito all'esposizione a NMs e per definire quali condizioni fisiologiche o patologiche dei soggetti esposti possano influenzare negativamente l'impatto sulla salute dei NMs (6).

Discussione

La possibile applicazione pratica di adeguate strategie di monitoraggio ambientale e biologico nell'ambito del complesso processo di valutazione e gestione del rischio da esposizione a NMs non può prescindere dal conseguimento di un maggior numero di informazioni di elevata qualità inerenti la tossicocinetica e la tossicodinamica di questi xenobiotici. A questo proposito è fondamentale stabilire quale, tra le numerose caratteristiche chimico-fisiche dei NMs, sia quella maggiormente coinvolta nell'induzione delle risposte biologiche ed al contempo è estremamente importante incrementare la nostra attuale conoscenza dei meccanismi molecolari di azione che vengono utilizzati dai NMs per esercitare i loro effetti tossici. Il raggiungimento di una più ampia e profonda comprensione dei suddetti aspetti è cruciale per elaborare ad esempio delle corrette strategie di monitoraggio ambientale. In tale ambito infatti non esiste ancora un consenso internazionale in merito a quale parametro metrologico sia quello più importante da misurare per caratterizzare l'esposizione professionale ai NMs. Inoltre, queste informazioni sarebbero altrettanto importanti per sviluppare ed identificare degli adeguati OELs di riferimento. Per raggiungere quest'ultimo obiettivo è anche essenziale ottenere un maggior numero di dati inerenti i livelli di esposizione dei NMs nei luoghi di lavoro mediante l'impiego e la validazione delle più recenti tecniche di campionamento ed analisi intese a valutare l'esposizione personale dei lavoratori. D'altro canto la possibilità di identificare dei validi indi-

catori di dose e di effetto per i NMs deve rispettivamente basarsi su un'adeguata conoscenza della tossicocinetica e tossicodinamica di questi xenobiotici. In questo contesto, l'impiego di nuove metodiche di analisi genomica, proteomica o trascrittomica potranno rappresentare un efficace supporto nella definizione della tossicità dei nanomateriali, dei sottesi meccanismi di azione e nell'individuazione di innovativi biomarcatori di effetto precoce e/o di suscettibilità. I potenziali biomarcatori dovranno essere accuratamente studiati e successivamente validati in reali contesti di esposizione occupazionale, tenendo ovviamente in considerazione eventuali aspetti etici e sociali correlati al loro utilizzo.

Conclusioni

Il monitoraggio ambientale e quello biologico rappresentano due elementi chiave nell'ambito della valutazione e gestione del rischio da esposizione a NMs. Ciononostante, al fine di poter applicare adeguatamente tali strumenti nella pratica quotidiana dell'igiene industriale e della medicina del lavoro è necessario raggiungere una migliore e più approfondita comprensione delle loro interazioni con gli organismi viventi. In particolare, gli studi futuri dovranno contribuire a: (i) chiarire quali sono le caratteristiche chimico-fisiche dei NMs che più di altre sono correlate all'induzione di effetti tossici, (ii) definire quali sono i parametri metrologici più rappresentativi dell'esposizione a NMs, (iii) validare le tecniche di campionamento personali e di analisi, (iv) stabilire e validare adeguati OELs, (v) definire biomarcatori di esposizione ed effetto.

Bibliografia

- 1) Iavicoli I, Fontana L, Leso V, Calabrese EJ. Hormetic dose-responses in nanotechnology studies. *Sci Total Environ* 2014; 487: 361-374.
- 2) Iavicoli I, Leso V, Fontana L, Cottica D, Bergamaschi A. Characterization of inhalable, thoracic, and respirable fractions and ultrafine particle exposure during grinding, brazing, and welding activities in a mechanical engineering factory. *J Occup Environ Med* 2013; 55: 430-445.
- 3) National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH), "Approaches to safe nanotechnology: managing the health and safety concerns associated with engineered nanomaterials," U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, 2009.
- 4) Asbach C, Meyer Plath A, Clavaguerra S, Fierz M, Dahmann D, McCalmann L, Alexander C, Todea AM, Iavicoli I. NanoIndEx. Assessment of Personal Exposure to Airborne Nanomaterials: A guidance document. 2016 http://www.nanoindex.eu/wp-content/uploads/2016/06/Nano_Broschüre.pdf
- 5) Iavicoli I, Leso V, Manno M, Schulte PA. Biomarkers of nanomaterial exposure and effect: current status. *J Nano Res* 2014; 16: 2302.
- 6) Iavicoli I, Leso V, Schulte PA. Biomarkers of susceptibility: State of the art and implications for occupational exposure to engineered nanomaterials. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2016; 299: 112-124.