

# Studio effetti biologici precoci degli inquinanti aerei

*Monitoring air pollution effects on children for supporting public health policy*

Il progetto **MAPEC\_LIFE** "*Monitoring Air Pollution Effects on Children for supporting public health policy*", approvato nel 2013 dalla Commissione Europea nell'ambito del Programma LIFE+2012, Environment Policy and Governance, è il primo grande studio multicentrico sugli effetti biologici precoci degli inquinanti aerei sulle cellule buccali dei bambini di 6-8 anni, residenti in **5 città italiane (Brescia, Lecce, Perugia, Pisa e Torino)**, in relazione alla concentrazione di alcuni inquinanti atmosferici e alle caratteristiche socio-demografiche e agli stili di vita dei bambini.

Capofila del progetto (1 gennaio 2014 - 31 dicembre 2016) è l'Università degli Studi di Brescia. I partner sono il Comune di Brescia, il Centro Servizi Multisetoriale e Tecnologico (CSMT Gestione) di Brescia, l'Università degli Studi di Perugia, l'Università di Pisa, l'Università degli Studi di Torino e l'Università del Salento, nello specifico il Laboratorio di Igiene del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche ed Ambientali, coordinato dalla Prof.ssa Antonella De Donno.

«Il MAPEC\_LIFE è un progetto di sanità pubblica – spiega il Prof. Umberto Gelatti dell'Unità di Igiene, Epidemiologia e Sanità Pubblica dell'Università di Brescia, coordinatore del progetto – il cui scopo principale è la tutela della salute dei cittadini, attraverso la raccolta di dati scientifici che possano essere di supporto ai decisori pubblici nella promozione di nuove e migliori politiche ambientali. Nello svolgimento del progetto abbiamo riscontrato interesse e sostegno da parte di varie componenti della società civile: dalle amministrazioni comunali alle istituzioni e dirigenze scolastiche, dal corpo insegnante alle famiglie e ai

bambini, indice di una consapevolezza ormai diffusa e condivisa sui temi dell'ambiente, della salute e della prevenzione».

«I risultati conseguiti dal gruppo di lavoro nell'ambito del progetto MAPEC\_LIFE sono importanti – interviene l'ing. Riccardo Trichilo, Presidente e Chief Executive Officer di CSMT –. Si tratta di un esempio concreto di eccellente cooperazione tra CSMT e mondo accademico, impegnati in attività di ricerca di grande utilità ambientale e sociale che rispondono pienamente all'idea di Smart City, intesa come città efficiente e sostenibile, di cui CSMT è convinto e fattivo promotore».

«Il Comune di Brescia ha costituito nel novembre 2015 l'osservatorio "Aria bene comune" con lo scopo di valutare le problematiche riguardanti l'inquinamento dell'aria nell'area vasta urbana e periurbana. - Il prof. Gianluigi Fondra, Assessore all'Ambiente e Presidente dell'Osservatorio chiarisce - Analizzando periodicamente i risultati dei controlli delle agenzie ambientali e sanitarie comparandoli con i più recenti studi delle istituzioni Universitarie, si arricchisce il confronto sulle misure da adottare in capo ai decisori. Gli esiti del progetto MAPEC\_LIFE rappresentano un contributo innovativo sulle conoscenze degli enti territoriali, dei portatori d'interesse e dei cittadini nella formazione di stili di vita e di condotte responsabili per migliorare la qualità della vita, in particolare della popolazione infantile».

## **Metodi**

Le cellule della mucosa buccale di tutti i bambini reclutati sono state raccolte mediante un leggero spazzolamento dell'interno della guancia e analizzate in laboratorio per valutare la presenza di micronuclei, quale indicatore di danno al DNA cellulare. Questo biomarcatore di effetto precoce rappresenta un danno biologico non direttamente correlato ad un rischio individuale, ma indicativo dell'esposizione di una popolazione a fattori di rischio.

Per valutare l'effettiva esposizione dei bambini all'inquinamento atmosferico, durante i giorni di campionamento biologico, si è proceduto al

campionamento di particolato atmosferico (PM<sub>0,5</sub>), mediante campionatori d'aria ad alto volume posizionati nei cortili delle scuole frequentate dai bambini reclutati. Il PM<sub>0,5</sub> così raccolto è stato analizzato per valutare la concentrazione di idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e di loro nitro-composti (nitroIPA), la tossicità su cellule polmonari umane in coltura (cellule A549), la genotossicità mediante il test del micronucleo e il comet assay sullo stesso tipo cellulare (cellule A549) e la mutagenicità mediante il test di Ames su cellule batteriche.

Per una più completa valutazione della qualità dell'aria a cui i bambini sono stati esposti, i dati delle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente relativi ai livelli dei principali inquinanti aerodispersi (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub>, NO, NO<sub>2</sub>, CO, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> e benzene) sono stati raccolti per tutto il periodo di campionamento. Inoltre, ai genitori dei bambini è stato somministrato un questionario per raccogliere informazioni su stato di salute del bambino, esposizioni outdoor e indoor, caratteristiche socio-economiche, stili di vita e alimentazione.

Per studiare la relazione tra esposizione a inquinanti ed effetti biologici, i campioni biologici ed ambientali sono stati raccolti sia in inverno che in tarda primavera, periodi caratterizzati, nella realtà urbana del nostro paese, rispettivamente da alti e bassi livelli di diversi inquinanti aerei. Inoltre, per valutare la variabilità biologica intra-soggetto, nei bambini reclutati a Brescia è stato effettuato un terzo prelievo biologico nella stagione invernale, a distanza di un anno dal precedente.

I dati così raccolti sono stati analizzati mediante l'impiego di modelli di analisi statistica multivariata per valutare le associazioni tra danno al DNA, livelli di inquinanti e gli altri fattori indagati.

Il progetto ha previsto, inoltre, lo sviluppo di un pacchetto di ausili didattici per aiutare ad affrontare con i bambini e le scuole i temi principali del progetto: inquinamento atmosferico, effetti sulla salute e stili di vita sani.

## **Risultati**

## 1. Popolazione indagata

I campionamenti ambientali e biologici si sono conclusi a gennaio 2016. Nelle 5 città sono state coinvolte 26 scuole primarie, per un totale di 139 classi. In totale, 1149 bambini sono stati inclusi nello studio ed esaminati in entrambe le stagioni: inverno (novembre 2014-marzo 2015) e primavera (aprile-giugno 2015). A Brescia, 191 bambini sono stati esaminati anche una terza volta (novembre 2015-gennaio 2016).

I bambini coinvolti sono per metà maschi e mediamente hanno un elevato livello socio-economico. Di loro, un bambino su 8 è esposto a fumo passivo in casa, uno su 3 è in sovrappeso o obeso e un bambino su 2 ha un'alimentazione che non segue i principi della dieta mediterranea.

«Nel complesso – spiega la Prof.ssa Antonella De Donno dell'Università del Salento – i dati dei questionari compilati dai genitori mostrano che lo stato ponderale dei bambini è sovrapponibile a quello di altri studi condotti sui bambini italiani della stessa età e confermano una quota più elevata di bambini sovrappeso nelle regioni del centro e sud Italia.

Purtroppo, i bambini mostrano comportamenti alimentari spesso scorretti, con una scarsa aderenza ai principi della dieta mediterranea. Inoltre, molti bambini sono risultati esposti a fattori di inquinamento indoor, spesso attribuibili a comportamenti sbagliati da parte dei genitori, come l'abitudine di fumare in casa».

## 2. Misure degli inquinanti atmosferici

I dati raccolti dalle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente mostrano livelli di inquinamento urbano più elevati in inverno rispetto alla primavera e nelle città del nord Italia (Torino e Brescia) rispetto a quelle del centro-sud (Pisa, Perugia e Lecce). In particolare, i livelli medi di PM10 rilevati nel periodo di campionamento invernale (novembre 2014-marzo 2015) sono: 50 µg/m<sup>3</sup> a Torino, 45 µg/m<sup>3</sup> a Brescia, 29 µg/m<sup>3</sup> a Pisa e Perugia, 27 µg/m<sup>3</sup> a Lecce. Tali livelli si abbassano sensibilmente nella stagione primaverile. Le concentrazioni di PM10 registrate nel periodo

aprile-giugno 2015, durante la seconda stagione di campionamento, sono: 24  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a Torino, 26  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a Brescia, 22  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a Pisa, 17  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a Perugia e 20  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  a Lecce.

Lo stesso andamento stagionale e geografico caratterizza tutti gli inquinanti indagati, ad eccezione dell'ozono che, invece, è più concentrato nella stagione primaverile e molto simile nelle diverse città.

Anche le concentrazioni di IPA e nitroIPA rilevate nel particolato atmosferico  $\text{PM}_{0,5}$  campionato presso le scuole coinvolte nel progetto mostrano tale andamento: i livelli primaverili sono fino a 10 volte inferiori a quelli invernali e le città del nord Italia sono quelle in cui si sono registrate le concentrazioni più alte, in entrambe le stagioni.

### **3. Attività tossica e genotossica dei campioni di particolato atmosferico**

I risultati dei test di laboratorio effettuati dal progetto MAPEC\_LIFE hanno mostrato che i campioni di particolato atmosferico inducono effetti tossici, genotossici e cancerogeni, se pur modesti, nelle cellule in coltura. Anche in questo caso, la stagionalità influenza gli effetti: i campioni prelevati in inverno inducono effetti maggiori rispetto a quelli raccolti in primavera. Per quanto riguarda la tossicità aspecifica e la promozione della cancerogenicità, il particolato atmosferico di Brescia è quello che ha dato gli effetti maggiori. Nel test di mutagenicità, invece, quello di Torino è risultato essere il particolato più attivo, seguito da quello di Brescia, Pisa, Perugia e infine Lecce. Questa capacità di provocare mutazioni è risultata essere correlata alla concentrazione di IPA e nitro-IPA nel  $\text{PM}_{0,5}$ .

«In un contesto di riduzione generale dei livelli di inquinamento da particolato atmosferico – interviene la prof.ssa Elisabetta Carraro, dell'Università di Torino – lo studio ha confermato la stagionalità di questo inquinante ed un gradiente Nord-Sud, con le concentrazioni più alte registrate in inverno nelle città del Nord Italia. La valutazione in vitro, su cellule in laboratorio, della capacità del  $\text{PM}_{0,5}$  di determinare danni al

DNA ha messo in evidenza un effetto complessivamente modesto, e che è associato alla stagione, alla città e alla concentrazione di Idrocarburi Policiclici Aromatici sul PM<sub>0,5</sub>».

#### **4. Effetti genotossici nelle cellule buccali dei bambini**

Nella stagione invernale, il 52,7% dei bambini ha mostrato di avere almeno un micronucleo nelle cellule della mucosa buccale (valore medio: 0,44 MN/1000 cellule). Si osserva tuttavia una bassa correlazione tra i livelli di micronuclei rilevati nella stagione invernale e quelli rilevati in primavera negli stessi bambini.

Confrontando i bambini delle 5 città, si nota che quelli di Brescia hanno in media un maggior numero di micronuclei rispetto agli altri (0,56 MN/1000 cellule). Seguono i bambini di Pisa (0,50 MN/1000 cellule), Perugia, Torino e Lecce (0,41, 0,39 e 0,32 MN/1000 cellule, rispettivamente). In primavera, si osserva un dimezzamento dell'effetto biologico in tutte le città (valore medio: 0,22 MN/1000 cellule) con una diminuzione anche della percentuale di bambini con almeno un micronucleo nelle cellule buccali (35,9%).

Applicando modelli avanzati di analisi statistica multivariata, si è visto che i livelli di alcuni inquinanti (benzene, PM<sub>2,5</sub>, ozono, SO<sub>2</sub> e IPA) sono associati alla frequenza di micronuclei nelle cellule dei bambini. In particolare, l'incremento del rischio di avere micronuclei nelle cellule buccali per l'aumento di una unità di inquinante è: 20,1% per il benzene (1 µg/m<sup>3</sup>), 1,1% per il PM<sub>2,5</sub> (1 µg/m<sup>3</sup>), 1,3% per l'ozono (1 µg/m<sup>3</sup>), 4,2% per l'SO<sub>2</sub> (1 µg/m<sup>3</sup>) e 1,7% per gli IPA nel PM<sub>0,5</sub> (1 ng/m<sup>3</sup>), pur nei limiti di incertezza delle stime dovute alla elevata variabilità del fenomeno.

L'importanza relativa di questi inquinanti dipende, inoltre, dalla variabilità delle concentrazioni nelle diverse città.

Infine, si è visto che l'esposizione a fumo passivo e il sovrappeso nei bambini tendono ad aumentare il rischio di avere micronuclei, mentre l'alimentazione sana tende a diminuirlo.

«Lo studio ha confermato la sensibilità del test del micronucleo, che è risultato in grado di evidenziare effetti biologici in associazione ai livelli di alcuni inquinanti aerodispersi – spiega il prof. Massimo Moretti dell'Università di Perugia –. In particolare, si è osservato un livello sensibilmente maggiore di micronuclei nella stagione invernale rispetto a quella primaverile, e sostanziali differenze tra le diverse realtà geografiche».

## **5. Attività educative**

«Il progetto MAPEC\_LIFE – racconta la prof. Annalaura Carducci, dell'Università di Pisa – è stato anche l'occasione per parlare nelle scuole dell'inquinamento atmosferico, dei suoi effetti sulla salute e degli stili di vita sani, con un progetto didattico che ha prodotto schede per gli insegnanti e videogames per i bambini. Tutto questo materiale è scaricabile liberamente dal sito internet del progetto ([www.mapec-life.eu](http://www.mapec-life.eu)). L'interesse suscitato e l'efficacia delle attività intraprese dimostrano l'importanza dell'educazione su questi temi fin dalla scuola primaria».

## **Conclusioni**

Il presente studio ha evidenziato la capacità della frazione ultrafine del particolato atmosferico (PM<sub>0,5</sub>) di indurre effetti tossici, mutageni e cancerogeni, se pur modesti, nelle cellule trattate in laboratorio.

L'effetto biologico precoce, evidenziato nelle cellule buccali dei bambini come presenza di micronuclei, è risultato essere associato a:

- stagione: l'effetto biologico misurato in inverno è sensibilmente maggiore rispetto alla primavera;
- città: i bambini di Brescia hanno mostrato l'effetto maggiore, seguiti da quelli di Pisa, Perugia, Torino e Lecce, nell'ordine;
- concentrazione di benzene, PM<sub>2,5</sub>, ozono, SO<sub>2</sub> e IPA: l'aumento di questi inquinanti è risultato moderatamente associato ad un aumento di micronuclei nelle cellule dei bambini;
- caratteristiche dei bambini: l'alimentazione sana ha mostrato di

attenuare l'effetto, mentre l'esposizione a fumo passivo e il sovrappeso di aggravarlo.

Nel considerare questi risultati, va tenuto presente che la stagione invernale 2014-2015 è stata caratterizzata da un livello medio di inquinanti aerodispersi relativamente basso, rispetto agli anni precedenti, probabilmente a causa di temperature miti ed elevata piovosità. Pertanto, è possibile che l'effetto biologico presente in altre stagioni invernali sia superiore rispetto a quello misurato nel presente studio.

«Lo studio MAPEC\_LIFE rappresenta il primo grande studio multicentrico sugli effetti biologici precoci degli inquinanti aerei sulle cellule buccali dei bambini di 6-8 anni – spiega il prof. Francesco Donato, dell'Università degli Studi di Brescia, responsabile scientifico del progetto – Pertanto, i risultati dello studio MAPEC\_LIFE non sono confrontabili con quelli delle altre ricerche condotte fino ad oggi nel mondo sugli effetti biologici dell'inquinamento atmosferico, perché queste ultime, per lo più di piccole dimensioni, sono state effettuate con metodiche diverse e su soggetti di età diversa».

«In conclusione – sottolinea il Prof. Gelatti – il livello dei marcatori biologici da noi studiati è risultato moderatamente associato alle concentrazioni di alcuni inquinanti aerei e ad altri fattori e può essere un indicatore di possibili, futuri, effetti nocivi alla salute. Tali effetti, alla luce delle attuali conoscenze, sono evidenziabili a livello di popolazione, ma non sono predittivi di insorgenza di patologie nel singolo individuo».