

## PROGETTO SIGNUM



*S* tudio

*I* mpatto

*G* enotossico

*N* elle

*U* nità

*M* ilitari

17 gennaio 2011

# Progetto SIGNUM

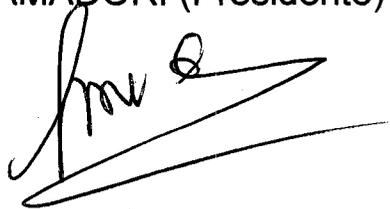
(Studio sull'Impatto Genotossico Nelle Unità Militari)

## Relazione finale

A cura del Comitato Scientifico:

- Ten. Gen. Michele DONVITO
- Magg. Gen. (a) Michele ANACLERIO
- Prof. Martino GRANDOLFO
- Prof. Sergio CAROLI, Dott.ssa Marina PATRIARCA
- Dott. Arduino VERDECCHIA, Dott. Riccardo CAPOCACCIA, Dott.ssa Roberta DE ANGELIS
- Prof. Bruno DALLAPICCOLA, Dott. Antonio NOVELLI
- Prof. Stefano BONASSI
- Dott.ssa Claudia BOLOGNESI
- Prof.ssa Lucia MIGLIORE
- Prof. Alberto IZZOTTI
- Col. Florigio LISTA
- Col. Vincenzo LA GIOIA

Prof. Sergio AMADORI (Presidente)



17 gennaio 2011

**Executive summary**

Il progetto di ricerca “SIGNUM”, acronimo di **S**tudio di **I**mpatto **G**enotossico **N**elle **U**nità **M**ilitari, è stato promosso dal Ministro della Difesa nel 2004 al fine di identificare possibili fattori di rischio a carico della popolazione militare impegnata nell’Operazione “Antica Babilonia” in teatro iracheno. La scelta dell’Iraq e’ stata giustificata dall’impiego significativo di munizionamenti contenenti uranio impoverito oltre che dalla presenza di insediamenti industriali a rischio di inquinamento ambientale.

Nelle aree di operazioni militari la valutazione del rischio associato a questi fattori può essere difficoltosa sia per le basse concentrazioni dei contaminanti, sia per la presenza di esposizioni multiple. Pertanto, ad integrazione del monitoraggio di aria, acqua, terreno e delle condizioni climatiche, si è ritenuto utile valutare i marcatori biologici di esposizione e di effetto precoce nella popolazione militare impiegata in Iraq..

L’esposizione ad uranio impoverito, ad altri agenti genotossici ed i conseguenti effetti biologici sono stati valutati tramite biomarcatori, i quali *“...offrono vantaggi senza uguali per la valutazione dell’esposizione genotossica in ambienti a contaminazione complessa. Essi infatti sono indici altamente sensibili di esposizione individuale, dato che forniscono una stima dalla dose interna, si correlano a tutte le vie di esposizione ed integrano una gran varietà di fonti di esposizione..... L’uso dei marcatori biologici di esposizione può migliorare il processo di risk assessment, offrendo una correlazione critica fra l’esposizione, la dose interna e il danno biologico”* (IPCS, WHO, 2000)

Lo studio, è stato articolato in due fasi distinte, una di valutazione dell’esposizione a xenoelementi potenzialmente genotossici – oggetto della presente relazione – ed una di sorveglianza clinico-epidemiologica, finalizzata a valutare la presenza di effetti a lungo termine (*follow-up* di almeno 10 anni, con controlli clinico-laboratoristici).

Il protocollo dello studio, approvato dal Comitato Etico della Direzione Generale della Sanità Militare prevedeva il confronto fra i valori dei biomarcatori in studio al tempo T0, prima cioè della partenza, ed al tempo T1, alla fine della permanenza in teatro operativo (3 mesi).

Sono stati prescelti biomarcatori di esposizione di tipo diretto, ovvero dosaggi analitici di uranio e suoi isotopi, arsenico, cadmio, molibdeno, nichel, piombo, vanadio, tungsteno, zirconio in urine, siero, capelli, e di tipo indiretto, quali addotti e addotti post-ossidativi al

DNA, micronuclei, aberrazioni cromosomiche e transriarrangiamenti, valutati nei linfomonociti del sangue.

La popolazione coinvolta è stata di 982 militari, dispiegati in teatro operativo iracheno fra il 2004 ed il 2005. Il campione in studio è stato stratificato in base ad età, area di nascita e tipologia di impiego per essere rappresentativo dell'intero contingente. La partecipazione a tutte le fasi del progetto è stata volontaria.

Per tutti gli individui in studio sono state raccolte informazioni dettagliate su possibili esposizioni confondenti, incluso stile di vita, dieta, fumo, anamnesi patologica, altre esposizioni a genotossici e vaccinazioni. Campioni biologici (sangue, urine, capelli), sono stati prelevati sul territorio nazionale, prima dell'impiego (T0), e presso un laboratorio attrezzato *ad hoc* in Iraq, al termine della missione (T1).

I risultati prodotti dal progetto SIGNUM sono stati integrati con i dati del monitoraggio ambientale e climatologico riferiti all'area circostante i campi delle truppe nazionali ("White Horse", "Camp Mittica"). Tali dati non hanno evidenziato contaminazioni significative dovute ad uranio o ad altri agenti genotossici, mentre hanno rilevato un'esposizione all'irraggiamento solare notevolmente superiore a quella presente sul territorio nazionale.

Lo studio ha evidenziato una significativa riduzione della concentrazione totale di uranio campionata nelle urine e nel siero nel periodo post-missione (T1) rispetto al periodo pre-impiego (T0). I livelli di concentrazione totale di U misurati nel gruppo in studio sono risultati estremamente ridotti, al punto da rendere inattendibile – nelle urine e nel siero – l'esame analitico del rapporto di specie isotopica. Tali concentrazioni non supportano ragionevolmente l'ipotesi di un'esposizione a U impoverito durante il periodo di missione in esame, coerentemente con il risultato del monitoraggio ambientale. Per quanto riguarda gli altri xenoelementi investigati, sono stati osservati modesti incrementi statisticamente significativi nelle concentrazioni di cadmio, molibdeno, nichel e zirconio, mentre decrementi, parimenti statisticamente significativi, sono stati osservati per arsenico, piombo, tungsteno e vanadio. Tali variazioni, di limitata importanza sotto il profilo tossicologico (i livelli medi e mediani di concentrazione riscontrati rientrano all'interno degli intervalli riportati nella letteratura come normali per le popolazioni non esposte professionalmente), possono essere verosimilmente ascritte a cambiamenti nelle abitudini di vita ed alimentari tra le condizioni pre-impiego e post-impiego.

L'analisi della frequenza di addotti al DNA, biomarcatore del legame fra molecole genotossiche e DNA, ha evidenziato l'assenza di esposizione a specifici inquinanti genotossici, confermando i risultati del monitoraggio ambientale. L'analisi del carico di natura ossidativa sul DNA linfocitario ha rivelato modesti incrementi, inferiori di alcuni ordini di grandezza ai valori indotti da inquinanti noti (fumo, esposizioni occupazionali). In particolare tale incremento è associato ad attività outdoor (soprattutto pattugliatori) e vaccinazioni in numero maggiore di 5 o con vaccini vivi attenuati. Questo risultato potrebbe costituire un fenomeno adattativo al carico funzionale indotto dall'attività psico-fisica correlata all'attività di pattugliatore, dalle condizioni climatiche ed al conferimento di immunità protettiva specifica indotta dai cicli vaccinali.

Il confronto delle frequenze di cellule micronucleate osservate nella popolazione totale a T0 e T1 rivela un aumento significativo a fine missione pari al 18% - in particolare nei gruppi che svolgevano prevalentemente attività esterna (conduttori, pattugliatori) – anche se i valori medi sono compresi nell'intervallo dei valori riportati per popolazioni non occupazionalmente esposte di pari età e sesso. Tali incrementi non sono associati ad esposizioni a inquinanti ambientali, anche per quei soggetti che hanno evidenziato gli incrementi più marcati delle concentrazioni di xenoelementi.

Lo studio della frequenza delle aberrazioni cromosomiche non ha mostrato alcun incremento associato alla permanenza in teatro operativo; al contrario la frequenza di rotture cromatidiche appare significativamente diminuita nella popolazione esaminata al termine del dispiegamento (T1).

La quasi totalità dei soggetti esaminati per la frequenza di transriarrangiamenti riporta valori nei limiti fisiologici. Il numero assoluto di transriarrangiamenti dopo la missione (T1) non presenta differenze statisticamente significative rispetto ai valori pre-impiego (T0).

In conclusione:

- i valori di esposizione ad uranio ed altri xenoelementi si collocano all'interno degli intervalli di riferimento riportati in letteratura per popolazioni non esposte professionalmente;
- gli incrementi di concentrazione osservati per alcuni xenoelementi sono risultati di scarsa entità, di limitata rilevanza tossicologica e non associati a variazioni dei marcatori di effetto biologico precoce;

- la frequenza di tutti i marcatori di effetto biologico precoce è risultata all'interno degli intervalli di riferimento riportati in letteratura per popolazioni non esposte professionalmente;
- la frequenza di alcuni di questi biomarcatori (addotti al DNA, aberrazioni cromosomiche, transriarrangiamenti) è rimasta invariata o addirittura ridotta al termine della missione;
- la frequenza di alterazioni ossidative al DNA e di cellule micronucleate è risultata incrementata al termine della missione, in particolare per i soggetti a prevalente attività outdoor o sottoposti a vaccinazioni in numero superiore a 5 o con vaccini viventi attenuati. Tale incremento, non riferibile ad esposizione a specifici xenoelementi, è verosimilmente riconducibile a fenomeni adattativi al carico funzionale psico-fisico (fotoesposizione, stress operativo, incremento dell'attività fisica, alterazione dei ritmi sonno-veglia, immunità specifica).

I risultati conclusivi del progetto "SIGNUM" suggeriscono l'opportunità di procedere con ulteriori studi mirati ad approfondire il ruolo di alcune variabili, emerse nel corso dello studio, quali stile di vita, carico vaccinale e condizioni di impiego operativo, nell'induzione di eventi biologici precoci. Nel frattempo potrebbe essere ragionevole considerare l'opportunità di adottare provvedimenti orientati a contrastare tali eventi, per esempio tramite il ricorso a modifiche delle abitudini di vita (dieta ricca di frutta e verdura fresca), a misure precauzionali per tutte le attività outdoor (fotoprotezione), ed al possibile uso di agenti antiossidanti.

La conduzione del *follow up* attualmente in corso sulla popolazione in studio, pianificato nel protocollo in forma di visite mediche e di accertamenti strumentali periodici, offre un ulteriore strumento per monitorare i vari parametri sanitari ed epidemiologici a lungo termine.

## **INDICE**

<b>I. INTRODUZIONE .....</b>	<b>12</b>
<b>II. COMITATO SCIENTIFICO .....</b>	<b>14</b>
<b>III. ARCHITETTURA DEL PROGETTO.....</b>	<b>15</b>
<b>IV. ASPETTI ETICI.....</b>	<b>19</b>
<b>V. GLOSSARIO .....</b>	<b>20</b>
<b>VI. RAZIONALE DELLO STUDIO.....</b>	<b>25</b>
1.Aspetti generali.....	25
2.Uranio impoverito: proprietà' chimico-fisiche ed effetti sanitari .....	34
3.Elementi di rilevanza tossicologica.....	44
4.Biomarcatori di esposizione e di effetto precoce .....	48
<b>VII. MATERIALI E METODI DELLO STUDIO .....</b>	<b>50</b>
1. Aspetti generali.....	50
a. Popolazione in studio .....	50
b. Campione – Dimensione e potenza statistica.....	50
c. Campionamento (T0) Pre- e (T1) Post-Impiego. Aspetti organizzativi ed esecutivi .....	53
2. Aspetti tecnici di dettaglio (vds Allegato A – Materiali e Metodi).....	60
<b>VIII. BASI DI DATI E ANALISI STATISTICHE.....</b>	<b>61</b>
2.Dati analizzati.....	62
a. File storico/anamnestico.....	62
b. Xenoelementi nelle urine .....	64
c. Xenoelementi nel siero.....	64
d. Rapporto isotopico dell'uranio.....	64
e. Alterazioni del DNA.....	64
f. Micronuclei .....	65
g. Aberrazioni cromosomiche .....	65
h. Transriarrangiamenti.....	66
3.Analisi statistiche .....	67
a. Analisi univariate .....	67
b. Analisi stratificate .....	67
c. Analisi delle correlazioni.....	68
4.Caratteristiche dei soggetti partecipanti e numerosità dei campioni disponibili.....	68
<b>IX. RAPPORTI DELLE UNITA' OPERATIVE.....</b>	<b>72</b>

<b>X. DOSAGGIO DI U, SUOI ISOTOPI, ED ALTRI XENOELEMENTI IN URINE, SIERO, CAPELLI .....</b>	<b>73</b>
1.Introduzione e rationale del saggio .....	74
2.Risultati .....	75
a. Intervalli di riferimento per gli xenoelementi in esame, nelle varie matrici biologiche.....	75
b. Numerosità dei campioni e misurazioni effettuate.....	75
3.Risultati del dosaggio degli xenoelementi in urine e siero.....	76
3.1 <i>Elementi con concentrazioni incrementate in media tra T0 e T1</i> .....	77
3.2 <i>Elementi con concentrazioni mediamente ridotte tra T0 e T1</i> .....	79
3.3 <i>Associazione con i biomarcatori di impatto genotossico (micronuclei e DNA)</i> .....	81
5.Concentrazione di elementi e rapporto isotopico uranio nei campioni di capelli.....	93
6.Criticità .....	94
7.Conclusioni .....	99
<b>XI. ANALISI DI BIOMARCATORI MOLECOLARI DI IMPATTO GENOTOSSICO E SUSCETTIBILITA' GENETICA.....</b>	<b>104</b>
1. Introduzione .....	105
2.Studio A. Addotti al DNA .....	106
a. Introduzione .....	106
b. Risultati .....	107
c. Discussione.....	111
3.Studio B. Alterazioni ossidative al DNA.....	113
a. Introduzione .....	113
c. Discussione.....	117
4.Studio C. Analisi di polimorfismi genetici .....	119
a. Introduzione .....	119
b. Risultati .....	121
c. Discussione.....	125
4.Discussione analitica dei risultati ottenuti .....	128
5.Conclusioni .....	134
<b>XII. RICERCA DI MICRONUCLEI IN LINFOCITI PERIFERICI .....</b>	<b>136</b>
1.Introduzione .....	137
2.Risultati .....	141
a. Struttura di Cancerogenesi Ambientale dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova .....	141
b. Sezione di Genetica del Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente di Pisa.....	144
c. Risultati aggregati dei laboratori di Genova e di Pisa .....	148
3.Discussione e conclusioni .....	160

<b>XIII. RICERCA DI ABERRAZIONI CROMOSOMICHE IN LINFOCITI PERIFERICI .....</b>	<b>165</b>
1.Introduzione .....	166
2.Tipologia delle Aberrazioni Cromosomiche .....	167
a. Aberrazioni strutturali cromosomiche.....	167
b. Aberrazioni strutturali cromatidiche.....	168
3.Risultati .....	170
4.Discussione .....	170
5.Conclusioni .....	171
<b>XIV. RICERCA DEI TRANSRIARRANGIAMENTI VGAMMA-JBETA IN LINFOCITI PERIFERICI.....</b>	<b>174</b>
1.Introduzione .....	175
b.Risultati e Discussione .....	178
c.Conclusioni .....	181
<b>XV. VALUTAZIONE AMBIENTALE DELLE POSSIBILI FONTI DI ESPOSIZIONE .....</b>	<b>183</b>
1.Dati ambientali.....	184
a. Caratteristiche naturali ed antropiche dell'ambiente operativo. Generalità.....	184
b. Zone di interesse .....	184
1) Aree di dispiegamento.....	184
2) Aree di rischio potenziale .....	185
2.Monitoraggio della contaminazione chimica, fisica e biologica nell'ambiente operativo.....	190
3.Risultati del monitoraggio ambientale radiologico, chimico e biologico.....	197
4.Fattori ambientali concorrenti – Aspetti meteo-climatici.....	200
<b>XVI. CONCLUSIONI .....</b>	<b>201</b>
1.Xenoelementi .....	201
2.Addotti e stress ossidativo .....	202
3.Micronuclei.....	202
4.Aberrazioni cromosomiche in linfociti periferici.....	203
5.Transriarrangiamenti V $\gamma$ - J $\beta$ in linfociti periferici.....	203
<b>XVII. CONCLUSIONI GENERALI .....</b>	<b>204</b>

**ALLEGATI**

- A. Materiali e Metodi;
- B. Master file del database utilizzato per l'analisi dei dati del progetto "SIGNUM" (solo su supporto informatico);
- C. Documentazione varia inerente al monitoraggio ambientale dell'area di An Nasiriyah effettuato nel periodo 2003 – 2006 da vari Enti militari (7° RGT NBC "Cremona"; CeTLI, CISAM) (solo su supporto informatico).

**APPENDICI ALL'ALLEGATO "A"**

- 1. Protocollo di campionamento;
- 2. Programma di addestramento del personale militare laboratorista;
- 3. Criteri di codifica della variabile "campo di impiego";
- 4. Valori di riferimento per xenoelementi nella popolazione generale, per esposizioni professionali o conseguenti allo stile di vita.

**ANNESI**

- I. Decreto del Ministro della Difesa datato 13 agosto 2004 per la nomina del Comitato scientifico del progetto "SIGNUM";
- II. Parere del Comitato Etico della Direzione Generale della Sanità Militare, espresso in data 26 aprile 2004 in esito a valutazione del progetto "SIGNUM";
- III. Prospetto informativo individuale illustrante caratteristiche e finalità del progetto "SIGNUM";
- IV. Scheda anamnestico-informativa individuale per i partecipanti al progetto "SIGNUM";
- V. Diario individuale del progetto "SIGNUM";
- VI. Rapporto di fotoannotazione dell'area di An Nasiriyah prodotto da Stato Maggiore della Difesa RIS-CII;
- VII. Documentazione "IRAQ" 2003 – 2006 – Parte A, Area di Nassiriyah, prodotta da CISAM, in merito ai rilievi ambientali radiometrici;
- VIII. Documentazione "IRAQ" 2003 – 2006 – Parte B Area di Nassiriyah, prodotta da CISAM, in merito ai rilievi ambientali radiometrici;
- IX. Controllo della radioattività nel particolato atmosferico mediante impiego di filtri di automezzi, prodotto da CISAM;
- X. Rapporto di valutazione meteo-climatica dell'area di An Nasiriyah prodotto da CNMCA.

## **I. INTRODUZIONE**

Il progetto “SIGNUM” finanziato con la Legge del 12 marzo 2004, n. 68 e la Legge n. 208 del 30 luglio del medesimo anno, acronimo della corrispondente definizione: **Studio di Impatto Genotossico Nelle Unità Militari**, è nato in seguito alle raccomandazioni espresse in seno alla relazione finale prodotta dalla Commissione di indagine costituita dal Ministero della Difesa nel 2000, presieduta dal prof. Mandelli, al fine di accertare le cause delle patologie tumorali di varia natura riscontrate nei militari italiani reduci da attività operative nei Balcani. In particolare la citata Commissione suggeriva di allargare il campo delle ricerche ed effettuare maggiori approfondimenti sulle possibili cause delle neoplasie in argomento, promovendo un ulteriore studio su tali fenomeni patologici.

Il Ministro della Difesa, accogliendo tali raccomandazioni, ha approvato pertanto nel 2004 un progetto di ricerca, promosso inizialmente dal prof. Mandelli e dalla Direzione Generale della Sanità Militare, dandone pubblica informazione con un comunicato-stampa del 13 febbraio 2004.

Il progetto, nella proposta iniziale, prevedeva unicamente lo studio delle urine dei militari destinati all’impiego in Iraq, al fine di valutare un eventuale esposizione ambientale ad uranio impoverito (DU)<sup>1</sup>. Tale disegno, basato sul dosaggio di questo elemento nelle urine prelevate **prima e al termine** dell’impiego in area di operazione, è stato arricchito di ulteriori aree di indagine, delineate a cura della Sanità militare.

Il progetto di ricerca è stato infatti finalizzato a meglio identificare i possibili fattori di rischio presenti in aree di operazioni, ricorrendo alla **valutazione di marcatori biologici di esposizione e di effetto precoce sugli individui potenzialmente esposti**. Tale approccio permette di tenere in considerazione la complessità delle interazioni ambientali fra fattori naturali ed antropici, altrimenti non agevolmente valutabile.

Infatti lo studio è stato disegnato allo scopo di valutare:

1. la presenza di esposizione a DU (o altri elementi genotossici noti);
2. il rischio di tumore in base alla variazione delle frequenza del marcatore studiato.

Per lo sviluppo e la conduzione di tale iniziativa sono state chiamate a concorrere prestigiose Istituzioni nazionali, di rilievo scientifico, civili e militari, quali<sup>2</sup>:

---

<sup>1</sup> Depleted Uranium

<sup>2</sup> Le Istituzioni civili sono riportate in ordine alfabetico.

- Istituto CSS Mendel di Roma;
- Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova
- Istituto Superiore di Sanità;
- Università di Genova;
- Università di Pisa;
- Centro Studi e Ricerche di Sanità e Veterinaria dell'E.I..

La gestione scientifica e il coordinamento di questa attività di ricerca è stata affidata ad un Comitato scientifico, nominato formalmente dal Ministro con decreto in data 13 agosto 2004 (Annesso I).

Tale Comitato, i cui membri designati avevano avviato le attività propedeutiche alla stesura del protocollo e alla definizione delle iniziali procedure operative prima della nomina formale ministeriale, è presieduto dal Prof. Sergio Amadori, Direttore dell'Istituto di Ematologia dell'Università di Tor Vergata - Roma, al quale è stato associato, in veste di osservatore, anche un rappresentante individuato dal COCER Difesa.

## **II. COMITATO SCIENTIFICO**

Il Comitato scientifico è stato istituito per la gestione tecnico-scientifica del progetto “SIGNUM” e per la produzione della **relazione conclusiva relativa all’assessment dell’esposizione e dei suoi effetti precoci**.

Al Comitato sono stati chiamati a partecipare esperti di comprovata professionalità medico-scientifica nei settori di indagine del progetto, nonché rappresentanti della Sanità militare.

Compiti del Comitato:

1. coordinare le attività degli Enti militari e delle Istituzioni civili di ricerca coinvolte nel progetto “SIGNUM” al fine di pervenire all’accertamento dei livelli di uranio e di altri elementi potenzialmente tossici eventualmente presenti in matrici biologiche prelevate da militari impiegati nelle Operazioni Internazionali;
2. individuare, in base ai risultati delle analisi e alle conseguenti attività di studio, eventuali situazioni espositive idonee a costituire fattori di rischio per la salute umana.

Il Comitato ha avuto la possibilità di avvalersi esperti, anche estranei alla Difesa, all’uopo autorizzati dal Ministro competente.

Per gli aspetti tecnico-operativi e per il coordinamento degli Enti militari, il Comitato si è avvalso di una *task force* appositamente istituita dallo Stato Maggiore della Difesa e diretta dal coordinatore, C.A. Mario Tarabbo.

Completata la fase di raccolta ed elaborazione dei dati, si è provveduto alla nomina di un “*writing committee*”, costituito prioritariamente dai responsabili delle varie UU.OO., deputato alla stesura della relazione finale.

I componenti del Comitato, il cui elenco è riportato nel decreto di nomina sono stati vincolati al segreto di ufficio riguardo alle questioni emerse nel corso delle attività di ricerca.

### III. ARCHITETTURA DEL PROGETTO

Il progetto SIGNUM è stato condotto sulla popolazione militare impegnata nell'Operazione "Antica Babilonia" in teatro iracheno.

Fonti ufficiali hanno riportato un impiego significativo (non meno di 300 ton.) di munizionamenti a DU nel corso della Guerra del Golfo del 1991, oltre alla presenza di insediamenti industriali ad alto rischio di inquinamento ambientale, motivo per il quale l'area in parola è stata ritenuta particolarmente significativa per le finalità progettuali.

Inoltre la tipologia dell'impegno operativo garantiva una sufficiente popolazione reclutabile ed anche i tempi della permanenza in Te. Op. erano compatibili con uno studio basato sulla valutazione di biomarcatori di esposizione e di effetto precoce.

Lo studio, sin dall'inizio, è stato concepito sulla base di una volontaria adesione di militari appartenenti ad un contingente nazionale di rotazione destinato al Te. Op. iracheno.

A fronte della volontarietà di adesione, comunque, nell'intento di assicurare la massima validità dei risultati attesi, il disegno dello studio ha previsto criteri di selezione della popolazione mirati a garantire l'identificazione di un campione il più possibile rappresentativo dell'intero contingente, applicando alcune variabili di stratificazione.

Queste variabili consistevano in:

- età;
- area di nascita;
- tipologia di impiego.

La numerosità auspicata per il campione arruolato, sulla base della distribuzione dei vari biomarcatori e dell'effetto atteso, è stata di circa 1000 individui (su un contingente di circa 3.000 militari dispiegati nel Teatro Operativo).

Lo studio è stato articolato su due distinte fasi.

1. Una fase di *assessment* dell'esposizione basata su:

- identificazione e quantificazione dell'esposizione a genotossici ambientali, la cui possibile presenza nel Te. Op. era suggerita dalla pubblicistica di settore/analisi ambientali,
- rilevazione e misurazione degli effetti biologici precoci a carico degli acidi nucleici e dei cromosomi, potenzialmente associati alle esposizioni sopraccitate

e/o ad altri agenti genotossici legati, direttamente o indirettamente, alle attività operative. La frequenza dei biomarcatori di esposizione e di effetto biologico precoce è stata anche valutata in funzione dei polimorfismi dei principali sistemi di riparazione del DNA e di difesa dal danno ossidativo

2. Una fase clinico-epidemiologica finalizzata a valutare la presenza di effetti a lungo termine conseguenti alla permanenza nel Teatro Operativo ed, in particolare, un eventuale aumento del rischio di cancro o di altre patologie cronico-degenerative, nonché valutazioni di mortalità specifica per causa. Per condurre questa fase dello studio è quindi prevista una sorveglianza sanitaria nel tempo della coorte in esame (*follow-up* di almeno 10 anni, con controlli clinico-laboratoristici volontari, eseguiti a cadenza annuale, per la verifica dello stato di salute).

In maggior dettaglio, la fase di *assessment* consiste in:

- dosaggio diretto di **xenoelementi** potenzialmente tossici (**uranio e suoi isotopi, arsenico, cadmio, molibdeno, nichel, piombo, vanadio, tungsteno, zirconio**), mediante metodiche spettrofotometriche quantitative, condotte a cura dell'Istituto Superiore di Sanità, capaci di individuare anche limitate esposizioni a fonti inquinanti e possibili indicazioni su fenomeni di accumulo nel tempo dei medesimi elementi.
- esplorazione, per il tramite di **biomarcatori su campioni biologici**, di possibili impatti sul patrimonio genetico di ogni individuo. In particolare sono stati oggetto di indagine:
  - **addotti e addotti post-ossidativi al DNA** delle cellule, nonché determinazione dei polimorfismi genici dei sistemi di riparazione del danno al DNA, naturalmente presenti nelle cellule di ogni individuo valutati su *linfomonociti*, a cura del Dipartimento di Scienze della Salute dell'Università di Genova;
  - **micronuclei** cellulari, valutati su *linfomonociti* del sangue, a cura della Struttura semplice di Cancerogenesi ambientale dell'Istituto Ricerca sul Cancro di Genova e del Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente dell'Università

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

di Pisa, congiuntamente impegnati – data l'alta numerosità del campione e la complessità della metodica;

- **aberrazioni cromosomiche**, su *linfomonociti* del sangue a cura dell'Istituto CSS Mendel di Roma;
- **transriarrangiamenti** su *linfomonociti* del sangue, a cura del Centro Studi e Ricerche di Sanità e Veterinaria dell'E.I..

Una visione sinottica dei marcatori valutati pre- e post-dispiegamento nonché delle matrici nelle quali sono state effettuate le determinazioni, è riportata nella tabella di seguito riportata.

PRE-DISPIEGAMENTO				POST-DISPIEGAMENTO			
MATRICI	INDICI DIRETTI	INDICI INDIRETTI		MATRICI	INDICI DIRETTI	INDICI INDIRETTI	
		DOSIMETRIA CITOGEN.	DANNO OSSIDATIVO			DOSIMETRIA CITOGEN.	DANNO OSSIDATIVO
CAPELLI	U, Mo, Cd, As, Zr, Ni, Pb, V, W <sup>1</sup>			CAPELLI	U, Mo, Cd, As, Zr, Ni, Pb, V, W		
URINE	U, Mo, Cd, As, Zr, Ni, Pb, V, W			URINE	U, Mo, Cd, As, Zr, Ni, Pb, V, W		
SIERO	U, Mo, Cd, As, Zr, Ni, Pb, V, W			SIERO	U, Mo, Cd, As, Zr, Ni, Pb, V, W		
LINFOM			ADDOTTI OX + POLIMORF. DNA-REPAIR	LINFOM			ADDOTTI OX + POLIMORF. DNA-REPAIR
LINFOM		MICRONUCLEI TRANSARR.		LINFOM		MICRONUCLEI TRANSARR.	
LINFOM		ABERR. CROM (10% campione)		LINFOM		ABERR. CROM (10% campione)	

Il campionamento preliminare all'impiego del personale in Te.Op. è stato effettuato sull'intero territorio nazionale da *team* militari di prelievo in 3 diverse campagne (agosto, ottobre, novembre 2004).

La realizzazione in Te.Op. di un laboratorio attrezzato *ad hoc* e la dislocazione di personale militare addestrato ha permesso di condurre *in loco* le attività di campionamento e di primo processamento delle matrici prelevate a conclusione del periodo di dispiegamento, nei mesi di novembre-dicembre 2004 e gennaio-febbraio 2005.

Le matrici biologiche utilizzate per lo studio in parola sono state:

- urine (50 ml.);
- sangue (50 ml.), dal quale sono stati separati siero, cellule ed acidi nucleici;
- capelli (300 mg. circa).

Un **controcampione di ogni matrice biologica disponibile**, cioè un secondo campione di ciascuno dei materiali raccolti, è stato prodotto mediante frazionamento di ogni prelievo effettuato prima della partenza (T0) e prima del rientro dall'area di operazioni (T1), per la successiva conservazione almeno trentennale sotto responsabilità della Sanità militare.

I controcampioni sono funzionali ad assicurare la possibilità di eseguire, in tempi successivi, eventuali ulteriori accertamenti, previa conferma di adesione individuale allo studio.

#### **IV. ASPETTI ETICI**

Il protocollo dello studio, presentato dal prof. Franco Mandelli al Comitato Etico della Direzione Generale della Sanità Militare nella riunione del 26 aprile 2004, è stato approvato nella stessa data con parere n. 1/04 (Annesso II).

Gli aspetti di rilevanza etica del protocollo, quali ad esempio l'anonimato dei risultati relativi alla sfera genetica di ogni partecipante, la riservatezza di ogni dato sanitario, il non utilizzo dei campioni per scopi o finalità estranee al progetto, il destino dei controcampioni conservati presso la Sanità militare nonché le condizioni di accesso ai medesimi, sono stati considerati adeguatamente, in accordo alle indicazioni del Comitato, e rappresentati ai singoli partecipanti nel prospetto informativo (Annesso III) che accompagnava il modulo di consenso informato, sottoscritto da tutti gli aderenti allo studio (Annesso IV, scheda anamnestico-informativa individuale, contenente la registrazione del consenso).

**V. GLOSSARIO**

- **Aberrazioni strutturali cromatidiche** = sono rotture che coinvolgono un solo cromatidio. Si osservano in cellule esposte all'agente mutageno durante la fase G2 o S del ciclo cellulare, cioè quando il DNA è già stato duplicato ed il danno permane solo su un filamento;
- **Aberrazioni strutturali cromosomiche** = le aberrazioni cromosomiche sono rotture che coinvolgono entrambi i cromatidi fratelli costituenti un cromosoma;
- **Addotto al DNA** = aliquota di una sostanza genotossica che, superate le difese dell'organismo, riesce a legarsi al DNA. E' pertanto anche definito come dose molecolare efficace;
- **As** = arsenico;
- **Buds** (o estroflessioni) = evaginazioni nucleari caratterizzate dalla stessa struttura dei micronuclei ma collegati al nucleo principale, considerate come biomarcatori di amplificazione genica;
- **Citocalasina** = tossina prodotta da alcuni mixomiceti che interferisce con la polimerizzazione dell'actina nei microfilamenti bloccando la citodieresi;
- **Citodieresi o citocinesi** = processo finale della mitosi e della meiosi che permette la divisione fisica del materiale cellulare. Avviene a conclusione della telofase e ha come risultato la formazione di due cellule figlie, a partire da una unica cellula madre;
- **Cd** = cadmio;
- **Cps** = conteggi per secondo;
- **DRC-Q-ICP-MS** = Dynamic Reaction Cell Quadrupole Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, cioè spettrometria a plasma induttivo-massa quadrupolare con cella dinamica di reazione;
- **DU** = uranio impoverito o depleto, dall'inglese Depleted Uranium;
- **Fase G0** = fase di stasi del ciclo cellulare;
- **Fitoemoagglutinina** = sostanza mitogena estratta dal fagiolo che stimola la proliferazione dei linfociti in coltura;

- **Genotipo** = indica per un gene l'esistenza di una situazione polimorfica nella popolazione con presenza di assetti più e meno funzionali. Nel caso di geni a funzione protettiva tali assetti configurano situazioni più o meno favorevoli dal punto di vista dell'omeostasi del DNA;
- **IAEA** = International Atomic Energy Agency;
- **ICRP** = International Commission on Radiological Protection (Commissione Internazionale per la Protezione Radiologica);
- **Interfase** = periodo che intercorre tra una mitosi cellulare e la successiva;
- **IRMM** = Institute of Reference Materials and Measurements (Commissione Europea);
- **Laboratorio Pulito di Classe 100** = laboratorio consistente di una precamera e di un laboratorio vero e proprio ad atmosfera controllata dove il numero massimo di particelle esogene presenti per piede cubo d'aria è garantito essere non più di 100, mentre in un laboratorio convenzionale può essere di alcuni milioni. Ciò consente di evitare ogni contaminazione dei campioni in analisi e quindi di preservarne il contenuto informativo iniziale. Ad esso si accede solo dopo aver indossato indumenti incontaminati monouso;
- **Linfociti e recettori specifici** = i linfociti sono cellule del sangue deputate alla funzione di difesa dagli agenti esterni attraverso la capacità di riconoscere in modo specifico costituenti estranei al nostro organismo e neutralizzarli e/o distruggerli. Tutti i linfociti quindi devono poter creare propri recettori deputati al riconoscimento specifico di molecole estranee. Esistono due tipi di recettori, quelli dei linfociti B (B cell receptors) e quelli dei linfociti T (T cell receptors). Tali recettori sono formati, nelle fasi precoci di maturazione della cellula linfocitaria, da segmenti genetici che accoppiandosi ne formano poi la struttura definitiva. Per i linfociti T questi segmenti genici sono le catene **alfa**, **beta**, **gamma** e delta. A loro volta ognuno di questi segmenti genici viene assemblato secondo un processo di ricombinazione di varie subunità denominate V (variability), D (diversity) e J (joining);
- **LOD** = Limit of Detection, limite di rivelabilità, ossia la più bassa quantità di un analita in un campione che può ancora essere attendibilmente distinta dal rumore di fondo. Si tratta di un parametro limite che indica se un analita è al di sopra o al di

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

sotto di un dato valore (di norma, un valore prestabilito del rapporto segnale-fondo pari a 2 o 3);

- **LOQ** = Limit of Quantification, limite di quantificazione, cioè la più bassa quantità di un analita che può essere determinata sotto condizioni operative prestabilite, normalmente pari ad un rapporto tra segnale e fondo di dieci);
- **µg/L** (microgrammi, cioè  $10^{-6}$ g, per litro) = unità di misura della concentrazione usata in alternativa a ng/l, cioè  $10^{-9}$ g per litro, a seconda delle necessità di immediatezza di lettura dei dati numerici;
- **Micronuclei** = i micronuclei rappresentano piccoli nuclei accessori morfologicamente identici al nucleo principale originati da frammenti cromosomici o da cromosomi interi che, ritardando la migrazione in anafase, restano esclusi dai nuclei principali durante la divisione cellulare;
- **Mo** = molibdeno;
- **MR** = Materiale di Riferimento;
- **MRC** = Materiale di Riferimento Certificato;
- **MW** = microwave, cioè microonde;
- **ng/l** (nanogrammi, cioè  $10^{-9}$ g per litro) = unità di misura della concentrazione, usata in alternativa a µg/l (µg, cioè  $10^{-6}$ g per litro) a seconda delle necessità di immediatezza di lettura;
- **Ni** = nichel;
- **NIST** = National Institute of Science and Technology (USA);
- **Ponti nucleoplasmatici (NPB)** = ponti di materiale nucleare evidenziabili tra i due nuclei nelle cellule binucleate originano da cromosomi dicentrici risultanti dalla errata riparazione del DNA e fusione dei telomeri;
- **8-oxo-dG** = è la più frequente alterazione di natura ossidativa presente nel DNA. Deriva sia dalla produzione endogena che dall'esposizione esogena in grado di indurre la produzione di specie reattive dell'ossigeno;
- **Particelle alfa** = forma di radiazione corpuscolare altamente ionizzante e con basso potere di penetrazione. Consistono di due protoni e due neutroni legati, cioè di nuclei di elio ( $^4\text{He}$ );
- **Particelle beta** = elettroni emessi da un nucleo radioattivo che decade;
- **Pb** = piombo;

- **Piroforicità** = proprietà di metalli, o di leghe metalliche, capace di dar luogo a scintille in seguito a strofinio o percosse;
- **Proliferazione cellulare (PI)** = capacità dei linfociti di duplicarsi in vitro;
- **Radiazione gamma** = radiazione elettromagnetica emessa da un nucleo instabile durante il suo decadimento;
- **Ricombinazione VDJ** = unico esempio nei vertebrati di ricombinazione genetica a carico di cellule non germinali. Una cellula che costituisce il nostro organismo cambia il suo assetto genetico durante il suo sviluppo. Tali cambiamenti sono portati a termine da una serie di reazioni enzimatiche e di sequenze genetiche capaci di essere riconosciute specificatamente da questi enzimi per “tagliare e cucire” segmenti genici contigui tra di loro. Normalmente le ricombinazioni tra segmenti genici avvengono all’interno degli stessi loci. Per esempio il frammento V del locus **beta** si unisce con il frammento J dello stesso locus **beta** e così via;
- **Rn** = radon
- **Rpm** = rotazioni per minuto;
- **SF-ICP-MS** = Sector Field Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, cioè spettrometria a plasma induttivo-massa a settore magnetico;
- **Transriarrangiamenti** = sono ricombinazioni che occorrono tra due segmenti genici che risiedono in loci diversi. Quando avvengono, possono essere anche funzionali e di per se non portando ad eventi francamente patologici. Sono normalmente presenti nel torrento circolatorio in numero molto esiguo. Per esempio il frammento V del locus **beta** si unisce con il frammento J del locus **gamma** e così via.
- **Uranio (U)** = è l’elemento chimico (U) più pesante presente in natura. Tutti i suoi isotopi (naturali e artificiali) sono radioattivi e presentano numeri di massa compresi fra 227 e 240. L’isotopo  $^{235}\text{U}$  è essenziale per la fissione nucleare, in cui per bombardamento neutronico si producono frammenti di fissione accompagnati da un rilascio d’energia;
- **Uranio arricchito** = prodotto del processo d’arricchimento in  $^{235}\text{U}$  necessario per gli utilizzi pacifici e militari dell’uranio;
- **Uranio impoverito (DU)** = Depleted Uranium, sottoprodotto del processo d’arricchimento in  $^{235}\text{U}$  necessario per gli utilizzi pacifici e militari dell’uranio;

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

- **V** = vanadio;
- **W** = wolframio o tungsteno;
- **WHO/OMS** = World Health Organization/Organizzazione Mondiale della Sanità, con sede a Ginevra (Svizzera);
- **Xenobiotico** = composto chimico estraneo all'organismo;
- **Zr** = zirconio.

## **VI. RAZIONALE DELLO STUDIO**

### **1. Aspetti generali**

L'acqua, il suolo e l'aria possono essere contaminati da diversi agenti genotossici, alcuni dei quali possono essere naturalmente presenti nell'ambiente, come metalli pesanti, As o Rn; altri invece sono il risultato di contaminazione ambientale su base antropica, principalmente dovuta all'industria, ma anche all'agricoltura (prodotti pesticidi, defolianti, diserbanti), con conseguenze spesso di lunga durata a causa della limitata biodegradabilità di tali sostanze.

I rischi per la salute umana possono pertanto essere di medio e di lungo termine, dovuti all'esposizione diretta alle matrici ambientali contaminate, o al consumo di prodotti della catena alimentare nei quali tali agenti possono concentrarsi.

I militari – al pari della popolazione civile – possono essere esposti alla contaminazione ambientale, spesso frequente nelle aree di operazioni ed inoltre possono risultare esposti a peculiari rischi per la salute, derivanti da esplosivi o munizioni, prodotti di combustione di idrocarburi, solventi di impiego militare etc., ugualmente contaminanti l'ambiente.

Si pone pertanto la necessità di delineare una valutazione del rischio ambientale operativo, in particolare finalizzato ad individuare l'impatto genotossico, compito particolarmente difficile nel caso di differenti contaminanti, differenti matrici, differenti vie e durate di esposizione.

La genotossicità rappresenta una caratteristica della maggior parte degli agenti cancerogeni, anche se non tutti gli agenti genotossici sono cancerogeni per l'uomo. L'individuazione dei rischi genotossici può essere ottenuta non solo attraverso la valutazione della genotossicità ambientale mediante test specifici in vitro<sup>3</sup> o mediante la complessa identificazione analitica di tutti i possibili agenti genotossici – primari e derivati – (fisici, chimici e biologici) presenti nelle matrici ambientali (aria, acqua, alimenti, terreno), ma anche attraverso lo studio degli *endpoint* genotossici negli individui esposti, rappresentati dai marcatori biologici di esposizione e di effetto precoce.

---

<sup>3</sup> Studi di genotossicità ambientale mediante test spesso sperimentali, con risultati non sempre estrapolabili per il rischio potenziale per l'uomo: quali, ad esempio, test di Ames, test su culture cellulari, etc.

Questi parametri rispecchiano l'avvenuta esposizione a mutageni noti o ignoti nel gruppo in studio, e rivelano la presenza di un conseguente impatto biologico mutageno.

In particolare, per ciò che concerne le aree di operazioni militari tali pericoli risultano difficilmente identificabili in via preliminare, potendo interagire in forma di "cocktail" complessi. Pertanto, a fronte di un difficile monitoraggio analitico **continuo e puntuale di tutte** le matrici ambientali (aria, acqua, terreno, alimenti) e di **tutti** i possibili parametri di pericolo presenti in una zona di interesse, si è ritenuto utile perseguire la **valutazione di marcatori biologici di esposizione e di effetto precoce sugli individui potenzialmente esposti**.

In particolare, secondo IPCS<sup>4</sup>, *"i marcatori biologici di esposizione offrono vantaggi senza uguali per la valutazione dell'esposizione genotossica in ambienti a contaminazione complessa. Essi infatti sono indici altamente sensibili di esposizione individuale, dato che forniscono una stima della dose interna, si correlano a tutte le vie di esposizione ed integrano una gran varietà di fonti di esposizione. Pertanto possono fornire una buona rappresentazione di passate esposizioni (ad esempio negli annessi cutanei, come capelli ed unghie), di recenti esposizioni a sorgenti esterne ed anche di sorgenti di esposizioni interne future (pesticidi nel tessuto adiposo, per esempio) .....L'uso dei marcatori biologici di esposizione può migliorare il processo di risk assessment, offrendo una correlazione critica fra l'esposizione, la dose interna e il danno biologico"*

La possibile esposizione ambientale ad agenti genotossici è stata pertanto studiata attraverso un confronto fra i valori al tempo T0, prima cioè della partenza, ed al tempo T1, alla fine cioè della permanenza nel Te.Op., di:

- elementi xenobiotici dosati nelle matrici biologiche (indici diretti di esposizione),
- marcatori biologici di esposizione e di effetto precoce determinati nelle medesime matrici biologiche della popolazione in studio (indici indiretti di esposizione).

Questo approccio sviluppato dal protocollo dello studio "SIGNUM" nel 2004, risulta peraltro pienamente coerente con le raccomandazioni contenute nella

---

<sup>4</sup> International Programme on Chemical Safety. WHO 2000

pubblicazione sviluppata dal working group HFM (Human Factor) della NATO RTO<sup>5</sup> nel giugno 2008<sup>6</sup>.

Nonostante che la distinzione fra biomarcatori di esposizione e di effetto precoce sia artificiosa e non ancora definitiva, essa – pure approssimativa – risulta utile in quanto più l'*endpoint* prescelto è prossimo ad un effetto direttamente correlato alla patologia, maggiore è la valenza predittiva del biomarcatore ai fini del *risk assessment*.

I biomarcatori possono risultare più o meno specificamente associati ad agenti mutageni, secondo profili genotossici (*genotoxic signature*) peculiari, essendo - ad esempio - i marcatori di effetto meno specificamente associati dei marcatori di esposizione a specifici agenti chimici genotossici. Infine la durata nel tempo e, di conseguenza, la loro rilevabilità analitica, può variare in relazione alla persistenza delle molecole alterate per l'esposizione genotossica, all'efficienza dei processi di riparazione o alla durata di vita delle cellule nelle quali il marcatore è rilevato.

---

<sup>5</sup> Research Technology Organization

<sup>6</sup> Final Report HFM-057/RTG-009. AC/323(HFM-057)TP/196 published June 2008.

**Bibliografia generale**

Biotechnologies for Assessment of Toxic Hazards in Operational Environments. *NATO RTO Technical Report – TR – HFM – 057*. June 2008;

Syed Laik Ali, S. Caroli. Inductively Coupled Plasma (ICP) – Spectrometry. *European Pharmacopoeia* (2003);

S. Caroli, A. Alimonti, F. Petrucci, B. Bocca, M. Krachler, F. Forestiere, M.T. Sacerdote, S. Mallone. Assessment of Exposure to Platinum-group Metals in Urban Children. *Spectrochim. Acta*, 56 (2001), 1241-1248;

A. Alimonti, F. Petrucci, M. Krachler, B. Bocca, S. Caroli. Reference Values for Chromium, Nickel and Vanadium in Urine of Youngsters from the Urban Area of Rome. *J. Environ. Monit.*, 2 (2000), 351-354;

A. Alimonti, F. Petrucci, F. Laurenti, P. Papoff, S. Caroli. Reference Values for Selected Trace Elements in Serum of Term Newborns from the Urban Area of Rome. *Clin. Chim. Acta*, 292 (2000), 163-173;

M. Krachler, A. Alimonti, F. Petrucci, F. Forastiere, S. Caroli. Influence of Sample Pre-treatment on the Determination of Trace Elements in Urine by Quadrupole and Magnetic Sector Field Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 363 (1998), 701-705;

S. Caroli, O. Senofonte, N. Violante, S. D'Illo, S. Caimi, F. Chiodo, A. Menditto. Diagnostic Potential of Hair Analysis as Applied to the Goldsmith Sector. *Microchem. J.*, 59 (1998), 32-44;

M. Krachler, A. Alimonti, F. Petrucci, K. Irgolic, F. Forastiere, S. Caroli. Analytical Problems in the Determination of Platinum-group Metals in Urine by Quadrupole and Magnetic Sector Field Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 363 (1998), 1-10;

O. Senofonte, N. Violante, S. Caroli. Assessment of Reference Values for Elements in Human Hair of Urban Schoolboys. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 14 (2000), 6-13;

M. Patriarca, A. Menditto, G. Di Felice, F. Petrucci, S. Caroli, M. Merli, C. Valente. Recent Developments of Trace Element Analysis in the Prevention, Diagnosis and Treatment of Diseases. *Microchem. J.*, 59 (1998), 194-202;

F. Petrucci, B. Bocca, A. Alimonti, S. Caroli. Determination of Pd, Pt and Rh in Airborne Particulate and Road Dust by High-Resolution ICP-MS: a Preliminary Investigation of the Emission from automotive Catalysts in the Urban Area of Rome. *J. Anal. At. Spectrom.*, 15 (2000), 525-528;

S. D'Illo, N. Violante, O. Senofonte, S. Caroli. Occupational Exposure of Goldsmith Workers to Potentially Toxic Metals as Monitored through Hair Analysis. *Microchem. J.*, 67 (2000), 343-349;

N. Violante, O. Senofonte, G. Marsili, P. Meli, M. E. Soggiu, S. Caroli. Human Hair as a Marker of Pollution by Chemical Elements Emitted by a Thermoelectric Power Plant. *Microchem. J.*, 67 (2000), 397-405;

E. Coni, B. Bocca, B. Galoppi, A. Alimonti, S. Caroli. Identification of Chemical Species of Some Trace and Minor Elements in Mature Breast Milk. *Microchem. J.*, 67 (2000), 187-194;

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

- B. Bocca, A. Alimonti, E. Coni, M. Di Pasquale, L. Giglio, A. Piccioli Bocca, S. Caroli. Determination of the Total Content and Binding Pattern of Elements in Human Milk by High Performance Liquid Chromatography - Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. *Talanta*, 53 (2000), 295-303;
- H. Bartoń, Z. Zachwieja, S. D'Ilio, S. Caroli, Application of Routine Estimation of Pb Isotopic Ratios by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry for Studying the Pb Origin in Hair of Children Living in Polluted Areas. A Pilot Study. *Microchem. J.*, 67 (2000), 21-30;
- O. Senofonte, N. Violante, S. D'Ilio, S. Caimi, A. Peri, S. Caroli. Hair Analysis and the Early Detection of Imbalances in Trace Elements for Members of Expeditions in Antarctica. *Microchem. J.*, 69 (2001), 231-238;
- I. Iavicoli, S. Caroli, A. Alimonti, F. Petrucci, G. Carelli. Biomonitoring of a Worker Population Exposed to Low Antimony Trioxide Levels. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 16 (2002), 33-39;
- B. Passariello, V. Giuliano, S. Quaresima, M. Barbaro, S. Caroli, G. Forte, G. Carelli, I. Iavicoli. Evaluation of the Environmental Contamination at an Abandoned Mining Site. *Microchem. J.*, 73 (2002), 245-250;
- N. Michalke, S. Caroli. Speciation of Trace Elements: Methods and Public Health. In: Medical Geology Reference: Earth Science Information in Support of Public Health Protection. O. Selinus (Eds.), Academic Press, 2003;
- B. Bocca, F. Petrucci, A. Alimonti, S. Caroli. Traffic-related Platinum and Rhodium Concentrations in the Atmosphere of Rome. *J. Environ. Monit.*, 5 (2003), 563-568;
- B. A. Lesniewska, B. Godlewska-Zylkiewicz, B. Bocca, S. Caimi, S. Caroli, A. Hulanicki. Platinum, Palladium and Rhodium content in road dust, tunnel dust and common grass in bialystok area (Poland) - a pilot study. *Sci. Total Env.* 2003;
- S. Bonassi, L. Hagmar, U. Stromberg, AH. Montagud, H. Tinnerberg, A. Forni, P. Hekkila, S. Wanders, P. Wilhardt, IL. Hansteen, LE. Knudsen, H. Norppa. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetics Biomarkers and Health. *Cancer Res.*, 60 (2000), 1619-1625;
- L. Hagmar, S. Bonassi, U. Stromberg, A. Brogger, LE. Knudsen, H. Norppa, C. Reuterwall. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res.*, 58 (1998), 4117-4121;
- A. Elhajouji, P. Van Hummelen, M. Kirsch Volders. Identification for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 26 (4) (1995), 292;
- A. Forni. Comparison of chromosome aberrations and micronuclei in testing genotoxicity in humans. *Toxicol. Letters* 72 (1994), 185;
- L. Hagmar, A. Brogger, IL. Hansteen, S. Heim, Hogerstedt B., Knudsen L., Lambert B., F. Mitelman, I. Nordenson, C. Reuterwall, S. Salomaa, S. Skerfving, M. Sorsa. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res.* 54 (11) (1994), 2919;
- Ishihara T., Sasaki M.S. Radiation-induced chromosome damage in man *Progress and Topics in Cytogenetics*. Avery. Sandberg Ed – Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, New York – (1988)4;

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

A. Baserga, GL. Castoldi, B. Dallapiccola. La patologia cromosomica. *Edizioni L. Pozzi* – Roma. 1973: 81-138;

A. Izzotti, GA. Rossi, M. Bagnasco, S. De Flora. Benzo(a)pyrene-DNA adducts in alveolar macrophages of smokers. *Carcinogenesis*. 12 (1991), 1281-1285;

A. Izzotti, F. D'Agostini, M. Bagnasco, L. Scatolini, A. Rovida A., RM. Balansky, CF. Cesarone, S. De Flora S. Chemoprevention of carcinogen-DNA adducts and chronic degenerative diseases. *Cancer Res.* 54 suppl. (1994), 1994s-1998s;

A. Izzotti, A. Camoirano, F. D'Agostini, S. Sciacca, F. De Naro Papa, CF. Cesarone, S. De Flora. Biomarker alterations produced in rat lung by intratracheal instillations of air particulate extracts, and chemoprevention with oral N-acetylcysteine. *Cancer Res.* 56 (1996), 1533-1538;

S. De Flora, A. Izzotti, K. Randerath, E. Randerath, H. Bartsch, J. Nair, R. Balansky, F. van Schooten, P. Degan, G. Fronza, D. Walsh, J. Lewtas. DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res. (Rev. Genetic Toxicol.)*. 366 (1996), 197-238;

A. Izzotti, M. Neri, D. Vecchio, R. Puntoni. Molecular epidemiology in cancer research. *Int. J. Oncol.* 11 (1997), 1053-1069;

S. De Flora, A. Izzotti, K. Randerath, E. Randerath, H. Bartsch, J. Nair, R. Balansky, F. van Schooten, P. Degan, G. Fronza, D. Walsh, J. Lewtas. DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res. (Rev. Genetic Toxicol.)*. 366 (1996), 197-238;

A. Izzotti, RM. Balansky, PM. Blagoeva, ZI. Mircheva, L. Tulimiero, C. Cartiglia, S. De Flora. DNA alterations in rat organs following chronic exposure to cigarette smoke and/or ethanol ingestion. *FASEB J.* 12 (1998), 753-758;

A. Izzotti. Detection of modified DNA nucleotides by postlabeling procedures. *Toxicol. Meth.* 8 (1998), 175-205;

M. Tanningher, D. Malacarne, A. Izzotti, D. Ugolini, S. Parodi. Drug metabolism polymorphisms as modulators of cancer susceptibility. *Mutat. Res. (Rev. Genetic Toxicol.)* 436 (1999), 227-261;

A. Izzotti, C. Cartiglia, M. Tanningher, S. De Flora, R. Balansky. Age-related increases of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and DNA protein cross-link in rat organs. *Mutat. Res. (Genetic Toxicol. Env. Mut.)* 446 (1999), 215-223;

A. Izzotti, C. Cartiglia, J. Lewtas, S. De Flora. Increased DNA alterations in atherosclerotic lesions of individuals lacking the GSTM1 genotype. *FASEB J.* 15 (2001), 752-757;

A. Izzotti, RM. Balansky, F. D'Agostini, C. Bennicelli, SR. Myers, CJ. Grubbs, RA. Lubet, GJ. Kelloff, S. De Flora. Modulation of biomarkers by chemopreventive agents in smoke exposed rats. *Cancer Res.* 61 (2001), 2472-2479;

A. Izzotti, SC. Saccà, C. Cartiglia, S. De Flora. Oxidative DNA damage in the eye of glaucoma patients. *Am. J. Med.* 114 (2003), 638-646;

RM. Balansky, A. Izzotti, F. D'Agostini, A. Camoirano, M. Bagnasco, RA. Lubet, S. De Flora. Systemic genotoxic effects produced by light, and synergism with cigarette smoke in the respiratory tract of hairless mice. *Carcinogenesis*. 24 (2003): 1525-1532;

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

- G. Romano, A. Sgambato, A. Boninsegna, G. Flamini, G. Curigliano, Q. Yang, V. La Gioia, A. Signorelli, A. Ferro, G. Capelli, RM. Santella, A. Cittadini. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in exfoliated oral cells by an immunohistochemical assay. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 8 (1) (1999), 91-6;
- C. Bolognesi, E. Perrone, E. Landini. Micronucleus monitoring of a floriculturist population from western Liguria, Italy. *Mutagenesis.* 17 (2002), 391-7;
- C. Bolognesi, R. Filiberti, M. Neri, E. Perrone, E. Landini, PA. Canessa, C. Simonassi, PG. Cerrano, L. Mutti, R. Puntoni. High frequency of micronuclei in peripheral blood lymphocytes as index of susceptibility to pleural malignant mesothelioma. *Cancer Res.* 62 (2002), 5418-9;
- M. Ballardini, F. Gemignani, L. Bodei, G. Mariani, M. Ferdeghini, AM. Rossi, L. Migliore, R. Barale. Formation of micronuclei and of clastogenic factor(s) in patients receiving therapeutic doses of iodine-131. *Mutat. Res.* 514 (2002), 77-85;
- L. Migliore, G. Frenzilli, C. Nesti, S. Fortaner, E. Sabbioni. Cytogenetic and oxidative damage induced in human lymphocytes by platinum, rhodium and palladium compounds. *Mutagenesis.* 17 (2002), 411-7;
- L. Migliore, L. Petrozzi, C. Lucetti, M. Gambaccini, S. Bernardini, R. Scarpato, F. Trippi, R. Barale, G. Frenzilli, V. Rodilla, U. Bonuccelli. Oxidative damage and cytogenetic analysis in leukocytes of Parkinson's disease patients. *Neurol.* 58 (2002), 1809-15;
- C. Nesti, F. Trippi, R. Scarpato, L. Migliore, G. Turchi. Cytokinesis-block micronucleus assay in primary human liver fibroblasts exposed to griseofulvin and mitomycin C. *Mutagenesis.* 15 (2000). 143-147;
- L. Zotti-Martelli, M. Peccatori, R. Scarpato, L. Migliore. Induction of micronuclei in human lymphocytes exposed in vitro to microwave radiation. *Mutat. Res.* 472 (2000), 51-58;
- C. Bolognesi, C. Lando, A. Forni, E. Landini, R. Scarpato, L. Migliore, S. Bonassi. Chromosomal damage and ageing: effect on micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes. *Age & Ageing.* 28 (1999), 393-397;
- L. Migliore, L. Cocchi, C. Nesti, E. Sabbioni. Micronucleus assay and FISH analysis in human lymphocytes treated with six metal salts. *Environ. Mol. Mutag.* 34 (1999), 279-284;
- L. Migliore, L. Cocchi, R. Scarpato. Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence in situ hybridization: its application to the human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected aneugens. *Mutagenesis.* 11 (1996), 285-290;
- R. Scarpato, L. Migliore, A. Hirvonen, G. Falck, H. Norppa. Cytogenetic monitoring of occupational exposure to pesticides: characterization of GSTM1, GSTT1 and NAT2 genotypes. *Environ. Mol. Mutag.* 27 (1996), 263-269;
- S. Bonassi, C. Bolognesi, A. Abbondandolo, R. Barale, P. Bigatti, L. Camurri, L. Dalpra', M. De Ferrari, A. Forni, C. Lando, P. Padovani, R. Pasquini, M. Stella, R. Puntoni. Influence of sex on cytogenetic endpoints: Evidence from a large human sample and review of the literature. *Cancer Epidemiol. Biomarkers & Prev.* 4 (1995), 671-679;
- C. Bolognesi, A. Abbondandolo, R. Barale, R. Casalone., L. Dalprà, M. De Ferrari, F. Degrassi, A. Forni, L. Lamberti, C. Lando, L. Migliore, P. Padovani, R. Pasquini, R. Puntoni, I. Sbrana, M. Stella,

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

S. Bonassi. Age-related increase of chromosome aberrations, sister-chromatid exchanges and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev.* 6 (1997), 249-256;

L. Hagmar, S. Bonassi, U. Strömberg, A. Brøgger, L. Knudsen, H. Norppa, C. Reuterwall. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer - A Report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and health (ESCH). *Cancer Res.* 58 (1998), 4117-4121;

M. Fenech, N. Holland, WP. Chang, E. Zeiger, S. Bonassi. The HUman MicroNucleus project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* 428 (1999), 271-283;

S. Bonassi, L. Hagmar, U. Strömberg, A. Huici Montagud, H. Tinnerberg, A. Forni, P. Heikkilä, S. Wanders, P. Wilhardt, IL. Hansteen, LE. Knudsen, H. Norppa. Chromosomal Aberrations in Lymphocytes Predict Human Cancer Independently of Exposure to Carcinogens. *Cancer Research.* 60 (2000), 1619-1625;

S. Bonassi, M. Fenech, C. Lando, YP. Lin, M. Ceppi, WP. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, S. Ban, R. Barale, MP. Bigatti, C. Bolognesi, C. Jia, M. Di Giorgio, LR. Ferguson, A. Fucic, OG. Lima, P. Hrelia, AP. Krishnaja, TK. Lee, L. Migliore, L. Mikhalevich, E. Mirkova, P. Mosesso, WU. Müller, Y. Odagiri, MR. Scarfi, E. Szabova, I. Vorobtsova, A. Vral, A. Zijno. The HUman MicroNucleus project. International Data Base Comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes. I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the baseline frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutag.* 37 (2001), 31-45;

S. Bonassi, WW. Au. Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 511(2002), 73-86;

M. Fenech, S. Bonassi, J. Turner, C. Lando, M. Ceppi, WP. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, MP. Bigatti, C. Bolognesi, C. Jia, G. De Luca, M. Di Giorgio, LR. Ferguson, A. Fucic, O. Garcia Lima, V. Hadjidekova, P. Hrelia, A. Jaworska, G. Joksic, AP. Krishnaja, TK. Lee, A. Martelli, MJ. McKay, L. Migliore, E. Mirkova, WU. Müller, Y. Odagiri, TT. Orsiere, MR. Scarfi, MJ. Silva, T. Sofuni, J. Suralles, G. Trenta, I. Vorobtsova, A. Vral, A. Zijno. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. *Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutag.* 534 (2003), 45-64;

M. Fenech, WP. Chang, M. Kirsch-Volders, N. Holland, S. Bonassi, E. Zeiger. HUMN Project: Detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated lymphocyte cultures. *Mutat. Res. Gen. Toxicol. Environ. Mutag.* 534 (2003), 65-75;

S. Bonassi, M. Neri, C. Lando, M. Ceppi, YP. Lin, WP. Chang, N. Holland, M. Kirsch-Volders, E. Zeiger, M. Fenech. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus Project. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 543 (2003), 155-166;

M. Neri, A. Fucic, LE. Knudsen, C. Lando, F. Merlo, S. Bonassi. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. *Mutat Res.* 544 (2003), 243-54;

VB. Hadjidekova, M. Bulanova, S. Bonassi, M. Neri. Micronucleus Frequency is Increased in Peripheral Blood Lymphocytes of Nuclear Power Plant Workers. *Radiat Res.* 160 (2003), 684-90;

IR. Kirsch, F. Lista. Transrearrangements as biomarkers for risk of lymphoid malignancy. *Cancer Surv.* 28 (1996), 311-327;

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

C. Lando, L. Hagmar, S. Bonassi. Biomarkers of cytogenetic damage in humans and risk of cancer. *The European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). Med. Lav.* 89 (1998), 124-131;

F. Lista, V. Bertness, CJ. Guidos, JS. Danska, IR. Kirsh. The absolute number of trans-rearrangements between the TCRG and TCBR loci is predictive of lymphoma risk: a severe combined immune deficiency (SCID) murine model. *Cancer Res.* 57 (1997), 4408-4413;

## 2. Uranio impoverito: proprietà chimico-fisiche ed effetti sanitari

L'uranio (U) fa parte della famiglia dei metalli pesanti (tipici il piombo, il cadmio, il tungsteno, ecc.) e ne condivide gran parte delle caratteristiche per quanto riguarda gli effetti biologici e sanitari. Nella sua forma naturale l'uranio è presente in piccole quantità nel suolo, nell'aria, nell'acqua e nel cibo ed è costituito da tre radioisotopi ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  e  $^{234}\text{U}$ ), caratterizzati da tempi di dimezzamento fisici e percentuali in massa diversi fra loro e ben noti, che decadono spontaneamente emettendo particelle alfa, beta e radiazione gamma [1].

Affinché l'uranio possa essere utilizzato come combustibile nucleare è necessario aumentare la concentrazione in peso di  $^{235}\text{U}$ , che in natura è pari allo 0,72%. Il materiale che ne deriva è noto come uranio arricchito e la concentrazione in peso di  $^{235}\text{U}$  varia tra il 2 e il 5% (combustibile per le centrali nucleari) e il 90% (arsenale nucleare). Il materiale di scarto di questo processo ha, ovviamente, una concentrazione di  $^{235}\text{U}$  ridotta rispetto a quello naturale ed è noto come uranio impoverito (DU, dalle parole inglesi *depleted uranium*).

Il motivo per cui l'uranio impoverito viene utilizzato nella produzione di proiettili ad elevata capacità di penetrazione di blindature, in particolare quelle dei carri armati, risiede nella sua elevata densità ( $18.95 \text{ g/cm}^3$ ), praticamente uguale a quella del tungsteno ( $19.3 \text{ g/cm}^3$ ) e circa 1.6 volte quella del piombo ( $11.7 \text{ g/cm}^3$ ). Per quanto riguarda i proiettili, è importante ricordare che, per questa sua elevatissima densità, l'uranio impoverito non è usato come esplosivo, ma come materiale inerte (penetratore).

In relazione ai possibili modelli espositivi validi per i militari, è importante ricordare che tutta l'energia cinetica di un proiettile ad uranio impoverito si concentra nel punto in cui esso colpisce il bersaglio. Nel caso di un urtco con un veicolo da combattimento, il proiettile attraversa vari materiali, producendo fumi e un aerosol di particelle che si accende spontaneamente, essendo il DU piroforico. La sua piroforicità causa poi a bordo l'esplosione di carburante e munizioni ivi contenute [2]. Le sostanze prodotte possono essere tossiche o cancerogene e la loro inalazione da parte dell'equipaggio risulta inevitabile. La loro presenza complica, quindi, la determinazione degli effetti diretti che possono essere attribuiti al DU. Lo studio degli effetti sulla salute dell'uomo causati da esposizioni a DU ha avuto inizio

in risposta ai noti episodi di *fuoco amico* [3], a causa dei quali alcuni militari USA furono feriti da schegge di DU, con numerosi frammenti rimasti inclusi nel tessuto muscolare [2, 4]. I soldati coinvolti in eventi di *fuoco amico* sono stati anche esposti a DU attraverso la pelle, o per inalazione e ingestione.

Gli aerosol sopra menzionati sono costituiti da particelle prodotte nell'accensione del DU e variano per dimensione, per composizione chimica e per grado di solubilità e si diffondono nel mezzo colpito. Ne segue che militari all'interno di, o molto vicini a, carri armati e veicoli da combattimento e coloro che vi sono entrati subito dopo l'esplosione possono avere inalato finissime particelle di ossido di DU o ingerito polveri di ossido di DU a causa del contatto mano-bocca o per avere ingoiato polvere, in seguito espettorata. L'esposizione a polvere di ossido di DU in alcuni casi si è anche verificata attraverso ferite aperte, ustioni o lacerazioni nella pelle [2, 3]. Oltre a quello del *fuoco amico*, diversi altri scenari possono avere causato esposizioni a DU durante il suo utilizzo bellico. L'incendio di numerosi carri armati e le esplosioni di munizioni a DU a scopi di bonifica hanno infatti bruciato, ossidato e frammentato molti proiettili, dando luogo a potenziali esposizioni dei soldati presenti nelle vicinanze o coinvolti nelle operazioni. Altro personale militare può essere stato esposto al DU per inalazione o ingestione di residui di DU risospesi in aria durante attività svolte in vicinanza di veicoli danneggiati da proiettili all'uranio impoverito o in operazioni di monitoraggio del territorio, specialmente in vicinanza dei crateri prodotti da proiettili inesplosi e, per questo, rimasti conficcati nel terreno. In definitiva, attualmente per descrivere le attività militari che possono aver dato luogo a particolari tipi di esposizione sono stati individuati tre possibili scenari [3, 5, 6], corrispondenti a tre livelli d'esposizione e, quindi, di potenziale rischio:

- *Livello 1* – Questo primo livello d'esposizione si riferisce al personale militare presente all'interno, o nelle vicinanze, di veicoli da combattimento mentre questi venivano colpiti da munizioni all'uranio impoverito e a militari entrati in veicoli subito dopo essere stati colpiti da munizioni all'uranio impoverito, per esempio per aiutare i feriti. Questi militari potrebbero essere stati colpiti da schegge di DU, potrebbero avere inalato aerosol di DU e potrebbero avere ingerito residui di DU. Inoltre,

particelle di uranio impoverito potrebbero essere penetrate in ferite, ustioni o altre lacerazioni della pelle.

- *Livello II* – Questo secondo livello è tipico di una situazione successiva al combattimento e comprende soldati e impiegati civili che abbiano lavorato in, o intorno a, veicoli colpiti da proiettili a uranio impoverito, quindi contaminati da frammenti e particelle di DU. L'esposizione è dominata, a questo livello, dall'inalazione legata al processo di risospensione all'interno del veicolo contaminato, dall'ingestione attraverso il contatto mano-bocca e dalla possibile contaminazione dell'abbigliamento.
- *Livello III* – Questo terzo livello comprende tutte le altre possibilità. Per esempio, soldati in combattimento che si siano trovati sottovento rispetto all'esplosione o all'incendio prodotto dal proiettile a uranio impoverito o che abbiano sostato solo brevemente all'interno di veicoli contaminati. Queste persone potrebbero avere inalato o ingerito particelle in sospensione, ma è improbabile che abbiano ricevuto dosi tali da causare effetti sulla salute. In quest'ultimo livello possono essere logicamente compresi anche la popolazione civile e i militari italiani dispiegati, per missioni di pace, molti mesi dopo la fine delle ostilità nei vari teatri.

I metalli pesanti, e quindi anche l'U, praticamente non esistono liberi allo stato ionizzato all'interno dei fluidi corporei, ma sono sempre legati o complessati con una grande varietà di molecole. In relazione alla tossicità chimica, i composti dell'uranio si classificano in:

- altamente tossici ( $\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{UO}_2\text{F}_2$ ,  $\text{UCl}_4$ ,  $\text{UCl}_5$ ),
- moderatamente tossici ( $\text{UO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{U}_2\text{O}_7$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{U}_2\text{O}_7$ ),
- non tossici o scarsamente tossici ( $\text{UF}_4$ ,  $\text{UO}_2$ ,  $\text{UO}_4$ ,  $\text{U}_3\text{O}_8$ ).

Gli effetti propri della tossicità chimica sono favoriti, ovviamente, nel caso di composti dell'uranio che risultino facilmente biodisponibili [7].

Sono numerosi gli studi condotti per determinare i parametri d'assorbimento degli ossidi d'uranio prodotti nella fabbricazione di combustibile nucleare e tutti hanno evidenziato la presenza di una gamma molto ampia di valori. La forma chimica del

particolato di DU prodottosi a seguito dell'uso nel munizionamento dipende dalle condizioni di formazione e le particelle formatesi negli impatti formano essenzialmente una miscela di  $U_3O_8$  e  $UO_2$  (con prevalenza di  $U_3O_8$ ), mentre la combustione produce quasi soltanto  $U_3O_8$  [5]. Tuttavia, vi è ancora incertezza circa le caratteristiche di assorbimento del DU formatosi in relazione al suo utilizzo bellico, a causa di fattori quali la distribuzione delle dimensioni delle particelle e la presenza di altri elementi.

L'uranio impoverito presenta un'attività pari a 39420 Bq/g ed è, quindi, meno radioattivo dell'uranio naturale, la cui attività è, invece, pari a 49973 Bq/g. Dal punto di vista radiologico l'uranio impoverito, come tutti gli elementi che emettono prevalentemente radiazioni debolmente penetranti quali, in particolare, le radiazioni alfa, deve essere studiato non tanto per quanto riguarda le eventuali esposizioni esterne, quanto per quelle interne, causate dall'inalazione, l'ingestione o l'incorporazione (a causa di ferite) di uranio impoverito [8].

Diversi autorevoli organismi, sia nazionali che internazionali, si sono occupati dei problemi suscitati dall'uso dell'uranio impoverito, pubblicando estesi rapporti [5-7, 9] in cui sono stati affrontati gli aspetti più rilevanti, sia dal punto di vista radiologico che tossicologico.

Nel processo di contaminazione interna con DU, inizialmente i composti dell'uranio inalati o ingeriti si depositano negli organi e nei tessuti bersaglio (fase non sistemica) per poi essere assorbiti o dissolti ed entrare in circolo con i fluidi corporei. Successivamente, le molecole organiche contenenti uranio e formatesi durante la dissoluzione (fase sistemica) si depositano nei tessuti e negli organi in percentuali e tempi di permanenza diversi. Lo studio della fase non sistemica può essere fatto separatamente, per l'inalazione e per l'ingestione, tramite l'utilizzo dei modelli del tratto respiratorio [10] e del tratto gastro-intestinale [11] proposti dall'International Commission on Radiological Protection (ICRP), un'organizzazione non governativa indipendente che, dal 1928, fornisce linee guida e raccomandazioni sulla radioprotezione e sui rischi associati all'utilizzo di sorgenti di radiazioni ionizzanti. Lo studio della fase sistemica, invece, viene fatto separatamente per i vari composti dell'uranio, che vengono classificati nelle tre

classi F (**F**ast absorption), M (**M**oderate absorption) e S (**S**low absorption) in base alla loro solubilità, cioè al tempo di assorbimento nei fluidi corporei [12].

In caso di inalazione, nel modello del tratto respiratorio il deposito delle particelle d'uranio nelle varie regioni polmonari dipende fortemente dalle dimensioni del particolato inalato. Le particelle con dimensioni più grandi (diametro medio superiore a 2,5  $\mu\text{m}$ ) si depositano nelle regioni tracheobronchiali e un'azione mucociliare le trasporta nelle faringe, da dove vengono ingoiate e trasferite, successivamente, nel tratto gastrointestinale. Le particelle più piccole (diametro medio inferiore a 2,5  $\mu\text{m}$ ) raggiungono il polmone profondo (o alveoli), dove i composti più solubili dell'uranio (tipo F) sono assorbiti dal sistema circolatorio in pochi giorni. I composti mediamente solubili (tipo M) restano nel polmone e nei linfonodi tracheobronchiali per qualche settimana. I composti relativamente insolubili (tipo S) entrano nel sistema circolatorio dopo essere rimasti anche per alcuni anni nei polmoni e nei linfonodi [13], i due maggiori siti di accumulo per questo tipo di composti [14].

I composti d'uranio eventualmente ingeriti transitano nel tratto gastro-intestinale, il cui modello ICRP è formato da sette sezioni e il passaggio del composto radioattivo avviene, nell'ordine, nella cavità orale, nell'esofago, nello stomaco, nell'intestino tenue e nell'intestino crasso. L'assorbimento nel sangue dei composti dell'uranio dipende dalle sue proprietà chimiche e l'uranio che è entrato in circolo con i fluidi corporei viene studiato utilizzando i modelli ICRP che descrivono sia la sua escrezione attraverso le feci e l'urina, che la distribuzione nei vari organi e tessuti bersaglio, in tempi e percentuali diverse a seconda della loro destinazione. Nel sangue, tipico compartimento di trasferimento, approssimativamente il 47% dell'uranio risulta complessato stabilmente con lo ione bicarbonato a causa dell'ambiente debolmente alcalino proprio del mezzo e, in tale forma, l'elemento mostra scarsa attività tossicologica. La maggior parte dell'uranio che lascia il circolo plasmatico è diretto alla vescica urinaria e ai tubuli renali (~75%) ed è destinato all'escrezione urinaria. L'uranio restante si deposita principalmente nello scheletro (~15%), nei tessuti molli (~7%) e nel fegato (~1,5%), ma il corpo continuerà ad eliminare il DU per molti anni, anche se in quantità sempre più piccole.

In definitiva, il rene è ritenuto l'organo-bersaglio principale dell'azione tossica dell'uranio e gli studi di nefrotossicità di maggiore interesse riguardano soprattutto le esposizioni occupazionali ad alcuni derivati dell'uranio (quali  $\text{Na}_2\text{U}_2\text{O}_7$  e  $(\text{NH}_4)_2\text{U}_2\text{O}_7$ ). Altro potenziale organo bersaglio dell'azione tossica dell'uranio è il fegato. I dati sperimentali a questo proposito (peraltro risalenti a studi piuttosto datati) non sono però conclusivi, non dimostrando significative alterazioni morfofunzionali dell'organo anche dopo esposizioni prolungate ad elevate concentrazioni di ossidi di uranio. Effetti gastrointestinali sono stati descritti sperimentalmente in un caso di introduzione di uranio per via digestiva (14,3 mg/kg di nitrato di uranile in dose singola). I sintomi, insorti entro poche ore dall'assunzione e rappresentati da nausea, vomito e diarrea, regredirono comunque entro le prime 24 ore [7].

I valori di concentrazione di DU nelle urine sono un valido strumento per la valutazione delle esposizioni umane a DU, anche se è importante specificare che ciò potrebbe non risultare più vero nel caso di inalazione di composti altamente insolubili [15]. Per completezza, è importante anche ricordare che i modelli biocinetici oggi utilizzati non sono del tutto privi di critiche, anche serie, legate alle incertezze che caratterizzano le informazioni di base (tipo e durata dell'esposizione e modello animale utilizzato) e anche le assunzioni su cui i modelli stessi si basano. Alcuni studi di biomonitoraggio hanno rilevato la presenza di DU in campioni di urina di militari [16] e di residenti [17] in aree colpite da munizionamento a DU, anche se non a livelli di rilevanza sanitaria, ma va comunque detto che i dati attualmente disponibili per la popolazione sono ancora pochissimi.

Come altri metalli pesanti, l'uranio è genotossico.

Uno studio condotto da Monleau *et al* [18] ha mostrato che l'inalazione di particelle d'uranio impoverito dà luogo, nei ratti, a:

1. rotture dell'elica del DNA nelle cellule del lavaggio bronco-alveolare (BAL, broncho-alveolar lavage),
2. aumento dell'espressione di citochine infiammatorie,
3. produzione di idroperossidi nel tessuto polmonare.

Tutti questi effetti suggeriscono che il danno al DNA sia, almeno in parte, una conseguenza dei processi infiammatori e dello stress ossidativo. Questi effetti,

indipendenti dal grado di solubilità dei composti d'uranio, sembrano essere collegati alle dosi e al tipo di inalazione (acuta o ripetuta). Le inalazioni ripetute sembrano indurre un potenziamento della genotossicità dell'uranio, sia nelle cellule BAL che in quelle del rene. È stato possibile verificare che il danno nel DNA delle cellule BAL è in parte composto da rotture a doppia elica e ciò suggerisce che possa essere la radiazione a contribuire agli effetti genotossici dell'uranio impoverito *in vivo*. Tuttavia, è risultata chiara la necessità di ulteriori ricerche volte a stabilire le frazioni di tossicità dell'uranio impoverito da collegarsi, rispettivamente, alle sue proprietà radiologiche ed a quelle chimiche. Uno studio successivo [19] ha poi individuato marcatori biologici della contaminazione interna da uranio in grado di discriminare fra gli effetti radiologici e quelli chimici. A questo fine sono state saggiate cellule binucleate con un micronucleo (BN-1MN), cellule binucleate con micronucleo centromero-negativo (BN-MNC-) e ponti nucleoplasmatici (NPB). Questo studio *in vitro* ha confermato le precedenti conclusioni, ottenute *in vivo*, che puntavano ad una dualità della tossicità dell'uranio impoverito.

I risultati *in vitro* hanno mostrato che BN-1MN sembra essere il marcatore della genotossicità complessiva dell'uranio (chimica+radiologica), mentre i marcatori BN-MNC- e NPB sembrano invece essere quelli relativi ai suoi effetti radiotossici.

Questi risultati hanno inoltre mostrato che, alle concentrazioni più basse d'uranio impoverito utilizzate negli esperimenti, si attiva un effetto genotossico non indotto in maniera specifica dalle radiazioni ionizzanti. Questi marcatori necessitano però ancora di una loro convalida *in vivo*. Sono stati successivamente evidenziati anche profili genotossici diversi per il DU e l'uranio arricchito [20].

Non esiste evidenza diretta di una genotossicità nell'uomo e, soprattutto, non è chiara la dipendenza dalle dosi di uranio inalata o ingerita. Esiste una letteratura molto ampia sui casi di cancro fra i lavoratori delle miniere di uranio che, in passato, erano esposti a concentrazioni molto elevate di gas radioattivo, ma si è concluso che il responsabile in questo caso fosse il  $^{222}\text{Rn}$ . Il problema della genotossicità può essere rilevante nel caso di esposizione continua e prolungata all'uranio, ma la mancanza di dati sufficienti rende impossibile stime quantitative di rischio.

In termini epidemiologici, i risultati degli studi pubblicati dal 1996 ad oggi sul rischio di tumori tra i militari della guerra del Golfo e delle missioni nei Balcani indicano

come non ci sia evidenza di un incremento del rischio di tumori totali nelle coorti di veterani di queste guerre o nei militari dispiegati in missioni di pace negli stessi teatri, né vi è evidenza consistente di un incremento del rischio per le neoplasie che potrebbero essere potenzialmente associate ad esposizioni a uranio impoverito [8, 21, 22]. Anche l'eccesso di linfomi di Hodgkin [23] rilevato nel 2000 non sembra caratterizzare in modo specifico il personale dispiegato e sembrerebbe essere stato un evento sporadico [22]. Nessuno degli studi esaminati ha però permesso di effettuare una valutazione obiettiva delle esposizioni a uranio impoverito e ad altri potenziali fattori di rischio cancerogeno sperimentate nei teatri operativi considerati. Inoltre, le coorti in studio sono giovani e i periodi di *follow up* sono probabilmente troppo brevi in relazione alla latenza delle neoplasie d'interesse. Tutti gli studi epidemiologici, pertanto, raccomandano la prosecuzione del *follow up* delle coorti esaminate e l'avvio di nuovi studi basati su una migliore valutazione dell'esposizione personale a uranio impoverito e ad altri fattori di rischio potenzialmente rilevanti. Queste conclusioni concordano con quelle raggiunte in precedenza da diversi autorevoli organismi nazionali e internazionali che, in rapporto alle conoscenze sui fattori di rischio radiologico e sui possibili scenari d'esposizione, non ritenevano prevedibili eccessi di tumori, né solidi né ematologici, rispetto all'incidenza naturale a meno di non considerare circostanze estreme (sopravvissuti al bombardamento diretto di un mezzo blindato, personale coinvolto nella bonifica subito dopo l'attacco, etc), nel qual caso il rischio, nelle condizioni più sfavorevoli, potrebbe raddoppiare [5].

Infine, è importante ricordare che il monitoraggio dello stato di salute di militari colpiti da *fuoco amico*, ormai al suo diciassettesimo anno, non ha portato a evidenziare effetti sanitari legati al lento rilascio di DU provocato da schegge incorporate [24], anche se è doveroso ricordare che gli effetti delle radiazioni possono presentarsi anche a distanza di diversi decenni.

**Bibliografia**

- 1) M. Grandolfo, C. Nuccetelli, S. Risica. Uranio impoverito: stato delle conoscenze e prospettive di ricerca. *Il Nuovo Saggiatore* (2005) 21, 89-94;
- 2) AEPI (U.S. Army Environmental Policy Institute). 1995. Health and Environmental Consequences of Depleted Uranium Use in the US Army. U.S. Army Environmental Policy Institute, Atlanta, GA. <http://www.fas.org/man/dod-101/sys/land/docs/techreport.html> [Disponibile dal 9 luglio 2007];
- 3) OSAGWI (Office of the Special Assistant to the Deputy Secretary of Defense for Gulf War Illnesses). 2000. Environmental Exposure Report: Depleted Uranium in the Gulf (II). U.S. Department of Defense, Washington, DC. [http://www.gulfink.osd.mil/du\\_ii/](http://www.gulfink.osd.mil/du_ii/) [Disponibile dal 6 luglio 2007];
- 4) Hooper, F.J., K.S. Squibb, E.L. Siegel, K. McPhaul, and J.P. Keogh. Elevated urine uranium excretion by soldiers with retained uranium shrapnel. *Health Phys* (1999). 77(5): 512-519;
- 5) The Royal Society. The Health hazards of depleted uranium munitions. Part I and II, *The Royal Society*, (2002) London;
- 6) USA National Research Council. Review of Toxicologic and Radiologic Risks to Military Personnel from Exposure to Depleted Uranium During and After Combat. <http://www.nap.edu/catalog/11979.html>;
- 7) ANPA (Agenzia Nazionale per la Protezione dell'Ambiente, attualmente ISPRA). Utilizzo di armamenti ad uranio impoverito nel conflitto dei Balcani (Serbia-Kosovo). Rischi di radioprotezione. Stime preliminari. Rapporto tecnico; Roma, febbraio 2000;
- 8) C. Nuccetelli, M. Grandolfo, S. Risica. Depleted uranium: possible health effects and experimental issues. *Microchemical Journal* (2005) 79, 331-335;
- 9) WHO (2001). Depleted Uranium - Sources, Exposures and Health effects, World Health Organization, Geneva;
- 10) International Commission on Radiological Protection. Human respiratory tract model for radiological protection. *ICRP publication 66*. Pergamon Press. Oxford 1994;
- 11) International Commission on Radiological Protection. Limits for intakes of radionuclides by workers. *ICRP publication 30*. Pergamon Press. Oxford 1979;
- 12) International Commission on Radiological Protection. Individual monitoring for internal exposures of workers; replacement of ICRP publication 54. *ICRP publication 78*. Pergamon Press. Oxford 1997;
- 13) ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). 1999. Toxicological profile for uranium. Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U.S. Department of Health and Human Services;
- 14) L. J. Leach, E. A. Maynard, H. C. Hodge, J. K. Scott, C. L. Yuile, G. E. Sylvester, H. B. Wilson. A five-year inhalation study with natural uranium dioxide (UO<sub>2</sub>) dust-I. Retention and biologic effect in the monkey, dog and rat. *Health Physics* (1970) 18, 599-612;

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

- 15) International Commission on Radiological Protection. Age dependent doses to members of the public from intake of radionuclides: Part 4, Inhalation dose coefficients. *ICRP publication 71*, Annals of ICRP 25, 1995, i-xiv;
- 16) Gwiazda R.H., K. Squibb, M. McDiarmid, D. Smith. Detection of depleted uranium in urine of veterans from the 1991 Gulf War. *Health Physics* Vol. 86 (2004), No. 1, p. 12-18;
- 17) Priest, ND, Thirlwall, M. Early results of studies on the levels of depleted uranium excreted by Balkan residents. *Archive of Oncology* (2001). Vol 9 (4), 237-240;
- 18) M. Monleau, M. De Méo, F. Paquet, V. Chazel, G. Dumènil, M. Donnadiou-Claraz. Genotoxic and Inflammatory Effects of Depleted Uranium Particles Inhaled by Rats. *Toxicological Sciences*. (2006) 89(1), 287-295.
- 19) C. Darolles, F. Paquet, P. Voisin, F. Petitot. Discrimination of radiotoxic and chemotoxic effects of uranium: Definition of biological markers for occupational risk assessment in the nuclear industry. *Toxicology Letters* (2007). 172S, S1-S240, S166;
- 20) C. Darolles, D. Broggio, A. Feugier, S. Frelon, I. Dublineau, M. De Meo, F. Petitot. Different genotoxic profiles between depleted and enriched uranium. *Toxicol. Lett.* (2009), doi:10.1016/j.toxlet.2009.11.009;
- 21) S. Lagorio, E. Grande, L. Martina. Review of epidemiological studies of cancer risk among Gulf War and Balkans veterans. *Epidemiol. Prev.* (2008) 32, 145-55;
- 22) M. S. Peragallo, F. Lista, G. Sarnicola, F. Marmo, A. Vecchione. Cancer surveillance in Italian army peacekeeping troops deployed in Bosnia and Kosovo, 1996-2007: Preliminary results. *Cancer Epidemiology*. (2010) doi: 10.1016/j.canep.2009.12.014;
- 23) Ministero della Difesa. Relazione Finale della Commissione istituita dal Ministro della Difesa sull'incidenza di neoplasie maligne tra i militari impiegati in Bosnia e Kosovo. Roma, 11 giugno 2002.  
[http://www.difesa.it/NR/rdonlyres/6DA4D27E-A75D-4C2D-AA46-8E8071EFAE06/0/relazione\\_finale.pdf](http://www.difesa.it/NR/rdonlyres/6DA4D27E-A75D-4C2D-AA46-8E8071EFAE06/0/relazione_finale.pdf);
- 24) McDiarmid MA, Engelhardt SM, Dorsey CS, Oliver M, Gucer P, Wilson PD, et al. Surveillance results of depleted uranium-exposed Gulf War veterans: sixteen years of follow-up. *J Toxicol Environ Health* (2009). Part A 72: 14-29;

### 3. Elementi di rilevanza tossicologica

Tutti gli elementi chimici selezionati per l'indagine, U compreso, sono di conclamata rilevanza tossicologica. Ciascuno di essi, con la sola esclusione di As (che tuttavia manifesta una copresenza nell'ottenimento di alcuni elementi), possono essere impiegati per la produzione di leghe metalliche utilizzate in vario modo in dispositivi bellici. Le loro caratteristiche sono riassumibili, in estrema sintesi, come riportato qui di seguito.

- As. Si tratta di un metalloide ad ampia diffusione nell'ambiente che si presenta sotto forme chimiche diverse (sia inorganiche sia organiche), ognuna con una sua specifica tossicità (patologie tumorali della pelle, dei polmoni, dello stomaco, tumori linfatici, neurotossicità). L'esposizione ambientale riguarda la popolazione in generale, essendo As presente in natura nel suolo, nell'aria e nell'acqua. Essa può anche correlata ad attività antropiche (lavorazione di metalli non ferrosi, vetri artistici, centrali termiche alimentate a carbone, semiconduttori, antiparassitari, preservanti del legno). Le principali vie di esposizione ad As sono l'inalazione (nel caso di attività lavorative) o l'ingestione tramite alimenti. L'acqua può essere una causa primaria di assunzione di As se proveniente da aree geologicamente ricche di questo elemento. Tra gli alimenti più ricchi di As sono da annoverare gli organismi marini, soprattutto molluschi e crostacei.
- Cd. Questo metallo tende ad accumularsi negli organismi viventi. Esso è stato a lungo usato come agente anticorrosivo. Composti di Cd sono presenti come stabilizzatori in materiali in PVC, nonché in pigmenti coloranti e, insieme a Ni, in batterie ricaricabili. È inoltre una impurezza dei fertilizzanti a base di fosfati. Prodotti contenenti Cd sono spesso smaltiti assieme ai rifiuti domestici, finendo così per contaminare l'ambiente, specialmente se i rifiuti sono inceneriti. L'abitudine al fumo, in particolare, è considerata una via primaria di esposizione al metallo. Sorgenti di Cd naturali ed antropiche possono portare alla contaminazione del suolo ed all'accumulo del metallo nei vegetali tramite le radici. L'acidificazione del suolo facilita questo processo e favorisce la bioaccumulazione di Cd nei prodotti agricoli usati per l'alimentazione umana. L'ingestione di Cd con la dieta avviene particolarmente consumando fibre e frutti

di mare. L'industrializzazione e le moderne tecniche agricole hanno provocato una notevole crescita dei livelli di questo metallo nell'ambiente.

- Mo. Quasi tutti i tessuti vegetali ed animali presentano tracce di Mo, mentre l'elemento è presente a livelli molto bassi nel suolo. Esso costituisce la parte attiva della xantina ossidasi, un enzima che favorisce la mobilitazione di Fe dalle riserve del fegato ed agevola l'ossidazione di Fe (II) a Fe (III). Fa parte altresì dell'enzima aldeide ossidasi preposto alla ossidazione dei grassi. Come agente antiossidante, ha una funzione importante nella cura delle malattie degenerative e nell'invecchiamento. È inoltre utile nella prevenzione dell'anemia e della carie dentaria. Altre caratteristiche di Mo sono legate alla sua partecipazione nel metabolismo di Cu, al suo coinvolgimento nei processi di azotofissazione e di riduzione dei nitrati, nella produzione di urina e nei normali processi cellulari. I cibi più ricchi di Mo sono le carni, i legumi, i cereali ed alcune verdure a foglia scura. L'intossicazione da Mo nell'uomo porta a diarrea, anemia e rallentamento nella crescita.
- Ni. Il principale impiego di Ni è nella produzione di leghe metalliche in generale e di acciai inossidabili in particolare, conferendo a questi ultimi resistenza, duttilità e protezione contro la corrosione ed il calore. È usato, unitamente a Cd, per batterie ricaricabili, per catalizzatori ed in prodotti di fonderia e placcatura. Alcuni alimenti, in particolare cioccolato, grassi, tè e fagioli, contengono quantità apprezzabili di Ni. Verdure provenienti da terreni inquinati sono in grado di accumulare notevoli quantità dell'elemento. Pur essenziale a livello di tracce, in quantità di poco superiori a quelle necessarie questo metallo possiede una notevole tossicità. Può, tra l'altro, causare patologie tumorali (polmoni, naso, laringe, prostata), asma, bronchite cronica, embolie polmonari, problemi respiratori e cardiaci e reazioni allergiche. A causa della presenza di Ni nel tabacco, i fumatori sono soggetti ad un più alto rischio di contrarre le patologie suddette. Le centrali elettriche e gli inceneritori di rifiuti rilasciano nell'atmosfera grandi quantità dell'elemento.
- Pb. Presente naturalmente in rocce e suoli, questo metallo è tra i più studiati per i suoi effetti tossici e per la sua natura ubiquitaria e costituisce tuttora uno dei maggiori problemi per la salute pubblica. Esso può riscontrarsi ad elevate

concentrazioni nel suolo, nella polvere e nelle discariche di rifiuti come conseguenza delle attività industriali. È usato per scopi molteplici (produzione di batterie, di leghe per saldatura e di leghe metalliche, nonché come componente di polimeri, ceramiche e vetri). In passato il metallo era aggiunto alla benzina sottoforma di composto tetraetilico come agente antidetonante ed è stato pertanto uno dei più preoccupanti inquinanti ambientali degli ultimi decenni. È stato inoltre impiegato per secoli per le condutture idriche causando seri problemi di inquinamento delle acque potabili. Anche l'impiego di piatti e contenitori per uso alimentare rivestiti di smalti contenenti Pb può dar luogo a fenomeni di accumulo del metallo da parte dell'organismo, specialmente nel caso di cibi a carattere acido o bevande molto calde. Molti alimenti (riso in particolare) contengono apprezzabili quantità di Pb con il conseguente non trascurabile apporto del metallo all'organismo con la dieta. Munizioni contenenti Pb possono essere un ulteriore fattore di esposizione a questo metallo.

- U. Suolo, acque ed organismi viventi presentano tutti tracce di U. Gli isotopi di U naturale emettono particelle  $\alpha$  con capacità di penetrazione per particelle di media energia (5 MeV) di spessori di circa 4 cm in aria e 50  $\mu\text{m}$  nei tessuti biologici. Il decadimento degli isotopi di U in altri elementi radioattivi dà invece luogo a particelle  $\beta$ , più penetranti delle particelle  $\alpha$ , e a raggi  $\gamma$ , assai più penetranti. La tossicità di natura chimica manifestata da U è analoga a quella di Pb. I principali siti di accumulo di U nell'organismo sono le ossa, i reni ed il fegato. Gli effetti di U per la salute sono riconducibili alla tossicità renale, a tumori ossei e polmonari e ad anomalie nella riproduzione. Questo elemento può entrare nell'organismo per inalazione, ingestione o anche attraverso ferite, ad esempio durante un evento bellico. I tre isotopi naturali di questo elemento,  $^{234}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  e  $^{238}\text{U}$ , hanno abbondanze di massa rispettivamente di 0,006 %, 0,72 % e 99,274 %. Durante il processo di arricchimento dell' $^{235}\text{U}$  si forma un sottoprodotto noto come DU che contiene circa 80 % di meno di  $^{234}\text{U}$  e circa 70 % di meno di  $^{235}\text{U}$ . Tra i molteplici usi di DU hanno importanza maggiore le applicazioni commerciali in aeronautica (contrappesi nelle ali e nei timoni), nella nautica (chiglie dei natanti), in radiologia (schermature per i raggi X) e nella

chimica preparativa, nonché gli impieghi militari (proiettili, mezzi corazzati). Il DU ha proprietà piroforiche.

- V. I composti di V sono altamente tossici e possono causare tumori polmonari per inalazione. Il metallo è poco abbondante in natura e di norma è ottenuto come sottoprodotto dai minerali di U. Si utilizza soprattutto, come ferrovanadio, per la preparazione di acciai speciali. Trova impiego in alcune componenti di reattori nucleari e nei superconduttori. L'elemento è presente in numerosi organismi nei quali spesso è il componente essenziale di alcuni enzimi. La sua essenzialità per l'uomo, tuttavia, non è mai stata dimostrata, anche se alcuni composti di V sembrano potenziare l'attività dell'insulina.
- W. Wolframio o tungsteno è un metallo raro nella crosta terrestre; si usa nei filamenti delle lampade ad incandescenza, nelle resistenze dei forni elettrici, nei tubi fluorescenti e nella preparazione di leghe ed acciai speciali. Sin dalla seconda guerra mondiale ha avuto molte applicazioni di carattere militare, ad esempio per blindare la punta dei proiettili anticarro e per la fabbricazione di dardi e di corazze di mezzi blindati. È stato a lungo usato anche per produrre braccialetti, anelli, orologi ed altri oggetti di uso personale. Da un punto di vista biologico è un nutriente essenziale per alcuni batteri. Gli enzimi del tipo ossidoriduttasi usano W in modo simile a quanto avviene per Mo. I dati disponibili circa la tossicità di W sono alquanto limitati. L'elemento può generare convulsioni e insufficienza renale con necrosi tubulare acuta.
- Zr. Questo metallo è molto resistente alla corrosione. Più del 90 % di tutto il metallo prodotto viene usato nelle centrali nucleari. Leghe metalliche di Zr sono infatti principalmente impiegate negli impianti nucleari sia in virtù della bassa sezione d'urto per l'assorbimento di neutroni, sia come rivestimento del combustibile nucleare nelle strutture di sostegno del nocciolo, sia per la loro resistenza all'azione corrosiva dell'acqua. Se ne fa un impiego esteso in chimica industriale per la costruzione di condutture in ambienti corrosivi. L'elemento è piroforico ed è stato usato in ordigni incendiari militari. I composti di Zr hanno una tossicità molto bassa e l'elemento non pare svolgere alcuna funzione essenziale negli organismi viventi.

#### 4. Biomarcatori di esposizione e di effetto precoce

A partire dalla fine degli anni '80 i limiti di un approccio epidemiologico tradizionale allo studio 'dei fattori di rischio ambientali sono risultati sempre più evidenti.

L'utilizzo dell'incidenza e della mortalità come unici *endpoint* da associare alla presenza di esposizione a cancerogeni si è dimostrato poco sensibile e - vista la crescente importanza dell'esposizione a miscele - anche poco specifico.

A completare il quadro di eventi che ha messo in crisi la cosiddetta "*epidemiologia black box*", cioè la mera associazione fra il fattore di rischio e l'evento conclusivo della storia naturale della malattia sono intervenute altre circostanze. In particolare lo sviluppo della biologia molecolare e della genetica ha posto le basi per la personalizzazione della medicina ed ha reso disponibili per gli studi di popolazione tecniche di misurazione del danno a costi e tempi compatibili con gli studi epidemiologici.

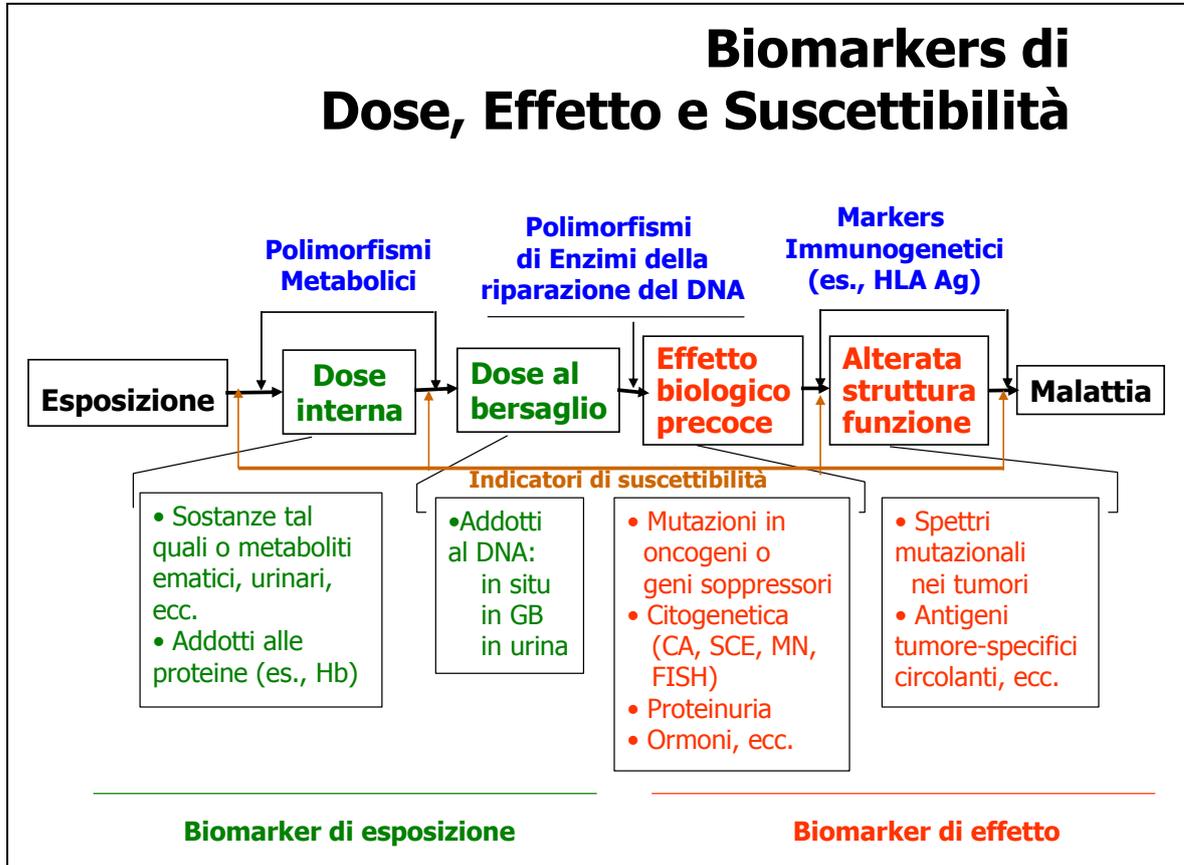
Lo sviluppo di modelli validi per l'eziopatogenesi di malattie complesse come il cancro e le malattie cardiovascolari, ha permesso di sviluppare biomarcatori in grado di fornire una misura degli eventi preliminari della progressione della malattia, permettendo di anticipare gli interventi di prevenzione, e identificare precocemente le popolazioni e in alcuni casi gli individui a maggior rischio di malattia.

L'epidemiologia molecolare nasce dall'integrazione fra la biologia molecolare e l'epidemiologia con l'obiettivo di identificare biomarcatori di effetti biologici precoci e di studiare il contributo dei fattori genetici, dei fattori di rischio ambientali e della loro interazione nell'eziologia e nella prognosi delle malattie congenite ed acquisite.

La disponibilità di biomarcatori in grado di misurare i livelli di esposizione al bersaglio (generalmente il DNA), di misurare la suscettibilità genetica e fenotipica dei soggetti in studio, di evidenziare danni a livello del DNA e dei cromosomi, e, infine, la misura degli effetti biologici precoci, la cui presenza permette di stimare il rischio di cancro e di malattie cardiovascolari, ha permesso di disegnare studi in popolazioni potenzialmente esposte a cancerogeni molto più informativi rispetto a tradizionali studi basati solo sugli indicatori di malattia.

Il modello di intervento su cui è basata l'epidemiologia molecolare e' descritto nella figura in calce, che rappresenta il susseguirsi degli eventi iniziali di malattia e dei

marcatori che li quantificano. Questo approccio è anche detto “a scatola di vetro”, perché permette di osservare la malattia nei suoi stadi e nel suo progredire, piuttosto che contare unicamente le diagnosi.



da Persechino B. (ISPESL) 2009

L'applicazione di un disegno di studio di questo tipo alla popolazione dei soldati italiani dislocati in Iraq, è sicuramente l'approccio più efficiente per una quantificazione dell'esposizione a composti tossici, del danno genetico indotto dalla permanenza nel Te. Op., e a livello di gruppo, della stima del rischio associata a queste esposizioni.

Per quanto riguarda l'aspetto più controverso dell'uso di questi indicatori, e cioè la capacità di stimare il rischio di malattia in soggetti sani, va considerata la valenza non individuale di questo dato e la possibilità, trattandosi di eventi precoci, di modificare la storia naturale della malattia rimuovendo la fonte di esposizione e avviando varie misure di prevenzione.

## **VII. MATERIALI E METODI DELLO STUDIO**

### **1. Aspetti generali**

#### **a. Popolazione in studio**

Il progetto “SIGNUM”, sin dall’inizio, è stato concepito sulla base di una volontaria adesione di militari appartenenti ad un contingente nazionale di rotazione destinato ad operare nel teatro iracheno, presso il campo di Tallil (An Nasiryha), nel contesto dell’Operazione “Antica Babilonia”, durante il secondo semestre del 2004.

Tale contingente, composto da circa 3.000 uomini, è stato immesso in area di operazioni a scaglioni intervallati e, pertanto, l’arrivo in Iraq si è sviluppato fra il mese di agosto e il mese di novembre 2004.

Ciò ha comportato la necessità di avviare iniziative di informazione preliminari destinate specificamente alla popolazione individuata e alla capillare opera di convincimento posta in atto da ogni singolo membro della catena di comando, sulla base degli input sanitari..

Al fine di coniugare la volontarietà di adesione del campione arruolato allo studio con la più fedele rappresentatività scientifica oltre che statistico-epidemiologica dell’intera popolazione campionata, il disegno dello studio ha previsto la randomizzazione della popolazione in esame, cercando di creare – in scala – un campione il più possibile rappresentativo della stessa, selezionato sulla base di peculiari chiavi statistiche significative rappresentate nel campione arruolato in percentuali rappresentative utili ad ottenere una coorte statisticamente fedele e rappresentativa dell’intero contingente:

- età;
- area di nascita;
- tipologia di impiego.

#### **b. Campione – Dimensione e potenza statistica**

La valutazione della dimensione campionaria in studi di Epidemiologia molecolare è condizionata non solo da parametri di ordine statistico, ma anche da ulteriori fattori di non facile valutazione. Fra questi quelli più rilevanti sono le

limitazioni economiche, che spesso impongono di disegnare studi di potenza statistica non ottimale, la natura auto-correlata di molte misurazioni e la presenza di un certo grado di missclassificazione dovuto ad imprecisioni di misura o alla suscettibilità individuale di tipo genetico.

Un aspetto da tenere in considerazione in studi basati su *endpoint* multipli è quello che per biomarcatori diversi le dimensioni ottimali dello studio possono variare anche grandemente.

In questo caso, lo studio del marcatore meno sensibile è quello che dà la dimensione totale dello studio. E' da osservare che il fatto di avere a disposizione campioni biologici, che vengono comunque raccolti per biomarcatori meno sensibili in molti casi rende economico e efficiente aumentare il numero degli esami effettuati anche per i biomarcatori più sensibili, permettendo così la valutazione di *endpoint* più fini in modo economicamente efficiente.

Quindi lo studio doveva essere in grado di valutare:

1. la presenza di esposizione a uranio impoverito (o altri genotossici noti)
2. evidenziare la presenza di esposizione non previste a sostanze mutagene o cancerogene
3. quantificare il danno genetico associato all'esposizione.

Per quanto riguarda il test del micronucleo (MN) recentemente in studi collaborativi internazionali (HUMN) è stato fatto un grande sforzo per uniformare i valori di riferimento e quindi questi possono essere utilizzati per un valido calcolo di potenza in studi di popolazione (Bonassi et al., 2003). La valutazione della dimensione campionaria è stata effettuata utilizzando il software nQuery advisor 3.0 (Elashoff JD, 1999).

La prima stima delle dimensione campionaria necessaria per studiare i punti sopra elencati è stata effettuata con un tradizionale approccio per i campioni ripetuti (prima-dopo) quale il t-test. La differenza considerata rilevante è stata del 20%, considerando quindi un gruppo in studio che permettesse di evidenziare al 95% con un test a due code e con una potenza statistica del 90% una variazione di 1,48 MN per mille cellule binucleate (utilizzando una media di riferimento di 7.4 MN ‰ con una SD di 3.3). L'introduzione di questi parametri

ha evidenziato come la dimensione raccomandata per ognuno di questi gruppi fosse di 106 individui. La scelta del 20% di incremento nella frequenza baseline di MN è stata basata sulle valutazioni preliminari di uno studio di coorte attualmente in corso su 5000 soggetti studiati per la frequenza di MN nei linfociti, che ha identificato in questo incremento il valore minimo cui si inizia ad osservare un aumento del rischio di cancro (Bonassi, 2002)

La numerosità totale stimata ha quindi raggiunto il valore di 954 soggetti, arrotondati a 1000 per compensare eventuali perdite.

Va inoltre considerato che una siffatta dimensione dello studio avrebbe permesso di valutare anche variazioni di altri *endpoint* nel complesso del gruppo in esame. Ad esempio la frequenza di *nucleoplasmic bridge*. In questo caso, vista la rarità dell'evento e la variabilità del test (dovuta anche alla recente introduzione di questo *endpoint*) la numerosità necessaria è da ritenersi infatti molto maggiore. Applicando i parametri precedenti ( $p < 0.05$ ; potenza al 90%; test a due code; incremento del 20%) ed inserendo il valor medio di 5‰ pubblicato dal progetto HUMN è stata ottenuta una dimensione di 937 soggetti. Quindi solo lo studio dell'intero contingente avrebbe consentito la valutazione di questo parametro.

Per ottenere stime valutate interamente nel gruppo in studio è invece necessario seguire nel tempo la corte dei soldati esaminati e il risultato di questo *follow-up* permetterà di stimare il rischio di incidenza di tumori legato al valore di MN osservato durante lo studio. Con la numerosità di 1000 soldati, tenendo conto di un livello di significatività pari a  $p < 0.05$ , test a una coda, potenza all'80%, in un periodo di meno di 10 anni è possibile evidenziare in modo significativo un incremento dell'incidenza di tumori totali dell'ordine di quattro volte il valore atteso.

In conclusione il numero indicato di 1000 soggetti per quanto concerne lo studio sulla frequenza di micronuclei nei linfociti periferici rappresenta un valore in grado di:

- 1) raggiungere un'ottima sensibilità nello studio delle specifiche esposizioni nei sottogruppi di soldati potenzialmente esposti a vari agenti genotossici,

- 2) integrare lo studio sulla frequenza di cellule micronucleate con *endpoint* più rari e innovativi,
- 3) evidenziare in un intervallo di anni ragionevolmente breve l'esistenza di importanti incrementi nel rischio di tumore.

**c. Campionamento (T0) Pre- e (T1) Post-Impiego. Aspetti organizzativi ed esecutivi**

1) Attività preliminari organizzative

Per la gestione delle attività logistiche ed operative militari inerenti alla realizzazione del progetto e per la soluzione delle problematiche via via emergenti, lo Stato Maggiore della Difesa ha preliminarmente identificato una figura di "Coordinatore" militare del progetto medesimo, attribuendone il compito ad un Ufficiale medico di rango adeguato (C.A. Mario Tarabbo).

Sotto tale coordinamento è stato costituito nel mese di luglio 2004 un "basket" interforze di personale sanitario, costituito da 3 Ufficiali medici, 12 Sottufficiali, 8 autisti e 4 automezzi, dal quale sono stati formati teams, itineranti fra i vari Enti/Distaccamenti e Reparti militari, incaricati di curare presso le singole sedi la fase informativa nonché l'effettuazione dei prelievi delle matrici prescelte.

2) Attività informativa

L'iniziale tentativo di produrre uno "spot" informativo audiovisivo, facilmente replicabile su supporto informatico da distribuirsi presso i vari Enti, Distaccamenti e Reparti interessati alla generazione del contingente da dispiegare in Te.Op., è stato rapidamente abbandonato, in quanto il prodotto, sviluppato "ad hoc" in modo artigianale, presso le singole Unità Operative, e montato quindi congiuntamente dai Centri di produzione audiovisiva dell'E.I. e dell'A.M., non è risultato pienamente soddisfacente.

Pertanto, l'attività informativa inerente alle caratteristiche scientifiche ed organizzative del progetto, destinata all'uditorio militare prescelto per il dispiegamento in Te.Op., è stata condotta a cura del personale dei team militari di prelievo nella fase di "generazione della forza" sul territorio

nazionale, in seno ai vari Enti/Distaccamenti e Reparti, contributori del contingente in via di costituzione.

Tale attività è stata per lo più effettuata in forma di briefings, pienamente armonizzati con i contenuti delle schede individuali anamnestico-informative sviluppate specificamente per il progetto, tenendo conto delle osservazioni apportate dal Comitato Etico della Direzione generale della Sanità Militare in fase istruttoria.

I briefings sono stati condotti in modo tale da illustrare all'uditorio le caratteristiche scientifiche del progetto, senza alimentare irragionevoli e ancestrali timori inerenti all'ambiente operativo iracheno, sgomberando nel contempo il campo ai numerosi equivoci ed alle "leggende metropolitane", prima tra tutti quella inerente alla valenza repressiva dello studio, con specifico riferimento al controllo del fenomeno della tossicodipendenza in ambito militare.

I briefings sono risultati tanto più apprezzati e convincenti, quanto più supportati dai Comandanti – a tutti i livelli, fino al più basso di plotone e squadra – con l'interesse, con l'attenzione, nonché con l'esempio personale.

### 3) Attività di prelievo (formazione e generalità)

Il personale sanitario militare individuato per la costituzione dei teams di prelievo è stato preliminarmente formato alle necessità operative e laboratoristiche del progetto, mediante un periodo preliminare di addestramento presso il Policlinico Militare "Celio" e presso l'Istituto Superiore di Sanità, in relazione alla complessità della metodica di prelievo dei campioni per il dosaggio degli xenoelementi.

Il prelievo è stato articolato in due distinti momenti:

- 1° step: pre-impiego, T0, in Patria presso le sedi di servizio dei singoli militari destinati a far parte del contingente rotazionale;
- 2° step: post-impiego, T1, in Teatro Operativo, al termine del periodo di impiego.

Le attività di campionamento sono state standardizzate per quanto possibile utilizzando il protocollo riportato in Appendice n. 1 all'allegato "A".

L'etichettatura dei campioni era stata standardizzata di modo che i contenitori delle diverse matrici biologiche sono stati di volta in volta predisposti dagli operatori dei teams di prelievo, in modo da apporre etichette su cui veniva trascritto il codice alfanumerico  $\alpha$ -wxyz (con  $\alpha$  = P o D per i campioni prelevati a T0 o a T1, rispettivamente, e wxyz il numero progressivo del campionamento nelle due serie di campioni). Ogni etichetta, inoltre, riportava il codice del laboratorio di destinazione (Genova o Pisa) per il saggio dei micronuclei nei linfociti periferici (GE oppure PI)

#### 4) Raccolta dati anamnestici

Al momento di ogni prelievo è stata fatta compilare, ad ogni militare partecipante al progetto, una scheda informativa contrassegnata con lo stesso codice assegnato al campione (la scheda in questione è riportata in Annesso IV).

I dati anamnestici raccolti sono stati finalizzati alla identificazione quanto più precisa di c.d. "fattori confondenti" operanti a livello individuale, sia prima che dopo l'impiego in Te.Op.

In pratica sono stati separatamente registrati per i militari partecipanti allo studio, in relazione ai due step T0 e T1:

- esposizioni radiologiche sanitarie recenti;
- ricoveri ospedalieri recenti per malattie virali, gravi o immunoallergiche;
- vaccinazioni;
- esposizioni recenti a sostanze genotossiche (pesticidi, amianto, catrame, vernici, solventi minerali);
- assunzione di peculiari farmaci;
- trattamenti per capelli;
- fototipo;
- abitudini alimentari e di vita (fumo/alcool/caffè/alimenti vegetali/frutta/alimenti cotti alla brace);
- attività lavorativa principale e secondaria;
- attività fisica voluttuaria o sportiva;
- precedenti impieghi in Te. Op..

I dati individuali raccolti sono stati quindi utilizzati per popolare il database generale del progetto, sviluppato a cura della Direzione Generale della Sanità Militare.

5) Diario individuale

E' stato predisposto e consegnato, all'atto del prelievo pre-impiego T0, ad ogni militare partecipante al progetto un libretto-diario individuale, sviluppato su base giornaliera a copertura dell'intero periodo di dispiegamento in Te.Op., al fine di incentivare l'annotazione ordinata delle attività giornaliere di rilievo svolte dal singolo individuo (Annesso V).

La compilazione di questo diario, che avrebbe potuto contribuire a meglio definire le attività svolte dal singolo o registrare peculiari eventi di potenziale esposizione confrontabili con gli indici bioumorali di esposizione, è risultata purtroppo infrequente, a causa dei soverchianti impegni operativi del personale militare dispiegato in teatro. Prima di ogni step di campionamento, a cura del personale del team, è stato fatto riempire dagli interessati un questionario individuale anamnestico finalizzato a rilevare esposizioni ad eventuali fattori confondenti individuali.

6) Campionamento pre-impiego (T0)

Il 1° step del campionamento (pre-impiego, T0) ha preso avvio in data 16 agosto 2004, al termine di una fase di selezione del campione da una ampia quota di soggetti che avevano preliminarmente comunque espresso l'adesione all'iniziativa. Questa modalità, concordata con il Centro Nazionale di Epidemiologia, Sorveglianza e Promozione della Salute dell'Istituto Superiore di Sanità, è stata adottata in modo da assicurare al campione la più fedele rappresentatività dell'intero contingente dispiegato.

Il campionamento pre-impiego T0, limitatamente al personale dell'E.I., M.M. e A.M., si è concluso il 2 settembre 2004, mentre per il personale dell'Arma dei Carabinieri, immesso in Te. Op. solo successivamente, si è sviluppato nel periodo compreso fra il 3 ottobre e il 9 novembre 2004.

I prelievi dei campioni sono stati effettuati presso le sedi stanziali dei militari arruolati allo studio dai team di prelevatori, i quali hanno anche curato il mantenimento ed il trasporto delle matrici biologiche deteriorabili, al termine di ogni giornata, nel rispetto delle temperature di conservazione (ambientale, - 20°C, -196°C), sino alle Unità Operative cooperanti allo studio.

Il numero totale dei militari campionati alla fine del 1° step (prelievo in Patria, T0) è risultato pari a **982 unità** (793 soggetti di EI, MM, AM – di cui 764 maschi e 29 femmine – nonché 189 CC). Da questi soggetti sono stati prelevati **915** campioni destinati ai saggi analitici su urine, siero, sangue e **104** campioni di capelli. La raccolta dei capelli è risultata di fatto quasi inattuabile sui militari in procinto di partire per le aree operative, in relazione all'indisponibilità di capigliatura di lunghezza adeguata al campionamento: i capelli consoni alle esigenze pratiche della vita operativa e al regime climatico del Te.Op., risultavano infatti essere troppo corti per il prelievo.

- 7) Allestimento del laboratorio da dispiegarsi in Te.Op. e addestramento del personale sanitario militare ad esso destinato.

Per poter avviare il 2° step (post-impiego, T1) di campionamento in Te. Op. – contrariamente a quanto originariamente previsto dal protocollo dello studio – si è dovuto provvedere ad allestire ex-novo un laboratorio ad hoc, dispiegabile in Te.Op., per poter assicurare la stabilizzazione delle matrici deteriorabili (sangue, per micronuclei e aberrazioni cromosomiche), in carenza del quale si sarebbe dovuto procedere ad onerosi invii aerei giornalieri dei campioni dall'Iraq in Patria, in numero contingentato (non superiore alle 200 unità/die, in relazione alle capacità ricettive massime delle UU.OO. riceventi).

Pertanto, oltre ad individuare le caratteristiche e le attrezzature del citato laboratorio, si è deciso di formare preliminarmente (ottobre-novembre 2004) il personale laboratorista dei teams militari di prelievo, mediante un breve stage formativo presso alcune Unità Operative (Università di Pisa, Istituto Ricerca sul cancro di Genova, Istituto Mendel-CSS di Roma). Quest'attività si è resa necessaria al fine di standardizzare la qualità delle procedure di

stabilizzazione delle matrici deteriorabili, tarando le attività degli operatori sulla scorta di standard condivisi, tecnici e procedurali.

Presso tali Laboratori nel mese di novembre 2004 è stato così eseguito un breve corso di addestramento (1 settimana) del personale militare, finalizzato a rendere compatibile le fasi di processazione e stabilizzazione dei campioni da condurre nel Te.Op.. Il programma di tale attività è riportato in Appendice n. 2 all'Allegato "A".

Sono stati preparati i mezzi di coltura e le soluzioni e sono stati presentati i materiali e le attrezzature necessarie allo svolgimento del protocollo. Durante la settimana sono state effettuate tutte le procedure per la preparazione dei leucociti dall'allestimento delle colture fino alla loro stabilizzazione in metanolo.

Al termine della settimana di addestramento è stato effettuato un *proficiency testing* con l'esecuzione del test del micronucleo in parallelo nei laboratori di Roma, Pisa e Genova su campioni da 7 volontari pervenuti da Roma nella settimana dal 17 al 23 novembre 2004.

La qualità dei campioni preparati a Roma, presso il Laboratorio militare, è stata considerata adeguata e da questi campioni è stata completata la preparazione e sono stati allestiti i vetrini.

Le letture dei vetrini ottenuti dai suddetti campioni nei laboratori di Roma, Pisa e Genova hanno mostrato una buona concordanza per tutti i parametri considerati.

I risultati sono stati ritenuti accettabili, così come il periodo di training formativo dei militari presso i vari Laboratori, per cui è stata accettata la variante al protocollo originario, consistente nel processamento e stabilizzazione dei campioni in Te. Op. da eseguirsi in apposito laboratorio gestito da personale militare.

8) Attività di prelievo – 2° Step (post-impiego, T1)

Le attività di campionamento in teatro (2° step, T1) sono state realizzate nel contesto del citato laboratorio di gestione e trattamento dei campioni, ove il team di prelievo ha operato.

I prelievi hanno riguardato inizialmente il personale E.I., M.M. e A.M. programmato per il rientro in Patria entro il mese di dicembre 2004 e, pertanto, si sono realizzati nel periodo 3 – 15 dicembre 2004.

I prelievi sul personale dell'Arma dei CC sono stati invece effettuati dal 15 gennaio al 21 febbraio 2005.

Il numero totale dei militari sottoposti a prelievo alla conclusione del 2° step (campionamento in Iraq), è risultato pari a **867 unità** (547 dell'EI, 140 della MM, 10 dell'AM e 170 dei CC), di cui solo 25 di sesso femminile e 762 di sesso maschile. Campioni di capelli sono stati prelevati da 32 individui.

La perdita di 115 soggetti, campionati nella fase di pre-impiego in Italia ma non in Iraq, è attribuibile alle seguenti motivazioni:

- mancata partenza dall'Italia di alcuni soggetti, giudicati non idonei all'impiego o riserve (31);
- anticipato rimpatrio di altri, per vari motivi (48);
- ritiro del consenso alla prosecuzione dello studio (28);
- impiego in Iraq in aree differenti da quelle del contingente nazionale (8).

Il secondo ed ultimo step di prelievo si è concluso alla fine del mese di febbraio 2005, allorché il team militare di prelievo, rientrato dal Te.Op. è stato disciolto ed i componenti hanno fatto rientro ai Comandi di appartenenza.

Dal confronto fra i campioni prelevati in 1° e 2° step, presupponendo tutti i campioni disponibili come idonei agli accertamenti laboratoristici (evento teorico improbabile, non confermato dalla realtà dei fatti), si deduceva la possibilità di effettuare confronti longitudinali su matrici urinarie ed ematiche per 836 soggetti, e solo per 32 soggetti su capelli.

**2. Aspetti tecnici di dettaglio (vds Allegato A – Materiali e Metodi)**

**VIII. BASI DI DATI E ANALISI STATISTICHE**

UNITA' OPERATIVA ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA' – CENTRO NAZIONALE DI  
EPIDEMIOLOGIA, SORVEGLIANZA E PROMOZIONE DELLA SALUTE

**Responsabil:**

**Dr. Arduino Verdecchia**

**Dr. Riccardo Capocaccia**

**Dr. Roberta De Angelis**

Istituto Superiore di Sanità – CNESPS  
Via Giano della Bella 34  
00161 Roma

## 1. Introduzione

L'obiettivo generale del progetto è di valutare l'esposizione a fattori di rischio tumorale durante il periodo di missione ed eventuali indicatori precoci di potenziale danno biologico ad essi associato. La base di dati utilizzata contiene quattro categorie di variabili.

1. Informazioni storico-anamnestiche relative a caratteristiche individuali ed allo stile di vita precedente alla missione
2. Informazioni sullo stile di vita e sull'attività svolta nel periodo di missione
3. Indicatori biologici di esposizione (xeno-elementi nelle urine, nel sangue e nei capelli)
4. Indicatori di effetti di danno precoce (micronuclei, transriarrangiamenti, DNA)

Queste ultime categorie di dati, e quelli relativi allo stile di vita, sono stati raccolti sui medesimi individui prima e dopo la missione. Questo permette di valutare le variazioni intra-individuali intervenute nel corso della missione, eliminando così i problemi connessi con la variabilità individuale dei parametri analizzati. L'analisi statistica è stata quindi essenzialmente basata sullo studio dei **dati appaiati**, cioè delle variazioni delle variabili ai punti 3 e 4 rilevate in ciascun individuo prima e dopo la missione in relazione sia alle variabili storico/anamnestiche, sia all'attività svolta in missione.

## 2. Dati analizzati

### a. File storico/anamnestico

Questo file contiene dati raccolti tramite questionario somministrato ai soggetti partecipanti. Nel corso delle riunioni delle U.O. si sono selezionate le variabili ritenute rilevanti per lo studio ed è stata decisa la loro categorizzazione. Le variabili utilizzate, oltre al codice identificativo individuale, sono:

1. *età* : tre classi  $\leq 30$  anni; 30-39 anni;  $> 40$  anni;
2. *sex*;
3. *fototipo*: sei categorie standard progressive da I a VI;
4. *fumo*: quattro classi: *non fumatore*,  $< 20$  sigarette die,  $\geq 20$  sigarette die, *ex fumatore*;
5. *alcool*: consumo giornaliero ricostruito sommando le quantità riferite di consumo di birra, vino e superalcolici espresse in *unità alcoliche equivalenti* (bicchiere di

vino = lattina di birra = bicchierino di superalcolici = circa 12 ml di alcool ). Tre classi : *non bevitore, consumo < 0,5 uae, consumo > 0,5 uae*. Il consumo riferito è stato rilevato due volte: prima della missione (T0) e al ritorno (T1);

6. *consumo di frutta*: tre classi: *una volta al giorno, piu' volte al giorno, raramente*. Il consumo riferito è stato rilevato due volte: prima della missione (T0) e al ritorno (T1);
7. *consumo di verdura*: tre classi: *una volta al giorno, piu' volte al giorno, raramente*. Il consumo riferito è stato rilevato due volte: prima della missione (T0) e al ritorno (T1);
8. *numero di missioni effettuate precedentemente*: numero progressivo da 0 a 9;
9. *area di missione in Iraq*: cinque classi: Mittica, White Horse, Mittica/White Horse, Mittica/altro, altro;
10. *impiego prevalente nella missione in Iraq(dettagliato)*: il campo testuale *d\_impiego* corrisponde alla mansione svolta durante la missione in Iraq. Il campo ha formato libero ed è stato quindi necessario normalizzarlo secondo criteri concordati con la Sanità Militare. Sono state individuate 14 categorie distinte di tipologie di impiego, mantenendo massima aderenza alle mansioni previste nel protocollo dello studio. Vedasi Tabella 1 in Appendice 3 per la corrispondenza con le dizioni testuali riportate nei questionari;
11. *impiego prevalente nella missione in Iraq (ridotto)*: le 14 categorie individuate per la variabile *d\_impiego* sono state ulteriormente ridotte a tre classi in funzione del luogo prevalente di svolgimento: *indoor (int)*, *outdoor (ext)*, *misto indoor/outdoor (mix)*. Si veda la Tabella 2 in Appendice 3 per la corrispondenza con la variabile in 14 categorie;
12. *Numero di vaccinazioni effettuate (tutte le tipologie tranne trivalente)*: ad eccezione del vaccino trivalente, tenuto separato, tutte le altre tipologie di vaccino sono state aggregate in un unico contatore. Per le vaccinazioni effettuate negli anni precedenti la missione, si sono escluse tutte quelle con data antecedente al 2003. Poiché in circa un terzo dei record la data di vaccinazione era mancante, si è proceduto a conteggiarle tutte, incluse quelle con data mancante (p\_vacc), oppure a conteggiare solo quelle con data ≥2003

perc  
hè?

(p\_vacc\_2003). Le vaccinazioni effettuate **nell'immediatezza** della missione sono conteggiate in un unico contatore(d\_vacc):

**13. Vaccinazione trivalente** : due modalità: sì/no. Le vaccinazioni trivalenti effettuate prima del 2003 sono state escluse. Si sono ritenuti validi anche i record senza data di effettuazione (p\_triv) o solo i record con data di effettuazione  $\geq 2003$  (p\_triv\_2003). Le vaccinazioni trivalenti effettuate nell'immediatezza della missione sono registrate a parte (d\_triv).

**b. Xenoelementi nelle urine**

Le concentrazioni degli elementi misurati (arsenico, cadmio, molibdeno, nichel, piombo, tungsteno, uranio, vanadio, zirconio) misurate in ( $\mu\text{g/l}$ ) sono state normalizzate a  $\mu\text{g/g}$  di creatinina, utilizzando la misurazione della concentrazione di creatinina effettuata in ogni campione.

**c. Xenoelementi nel siero**

Sono state misurate le concentrazioni ( $\mu\text{g/l}$ ) dei seguenti elementi: arsenico, molibdeno, tungsteno, uranio, vanadio, zirconio

**d. Rapporto isotopico dell'uranio**

Le determinazioni del rapporto tra gli isotopi di massa  $^{235}\text{U}$  e  $^{238}\text{U}$  dell'uranio nei campioni di *urine* sono state effettuate su tutti i campioni con concentrazione di uranio superiore a 25 ng/l e sul corrispondente campione prelevato nello stesso individuo a T0 o a T1 (in questo caso indipendentemente dalla concentrazione di uranio). Sono inoltre state effettuate le rilevazioni dei rapporti isotopici in campioni di *capelli* limitatamente a 6 soggetti, disponibili sia a T0 che a T1.

**e. Alterazioni del DNA**

Sono stati rilevati biomarcatori del danno ossidativo e marcatori oncogenetici, in particolare:

- numero di addotti al DNA
- alterazioni nucleotidiche ossidative del DNA (8-idrossi-2'-desossiguanosina: 8-oxo-dG)

- polimorfismi di suscettibilità genetica:
  - *polimorfismo GSTM1* con due modalità: N e P,
  - *polimorfismo XRCC* con tre modalità: E , M e W,
  - *polimorfismo OGG1* con tre modalità: E , M e W,
  - *combinazione dei polimorfismi GSTM1-XRCC-OGG1*, con 18 diverse modalità derivanti dall'incrocio delle modalità dei tre polimorfismi suddetti nell'ordine GSTM1-XRCC-OGG1 (NEE, NEM,NEW,NME,...etc)

**f. Micronuclei**

Gli esami di laboratorio sui micronuclei sono stati condotti su due sottocampioni distinti, uno dei quali analizzato dall'Unità di Genova, e l'altro dall'Unità di Pisa. Sono state analizzate le seguenti variabili, rilevate con la stessa metodologia nei due centri:

- Percentuale di cellule binucleate,
- Cytokinesis Block Proliferation Index,
- *Cellule binucleate (BN) con micronuclei (MN) su 1000 cellule BN totali lette,*
- *Micronuclei (MN) complessivi su 1000 cellule binucleate (BN) totali lette,*
- *Cellule mononucleate (MONO) con micronuclei (MN) su 1000 cellule mononucleate totali lette,*
- *Micronuclei complessivi su 1000 cellule mononucleate totali lette,*
- Cellule binucleate (BN) con nucleoplasmic bridge (NPB) su 1000 cellule BN totali,
- Nucleoplasmic bridges (NPB) in tutto su 1000 cellule binucleate (BN) totali lette,
- Cellule binucleate (BN) con micronucleo e nucleoplasmic bridge (NPB) su 1000 cellule binucleate totali lette,
- Cellule binucleate (BN) con bud (BUD) su 1000 cellule binucleate totali lette,
- Buds (BUD) complessive su 1000 cellule binucleate totali lette.

**g. Aberrazioni cromosomiche**

Un'analisi delle aberrazioni cromosomiche del DNA sono state fatte su un campione di 98 soggetti, su un totale campionato di 110, sia all'andata (T0) che

al ritorno della missione (T1). I dati sono espressi in termini di numero di cellule con anomalie riscontrate, su 100 cellule analizzate per ciascun soggetto. A causa della sua particolare struttura, il dataset delle aberrazioni cromosomiche è stato analizzato separatamente in termini di frequenze di cellule con anomalie, confrontate prima e dopo la missione.

#### **h. Transriarrangiamenti**

Per rivelare la presenza dei transriarrangiamenti, ogni campione è stato testato separatamente con due sonde, l'una localizzata nel locus **gamma** della regione variabile del TCR e perciò chiamata V $\gamma$ C, l'altra localizzata nel primo gruppo dei segmenti Joining del locus **beta** del TCR e perciò detta Jb1c. Sono state analizzate:

- la media numerica *intrasonda* della sonda *gamma* (*media\_g*),
- la media numerica *intrasonda* della sonda *beta* (*media\_b*),
- la media numerica intersonda, (*media\_gb*) che rappresenta il reale valore numerico dei transriarrangiamenti riscontrati in un individuo rapportato al numero di cellule testate.

### 3. Analisi statistiche

#### a. Analisi univariate

Per ciascun parametro, biologico o fisico, misurato (Y) si sono analizzate le **distribuzioni di frequenza** e le **statistiche di base** nel complesso degli individui esaminati per tre diversi indicatori :

- valori pre-impiego T0 (dati appaiati e non):  $Y_{i,a}$  dove  $i=1,\dots,N_a$
- valori post-impiego T1 (dati appaiati e non):  $Y_{i,r}$  dove  $i=1,\dots,N_r$
- differenze appaiate tra valori T1 e valori T0:  $D_i=Y_{i,r}-Y_{i,a}$  dove  $i=1,\dots,N_{app}$

Le statistiche considerate per caratterizzare le distribuzioni dei tre indicatori sono:

- valori minimo e massimo, mediana e percentili 5 e 95
- valor medio, deviazione standard

L'intervallo di variazione complessivo di ciascun parametro è stato messo a confronto con gli **intervalli di riferimento** disponibili in letteratura da analoghe rilevazioni nella popolazione generale o con gli intervalli forniti dalle varie unità responsabili delle analisi sulla base delle misurazioni storiche effettuate nel laboratorio di riferimento.

Nel caso delle differenze appaiate per codice identificativo individuale si è inoltre testata:

- l'appartenenza o meno alla distribuzione normale
- la significatività statistica dell'ipotesi di media delle differenze nulla.

Poiché per tutti i parametri esaminati il test di normalità della distribuzione delle differenze ha dato esito negativo (1), si è applicato il **test non-parametrico** di Wilcoxon (2) per valutare l'ipotesi di mediana delle differenze nulla.

Da notare che il numero di campioni pre-impiego T0 ( $N_a$ ) non corrisponde esattamente al numero di campioni post-impiego T1 ( $N_r$ ) e che il numero di soggetti con entrambe le misure ( $N_{app}$ ) è risultato essere sempre inferiore a entrambi ( $N_{app}<N_a$  e  $N_{app}<N_r$ ).

#### b. Analisi stratificate

Le informazioni su stile di vita, tipologia di impiego, storia vaccinale etc, contenute nel file *storico-anamnestico*, possono essere correlate con le

variazioni pre-post missione riscontrate. Per questo motivo si è proceduto a replicare le analisi univariate sopra descritte per **ciascuno strato** delle variabili rilevanti del file storico-anamnestico e dei polimorfismi genetici sopra descritti che modulano la suscettibilità individuale alle alterazioni del DNA.

**c. Analisi delle correlazioni**

La presenza di eventuali relazioni tra le differenze individuali (T1 – T0) riscontrate nelle diverse basi di dati (micronuclei, alterazioni del DNA e xeno elementi in urine o siero) è stata valutata utilizzando il coefficiente di correlazione di Pearson (r) espresso da:

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

dove sia x che y si riferiscono alle variabili differenza (Di=Yi,r-Yi,a ) sopradescritte.

**4. Caratteristiche dei soggetti partecipanti e numerosità dei campioni disponibili**

Complessivamente lo studio si riferisce a 981 soggetti per i quali è stato rilevato un numero variabile di determinazioni di xeno-elementi e biomarcatori nei campioni biologici prelevati al tempo T0 e al tempo T1, associate a dati anamnestici. La Tabella VIII - a mostra le caratteristiche salienti dei soggetti campionati desunte dal file storico-anamnestico.

Si tratta di soggetti in maggioranza nella fascia d'età 30-39 anni (60%), prevalentemente uomini (97%), originari di regioni meridionali (76%) e nei ruoli dell'Esercito Italiano (64%). La proporzione di soggetti con 3 o più missioni precedenti a quella in esame è pari al 38%, mentre il 28% all'epoca del prelievo svolgeva la sua prima missione.

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella VIII - a:**  
Caratteristiche generali dei soggetti partecipanti desunte dal file storico/anamnestico.

Variabile	N	prop. (%)	
<b> sesso </b>			
F	28	3%	
M	953	97%	
Totale	981	100%	
<b> età </b>			
<30	241	25%	
30-39	593	60%	
40+	147	15%	
Totale	981	100%	
<b> luogo di nascita </b>			
Centro	119	12%	
Isole	164	17%	
Nord	117	12%	
Sud	580	59%	
mancante	1	0%	
Totale	981	100%	
<b> FFAA </b>			
AM	14	1%	
CC	187	19%	
EI	630	64%	
MM	150	15%	
Totale	981	100%	
<b> numero di missioni precedenti </b>			
	0	274	28%
	1	190	19%
	2	148	15%
	3	142	14%
	4	84	9%
	5	56	6%
	6	38	4%
	7	19	2%
	8	23	2%
	9	7	1%
Totale	981	100%	
<b> sede missione </b>			
MITTICA	484	49%	
MITTICA-ALTRO	4	0%	
MITTICA-WHITE HORSE	61	6%	
WHITE HORSE	272	28%	
ALTRO	19	2%	
mancante	141	14%	
Totale	981	100%	
<b> mansione durante la missione </b>			
armiere	31	3%	
conduttore	81	8%	
disinfettore	3	0%	
elicotterista	2	0%	
genio	8	1%	
lavanderia	1	0%	
logistica	148	15%	
officina meccanica	22	2%	
mezzi terrestri	16	2%	
nucl/batt/chim	4	0%	
pattuglia	404	41%	
sminamento	8	1%	
trasmissioni	23	2%	
ufficio	73	7%	
mancante	157	16%	
Totale	981	100%	

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

L'area di missione prevalente è quella di Mittica (49%), seguita da quella denominata White Horse (28%). La mansione prevalente svolta durante la missione in Iraq è quella connessa con le operazioni di pattugliamento (41%), seguita dalle funzioni logistiche (15%), di conduttore di automezzi (8%) e ufficio (7%). Le informazioni mancanti sulla mansione sono in larga misura relative a soggetti che non hanno avuto prelievo di campioni post-impiego (T1) per i motivi esposti in precedenza.

La Tabella VIII - b riporta, per le varie tipologie di determinazioni effettuate, la numerosità complessiva delle misurazioni disponibili in campioni T0/T1 che sono state incluse nelle analisi statistiche. Ulteriori dettagli sulle caratteristiche dei campioni biologici sottoposti a misura sono descritti nelle sezioni specifiche di ciascun indicatore di esposizione.

**Tabella VIII-b:** Numerosità degli individui e delle determinazioni effettuate nei campioni T0/ T1 di urine, siero e sangue in funzione dei diversi bio-marcatori.

individui	numero di determinazioni *			
		T0	T1	dati appaiati T0/T1
981				
	elementi siero	968	857	854
	elementi urine	930	658	626
	DNA	851	851	851
	micronuclei	978	826	746
	transriarrangiamenti	877	969	869
	aberrazioni crom.	98	98	98

*\* Nel caso di biomarcatori in DNA, micronuclei e transriarrangiamenti, la numerosità varia in funzione del parametro misurato e la tabella riporta la numerosità minima riscontrata.*

---

Hanno contribuito alle attività di questa Unità operativa:

- Andrea Tavilla
- Silvia Francisci
- Francesca Meduri

**Bibliografia generale**

Siegel, S. Non-parametric statistics for the behavioral sciences. (1956). 75-83 New York: McGraw-Hill;

Wilcoxon, F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics*. (1945)1, 80-83.

**IX. RAPPORTI DELLE UNITA' OPERATIVE**

*Ogni Unità Operativa ha sviluppato in piena autonomia il proprio contributo tecnico per la realizzazione del progetto "SIGNUM" e, di conseguenza, detiene la completa responsabilità del dato prodotto*

**X. DOSAGGIO DI U, SUOI ISOTOPI, ED ALTRI XENOELEMENTI**  
**IN URINE, SIERO, CAPELLI**

**Responsabili:**

**Prof. Sergio Caroli,**

**Dr. Marina Patriarca**

**Dr. Roberta De Angelis**

Istituto Superiore di Sanità  
Viale Regina Elena 299  
00161 Roma

## 1. Introduzione e rationale del saggio

Scopo delle attività condotte da questa Unità Operativa è stato fornire un'indicazione obiettiva dell'esposizione interna a uranio (U), uranio depletato (DU) e agli xenoelementi: arsenico (As), cadmio (Cd), molibdeno (Mo), nichel (Ni), piombo (Pb), vanadio (V), tungsteno (W) e zirconio (Zr), attraverso la quantificazione di marcatori biologici di dose interna, identificati come:

- a) concentrazione totale di ciascun elemento chimico nelle urine (valutata su campioni estemporanei di urine e pertanto espressa normalizzata per la concentrazione di creatinina),
- b) concentrazione totale di ciascun elemento chimico nel siero,
- c) concentrazione totale di ciascun elemento chimico nei capelli,
- d) composizione isotopica (espressa come rapporto tra gli isotopi  $^{238}\text{U}$ : $^{235}\text{U}$ ) dell'uranio presente nei campioni biologici analizzati.

A tal proposito l'Unità ha potuto disporre di campioni di urine, siero e capelli prima ( $T_0$ ) e dopo ( $T_1$ ) l'impiego in zona di operazione, prelevati previo ottenimento di consenso informato da parte dei militari partecipanti allo studio.

Le caratteristiche di prestazione dei procedimenti analitici utilizzati sono state determinate prima di iniziare le analisi sui campioni del progetto e monitorate attraverso programmi di controllo di qualità interno.

Per la valutazione dei dati prodotti ai fini di identificare l'eventuale esposizione a xenoelementi durante le missioni di pace in Iraq, sono stati revisionati i dati raccolti da database accessibili al pubblico e dalla letteratura scientifica in merito alle concentrazioni osservate per gli elementi e le matrici oggetto dello studio, in campioni di popolazione generale.

Inoltre sono stati revisionati i livelli di esposizione utilizzati per la tutela di soggetti professionalmente esposti e i riferimenti alle linee guida internazionali in merito all'introduzione di elementi chimici con la dieta da parte della popolazione generale e all'impatto sulla salute di contaminanti metallici nell'ambiente.

## 2. Risultati

I risultati dei dosaggi effettuati per ciascun soggetto sono riportati nel Master file contenuto nel supporto informatico (CD-ROM) allegato (“B”) al presente rapporto, corredati delle informazioni, rese anonime ma necessarie a garantirne l'interpretazione.

### a. Intervalli di riferimento per gli xenoelementi in esame, nelle varie matrici biologiche.

Il disegno del progetto era principalmente mirato al confronto tra i valori osservati, prima (T0) e dopo la missione (T1), nello stesso soggetto, che funziona così da “controllo” di sé stesso.

Per l’attuazione del progetto è stato comunque necessario acquisire informazioni in merito ai livelli di concentrazione attesi, per poter definire in modo idoneo le procedure analitiche, di convalida e di assicurazione della qualità, oltre che per valutare se i valori di concentrazione determinati per gli elementi in esame rientrano o meno negli intervalli considerati normali per il soggetto adulto.

Nel documento in Appendice 4 sono riportati i dati raccolti dalla letteratura scientifica relativi ai valori di riferimento inerenti agli xenoelementi studiati – nelle varie matrici biologiche – per la popolazione generale, per esposizioni professionali o conseguenti ad abitudini di vita.

### b. Numerosità dei campioni e misurazioni effettuate

Le caratteristiche salienti delle misurazioni effettuate per gli xenoelementi previsti dal protocollo per tipologia di matrice biologica sono riassunte nella tabella seguente.

**Tabella X - a:** Numerosità dei campioni T0,T1 di urine,siero e capelli. Misurazioni disponibili per la concentrazione di elementi e rapporto di specie dell’uranio

numero di campioni esaminati (*)				misure effettuate	
matrice biologica	andata (T0)	ritorno (T1)	appaiati T0/T1	concentrazione elementi	Rapporto di specie U
siero	968	857	854	As, Mo,U,V,W,Zr	-
urine	930	658	626	As, Cd, Mo,Ni, Pb,U,V,W,Zr	si
capelli	6	6	6	As, Cd, Mo,Ni, Pb,U,V,W,Zr	si

*1). Misurazioni per i campioni di urine*

I campioni disponibili erano relativi a 952 soggetti. I campioni pre-missione (T0) sono risultati essere 930 e quelli post-missione (T1) 658. Complessivamente **626** soggetti con misure appaiate pre-post missione sono eligibili per l'analisi. Sono state effettuate determinazioni di concentrazione di *tutti* gli elementi previsti nel protocollo, nonché della creatinina. Le misure standardizzate per concentrazione di creatinina sono espresse in µg/g (Tabella X - b). E' stata altresì effettuata la misurazione del rapporto tra gli isotopi di massa  $^{235}\text{U}$  e  $^{238}\text{U}$  (RI  $^{235}\text{U}/^{238}\text{U}$ ) dell'uranio presente in tracce. Sono state effettuate in totale 719 misure di RI, di cui 435 su campioni (T0) e 284 su campioni (T1).

*2). Misurazioni per i campioni di siero*

I campioni disponibili erano relativi a 971 soggetti. I campioni utili (T0) sono risultati essere 968 e quelli (T1) 857. In totale 854 soggetti hanno misure appaiate pre-post missione e sono eligibili per l'analisi. Per i campioni di Siero sono state effettuate determinazioni utili per i seguenti sei elementi: As, Mo, U, V, W, Zr (Tabella X - c). Le motivazioni tecnico-strumentali per cui non è stato possibile misurare le concentrazioni di Cd,Pb,Ni e il rapporto di specie dell'uranio sono riportate nella sezione di descrizione delle metodologie analitiche.

*3). Misurazioni per i campioni di capelli*

Le determinazioni di tutti gli xenoelementi e dei rapporti isotopici dell'uranio sono state effettuate sui campioni dei soli soggetti (6) per i quali erano disponibili entrambi i prelievi effettuati prima (T0) e dopo (T1) la missione in quantitativi idonei al saggio analitico.

**3. Risultati del dosaggio degli xenoelementi in urine e siero**

Le valutazioni statistiche sulla concentrazione di elementi nei soggetti con misure pre-post missione appaiate hanno riguardato l'analisi della distribuzione di frequenza dei valori pre-missione (T0), post-missione (T1) e dei differenziali T1-T0. Nelle Tabelle X - b (campioni urine) e X - c (campioni siero) sono riportate le caratteristiche salienti delle distribuzioni: media, deviazione standard, mediana,

intervallo di variazione minimo e massimo, quantili 5% e 95%. Poiché le misure di concentrazione di tutti gli elementi, sottoposte a test di normalità, sono risultate essere non normalmente distribuite, per valutare il significativo scostamento della variazione T1-T0 dal valore nullo si è utilizzato il test di Wilcoxon. Per l'uranio e per gli elementi significativamente incrementati le stesse analisi statistiche sono state effettuate stratificando rispetto a caratteristiche demografiche, stili di vita e mansioni in Te. Op. (Tabelle X - d / h).

Queste analisi consentono di dire che le variazioni tra T0 e T1 complessivamente risultano:

- diminuite o stabili per: As, Pb, U, V e W
- incrementate per: Cd, Mo, Ni, Zr

Nel seguito sono riportate le considerazioni di dettaglio per ciascun elemento.

### **3.1 Elementi con concentrazioni incrementate in media tra T0 e T1**

#### **Cadmio**

Si è osservato un incremento significativo, ma molto modesto (+ 5% in media) nei campioni di *urine* (questo elemento non è stato misurato nel siero). La concentrazione media passa infatti da 0.274 µg/g in T0 a 0.289 µg/g in T1, e la concentrazione mediana passa da 0.242 a 0.255 µg/g. Tali valori rientrano negli intervalli di riferimento registrati nella popolazione generale non esposta (0.2-1.6 µg/g).

Nelle analisi stratificate per caratteristiche individuali e stile di vita dei soggetti si segnala una correlazione positiva tra incremento differenziale di concentrazione di Cd e consumo di verdura durante la missione: +0.05 µg/g (più V/die), +0.02 (1 V/die), +0.00 (raramente); e un incremento significativo più alto per sede missione White Horse (+0.03 µg/g contro +0.01 non significativo a Mittica). Nessun incremento significativo stratificando per mansione di impiego.

#### **Molibdeno**

Incremento significativo della media sia nei campioni di *siero* (+0.78 partendo da 0.689 µg/l in T0), che in quelli di *urine* (+6.64 partendo da 41.51 µg/g in T0). La mediana si incrementa di meno nelle urine (da 35.6 in T0 a 40.1 in T1) e quasi per nulla nel siero (da 0.60 a 0.60 µg/l). La dispersione in T1 nei campioni

siero è infatti molto elevata e la media è maggiormente influenzata rispetto alla mediana dai valori estremi di concentrazione. I valori di concentrazione rientrano negli intervalli di riferimento riportati in letteratura sia per la rilevazione nelle urine (<168 µg/g) che nel siero (<1.68 µg/l).

L'analisi stratificata per le misure nel siero, che include la casistica più ampia, indica una correlazione positiva con il consumo di frutta e verdura durante la missione, un incremento inferiore per i 270 soggetti di stanza a White Horse (+0.05) che per i 475 con sede a Mittica (+1.05). Tra le mansioni di impiego l'unico incremento statisticamente significativo con livello di incertezza inferiore al 1% si rileva tra gli addetti ad attività di pattugliamento (+1.18 µg/l).

### **Nichel**

Incremento significativo (+ 21% in media) nei campioni *urine* (elemento non misurato nel siero). La concentrazione media passa infatti da 1.51 microg/g in T0 a 1.83 µg/g in T1, la concentrazione mediana da 1.34 a 1.59. Tali valori rientrano abbondantemente nei livelli di riferimento misurati in campioni di popolazione generale (<10 µg/g).

L'analisi degli incrementi stratificata mostra una correlazione positiva con l'età, con la categoria di impiego esterno/interno (incrementi maggiori per mansione svolta all'esterno) e con il consumo di frutta e verdura durante la missione. Mittica è la sede dove si registrano incrementi significativi più forti (+0.41 µg/g contro +0.24 a White Horse). Tra le mansioni di impiego con incrementi significativi la categoria dei conduttori (55 soggetti) presenta l'incremento più alto (+0.51 contro +0.34 ufficio e +0.35 pattugliamento).

### **Zirconio**

Risultati discordanti tra misure nei dati appaiati siero (854 soggetti) e urine (626 soggetti).

Nei campioni di siero si osserva un incremento significativo: la concentrazione media passa da 0.217 µg/l in T0 a 0.296 in T1. La concentrazione mediana si incrementa in misura molto più ridotta (da 0.17 a 0.18) coerentemente con una maggiore dispersione verso destra delle misure in T1 (intervallo 0-33.23 e deviazione standard 1.16) rispetto a T0 (range 0-2.49 e deviazione standard

0.19). I livelli medi e mediani sono ad ogni modo molto al di sotto del livello massimo di riferimento riportato in letteratura (0.7).

Nei campioni di urine si riscontra invece una significativa riduzione del valore medio e una sostanziale stabilità sia della mediana che della dispersione tra T0 (range 0-0.14 µg/g) e T1 (intervallo 0-0.15). L'analisi condotta sui 205 soggetti con campione siero presente e campione urine mancante ha rivelato che questo sottogruppo presenta livelli di concentrazione nel siero mediamente più alti in T1 rispetto ai soggetti con urine e siero disponibili, pertanto la loro esclusione dal dataset urine potrebbe produrre una sottostima dell'incremento differenziale.

L'analisi stratificata per le misure nel siero, che contiene la casistica più completa, indica che l'incremento si concentra nei più giovani (+0.11 µg/l al di sotto dei 30 anni di età; -0.03 a 30-39 anni), è più alto per il gruppo di 270 con sede White Horse (+0.18) che non per i 475 con sede Mittica (+0.01). Tra le mansioni di impiego gli unici incrementi significativi si osservano per attività di logistica e in officina meccanica.

### **3.2 Elementi con concentrazioni mediamente ridotte tra T0 e T1**

#### **Uranio**

Si registrano riduzioni significative ( $P < 0.01$ ) della concentrazione media e mediana sia nei campioni siero (854 soggetti) che nei campioni urine (626 soggetti). La concentrazione media nei campioni siero, che rappresentano la casistica più completa, passa da 0.0390 µg/l in T0 a 0.0339 µg/l in T1, la concentrazione mediana passa da 0.036 a 0.025 µg/l. La distribuzione tra 5° e 95° percentile resta invariata (0-0.07 µg/l). Si osservano oltre il 95° percentile, dei valori estremi più alti in T1 (0.07-1.66) rispetto a T0 (0.07-0.53). I valori di riferimento disponibili in letteratura sono poco robusti per trarre conclusioni (solo uno studio con solo 100 casi, max. 0.011).

Analogo risultato si ottiene nel sottoinsieme dei campioni urine, dove media e mediana in T1 sono inferiori ai valori riscontrati in T0, e l'intervallo di variabilità complessivo della concentrazione è minore a T1 (0.00-0.04 µg/g) rispetto a T0 (0.00-0.28 µg/g). I valori di concentrazione nelle urine rientrano nei livelli di riferimento riportati in letteratura per la popolazione generale ( $< 0.043$  µg/g).

L'analisi stratificata dei campioni di siero indica riduzioni significative in tutte le variabili di stratificazione considerate e nessuna particolare associazione; in particolare non si registra nessun incremento significativo di concentrazione associata alla mansione di impiego in Te. Op..

### **Arsenico**

Si registrano riduzioni significative ( $P < 0.01$ ) della concentrazione media e mediana sia nei campioni siero (854 soggetti) che nei campioni urine (626 soggetti). La concentrazione media nei campioni siero, che rappresentano la casistica più completa, passa da 1.37  $\mu\text{g/l}$  in T0 a 0.83  $\mu\text{g/l}$  in T1, la concentrazione mediana passa da 0.6 a 0.4  $\mu\text{g/l}$ .

Analogo risultato si ottiene nel sottoinsieme dei campioni urine, dove la concentrazione media si dimezza (-26.99  $\mu\text{g/g}$ ) e la mediana si riduce da 22.2  $\mu\text{g/g}$  in T1 a 16.3  $\mu\text{g/g}$  in T0. L'intervallo di variabilità complessivo della concentrazione è minore a T1 rispetto a T0 in entrambe le casistiche siero e urine. I livelli di concentrazione rientrano negli intervalli di riferimento rilevati in campioni di popolazione generale.

### **Piombo**

Riduzione significativa (-16% in media) nei campioni *urine* (elemento non misurato nel siero). La concentrazione media passa infatti da 1.20  $\mu\text{g/g}$  in T0 a 0.998  $\mu\text{g/g}$  in T1, la concentrazione mediana da 0.97 a 0.85  $\mu\text{g/g}$ . L'intervallo di variabilità complessivo della concentrazione è minore al T1 rispetto a T0. I livelli di concentrazione in T0 e in T1 rientrano negli intervalli di riferimento disponibili per la popolazione generale (fino a 2.3  $\mu\text{g/g}$ ).

### **Vanadio**

Si registrano riduzioni significative ( $P < 0.01$ ) della concentrazione media e mediana sia nei campioni siero (854 soggetti) che nei campioni urine (626 soggetti). La concentrazione media nei campioni di siero passa da 0.036  $\mu\text{g/l}$  in T0 a 0.032  $\mu\text{g/l}$  in T1, la concentrazione mediana passa da 0.030 a 0.000  $\mu\text{g/l}$  e l'intervallo complessivo di variabilità si riduce da (0-0.71) in T0 a (0-0.55) in T1. Tali concentrazioni rientrano abbondantemente nei valori di riferimento misurati in campioni di popolazione generale non esposta (fino a 0.9  $\mu\text{g/l}$ ).

Analogo risultato si ottiene nel sottoinsieme dei campioni urine, dove la concentrazione media si riduce di circa il 25% (da 0.080 a 0.062 µg/g) e la mediana si riduce da 0.060 µg/g in T1 a 0.051 µg/g in T0. Anche nei campioni di urine l'intervallo di variazione complessivo della concentrazione è inferiore a T1 rispetto a T0. I valori riscontrati sono compatibili con l'intervallo di riferimento derivato da studi sulla popolazione generale (0.166 -10 µg /l).

### **Tungsteno**

I risultati non sono completamente concordanti tra misure nei dati appaiati siero (854 soggetti) e urine (626 soggetti). Nei campioni di siero si osserva una modesta (-4%) riduzione significativa ( $P < 0.01$ ) della concentrazione media che passa da 0.068 µg/l in T0 a 0.065 in T1. La concentrazione mediana si riduce anch'essa da 0.060 a 0.050. I valori di concentrazione sono al di sotto dei livelli massimi di riferimento della popolazione generale.

Nei risultati urine si osserva invece un incremento (+25%), ai limiti della significatività statistica ( $P = 0.03$ ), della concentrazione media (da 0.124 a 0.155 µg/g) e più modesto della mediana (+7%) che passa da 0.082 a 0.089 µg/g. Anche in questo caso i livelli di concentrazione rientrano abbondantemente negli intervalli di riferimento rilevati in popolazioni non esposte (fino a 3.3 µg/l).

Questi risultati sono ricavati su un sottoinsieme dei soggetti inclusi nelle analisi del siero ed hanno pertanto una validità più limitata.

### **3.3 Associazione con i biomarcatori di impatto genotossico (micronuclei e DNA).**

Obiettivo di questa ulteriore analisi è valutare l'eventuale riflesso dell'incremento pre-post impiego nella concentrazione di xeno-elementi sui marcatori molecolari di impatto genotossico, ovvero percentuale di cellule micronucleate, addotti e alterazioni ossidative del DNA. A tale scopo si è verificato se per gli individui con incrementi di concentrazione di xeno-elementi più elevati tra quelli riscontrati nella casistica esaminata (oltre la soglia del 75° percentile) si rilevino incrementi dei bio-marcatori molecolari superiori ai valori ottenuti nel campione complessivo.

L'analisi è stata effettuata per tutti gli xeno-elementi oggetto di indagine. I soggetti con incrementi di concentrazione nel siero di As, Mo, U, V, W e Zr

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

superiori al 75° percentile sono stati selezionati dalla distribuzione rilevata nel campione complessivo per ciascun elemento. I corrispondenti valori soglia sono rispettivamente: 0.3 µg/l per As, a 0.3 µg/l per Mo, a 0.005 µg/l per U, a 0.01 µg/l per V, a 0.01 µg/l per W e a 0.15 µg/l per Zr. Per Cd, Ni e Pb, gli individui con i maggiori incrementi di concentrazione nelle urine sono stati selezionati con lo stesso criterio. La soglia del 75° percentile per l'incremento di concentrazione nelle urine corrisponde a: 0.1 µg/g per Cd, a 0.8 µg/g per Ni e a 0.1 µg/g per Pb.

La distribuzione dei differenziali pre-post impiego dei marcatori molecolari non presenta differenze rilevanti rispetto a quanto osservato nel campione complessivo (Tabella X - j).

La frequenza di cellule binucleate con micronuclei è incrementata mediamente di  $0.72 \pm 3.17$  nel campione totale, mentre varia da  $0.41 \pm 2.9$  per i soggetti con concentrazione incrementata di V fino ad un massimo di  $1.04 \pm 3$  per gli individui ad incrementata concentrazione di Mo.

La frequenza di cellule mononucleate con micronuclei nei soggetti con incrementata concentrazione di xeno-elementi presenta una tendenza all'aumento confrontabile (da un minimo di  $0.12 \pm 1.6$  per il V fino ad un massimo di  $0.37 \pm 1.6$  per U) con quella riscontrata in media nel campione totale ( $0.25 \pm 1.68$ ). Per Cd e Zr, dove si osservano incrementi superiori ( $+ 0.48 \pm 1.8$  per Cd e  $0.66 \pm 1.7$  per Zr), seppure al limite della significatività statistica, la correlazione tra i differenziali di concentrazione e quelli di frequenza di cellule mononucleate con micronuclei è irrilevante (Zr:  $R=0.13$ ) (Cd:  $R=-0.11$ ).

Per il numero medio di alterazioni ossidative al DNA si rilevano modesti incrementi (tra  $0.29 \pm 1.04$  per lo Zr e  $0.79 \pm 2.44$  per l'As) del tutto comparabili con l'incremento rilevato per il totale dei soggetti esaminati ( $0.67 \pm 2.02$  per  $10^5$  nucleotidi).

La quantità totale media di addotti al DNA, risultata sostanzialmente invariata nel campione complessivo ( $-0.004 \pm 0.83$  per  $10^8$  nucleotidi), per gli individui con i maggiori incrementi di concentrazione di Mo, Zr, U, V presenta lievi riduzioni non significative (da  $-0.045$  a  $-0.009$  rispettivamente) e modesti incrementi, non sempre significativi, per i restanti xeno-elementi (da  $0.035$  per W a  $0.15$  per Pb). L'entità di tali aumenti è comunque inferiore a quello legato all'effetto età, unico elemento per il quale si sono registrati incrementi significativi, per quanto

modesti, negli addotti al DNA tra T0 e T1 (+0.21 addotti/10<sup>8</sup> nucleotidi nei soggetti ultraquarantenni rispetto ai soggetti di età inferiore ai 40 anni).

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

Tabella X - b: Concentrazioni di xenoelementi standardizzate per creatinina ( $\mu\text{g/g}$ ) nei campioni di urine per i soggetti con dati appaiati a T0 e T1.

		arsenico	cadmio	molibdeno	nicel	piombo	uranio	vanadio	tungsteno	zirconio
	<b>Numero soggetti</b>	626	626	626	626	626	626	626	626	626
<b>valori T0 (dati appaiati)</b>	<b>media</b>	<b>54.5427</b>	<b>0.2742</b>	<b>41.5142</b>	<b>1.5130</b>	<b>1.1967</b>	<b>0.0158</b>	<b>0.0802</b>	<b>0.1244</b>	<b>0.0026</b>
	<b>dev st</b>	108.71	0.16	28.38	1.02	0.94	0.02	0.08	0.15	0.01
	<b>minimo</b>	2.72	0.00	3.36	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	<b>quantile 5%</b>	5.87	0.12	15.86	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00
	<b>mediana</b>	22.208	0.242	35.602	1.338	0.975	0.012	0.060	0.082	0.000
	<b>quantile 95%</b>	249.52	0.55	89.75	3.26	2.38	0.04	0.21	0.37	0.02
	<b>massimo</b>	1150.24	1.93	324.44	7.33	13.74	0.28	0.87	1.54	0.14
<b>valori T1 (dati appaiati)</b>	<b>media</b>	<b>27.5532</b>	<b>0.2890</b>	<b>48.1583</b>	<b>1.8351</b>	<b>0.9985</b>	<b>0.0044</b>	<b>0.0623</b>	<b>0.1554</b>	<b>0.0020</b>
	<b>dev st</b>	37.45	0.15	30.13	1.45	0.72	0.00	0.05	0.49	0.01
	<b>minimo</b>	2.65	0.00	4.58	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	<b>quantile 5%</b>	4.86	0.12	15.71	0.00	0.43	0.00	0.00	0.00	0.00
	<b>mediana</b>	16.330	0.255	40.094	1.592	0.855	0.004	0.051	0.089	0.000
	<b>quantile 95%</b>	82.86	0.58	103.87	4.06	2.15	0.01	0.16	0.43	0.00
	<b>massimo</b>	350.98	1.04	266.19	12.44	10.96	0.04	0.39	11.88	0.15
<b>test differenze T0/T1</b>	<b>media</b>	<b>-26.9895</b>	<b>0.0148</b>	<b>6.6441</b>	<b>0.3221</b>	<b>-0.1983</b>	<b>-0.0114</b>	<b>-0.0179</b>	<b>0.0310</b>	<b>-0.0006</b>
	<b>dev st</b>	112.51	0.18	39.30	1.62	0.83	0.02	0.08	0.51	0.02
	<b>minimo</b>	-1068.96	-1.27	-242.31	-5.40	-10.70	-0.27	-0.74	-1.51	-0.14
	<b>quantile 5%</b>	-221.225	-0.260	-48.065	-1.719	-1.158	-0.036	-0.139	-0.236	-0.019
	<b>mediana</b>	-5.006	0.011	4.888	0.231	-0.138	-0.008	-0.009	0.006	0
	<b>quantile 95%</b>	54.60	0.300	69.029	2.577	0.688	0.001	0.081	0.310	0
	<b>massimo</b>	298.61	0.69	249.59	11.56	4.50	0.01	0.39	11.76	0.15
	<b>Wilcoxon stat.test</b>	-6.73	2.84	5.11	5.12	-8.51	-20.67	-5.45	2.12	-0.11
	<b>p-value</b>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.03	0.02

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

Tabella X - c: Concentrazioni di xeno-elementi ( $\mu\text{g/L}$ ) nei campioni di siero per i soggetti con dati appaiati in T0 e T1.

		arsenico	molibdeno	uranio	vanadio	tungsteno	zirconio
	<i>Numero soggetti</i>	854	854	854	854	854	854
valori T0 (dati appaiati)	<i>media</i>	<b>1.371</b>	<b>0.689</b>	<b>0.039</b>	<b>0.036</b>	<b>0.068</b>	<b>0.217</b>
	<i>dev st</i>	2.74	0.84	0.03	0.06	0.09	0.19
	<i>minimo</i>	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00
	<i>quantile 5%</i>	0.00	0.30	0.01	0.00	0.00	0.00
	<i>mediana</i>	0.600	0.600	0.036	0.030	0.060	0.170
	<i>quantile 95%</i>	5.80	1.20	0.07	0.12	0.13	0.50
	<i>massimo</i>	27.10	15.70	0.53	0.71	2.14	2.49
valori T1 (dati appaiati)	<i>media</i>	<b>0.8340</b>	<b>1.4685</b>	<b>0.0339</b>	<b>0.0320</b>	<b>0.0653</b>	<b>0.2957</b>
	<i>dev st</i>	1.80	8.82	0.07	0.06	0.40	1.16
	<i>minimo</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	<i>5 quant</i>	0.00	0.30	0.01	0.00	0.00	0.07
	<i>mediana</i>	0.400	0.600	0.025	0.000	0.050	0.180
	<i>95 quant</i>	2.90	1.60	0.07	0.13	0.14	0.82
	<i>massimo</i>	24.80	142.10	1.66	0.55	10.34	33.23
test differenze T0/T1	<i>media</i>	<b>-0.5369</b>	<b>0.7790</b>	<b>-0.0054</b>	<b>-0.0044</b>	<b>-0.0028</b>	<b>0.0792</b>
	<i>dev st</i>	3.14	8.61	0.07	0.05	0.41	1.17
	<i>minimo</i>	-25.20	-15.40	-0.51	-0.61	-2.14	-2.10
	<i>5 quant</i>	-5.1	-0.6	-0.05	-0.07	-0.11	-0.31
	<i>mediana</i>	-0.1	0.0	-0.0077	0.0	-0.01	0.02
	<i>95 quant</i>	2.0	1.0	0.0405	0.07	0.08	0.6
	<i>massimo</i>	20.50	135.30	1.63	0.38	10.34	33.12
	<i>Wilcoxon stat.test</i>	-5.60	3.01	-10.16	-1.80	-7.25	2.35
	<i>p-value</i>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella X - d:** Concentrazione ( $\mu\text{g/g}$ ) di cadmio nei campioni di urine (dati appaiati T0 e T1). In neretto i valori corrispondenti a differenze significativamente diverse da zero con livello di confidenza del 95% ( $p\text{-value} < 0.05$ )

Cadmio	Urine	N	test differenze A/R				valori Andata (dati appaiati)					valori Ritorno (dati appaiati)					p-value
			media	dev st	min	max	media	5 quant	median	95 quan	max	media	5 quant	median	95 quan	max	
	<b>totale</b>	<b>626</b>	<b>0.01</b>	<b>0.18</b>	<b>-1.27</b>	<b>0.69</b>	<b>0.27</b>	<b>0.12</b>	<b>0.24</b>	<b>0.55</b>	<b>1.93</b>	<b>0.29</b>	<b>0.12</b>	<b>0.25</b>	<b>0.58</b>	<b>1.04</b>	<b>0.004</b>
	<b>categoria int/ext</b>																
	ext	327	0.01	0.16	-0.82	0.69	0.27	0.12	0.23	0.51	1.21	0.27	0.13	0.24	0.52	0.83	0.202
	int	180	<b>0.03</b>	0.21	-1.27	0.67	<b>0.28</b>	<b>0.12</b>	<b>0.24</b>	<b>0.58</b>	<b>1.93</b>	<b>0.31</b>	<b>0.13</b>	<b>0.27</b>	<b>0.69</b>	<b>1.04</b>	0.011
	mix	119	0.01	0.17	-0.53	0.57	0.28	0.11	0.26	0.55	1.06	0.30	0.11	0.27	0.58	0.76	0.247
	<b>eta'</b>																
	<30	444	<b>0.02</b>	0.18	-1.27	0.67	<b>0.26</b>	<b>0.11</b>	<b>0.23</b>	<b>0.51</b>	<b>1.93</b>	<b>0.29</b>	<b>0.13</b>	<b>0.25</b>	<b>0.58</b>	<b>1.04</b>	0.000
	30-39	134	0.01	0.17	-0.43	0.69	0.28	0.13	0.26	0.51	0.70	0.29	0.12	0.25	0.64	1.00	0.934
	40+	48	<b>-0.07</b>	0.17	-0.51	0.35	<b>0.38</b>	<b>0.18</b>	<b>0.35</b>	<b>0.73</b>	<b>0.76</b>	<b>0.31</b>	<b>0.14</b>	<b>0.28</b>	<b>0.54</b>	<b>0.61</b>	0.003
	<b>fumo</b>																
	0	6	-0.09	0.13	-0.31	0.11	0.33	0.15	0.38	0.45	0.45	0.24	0.09	0.28	0.33	0.33	0.219
	0	267	0.01	0.16	-0.51	0.69	0.25	0.11	0.22	0.48	0.85	0.26	0.12	0.23	0.52	0.94	0.261
	1-19	171	<b>0.02</b>	0.20	-1.27	0.67	<b>0.29</b>	<b>0.13</b>	<b>0.25</b>	<b>0.58</b>	<b>1.93</b>	<b>0.31</b>	<b>0.14</b>	<b>0.27</b>	<b>0.63</b>	<b>1.04</b>	0.023
	20+	101	0.02	0.18	-0.82	0.57	0.28	0.11	0.24	0.51	1.21	0.30	0.14	0.26	0.58	1.00	0.060
	EX	81	0.00	0.18	-0.91	0.40	0.31	0.12	0.27	0.66	1.35	0.31	0.13	0.28	0.57	0.73	0.445
	<b>frutta</b>																
	2	2	0.06	0.01	0.05	0.07	0.19	0.19	0.19	0.20	0.20	0.26	0.25	0.26	0.27	0.27	0.500
	1V/die	281	<b>0.01</b>	0.17	-0.91	0.69	<b>0.27</b>	<b>0.11</b>	<b>0.24</b>	<b>0.53</b>	<b>1.35</b>	<b>0.28</b>	<b>0.13</b>	<b>0.25</b>	<b>0.54</b>	<b>1.00</b>	0.045
	PIU' V/die	109	0.02	0.21	-1.27	0.47	0.27	0.11	0.24	0.55	1.93	0.29	0.12	0.26	0.65	1.04	0.197
	RAR	234	0.01	0.17	-0.82	0.67	0.28	0.13	0.25	0.58	1.21	0.29	0.13	0.26	0.62	0.91	0.141
	<b>verdura</b>																
	4	4	-0.05	0.13	-0.19	0.07	0.35	0.19	0.24	0.73	0.73	0.30	0.15	0.26	0.54	0.54	0.625
	1V/die	232	<b>0.02</b>	0.18	-0.91	0.64	<b>0.27</b>	<b>0.11</b>	<b>0.24</b>	<b>0.53</b>	<b>1.35</b>	<b>0.29</b>	<b>0.12</b>	<b>0.25</b>	<b>0.57</b>	<b>1.04</b>	0.017
	PIU' V/die	78	<b>0.05</b>	0.17	-0.28	0.69	<b>0.26</b>	<b>0.11</b>	<b>0.23</b>	<b>0.50</b>	<b>0.58</b>	<b>0.30</b>	<b>0.09</b>	<b>0.27</b>	<b>0.68</b>	<b>0.83</b>	0.025
	RAR	312	<b>0.00</b>	0.18	-1.27	0.67	0.28	0.12	0.24	0.57	1.93	0.28	0.13	0.25	0.58	0.91	0.353
	<b>alcol</b>																
	0	491	<b>0.02</b>	0.18	-1.27	0.69	<b>0.28</b>	<b>0.12</b>	<b>0.24</b>	<b>0.53</b>	<b>1.93</b>	<b>0.29</b>	<b>0.13</b>	<b>0.26</b>	<b>0.58</b>	<b>1.00</b>	0.003
	0-0.5	110	0.00	0.16	-0.47	0.47	0.28	0.11	0.23	0.57	0.75	0.28	0.12	0.24	0.61	0.75	0.763
	0.5+	25	0.02	0.16	-0.27	0.45	0.24	0.11	0.22	0.46	0.59	0.27	0.12	0.21	0.52	1.04	0.610
	<b>numero missioni</b>																
	0	186	-0.01	0.20	-1.27	0.67	0.29	0.13	0.24	0.63	1.93	0.28	0.11	0.24	0.59	0.91	0.622
	1	122	0.02	0.16	-0.48	0.51	0.27	0.12	0.24	0.59	0.78	0.29	0.14	0.27	0.54	1.00	0.083
	2	87	0.04	0.17	-0.43	0.69	0.27	0.12	0.26	0.51	0.69	0.31	0.14	0.26	0.64	0.83	0.117
	3	88	0.03	0.18	-0.82	0.64	0.27	0.11	0.24	0.51	1.21	0.30	0.13	0.25	0.60	1.04	0.050
	4	49	0.05	0.15	-0.42	0.35	0.27	0.14	0.25	0.50	0.56	0.32	0.14	0.33	0.52	0.58	0.009
	5	36	0.01	0.15	-0.43	0.29	0.26	0.12	0.23	0.55	0.69	0.28	0.12	0.26	0.53	0.63	0.345
	6	25	0.01	0.14	-0.41	0.25	0.25	0.13	0.22	0.41	0.55	0.26	0.12	0.24	0.49	0.63	0.393
	7	13	-0.01	0.14	-0.27	0.20	0.24	0.10	0.21	0.46	0.46	0.23	0.13	0.20	0.38	0.38	0.588
	8	15	0.01	0.22	-0.45	0.41	0.27	0.09	0.27	0.66	0.66	0.28	0.10	0.24	0.73	0.73	0.978
	9	5	0.01	0.18	-0.23	0.15	0.24	0.08	0.22	0.46	0.46	0.24	0.08	0.26	0.37	0.37	1.000
	<b>sede</b>																
	16	16	0.04	0.20	-0.45	0.32	0.24	0.07	0.19	0.66	0.66	0.28	0.08	0.27	0.63	0.63	0.348
	ALTRO	15	-0.05	0.13	-0.25	0.21	0.31	0.15	0.32	0.56	0.56	0.27	0.09	0.27	0.46	0.46	0.169
	MITTICA	349	0.01	0.18	-1.27	0.69	0.28	0.12	0.24	0.55	1.93	0.29	0.12	0.25	0.60	1.00	0.279
	MITTICA-ALTRO	3	-0.18	0.12	-0.26	-0.05	0.47	0.30	0.45	0.66	0.66	0.28	0.21	0.25	0.40	0.40	0.250
	MITTICA-WHITE HORSE	46	0.02	0.21	-0.91	0.33	0.27	0.11	0.23	0.51	1.35	0.29	0.15	0.25	0.50	0.69	0.057
	WHITE HORSE	197	<b>0.03</b>	0.17	-0.82	0.56	<b>0.27</b>	<b>0.12</b>	<b>0.24</b>	<b>0.51</b>	<b>1.21</b>	<b>0.29</b>	<b>0.12</b>	<b>0.26</b>	<b>0.59</b>	<b>1.04</b>	0.002
	<b>mansione</b>																
	non presente	9	0.01	0.18	-0.31	0.30	0.27	0.13	0.33	0.45	0.45	0.29	0.09	0.29	0.49	0.49	0.910
	armiere	9	0.09	0.17	-0.07	0.45	0.30	0.15	0.28	0.59	0.59	0.39	0.20	0.31	1.04	1.04	0.203
	non classificata	20	0.04	0.13	-0.25	0.25	0.24	0.14	0.20	0.45	0.51	0.28	0.13	0.26	0.56	0.63	0.202
	conduttore	55	0.04	0.25	-0.91	0.67	0.31	0.11	0.25	0.64	1.35	0.35	0.14	0.27	0.91	1.00	0.154
	disinfettore	2	-0.09	0.02	-0.11	-0.08	0.28	0.27	0.28	0.29	0.29	0.18	0.16	0.18	0.21	0.21	0.500
	elicotterista	2	-0.04	0.16	-0.15	0.07	0.25	0.20	0.25	0.31	0.31	0.22	0.16	0.22	0.27	0.27	1.000
	genio	5	0.20	0.17	-0.01	0.46	0.25	0.15	0.27	0.32	0.32	0.44	0.19	0.42	0.78	0.78	0.125
	lavanderia	1	0.04		0.04	0.04	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	1.000
	logistica	104	0.01	0.18	-0.53	0.57	0.29	0.12	0.26	0.55	1.06	0.30	0.11	0.28	0.58	0.76	0.306
	off. Meccanica	13	0.08	0.17	-0.17	0.38	0.22	0.09	0.22	0.42	0.42	0.30	0.08	0.33	0.60	0.60	0.168
	mezzi terrestri	13	0.07	0.18	-0.27	0.41	0.30	0.13	0.26	0.58	0.58	0.38	0.16	0.31	0.72	0.72	0.080
	pattugliatore	315	0.00	0.16	-0.82	0.69	0.27	0.11	0.23	0.53	1.21	0.27	0.12	0.24	0.52	0.83	0.344
	sminamento	5	0.03	0.18	-0.24	0.23	0.30	0.13	0.30	0.45	0.45	0.32	0.21	0.26	0.63	0.63	0.813
	trasmissioni	13	0.04	0.12	-0.16	0.30	0.24	0.05	0.25	0.40	0.40	0.28	0.16	0.26	0.56	0.56	0.376
	ufficio	60	-0.01	0.22	-1.27	0.51	0.29	0.13	0.24	0.58	1.93	0.27	0.12	0.25	0.59	0.77	0.994
	<b>sesto</b>																
	F	16	-0.04	0.35	-1.27	0.28	0.35	0.12	0.25	1.93	1.93	0.30	0.14	0.27	0.65	0.65	0.597
	M	610	<b>0.02</b>	0.17	-0.91	0.69	<b>0.27</b>	<b>0.12</b>	<b>0.24</b>	<b>0.55</b>	<b>1.35</b>	<b>0.29</b>	<b>0.12</b>	<b>0.25</b>	<b>0.58</b>	<b>1.04</b>	0.006
	<b>trivalente</b>																
	0	587	<b>0.01</b>	0.17	-1.27	0.69	<b>0.27</b>	<b>0.12</b>	<b>0.24</b>	<b>0.55</b>	<b>1.93</b>	<b>0.29</b>	<b>0.13</b>	<b>0.26</b>	<b>0.58</b>	<b>1.04</b>	0.004
	1	39															

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella X - e:** Concentrazione (µg/l) di molibdeno nei campioni di siero (dati appaiati T0 eT1).  
 In neretto i valori corrispondenti a differenze significativamente diverse da zero con livello di confidenza del 95% (p-value <0.05)

Molibdeno		test differenze A/R				valori Andata (dati appaiati)					valori Ritorno (dati appaiati)					p-value
Siero	n	media	dev st	min	max	media	5 quant	median:95	quant	max	media	5 quant	median:95	quant	max	
<b>totale</b>	<b>854</b>	<b>0.78</b>	<b>8.61</b>	<b>-15.4</b>	<b>135.3</b>	<b>0.69</b>	<b>0.3</b>	<b>0.6</b>	<b>1.2</b>	<b>15.7</b>	<b>1.47</b>	<b>0.3</b>	<b>0.6</b>	<b>1.6</b>	<b>142.1</b>	<b>0</b>
<b>categoria int/ext</b>																
ext	421	<b>1.12</b>	10.27	-15.4	128	<b>0.73</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.3	15.7	<b>1.85</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.8	142.1	0.003
int	261	<b>0.67</b>	8.48	-1	135.3	<b>0.64</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.1	2.4	<b>1.31</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.4	135.9	0.012
mix	172	0.11	0.97	-1.7	8.7	0.66	0.3	0.6	1.1	2.2	0.77	0.3	0.6	1.4	9.2	0.356
<b> sesso</b>																
F	21	0.17	0.40	-0.4	1.2	0.50	0.3	0.4	0.8	0.8	0.67	0.3	0.6	1.3	1.6	0.102
M	833	<b>0.79</b>	8.72	-15.4	135.3	<b>0.69</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.2	15.7	<b>1.49</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.6	142.1	0.001
<b> età</b>																
<30	647	<b>0.66</b>	8.25	-15.4	135.3	<b>0.68</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.2	15.7	<b>1.35</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.5	135.9	0.001
30-39	152	<b>1.27</b>	10.68	-9.9	128	<b>0.75</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.2	14.1	<b>2.02</b>	0.2	<b>0.6</b>	1.8	142.1	0.009
40+	55	0.79	6.09	-1	45	0.60	0.3	0.5	1	1.7	1.39	0	0.5	1.3	45.6	0.259
<b> fumo</b>																
0	8	-0.08	0.37	-0.8	0.5	0.81	0.4	0.7	1.5	1.5	0.74	0.5	0.65	1	1	0.656
0	359	<b>1.36</b>	11.74	-9.9	135.3	<b>0.70</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.1	14.1	<b>2.06</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.7	142.1	0
1-19	240	0.68	7.41	-1.6	111.3	0.68	0.3	0.6	1.3	2.6	1.36	0.3	0.6	1.6	111.7	0.322
20+	141	0.07	1.91	-15.4	14.8	0.71	0.3	0.6	1.1	15.7	0.79	0.3	0.6	1.3	15.2	0.12
EX	106	0.05	0.42	-1	1.6	0.63	0.3	0.6	1.1	1.7	0.67	0.2	0.6	1.5	2.2	0.5
<b> frutta</b>																
1V/die	2	0.65	0.21	0.5	0.8	0.55	0.5	0.55	0.6	0.6	1.20	1.1	1.2	1.3	1.3	0.5
1V/die	389	1.01	9.38	-15.4	135.3	0.69	0.3	0.6	1.3	15.7	1.70	0.3	0.6	1.8	135.9	0.063
PIU' V/die	135	<b>1.95</b>	14.60	-1	128	<b>0.75</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.2	14.1	<b>2.70</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.7	142.1	0.028
RAR	328	<b>0.02</b>	0.75	-9.9	4.9	<b>0.67</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.1	10.8	<b>0.69</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.3	5.3	0.02
<b> verdura</b>																
1V/die	4	0.33	0.43	-0.2	0.8	0.50	0.4	0.5	0.6	0.6	0.83	0.3	0.85	1.3	1.3	0.375
1V/die	317	<b>1.26</b>	10.86	-1.3	135.3	<b>0.68</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.1	14.1	<b>1.94</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.7	142.1	0.002
PIU' V/die	105	1.02	11.09	-15.4	112.2	0.77	0.3	0.6	1.3	15.7	1.80	0	0.6	1.6	112.8	0.978
RAR	428	<b>0.37</b>	5.53	-9.9	111.3	<b>0.68</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.2	10.8	<b>1.04</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.5	111.7	0.006
<b> alcool</b>																
0	656	<b>0.98</b>	9.78	-15.4	135.3	<b>0.71</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.2	15.7	<b>1.69</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.6	142.1	0
0-0.5	156	0.15	1.77	-1.3	21.6	0.64	0.3	0.6	1.2	2.6	0.79	0.3	0.6	1.3	24	0.507
0.5+	42	0.03	0.40	-0.6	1.3	0.58	0.3	0.5	1.1	1.2	0.61	0.3	0.5	1.3	2.1	0.917
<b> numero missioni</b>																
0	241	0.53	8.32	-15.4	128	0.80	0.3	0.6	1.2	15.7	1.32	0.3	0.6	1.5	142.1	0.618
1	163	<b>2.08</b>	14.18	-1.6	135.3	<b>0.65</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.2	2.4	<b>2.73</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.7	135.9	0.03
2	128	0.06	0.43	-0.9	2	0.62	0.3	0.6	1.1	1.5	0.68	0.3	0.6	1.4	2.5	0.155
3	125	-0.06	1.01	-9.9	2.5	0.75	0.3	0.6	1.2	10.8	0.69	0.3	0.6	1.3	2.8	0.612
4	70	<b>1.76</b>	13.40	-0.8	112.2	<b>0.59</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.1	1.2	<b>2.35</b>	0.3	<b>0.7</b>	1.8	112.8	0.005
5	50	0.42	2.14	-0.6	14.8	0.62	0.4	0.6	1	1.3	1.04	0.3	0.6	1.6	15.2	0.134
6	34	0.18	1.00	-1.7	4.9	0.55	0.3	0.5	0.9	2.2	0.74	0.3	0.5	2.2	5.3	0.673
7	17	1.45	5.21	-0.2	21.6	0.59	0.3	0.5	2.4	2.4	2.05	0.4	0.6	24	24	0.096
8	20	1.17	3.86	-1	15.8	0.63	0.3	0.6	1.4	1.5	1.79	0.15	0.6	12.15	16.4	0.337
9	6	0.22	0.43	-0.5	0.7	0.45	0.3	0.4	0.7	0.7	0.67	0.2	0.6	1.1	1.1	0.219
<b> sede</b>																
	26	0.17	0.92	-1	3.8	0.67	0.3	0.6	1.3	1.5	0.84	0.3	0.6	2.2	4.4	0.695
ALTRO	18	0.38	1.80	-0.3	7.5	0.63	0.3	0.6	1.1	1.1	1.01	0.3	0.65	7.9	7.9	0.677
MITTICA	475	<b>1.05</b>	10.33	-15.4	135.3	<b>0.72</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.2	15.7	<b>1.76</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.6	142.1	0.04
MITTICA-ALTRO	4	2.08	4.45	-0.9	8.7	0.78	0.5	0.7	1.2	1.2	2.85	0.3	0.95	9.2	9.2	0.625
MITTICA-WHITE HORSE	61	<b>2.21</b>	14.25	-1.3	111.3	<b>0.66</b>	0.4	<b>0.6</b>	1.3	2.6	<b>2.88</b>	0.4	<b>0.7</b>	2.2	111.7	0
WHITE HORSE	270	<b>0.05</b>	0.46	-2.7	3.9	<b>0.65</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.1	3.6	<b>0.70</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.4	4.3	0.031
<b> mansione</b>																
non presente	12	0.08	0.37	-0.8	0.7	0.74	0.4	0.65	1.5	1.5	0.83	0.6	0.8	1.3	1.3	0.285
armi	31	0.05	0.41	-0.6	1.2	0.59	0.4	0.5	1	1.1	0.65	0.3	0.6	1.6	1.6	0.842
non classificata	29	0.29	0.83	-0.7	3.8	0.57	0.3	0.5	1.1	1.2	0.86	0.5	0.6	2.2	4.4	0.074
conduttore	80	0.01	0.30	-0.8	0.7	0.64	0.3	0.6	1.1	1.6	0.65	0.3	0.6	1.15	1.5	0.842
disinfettore	3	0.03	0.15	-0.1	0.2	0.47	0.4	0.5	0.5	0.5	0.50	0.4	0.4	0.7	0.7	1
elicotterista	2	-0.35	1.77	-1.6	0.9	1.60	0.8	1.6	2.4	2.4	1.25	0.8	1.25	1.7	1.7	1
genio	8	0.08	0.27	-0.2	0.5	0.71	0.5	0.65	1.3	1.3	0.79	0.5	0.75	1.1	1.1	0.625
lavanderia	1	0.10		0.1	0.1	0.40	0.4	0.4	0.4	0.4	0.50	0.5	0.5	0.5	0.5	1
logistica	146	0.12	1.05	-1.7	8.7	0.67	0.3	0.6	1	2.2	0.79	0.2	0.6	1.5	9.2	0.506
off. Meccanica	20	6.83	30.24	-0.7	135.3	0.71	0.3	0.6	1.3	1.3	7.54	0.25	0.75	68.85	135.9	0.41
mezzi terrestri	16	1.53	5.37	-0.6	21.6	0.83	0.4	0.75	2.4	2.4	2.35	0.3	0.95	24	24	0.104
nucl. batt. chim.	4	-0.13	0.32	-0.4	0.2	0.55	0.3	0.6	0.7	0.7	0.43	0.3	0.35	0.7	0.7	0.5
pattugliatore	399	<b>1.18</b>	10.54	-15.4	128	<b>0.73</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.3	15.7	<b>1.91</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.8	142.1	0.004
sminamento	8	0.24	0.41	-0.4	0.9	0.61	0.5	0.6	0.9	0.9	0.85	0.2	0.9	1.6	1.6	0.156
trasmissioni	23	0.06	0.34	-0.5	0.8	0.61	0.4	0.6	1.1	1.1	0.67	0.3	0.6	1.2	1.3	0.563
ufficio	72	0.02	0.32	-1	0.9	0.61	0.3	0.6	1.1	1.7	0.63	0.3	0.6	1.3	1.5	0.387
<b> trivalente</b>																
0	803	<b>0.69</b>	7.63	-9.9	135.3	<b>0.65</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.1	10.8	<b>1.34</b>	0.3	<b>0.6</b>	1.6	135.9	0
1	51	2.16	18.11	-15.4	128	1.32	0.4	0.7	3.6	15.7	3.48	0.3	0.6	1.5	142.1	0.56

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella X - f:** Concentrazione (µg/g) di nichel nei campioni Urine (dati appaiati T0 eT1).  
 In neretto i valori corrispondenti a differenze significativamente diverse da zero con livello di confidenza del 95% (p-value <0.05)

Nichel Urine	n	test differenze A/R				valori Andata (dati appaiati)					valori Ritorno (dati appaiati)					p-value
		media	dev st	min	max	media	5 quant	mediana	95 quan	max	media	5 quant	mediana	95 quan	max	
<b>totale</b>	<b>626</b>	<b>0.32</b>	<b>1.62</b>	<b>-5.40</b>	<b>11.56</b>	<b>1.51</b>	<b>0.00</b>	<b>1.34</b>	<b>3.26</b>	<b>7.33</b>	<b>1.84</b>	<b>0.00</b>	<b>1.59</b>	<b>4.06</b>	<b>12.44</b>	<b>0</b>
<b>età</b>																
<30	444	<b>0.30</b>	1.62	-5.40	11.56	<b>1.54</b>	0.00	<b>1.35</b>	3.25	7.33	<b>1.84</b>	0.00	<b>1.59</b>	4.06	12.44	0
30-39	134	<b>0.34</b>	1.58	-2.68	10.35	<b>1.42</b>	0.00	<b>1.34</b>	3.07	5.15	<b>1.75</b>	0.00	<b>1.56</b>	3.47	11.30	0.019
40+	48	<b>0.49</b>	1.75	-2.46	8.11	<b>1.57</b>	0.00	<b>1.33</b>	3.75	4.47	<b>2.06</b>	0.00	<b>1.68</b>	6.10	10.79	0.047
<b>categoria int/ext</b>																
ext	327	<b>0.35</b>	1.66	-5.30	11.56	<b>1.52</b>	0.00	<b>1.37</b>	3.36	6.94	<b>1.87</b>	0.71	<b>1.56</b>	4.31	12.44	0
int	180	<b>0.26</b>	1.57	-5.40	8.11	<b>1.52</b>	0.00	<b>1.28</b>	4.07	7.33	<b>1.78</b>	0.00	<b>1.62</b>	3.73	10.79	0.003
mix	119	<b>0.33</b>	1.59	-2.15	10.33	<b>1.49</b>	0.00	<b>1.34</b>	2.92	3.75	<b>1.82</b>	0.00	<b>1.67</b>	3.76	11.72	0.049
<b>seesso</b>																
F	16	0.38	1.66	-4.45	2.86	1.90	0.45	1.70	5.19	5.19	2.28	0.74	2.08	4.58	4.58	0.175
M	610	<b>0.32</b>	1.62	-5.40	11.56	<b>1.50</b>	0.00	<b>1.33</b>	3.25	7.33	<b>1.82</b>	0.00	<b>1.59</b>	4.06	12.44	0
<b>fumo</b>																
	6	0.67	1.03	-0.50	2.26	0.71	0.00	0.81	1.33	1.33	1.38	0.00	1.54	2.26	2.26	0.219
0	267	<b>0.41</b>	1.60	-3.61	10.35	<b>1.44</b>	0.00	<b>1.36</b>	3.07	4.94	<b>1.85</b>	0.00	<b>1.56</b>	4.31	11.72	0
1-19	171	<b>0.26</b>	1.71	-5.40	11.56	<b>1.58</b>	0.00	<b>1.27</b>	3.55	7.33	<b>1.85</b>	0.00	<b>1.63</b>	4.06	12.44	0.009
20+	101	<b>0.37</b>	1.47	-2.98	8.86	<b>1.52</b>	0.00	<b>1.33</b>	3.38	5.57	<b>1.89</b>	0.82	<b>1.65</b>	3.64	10.00	0.009
EX	81	0.07	1.70	-3.75	7.99	1.65	0.00	1.43	3.35	5.42	1.72	0.00	1.67	2.76	9.78	0.757
<b>consumo frutta</b>																
	2	-0.16	0.04	-0.19	-0.13	1.72	1.29	1.72	2.16	2.16	1.56	1.10	1.56	2.02	2.02	0.5
1V/die	281	<b>0.26</b>	1.29	-5.30	7.88	<b>1.52</b>	0.00	<b>1.31</b>	3.25	7.33	<b>1.78</b>	0.00	<b>1.60</b>	3.73	8.57	0
PIU' V/die	109	<b>0.68</b>	2.57	-4.45	11.56	<b>1.62</b>	0.00	<b>1.44</b>	3.61	5.19	<b>2.30</b>	0.00	<b>1.68</b>	10.00	12.44	0.025
RAR	234	<b>0.24</b>	1.38	-5.40	7.99	<b>1.45</b>	0.00	<b>1.32</b>	2.98	6.50	<b>1.69</b>	0.00	<b>1.57</b>	3.46	9.78	0.005
<b>verdura</b>																
	4	0.44	0.95	-0.19	1.84	2.32	1.29	1.86	4.26	4.26	2.76	1.10	1.92	6.10	6.10	0.625
1V/die	232	<b>0.34</b>	1.63	-5.30	10.35	<b>1.48</b>	0.00	<b>1.27</b>	3.26	6.94	<b>1.82</b>	0.00	<b>1.60</b>	4.13	11.30	0
PIU' V/die	78	<b>0.69</b>	2.55	-3.11	11.56	<b>1.66</b>	0.00	<b>1.43</b>	4.11	7.33	<b>2.35</b>	0.00	<b>1.66</b>	10.00	12.44	0.041
RAR	312	<b>0.21</b>	1.28	-5.40	7.99	<b>1.49</b>	0.00	<b>1.36</b>	3.08	6.50	<b>1.71</b>	0.00	<b>1.57</b>	3.16	9.78	0.001
<b>alcol</b>																
0	491	<b>0.33</b>	1.67	-5.40	11.56	<b>1.53</b>	0.00	<b>1.36</b>	3.25	6.94	<b>1.86</b>	0.00	<b>1.61</b>	3.84	12.44	0
0-0.5	110	<b>0.31</b>	1.39	-2.84	6.28	<b>1.43</b>	0.00	<b>1.21</b>	3.36	7.33	<b>1.75</b>	0.00	<b>1.52</b>	4.65	7.46	0.012
0.5+	25	0.15	1.54	-2.98	4.47	1.59	0.00	1.33	2.71	5.57	1.74	0.00	1.46	3.91	6.49	0.647
<b>numero missioni</b>																
0	186	0.34	1.80	-5.40	10.35	1.51	0.00	1.26	3.35	6.50	1.85	0.00	1.58	3.79	11.30	0.004
1	122	0.32	1.22	-3.31	6.28	1.50	0.00	1.36	3.21	4.56	1.83	0.00	1.55	4.42	7.46	0.002
2	87	0.31	1.81	-3.11	11.56	1.54	0.00	1.37	3.38	4.94	1.85	0.57	1.63	3.28	12.44	0.22
3	88	0.36	1.47	-2.68	7.88	1.50	0.00	1.39	2.47	7.33	1.85	0.55	1.57	4.65	8.57	0.038
4	49	0.28	2.30	-5.30	10.33	1.83	0.62	1.52	4.47	6.94	2.10	0.00	1.80	4.64	11.72	0.691
5	36	0.23	1.29	-2.17	3.53	1.53	0.00	1.40	4.11	4.45	1.76	0.00	1.68	4.29	6.13	0.325
6	25	0.35	0.97	-2.68	1.66	1.17	0.00	1.12	2.44	3.50	1.52	0.82	1.43	2.88	2.93	0.015
7	13	0.62	1.29	-1.44	3.25	1.02	0.00	1.19	2.60	2.60	1.64	0.00	1.74	4.52	4.52	0.146
8	15	0.04	1.20	-2.98	2.16	1.59	0.00	1.57	5.57	5.57	1.64	0.00	1.41	3.75	3.75	0.67
9	5	0.23	1.08	-1.00	1.78	1.18	0.00	0.91	2.35	2.35	1.42	1.13	1.36	1.78	1.78	0.813
<b>sede</b>																
	16	0.61	0.98	-1.20	2.32	1.23	0.00	1.27	2.24	2.24	1.84	0.74	1.73	3.54	3.54	0.029
ALTRO	15	0.07	1.18	-2.68	1.41	1.89	0.00	1.57	5.56	5.56	1.96	0.82	1.83	3.18	3.18	0.33
MITTICA	349	<b>0.41</b>	1.74	-5.30	11.56	<b>1.46</b>	0.00	<b>1.32</b>	3.23	7.33	<b>1.87</b>	0.00	<b>1.57</b>	4.42	12.44	0
MITTICA-ALTRO	3	-0.48	0.57	-1.04	0.11	1.76	1.20	1.92	2.17	2.17	1.29	0.88	1.30	1.67	1.67	0.5
MITTICA-WHITE HORSE	46	0.05	1.43	-3.75	3.37	1.68	0.00	1.17	4.75	5.57	1.73	0.63	1.67	2.76	5.76	0.439
WHITE HORSE	197	<b>0.24</b>	1.52	-5.40	10.33	<b>1.56</b>	0.00	<b>1.43</b>	3.06	6.50	<b>1.80</b>	0.55	<b>1.59</b>	3.79	11.72	0.019
<b>mansione</b>																
non presente	9	0.33	0.69	-0.50	1.54	0.75	0.00	1.00	1.33	1.33	1.08	0.00	1.17	2.52	2.52	0.313
arniere	9	-0.42	1.53	-2.68	2.66	2.11	0.00	1.70	7.33	7.33	1.69	0.00	1.68	4.65	4.65	0.461
non classificata	20	0.15	0.90	-1.80	2.32	1.32	0.00	1.29	2.20	2.24	1.47	0.00	1.42	3.10	3.54	0.515
conduttore	55	<b>0.51</b>	1.82	-3.75	7.99	<b>1.59</b>	0.00	<b>1.37</b>	3.08	5.56	<b>2.10</b>	0.00	<b>1.89</b>	5.88	9.78	0.025
disinfettore	2	0.73	0.72	0.22	1.24	1.42	1.33	1.42	1.52	1.52	2.16	1.74	2.16	2.57	2.57	0.5
elicotterista	2	-0.40	0.49	-0.75	-0.05	1.78	1.59	1.78	1.97	1.97	1.38	1.22	1.38	1.54	1.54	0.5
genio	5	2.27	5.20	-0.26	11.56	1.88	0.67	0.88	3.96	3.96	4.15	0.60	2.96	12.44	12.44	1
lavanderia	1	0.33		0.33	0.33	1.05	1.05	1.05	1.05	1.05	1.38	1.38	1.38	1.38	1.38	1
logistica	104	0.35	1.68	-2.15	10.33	1.53	0.55	1.40	2.92	3.75	1.88	0.00	1.68	3.76	11.72	0.08
off. Meccanica	13	0.40	0.87	-1.01	2.11	1.08	0.00	0.98	2.92	2.92	1.48	0.62	1.54	2.11	2.11	0.168
mezzi terrestri	13	-0.77	1.70	-5.40	0.50	2.25	0.70	1.76	6.50	6.50	1.48	0.00	1.25	2.87	2.87	0.273
pattugliatore	315	<b>0.35</b>	1.55	-5.30	10.35	<b>1.50</b>	0.00	<b>1.36</b>	3.35	6.94	<b>1.85</b>	0.71	<b>1.57</b>	4.31	11.30	0
sminamento	5	-1.10	0.95	-2.68	-0.22	2.48	1.76	2.17	3.50	3.50	1.38	0.82	1.54	1.98	1.98	0.063
trasmissioni	13	0.12	0.78	-1.25	1.68	1.19	0.00	1.25	1.99	1.99	1.31	0.00	1.45	1.97	1.97	0.685
ufficio	60	<b>0.34</b>	1.64	-4.45	8.11	<b>1.50</b>	0.00	<b>1.22</b>	4.29	5.19	<b>1.84</b>	0.00	<b>1.62</b>	3.80	10.79	0.022

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

Tabella X - g: Concentrazione (µg/l) di uranio nei campioni Siero (dati appaiati T0 eT1). In neretto i valori corrispondenti a differenze significativamente diverse da zero con livello di confidenza del 95% (p-value <0.05)

Uranio		test differenze A/R				valori Andata (dati appaiati)					valori Ritorno (dati appaiati)					p-value
Siero	n	media	dev st	min	max	media	5 quant	median: 95	quan	max	media	5 quant	median: 95	quan	max	
	854	<b>-0.005</b>	<b>0.072</b>	<b>-0.513</b>	<b>1.630</b>	<b>0.039</b>	<b>0.015</b>	<b>0.036</b>	<b>0.073</b>	<b>0.526</b>	<b>0.034</b>	<b>0.010</b>	<b>0.025</b>	<b>0.074</b>	<b>1.664</b>	<b>0.000</b>
<b>categoria int/ext</b>																
ext	421	<b>-0.007</b>	0.058	-0.513	0.880	<b>0.041</b>	0.015	<b>0.036</b>	0.075	0.526	<b>0.034</b>	0.009	<b>0.025</b>	0.078	0.914	0.000
int	261	<b>-0.001</b>	0.105	-0.123	1.630	<b>0.037</b>	0.014	<b>0.034</b>	0.071	0.167	<b>0.037</b>	0.011	<b>0.026</b>	0.066	1.664	0.000
mix	172	<b>-0.010</b>	0.024	-0.070	0.141	<b>0.039</b>	0.016	<b>0.037</b>	0.073	0.101	<b>0.029</b>	0.011	<b>0.025</b>	0.062	0.166	0.000
<b>età</b>																
<30	647	<b>-0.006</b>	0.029	-0.177	0.142	<b>0.040</b>	0.016	<b>0.037</b>	0.073	0.204	<b>0.034</b>	0.011	<b>0.028</b>	0.076	0.180	0.000
30-39	152	<b>0.001</b>	0.159	-0.513	1.630	<b>0.038</b>	0.013	<b>0.033</b>	0.079	0.526	<b>0.039</b>	0.008	<b>0.018</b>	0.063	1.664	0.000
40+	55	<b>-0.016</b>	0.024	-0.105	0.014	<b>0.036</b>	0.015	<b>0.030</b>	0.072	0.119	<b>0.020</b>	0.009	<b>0.018</b>	0.034	0.051	0.000
<b>sex</b>																
F	21	0.007	0.036	-0.093	0.101	0.034	0.015	0.026	0.052	0.135	0.040	0.013	0.033	0.062	0.152	0.300
M	833	<b>-0.006</b>	0.072	-0.513	1.630	<b>0.039</b>	0.015	<b>0.036</b>	0.073	0.526	<b>0.034</b>	0.010	<b>0.025</b>	0.074	1.664	0.000
<b>numero missioni precedenti</b>																
0	241	<b>-0.005</b>	0.065	-0.123	0.880	<b>0.039</b>	0.013	<b>0.034</b>	0.083	0.167	<b>0.034</b>	0.009	<b>0.025</b>	0.075	0.914	0.000
1	163	<b>-0.009</b>	0.029	-0.177	0.076	<b>0.040</b>	0.015	<b>0.035</b>	0.073	0.204	<b>0.031</b>	0.011	<b>0.027</b>	0.063	0.126	0.000
2	128	<b>-0.005</b>	0.025	-0.068	0.142	<b>0.036</b>	0.014	<b>0.034</b>	0.066	0.084	<b>0.031</b>	0.011	<b>0.029</b>	0.058	0.170	0.003
3	125	<b>-0.012</b>	0.053	-0.513	0.141	<b>0.043</b>	0.018	<b>0.036</b>	0.076	0.526	<b>0.031</b>	0.010	<b>0.024</b>	0.075	0.166	0.000
4	70	<b>-0.006</b>	0.024	-0.060	0.062	<b>0.037</b>	0.016	<b>0.036</b>	0.064	0.082	<b>0.032</b>	0.011	<b>0.023</b>	0.078	0.080	0.003
5	50	<b>-0.008</b>	0.023	-0.051	0.068	<b>0.041</b>	0.018	<b>0.042</b>	0.065	0.083	<b>0.033</b>	0.008	<b>0.025</b>	0.086	0.143	0.002
6	34	<b>-0.009</b>	0.026	-0.062	0.075	<b>0.039</b>	0.012	<b>0.041</b>	0.072	0.083	<b>0.029</b>	0.010	<b>0.022</b>	0.100	0.122	0.005
7	17	0.092	0.398	-0.056	1.630	0.036	0.021	0.034	0.072	0.072	0.128	0.008	0.020	1.664	1.664	0.378
8	20	<b>-0.010</b>	0.022	-0.053	0.042	<b>0.043</b>	0.018	<b>0.042</b>	0.069	0.074	<b>0.032</b>	0.010	<b>0.026</b>	0.080	0.096	0.041
9	6	0.002	0.015	-0.021	0.021	0.040	0.019	0.046	0.051	0.051	0.042	0.012	0.048	0.059	0.059	0.750
<b>sede missione</b>																
	26	0.002	0.020	-0.028	0.058	0.036	0.018	0.034	0.068	0.071	0.038	0.016	0.030	0.078	0.078	0.921
ALTRO	18	<b>-0.012</b>	0.025	-0.055	0.042	<b>0.040</b>	0.016	<b>0.038</b>	0.077	0.077	<b>0.028</b>	0.009	<b>0.018</b>	0.075	0.075	0.038
MITTICA	475	<b>-0.005</b>	0.093	-0.513	1.630	<b>0.039</b>	0.013	<b>0.034</b>	0.077	0.526	<b>0.034</b>	0.009	<b>0.022</b>	0.075	1.664	0.000
MITTICA-ALTRO	4	-0.011	0.031	-0.033	0.035	0.039	0.021	0.038	0.058	0.058	0.028	0.012	0.022	0.056	0.056	0.875
MITTICA-WHITE HORS	61	0.003	0.028	-0.048	0.076	0.042	0.020	0.041	0.069	0.087	0.045	0.013	0.038	0.100	0.122	0.790
WHITE HORSE	270	<b>-0.009</b>	0.025	-0.123	0.141	<b>0.040</b>	0.017	<b>0.037</b>	0.069	0.167	<b>0.031</b>	0.011	<b>0.028</b>	0.058	0.179	0.000
<b>mansione</b>																
non presente	12	0.000	0.017	-0.029	0.018	0.032	0.015	0.032	0.047	0.047	0.031	0.012	0.031	0.048	0.048	0.910
armi	31	0.005	0.035	-0.034	0.131	0.035	0.017	0.034	0.061	0.062	0.040	0.011	0.030	0.152	0.180	0.848
non classificata	29	-0.006	0.028	-0.074	0.062	0.038	0.013	0.035	0.071	0.091	0.032	0.011	0.026	0.078	0.080	0.176
conduttore	80	<b>-0.010</b>	0.023	-0.106	0.053	<b>0.039</b>	0.014	<b>0.036</b>	0.075	0.118	<b>0.029</b>	0.011	<b>0.027</b>	0.056	0.072	0.000
disinfettore	3	-0.013	0.019	-0.034	0.003	0.029	0.016	0.028	0.043	0.043	0.016	0.008	0.019	0.021	0.021	0.500
elicotterista	2	-0.011	0.023	-0.027	0.006	0.037	0.031	0.037	0.042	0.042	0.026	0.015	0.026	0.037	0.037	1.000
genio	8	-0.017	0.027	-0.065	0.017	0.056	0.039	0.056	0.077	0.077	0.039	0.012	0.038	0.077	0.077	0.070
lavanderia	1	-0.004		-0.004	-0.004	0.022	0.022	0.022	0.022	0.022	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018	1.000
logistica	146	<b>-0.010</b>	0.022	-0.070	0.060	<b>0.039</b>	0.016	<b>0.037</b>	0.075	0.101	<b>0.029</b>	0.011	<b>0.026</b>	0.058	0.143	0.000
off. Meccanica	20	<b>-0.015</b>	0.034	-0.123	0.058	<b>0.045</b>	0.012	<b>0.044</b>	0.118	0.167	<b>0.030</b>	0.011	<b>0.027</b>	0.056	0.067	0.021
mezzi terrestri	16	0.092	0.411	-0.035	1.630	0.038	0.012	0.035	0.060	0.060	0.130	0.015	0.026	1.664	1.664	0.163
nucl. batt. chim.	4	-0.014	0.010	-0.027	-0.003	0.044	0.035	0.046	0.052	0.052	0.030	0.021	0.029	0.041	0.041	0.125
pattugliatore	399	<b>-0.006</b>	0.059	-0.513	0.880	<b>0.040</b>	0.014	<b>0.035</b>	0.076	0.526	<b>0.034</b>	0.009	<b>0.025</b>	0.080	0.914	0.000
sminamento	8	-0.013	0.024	-0.038	0.035	0.042	0.021	0.037	0.069	0.069	0.029	0.010	0.029	0.056	0.056	0.195
trasmissioni	23	<b>-0.004</b>	0.037	-0.045	0.141	<b>0.037</b>	0.021	<b>0.039</b>	0.055	0.056	<b>0.033</b>	0.013	<b>0.023</b>	0.063	0.166	0.049
ufficio	72	<b>-0.007</b>	0.031	-0.076	0.142	<b>0.035</b>	0.014	<b>0.028</b>	0.083	0.096	<b>0.028</b>	0.009	<b>0.023</b>	0.067	0.170	0.001
<b>fumo</b>																
0	8	-0.008	0.024	-0.048	0.018	0.037	0.018	0.038	0.058	0.058	0.030	0.010	0.033	0.048	0.048	0.461
0	359	<b>-0.007</b>	0.061	-0.513	0.880	<b>0.040</b>	0.014	<b>0.035</b>	0.076	0.526	<b>0.033</b>	0.011	<b>0.025</b>	0.076	0.914	0.000
1-19	240	<b>-0.002</b>	0.110	-0.105	1.630	<b>0.041</b>	0.016	<b>0.038</b>	0.074	0.119	<b>0.039</b>	0.010	<b>0.028</b>	0.072	1.664	0.000
20+	141	<b>-0.005</b>	0.030	-0.093	0.141	<b>0.038</b>	0.016	<b>0.035</b>	0.069	0.135	<b>0.033</b>	0.011	<b>0.026</b>	0.078	0.166	0.002
EX	106	<b>-0.007</b>	0.025	-0.090	0.131	<b>0.036</b>	0.015	<b>0.034</b>	0.066	0.108	<b>0.029</b>	0.009	<b>0.022</b>	0.070	0.180	0.000
<b>frutta</b>																
	2	0.013	0.006	0.009	0.017	0.042	0.025	0.042	0.059	0.059	0.055	0.034	0.055	0.076	0.076	0.500
1V/die	389	<b>-0.002</b>	0.088	-0.177	1.630	<b>0.038</b>	0.015	<b>0.035</b>	0.069	0.204	<b>0.036</b>	0.010	<b>0.025</b>	0.075	1.664	0.000
PIU' V/die	135	<b>-0.002</b>	0.082	-0.105	0.880	<b>0.038</b>	0.014	<b>0.035</b>	0.085	0.135	<b>0.036</b>	0.010	<b>0.024</b>	0.071	0.914	0.000
RAR	328	<b>-0.011</b>	0.038	-0.513	0.090	<b>0.041</b>	0.015	<b>0.037</b>	0.074	0.526	<b>0.030</b>	0.011	<b>0.026</b>	0.066	0.126	0.000
<b>verdura</b>																
	4	0.001	0.030	-0.042	0.022	0.040	0.020	0.041	0.059	0.059	0.042	0.015	0.038	0.076	0.076	0.875
1V/die	317	<b>-0.004</b>	0.057	-0.074	0.880	<b>0.037</b>	0.013	<b>0.034</b>	0.069	0.099	<b>0.033</b>	0.009	<b>0.025</b>	0.074	0.914	0.000
PIU' V/die	105	<b>-0.011</b>	0.025	-0.105	0.076	<b>0.037</b>	0.016	<b>0.034</b>	0.076	0.119	<b>0.026</b>	0.010	<b>0.023</b>	0.058	0.109	0.000
RAR	428	<b>-0.005</b>	0.088	-0.513	1.630	<b>0.042</b>	0.015	<b>0.037</b>	0.075	0.526	<b>0.036</b>	0.011	<b>0.027</b>	0.077	1.664	0.000
<b>alcol</b>																
0	656	<b>-0.008</b>	0.049	-0.513	0.880	<b>0.040</b>	0.015	<b>0.036</b>	0.075	0.526	<b>0.032</b>	0.010	<b>0.025</b>	0.076	0.914	0.000
0-0.5	156	<b>0.002</b>	0.133	-0.074	1.630	<b>0.038</b>	0.014	<b>0.035</b>	0.071	0.089	<b>0.040</b>	0.010	<b>0.025</b>	0.064	1.664	0.000
0.5+	42	0.002	0.031	-0.050	0.142	0.035	0.013	0.036	0.058	0.083	0.037	0.012	0.027	0.096	0.170	0.693

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella X - h:** Concentrazione (µg/l) di zirconio nei campioni di siero (dati appaiati T0 eT1).  
In neretto i valori corrispondenti a differenze significativamente diverse da zero con livello di confidenza del 95% (p-value <0.05)

zirconio siero	test differenze A/R					valori Andata (dati appaiati)					valori Ritorno (dati appaiati)					p value
	N	media	dev st	min	max	media	quant 5	mediana	quant 95	max	media	quant 5	mediana	quant 95	max	
<b>totale</b>	854	<b>0.08</b>	1.17	-2.10	33.12	<b>0.22</b>	<b>0.00</b>	<b>0.17</b>	0.50	2.49	<b>0.30</b>	<b>0.07</b>	<b>0.18</b>	0.82	33.23	<b>0.013</b>
<b>categoria int/ext</b>																
ext	421	0.12	1.65	-1.92	33.12	0.24	0.00	0.21	0.52	2.30	0.36	0.07	0.18	1.04	33.23	0.556
int	261	0.03	0.28	-2.10	1.33	0.20	0.00	0.15	0.47	2.49	0.23	0.07	0.18	0.54	1.55	0.082
mix	172	<b>0.05</b>	0.25	-0.97	1.70	<b>0.18</b>	<b>0.00</b>	<b>0.14</b>	0.46	1.13	<b>0.23</b>	<b>0.00</b>	<b>0.19</b>	0.59	1.70	0.003
<b>età</b>																
<30	647	<b>0.11</b>	1.34	-2.10	33.12	<b>0.21</b>	<b>0.00</b>	<b>0.16</b>	0.51	2.49	<b>0.33</b>	<b>0.08</b>	<b>0.20</b>	0.90	33.23	0
30-39	152	<b>-0.03</b>	0.27	-0.61	1.33	<b>0.23</b>	<b>0.00</b>	<b>0.20</b>	0.47	0.87	<b>0.20</b>	<b>0.00</b>	<b>0.15</b>	0.56	1.55	0.001
40+	55	-0.04	0.18	-0.40	0.37	0.21	0.00	0.20	0.46	0.50	0.17	0.00	0.15	0.38	0.46	0.152
<b>fumo</b>																
	8	0.11	0.22	-0.28	0.40	0.13	0.00	0.12	0.38	0.38	0.24	0.08	0.25	0.52	0.52	0.195
0	359	0.04	0.31	-1.92	2.00	0.21	0.00	0.17	0.46	2.30	0.25	0.08	0.18	0.77	2.17	0.146
1-19	240	0.18	2.16	-2.10	33.12	0.23	0.00	0.18	0.51	2.49	0.41	0.04	0.21	0.82	33.23	0.09
20+	141	0.08	0.34	-0.79	1.70	0.20	0.00	0.14	0.55	0.94	0.28	0.08	0.18	0.97	1.70	0.064
EX	106	-0.02	0.24	-1.08	0.83	0.22	0.00	0.19	0.47	1.08	0.20	0.00	0.16	0.56	1.12	0.47
<b>numero missioni precedenti</b>																
0	241	0.19	2.15	-0.97	33.12	0.20	0.00	0.17	0.47	1.13	0.39	0.00	0.18	0.90	33.23	0.169
1	163	<b>0.06</b>	0.22	-0.52	1.20	<b>0.19</b>	<b>0.00</b>	<b>0.16</b>	0.44	0.69	<b>0.25</b>	<b>0.08</b>	<b>0.20</b>	0.60	1.20	0
2	128	<b>0.05</b>	0.33	-2.10	1.33	<b>0.19</b>	<b>0.00</b>	<b>0.14</b>	0.43	2.49	<b>0.24</b>	<b>0.08</b>	<b>0.18</b>	0.60	1.33	0.008
3	125	0.05	0.36	-0.79	2.00	0.23	0.00	0.17	0.55	0.94	0.28	0.08	0.20	0.78	2.17	0.582
4	70	0.07	0.32	-0.57	1.44	0.19	0.00	0.15	0.49	0.57	0.26	0.00	0.18	1.08	1.44	0.21
5	50	-0.04	0.39	-1.92	0.88	0.32	0.00	0.32	0.54	2.30	0.28	0.07	0.19	1.07	1.12	0.173
6	34	-0.02	0.32	-1.08	1.11	0.24	0.00	0.22	0.55	1.08	0.22	0.07	0.17	0.86	1.39	0.316
7	17	-0.01	0.38	-0.45	1.33	0.28	0.07	0.31	0.54	0.54	0.27	0.00	0.18	1.55	1.55	0.203
8	20	<b>-0.10</b>	0.31	-0.62	0.80	<b>0.36</b>	<b>0.16</b>	<b>0.34</b>	0.67	0.76	<b>0.27</b>	<b>0.11</b>	<b>0.17</b>	0.95	1.04	0.023
9	6	-0.07	0.22	-0.31	0.29	0.34	0.26	0.32	0.42	0.42	0.27	0.11	0.24	0.58	0.58	0.438
<b>sede</b>																
	26	0.12	0.38	-0.25	1.44	0.18	0.00	0.15	0.40	0.46	0.30	0.07	0.18	1.06	1.44	0.385
ALTRO	18	-0.07	0.23	-0.58	0.41	0.28	0.08	0.24	0.69	0.69	0.21	0.10	0.19	0.59	0.59	0.185
MITTICA	475	<b>0.01</b>	0.34	-1.92	2.00	<b>0.23</b>	<b>0.00</b>	<b>0.19</b>	0.49	2.30	<b>0.24</b>	<b>0.00</b>	<b>0.16</b>	0.75	2.17	0.006
MITTICA-ALTRO	4	0.23	0.56	-0.20	1.00	0.18	0.07	0.17	0.30	0.30	0.41	0.10	0.23	1.07	1.07	0.625
MITTICA-WHITE HORSE	61	<b>0.20</b>	0.29	-0.31	1.11	<b>0.24</b>	<b>0.08</b>	<b>0.23</b>	0.49	0.70	<b>0.44</b>	<b>0.09</b>	<b>0.31</b>	1.09	1.39	0
WHITE HORSE	270	<b>0.18</b>	2.03	-2.10	33.12	<b>0.19</b>	<b>0.00</b>	<b>0.13</b>	0.51	2.49	<b>0.37</b>	<b>0.09</b>	<b>0.21</b>	0.56	33.23	0
<b>mansione</b>																
non presente	12	0.13	0.15	-0.04	0.40	0.10	0.00	0.10	0.18	0.18	0.23	0.08	0.20	0.52	0.52	0.009
armiere	31	0.06	0.24	-0.26	0.90	0.19	0.00	0.18	0.41	0.41	0.25	0.00	0.20	0.61	0.97	0.231
non classificata	29	0.06	0.37	-0.50	1.09	0.22	0.00	0.22	0.51	0.59	0.28	0.07	0.18	1.06	1.09	0.809
conduttore	80	-0.04	0.31	-2.10	0.41	0.24	0.00	0.16	0.61	2.49	0.20	0.07	0.19	0.35	0.82	0.734
disinfettore	3	0.10	0.14	-0.06	0.18	0.06	0.00	0.00	0.17	0.17	0.16	0.11	0.18	0.18	0.18	0.5
elicotterista	2	0.10	0.04	0.07	0.12	0.11	0.10	0.11	0.12	0.12	0.21	0.17	0.21	0.24	0.24	0.5
genio	8	-0.14	0.12	-0.28	0.12	0.36	0.00	0.40	0.52	0.52	0.21	0.12	0.22	0.32	0.32	0.031
lavanderia	1	0.08		0.08	0.08	0.11	0.11	0.11	0.11	0.11	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19	1
logistica	146	<b>0.04</b>	0.22	-0.97	1.00	<b>0.19</b>	<b>0.00</b>	<b>0.15</b>	0.46	1.13	<b>0.22</b>	<b>0.08</b>	<b>0.20</b>	0.53	1.08	0.005
off. Meccanica	20	<b>0.05</b>	0.17	-0.39	0.37	<b>0.17</b>	<b>0.00</b>	<b>0.13</b>	0.42	0.47	<b>0.22</b>	<b>0.04</b>	<b>0.21</b>	0.46	0.48	0.043
mezzi terrestri	16	0.10	0.43	-0.62	1.33	0.20	0.00	0.12	0.76	0.76	0.30	0.08	0.19	1.55	1.55	0.342
nucl. batt.chim.	4	0.10	0.05	0.06	0.16	0.10	0.07	0.11	0.12	0.12	0.20	0.18	0.20	0.23	0.23	0.125
pattugliatore	399	0.13	1.69	-1.92	33.12	0.24	0.00	0.21	0.53	2.30	0.37	0.07	0.18	1.07	33.23	0.48
sminamento	8	0.08	0.43	-0.44	1.00	0.25	0.07	0.16	0.69	0.69	0.34	0.14	0.23	1.07	1.07	0.82
trasmissioni	23	0.10	0.41	-0.31	1.70	0.17	0.00	0.13	0.42	0.47	0.27	0.00	0.15	0.60	1.70	0.365
ufficio	72	0.04	0.22	-0.27	1.12	0.17	0.00	0.15	0.39	0.66	0.21	0.00	0.17	0.56	1.12	0.727
<b>sexso</b>																
F	21	<b>0.16</b>	0.27	-0.29	0.90	<b>0.13</b>	<b>0.00</b>	<b>0.11</b>	0.28	0.38	<b>0.29</b>	<b>0.08</b>	<b>0.17</b>	0.80	0.97	0.007
M	833	<b>0.08</b>	1.19	-2.10	33.12	<b>0.22</b>	<b>0.00</b>	<b>0.17</b>	0.50	2.49	<b>0.30</b>	<b>0.07</b>	<b>0.18</b>	0.82	33.23	0.037
<b>consumo frutta</b>																
	2	0.27	0.24	0.10	0.44	0.09	0.07	0.09	0.10	0.10	0.36	0.17	0.36	0.54	0.54	0.5
1V/die	389	<b>0.06</b>	0.32	-1.92	2.00	<b>0.21</b>	<b>0.00</b>	<b>0.17</b>	0.49	2.30	<b>0.27</b>	<b>0.07</b>	<b>0.20</b>	0.92	2.17	0.009
PIU' V/die	135	0.03	0.32	-2.10	1.34	0.21	0.00	0.17	0.45	2.49	0.24	0.00	0.17	0.63	1.50	0.528
RAR	328	0.13	1.85	-1.08	33.12	0.22	0.00	0.17	0.55	1.13	0.35	0.08	0.18	0.85	33.23	0.513
<b>consumo verdura</b>																
	4	0.16	0.27	-0.20	0.44	0.13	0.00	0.09	0.34	0.34	0.28	0.14	0.23	0.54	0.54	0.375
1V/die	317	0.03	0.33	-1.92	2.00	0.22	0.00	0.17	0.55	2.30	0.25	0.00	0.18	0.72	2.17	0.282
PIU' V/die	105	0.04	0.30	-0.40	1.44	0.19	0.00	0.17	0.41	0.54	0.23	0.00	0.16	0.63	1.44	0.94
RAR	428	<b>0.12</b>	1.63	-2.10	33.12	<b>0.22</b>	<b>0.00</b>	<b>0.18</b>	0.51	2.49	<b>0.35</b>	<b>0.08</b>	<b>0.19</b>	0.89	33.23	0.015
<b>vaccinazione trivalente</b>																
0	803	<b>0.04</b>	0.32	-2.10	2.00	<b>0.22</b>	<b>0.00</b>	<b>0.17</b>	0.50	2.49	<b>0.26</b>	<b>0.07</b>	<b>0.19</b>	0.80	2.17	0.007
1	51	0.64	4.65	-0.97	33.12	0.24	0.00	0.21	0.47	1.13	0.89	0.08	0.17	0.82	33.23	0.634

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella X - j:** Differenziali T1-T0 per i biomarcatori di genotossicità rilevati nel campione totale e nei sottocampioni di soggetti con incrementi di concentrazione di xeno-elementi nel siero superiori al 75° percentile. Valore medio, deviazione standard e intervallo di confidenza della media in ipotesi di normalità (I.C. 95%), valori minimi e massimi riscontrati.

Biomarcatore	campione	N	media	dev std	I.C. 95%		min	max
<b>binucleate con micronuclei x1000 binucleate</b>	<b>totale</b>	<b>826</b>	<b>0.72</b>	<b>3.2</b>	<b>0.5</b>	<b>0.9</b>	<b>-8.50</b>	<b>17.40</b>
	V	216	<b>0.41</b>	2.9	0.0	0.8	-8.33	12.59
	W	227	<b>0.59</b>	2.9	0.2	1.0	-8.33	12.00
	Ni*	165	<b>0.65</b>	3.3	0.1	1.2	-7.12	17.40
	As	229	<b>0.70</b>	3.0	0.3	1.1	-6.00	10.67
	U	202	<b>0.70</b>	2.8	0.3	1.1	-8.33	10.62
	Pb*	153	<b>0.74</b>	3.5	0.2	1.3	-8.33	17.40
	Cd*	155	<b>0.82</b>	3.2	0.3	1.3	-7.57	10.67
	Zr	199	<b>0.91</b>	3.2	0.4	1.4	-8.33	15.00
	Mo	222	<b>1.04</b>	3.0	0.6	1.4	-7.50	11.00
<b>mononucleate con micronuclei x1000 mononucleate</b>	<b>totale</b>	<b>746</b>	<b>0.25</b>	<b>1.7</b>	<b>0.1</b>	<b>0.4</b>	<b>-5.00</b>	<b>7.50</b>
	V	192	<b>0.12</b>	1.6	-0.1	0.3	-4.50	5.90
	W	198	<b>0.15</b>	1.4	-0.1	0.4	-4.00	6.50
	Ni*	149	<b>0.16</b>	1.8	-0.1	0.4	-5.00	7.23
	Pb*	139	<b>0.18</b>	1.8	-0.1	0.5	-4.50	7.23
	As	203	<b>0.29</b>	1.7	0.1	0.5	-4.00	7.50
	Mo	203	<b>0.31</b>	1.5	0.1	0.5	-4.00	5.00
	U	175	<b>0.37</b>	1.6	0.1	0.6	-3.00	7.50
	Cd*	140	<b>0.48</b>	1.8	0.2	0.8	-5.00	7.23
	Zr	178	<b>0.66</b>	1.7	0.4	0.9	-2.50	7.23
<b>alterazioni ossidative/10<sup>5</sup> nucleotidi</b>	<b>totale</b>	<b>853</b>	<b>0.67</b>	<b>2.0</b>	<b>0.5</b>	<b>0.8</b>	<b>-6.94</b>	<b>19.77</b>
	Zr	211	<b>0.29</b>	1.0	0.1	0.4	-2.34	5.59
	U	212	<b>0.34</b>	1.2	0.2	0.5	-3.08	8.73
	W	239	<b>0.37</b>	1.3	0.2	0.5	-3.08	8.73
	Cd*	157	<b>0.59</b>	1.4	0.4	0.8	-1.41	6.78
	Mo	230	<b>0.60</b>	1.5	0.4	0.8	-3.08	7.03
	V	227	<b>0.67</b>	2.1	0.4	0.9	-4.24	19.77
	Pb*	157	<b>0.68</b>	1.7	0.4	1.0	-2.22	8.90
	Ni*	169	<b>0.74</b>	1.7	0.5	1.0	-3.58	11.01
	As	235	<b>0.79</b>	2.4	0.5	1.1	-4.24	19.77
<b>addotti DNA/10<sup>8</sup> nucleotidi</b>	<b>totale</b>	<b>851</b>	<b>-0.004</b>	<b>0.8</b>	<b>-0.1</b>	<b>0.1</b>	<b>-2.35</b>	<b>15.30</b>
	Mo	229	<b>-0.045</b>	0.7	-0.1	0.0	-2.35	2.83
	Zr	211	<b>-0.020</b>	0.6	-0.1	0.1	-1.38	2.83
	U	212	<b>-0.019</b>	0.6	-0.1	0.1	-2.22	2.83
	V	227	<b>-0.009</b>	0.6	-0.1	0.1	-2.13	2.74
	W	239	<b>0.035</b>	0.6	0.0	0.1	-2.13	2.83
	As	235	<b>0.042</b>	0.7	0.0	0.1	-2.35	2.87
	Ni*	167	<b>0.047</b>	0.7	-0.1	0.2	-1.54	2.46
	Cd*	156	<b>0.121</b>	1.4	-0.1	0.3	-2.34	15.30
	Pb*	157	<b>0.151</b>	1.4	-0.1	0.4	-1.54	15.30

\* per Cd, Ni e Pb gli incrementi di concentrazione sono rilevati nelle urine

#### 4. Rapporto isotopico $U^{238}/U^{235}$ nei campioni di urine

Si ricorda che il Rapporto isotopico (RI)  $^{238}U/^{235}U$  naturale è 137,9 (il suo inverso,  $1/RI$ , è pari a 0,00725) e che nei campioni di DU, nei quali è ridotta la percentuale di  $^{235}U$ , il RI risulta di conseguenza maggiore.

Sono state effettuate determinazioni di RI soltanto sui campioni ( $T_0$  o  $T_1$ ) con concentrazioni di uranio superiori a 25 ng/l, nonché sul corrispondente campione (se esistente) dello stesso individuo prelevato a  $T_0$  o a  $T_1$  e in questo caso indipendentemente dalla concentrazione di U riscontrata. Questa selezione ha portato ad un totale di 719 misure di RI, di cui 435 su campioni  $T_0$  e 284 su campioni  $T_1$ . Tale sbilanciamento di numerosità è legata al fatto che una minore proporzione di campioni  $T_1$  superava la soglia dei 25 ng/l in quanto la concentrazione di U risultava drasticamente diminuita tra  $T_0$  (in media 26 ng/l) e  $T_1$  (in media 6 ng/l).

La determinazione del RI per concentrazioni di U molto basse (<25 ng/l) è risultata essere molto critica (si veda la sezione sulle metodologie analitiche).

Un ulteriore problema è dato dal limite di quantificazione strumentale della metodica utilizzata per la determinazione dei singoli isotopi  $^{235}U$  e  $^{238}U$ . Tale limite, pari a 20 conteggi per secondo (cps), non pone particolari problemi nella determinazione dell'isotopo  $^{238}U$ , ma per l'isotopo  $^{235}U$  ben 230 campioni su 719 sono risultati al di sotto del limite di quantificazione strumentale e per questi non è stata possibile una determinazione affidabile del RI.

Escludendo le misure per campioni con concentrazioni di U inferiori a 25 ng/l e quelle con determinazione di  $^{235}U$  inferiori ai 20 cps, restano 274 misure complessive su 719 iniziali (270 a  $T_0$  e 4 a  $T_1$ ) di cui soltanto 2 coppie sono relative a soggetti con dati appaiati (ID 230 e 526 entrambi con concentrazioni di U nei prelievi post-missione ridotte rispetto a quelli pre-missione).

Di fatto non è stato possibile valutare eventuali incrementi del RI tra  $T_0$  e  $T_1$  a partire dai campioni di urine.

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

Le caratteristiche della metodica analitica, in riferimento alle basse concentrazioni di uranio presenti nei campioni di siero non hanno consentito la determinazione del rapporto isotopico dell'elemento

### 5. Concentrazione di elementi e rapporto isotopico uranio nei campioni di capelli

Come già riportato, le determinazioni sono state effettuate sui campioni dei soli soggetti (6) per i quali erano disponibili entrambi i prelievi effettuati prima (T0) e dopo (T1) la missione in quantitativi idonei al saggio analitico.

Nella Tab. X - k sono riportati i valori di concentrazione così ottenuti per As, Cd, Ni, Pb, U e V, nonché i valori del RI, che risultano essere in tutti i casi compatibili con i valori dell'U naturale. Su un numero così ridotto di dati sperimentali non è possibile eseguire alcuna analisi statistica rappresentativa della popolazione in studio. In Tab. X-i sono comunque riportati i valori medi per le determinazioni a T0 e T1.

Le determinazioni tricolocliche – per le quali invece non esistevano nel 2004 (anno di avvio del progetto) dati di letteratura inerenti alla capacità di accumulo di U e altri xenoelementi – si sono dimostrate, sia pure nel numero limitato dei campioni disponibili, vantaggiose e di auspicabile impiego futuro in quanto:

- metodologicamente affidabili,
- coerenti con i dosaggi rilevati nelle altre matrici biologiche,
- non invasive,
- in grado di offrire un dato di integrazione temporale espositiva, non desumibile invece dai dosaggi nei liquidi biologici.

Numero Ordine	ID Numero	ID Andata Ritorno	H_As µg/g	H_Cd µg/g	H_Ni µg/g	H_Pb µg/g	H_U µg/g	H_V µg/g	U235 cps	U238 cps	1/RI
1	199	A	0.040	0.824	1.62	0.98	0.005	0.20	1660.0	233331.0	140.6
2	199	R	0.033	0.566	0.92	0.40	0.031	0.32	613.0	84872.9	138.5
3	215	A	0.533	0.205	2.39	1.49	0.014	0.27	205.0	27946.4	136.3
4	215	R	0.331	0.231	4.56	1.07	0.047	0.30	959.0	133661.1	139.4
5	253	A	0.055	0.055	0.36	1.74	0.066	0.04	1146.3	159974.0	139.6
6	253	R	0.092	0.059	0.56	0.88	0.182	0.09	3366.6	469045.3	139.3
7	430	A	0.041	1.564	1.66	74.68	0.011	0.09	186.4	25664.6	137.7
8	430	R	0.260	2.408	1.46	75.30	0.008	0.40	110.1	14886.4	135.2
9	560	A	0.044	0.431	0.36	1.80	0.052	0.02	921.0	127568.6	138.5
10	560	R	0.079	0.037	1.12	1.06	0.018	0.13	306.2	42208.6	137.8
11	207 PI	A	0.081	0.103	2.11	0.70	0.082	0.27	1444.6	200852.6	139.0
12	207 PI	R	0.047	0.500	2.19	1.55	0.019	0.21	287.4	39776.5	138.4
<b>media</b>		A	0.132	0.530	1.417	13.565	0.038	0.148	927.2	129222.9	138.6
<b>media</b>		R	0.140	0.634	1.802	13.377	0.051	0.242	940.4	130741.8	138.1

**Tabella X - k:** Risultati delle determinazioni delle concentrazioni totali di elementi e del rapporto tra gli isotopi di massa 235 e 238 dell'uranio nei campioni di capelli.

## 6. Criticità

L'interpretazione dei risultati in oggetto deve tenere conto di tre specifici fattori che ne possono mettere a rischio la validità. Questi sono, nell'ordine:

1. emolisi di grado variabile in una quota significativa dei campioni di siero (T0) e (T1), determinata in base a stima visiva, essendosi rivelata non affidabile la valutazione in base alla concentrazione di Fe misurata. Il fenomeno di emolisi in buona parte dei campioni di siero è probabilmente da correlarsi a fasi di imprevedibile interruzione della catena del freddo;
2. prelievo di poche unità di campioni di capelli rispetto al previsto campionamento di tutti i soggetti e limitata disponibilità di quantitativi sufficienti ai dosaggi analitici.
3. smarrimento di 195 campioni di urine post-missione (T1) con 659 campioni effettivamente analizzati su 854 totali, con conseguente riduzione di determinazioni appaiate nei campioni di urine (626 misure appaiate contro 854 nel siero o 851 per il DNA). Tra il mese di giugno 2005 ed il mese di ottobre 2006 i laboratori dove si trovavano i congelatori contenenti i campioni del Progetto SIGNUM non sono stati più accessibili all'UO dell'ISS responsabile delle misurazioni per gli xeno-elementi perché riassegnati ad altri responsabili. Quando oltre un anno più tardi l'UO è rientrata in possesso dei suddetti laboratori, un numero totale di 195 campioni di urine (T1) non risultava più reperibile. Sin dal 30 novembre 2006 fu pertanto avviata una ricerca sistematica dei campioni smarriti presso l'ISS. Tale ricerca, effettuata con il coinvolgimento di tutto il personale interessato e controllando l'intero iter di stoccaggio dei campioni in ISS dal momento della prima consegna, non ha avuto esito positivo.

L'eventuale impatto distorsivo della perdita di casi sui risultati dei campioni di urine è stato valutato analizzando i 205 soggetti con misure post-impiego (T1) *mancanti* per le urine e disponibili per il siero (categoria A). Nello specifico si è valutato se caratteristiche generali e profilo di esposizione a xeno-elementi - desumibili dalle misure nel siero - differissero da quelle degli individui con campioni urine T1 presenti (categoria B). I soggetti della casistica A hanno caratteristiche simili alla casistica B per sesso, fototipo, abitudine al fumo,

alimentazione, sono mediamente più giovani (età <30 anni per l'87% dei soggetti contro il 72% della casistica B) e impiegati in misura maggiore come armieri (9% contro 2%), in misura minore in attività di pattugliamento (39% contro 50%) e ufficio (5% contro 10%) (Tabella X - l).

Per quanto riguarda i profili di esposizione, i soggetti della casistica A presentano valori medi di concentrazione ampiamente all'interno dell'intervallo di variabilità osservato per i soggetti della casistica B (Tabella X - m). Inoltre i valori medi di concentrazione sono sempre inferiori nella casistica A rispetto alla B, tranne che per arsenico e zirconio per i quali medie e dispersioni delle concentrazioni sono più elevate nel gruppo A rispetto a B.

Questo quadro indica che la perdita di campioni di urine post-impiego (T1) può avere generato una sottostima della media delle differenze individuali (T1 – T0) per lo zirconio. Infatti la concentrazione di questo elemento risulta mediamente incrementato nei campioni appaiati di siero (da 0.22 a 0.30 µg/l) e non in quelli di urine (da 2.6 a 2.0 ng/g). Difficilmente invece la perdita di campioni T1 nelle urine può modificare la forte riduzione differenziale riscontrata per le concentrazioni di arsenico sia nei dati urine (da 54.54 a 27.55 µg/g) che nei dati siero (da 1.37 a 0.83 µg/l).

Da queste analisi comparative si può concludere che:

- la potenza statistica dell'indagine, seppur diminuita, non è tale da invalidare le finalità dello studio.
- le caratteristiche demografiche e di impiego operativo della popolazione per la quale il campione non era più disponibile, pur presentando qualche differenza, non sono difformi nella sostanza da quelle della popolazione sottoposta ad esame;
- per As, Mo, U, V, W i soggetti con campioni di urine smarriti non presentano differenziali di concentrazione nel siero tali da modificare l'esito risultante dai 626 campioni urine appaiati disponibili. Per tutti questi elementi si sono ottenuti risultati coerenti in urine e siero per i differenziali di concentrazione. Per lo Zr invece la perdita sembra essere informativa, ed è pertanto preferibile fare riferimento ai risultati del siero che includono la casistica più completa.

L'effetto della perdita di campioni per Cd, Ni e Pb non è valutabile perché non sono disponibili misurazioni di confronto nel siero.

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella X - I:**

Caratteristiche dei soggetti con campione di urine T1 mancante, desunte dal file storico/anamnestico.

- **Categoria A:** soggetti con campioni di urine T1 mancante/siero presente.
- **Categoria B:** soggetti con campioni di urine T1 presenti/siero presente

Variabile	A	B	A	B	
	N	N	%	%	
sesso	F	5	18	2%	3%
	M	200	640	98%	97%
	Totale complessivo	205	658	100%	100%
età	<30	178	475	87%	72%
	30-39	20	135	10%	21%
	40+	7	48	3%	7%
	Totale complessivo	205	658	100%	100%
mansione	genio	3	5	1%	1%
	armiere	18	13	9%	2%
	mancante	13	20	6%	3%
	conduttore	22	59	11%	9%
	disinfettore	1	2	0%	0%
	elicotterista		2	0%	0%
	lavanderia		1	0%	0%
	logistica	36	111	18%	17%
	officina mecc.	3	17	1%	3%
	mezzi terrestri	2	14	1%	2%
	nbc	4		2%	0%
	pattuglia	79	325	39%	50%
	sminamento	3	5	1%	1%
	trasmissione	10	13	5%	2%
	ufficio	11	62	5%	10%
	Totale complessivo	205	649	100%	100%
sede impiego	ALTRO	4	15	2%	2%
	MITTICA	120	361	62%	56%
	MITTICA-ALTRO	1	3	1%	0%
	MITTICA-WHITE HORSE	14	47	7%	7%
	WHITE HORSE	56	216	29%	34%
	Totale complessivo	195	642	100%	100%
fototipo	I		1	0%	0%
	II	26	80	13%	12%
	III	105	326	54%	50%
	IV	49	193	25%	30%
	V	12	43	6%	7%
	VI	1	6	1%	1%
	Totale complessivo	193	649	100%	100%
fumo	0	84	280	41%	43%
	1-19	63	178	31%	27%
	20+	32	110	16%	17%
	EX	24	84	12%	13%
	Totale complessivo	203	652	100%	100%

**Tabella X - m:**

Determinazioni di xenoelementi nel siero. Confronto tra casistica **A** e **B**.

- **A** (soggetti con campioni di urine T1 mancanti/siero T1 presenti);
- **B** (soggetti con campioni di urine T1 presenti/siero T1 presenti).

	Determinazioni nei campioni di siero T1 (µg/L)					
	elemento	numerosità	media	dev. stand.	minimo	massimo
<b>A: soggetti con campioni urine T1 mancanti/ campioni siero T1 presenti</b>	As	205	<b>1.23</b>	2.98	0	24.8
	Mo	205	<b>0.78</b>	1.08	0	11.7
	U	205	<b>0.03</b>	0.02	0.008	0.152
	V	205	<b>0.03</b>	0.05	0	0.3
	W	205	<b>0.05</b>	0.04	0	0.23
	Zr	205	<b>0.39</b>	2.31	0	33.23
<b>B: soggetti con campioni urine T1 presenti/ campioni siero T1 presenti</b>	As	652	<b>0.71</b>	1.17	0	14.3
	Mo	652	<b>1.68</b>	10.07	0	142.1
	U	652	<b>0.03</b>	0.08	0.0046	1.664
	V	652	<b>0.03</b>	0.06	0	0.55
	W	652	<b>0.07</b>	0.45	0	10.34
	Zr	652	<b>0.27</b>	0.28	0	2.17

## 7. Conclusioni

Quanto sopra esposto consente di evidenziare alcuni aspetti di rilievo riassumibili come segue:

- la concentrazione totale di **uranio** campionata nelle urine e nel siero nel periodo post-missione diminuisce significativamente. Complessivamente, infatti, le concentrazioni di U medie e mediane sono risultate maggiori nei campioni pre-missione (T0). Il risultato non cambia quando si analizzano le singole tipologie di impiego in Te. Op. (Tabella X - g), per tutte le categorie infatti la concentrazione è mediamente invariata o ridotta significativamente;
- le difficoltà analitiche sorte nella determinazioni del RI, amplificate da concentrazioni di U al di sotto o al limite di rivelabilità, e dal ritardo temporale tra data del prelievo ed esame analitico, non hanno permesso di derivare dati valutabili per un numero congruente di soggetti. È ragionevole però affermare che ai livelli di concentrazioni totali di U riscontrati è estremamente improbabile che possa essersi verificato un incremento di esposizione ad U impoverito durante il dispiegamento, rendendo di fatto irrilevante determinare il RI  $^{238}\text{U}/^{235}\text{U}$  al di sotto di una certa soglia di concentrazione totale di U;
- per quanto riguarda gli altri elementi, sono stati notati modesti incrementi statisticamente significativi nelle concentrazioni di Cd, Mo, Ni, Zr e decrementi, parimenti statisticamente significativi, per As, Pb, W e V. Tali variazioni, di scarsa o nulla importanza sotto il profilo tossicologico, possono essere plausibilmente ascritte a cambiamenti nelle abitudini di vita tra le condizioni di pre-impiego e quelle di impiego. In particolare gli incrementi riscontrati per Cd, Mo e Ni sono risultati positivamente correlati con il consumo di verdura e/o frutta. Va sottolineato, comunque, che i livelli medi e mediani di concentrazione riscontrati rientrano all'interno degli intervalli riportati nella letteratura come normali per l'individuo medio Italiano non esposto professionalmente;
- l'analisi dei pochi campioni di capelli disponibili ha fornito indicazioni probanti circa la capacità di questo materiale biologico di servire come bioindicatore dell'esposizione a U, anche a basse concentrazioni totali quali quelle riscontrate nei soggetti esaminati. Le difficoltà analitiche ai fini della determinazione del RI  $^{238}\text{U}/^{235}\text{U}$  sono risultate infatti molto minori rispetto alle analoghe determinazioni

nelle urine. L'esiguo numero di campioni ricevuti non permette d'altra parte alcuna valutazione statistica di rilievo.

---

Hanno contribuito alle attività di questa Unità operativa:

- Ferdinando Chiodo
- Antonio Menditto
- Augusto Pastorelli
- Antonella Semeraro
- Angela Sorbo
- 1° Mrs. Carlo Battista
- App. CC. Giovanni Spataro

**Bibliografia generale**

M. A. McDiarmid, F. J. Hoper, K. Squibb, K. McPhaul. The Utility of Spot Collection for Urinary Uranium Determination in Depleted Uranium Exposed Gulf War Veterans. *Health Phys.* 77 (1999), 261 – 264;

Depleted Uranium-Catalyzed DNA Damage: Absence of Significant Alpha Particle Decay, *J. Inorg. Biochem.*, 91 (2002), 246 – 252;

A. Bleise, P. R. Danesi, W. Burkhart. Properties, Use and Health Effects of Depleted Uranium (DU): A General Overview. *J. Environ. Radioactivity*. 64 (2003), 93 – 12;

S. Caroli, M. Forte, C. Nuccetelli, S. Risica, R. Rusconi. Assessing Natural Radioactivity in Drinking Water: A Synergism between Radiometric and Non-Radiometric Techniques. *Rio Symposium*, 2005;

K. S. Squibb. M. A. McDiarmid. Depleted Uranium Exposure and Health Effects in Gulf War Veterans. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 361 (2006), 639–648;

D. Bland, R. Rona, D. Coggon, J. Anderson, N. Greenberg, L. Hull, S. Wessely. Urinary Isotopic Analysis in the UK Armed Forces: No Evidence of Depleted Uranium Absorption in Combat and Other Personnel in Iraq. *Occup. Environ. Med.*, 2007, 1 – 5;

T. I. Todorov, H. Xu, J. W. Ejnik, F. G. Mullik, K. Squibb, M. A. McDiarmid, J. Centeno. Depleted Uranium Analysis in Blood by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 24 (2009), 189 – 193;

Approved Recommendation on the Theory of Reference Values. Part 1. The Concept of Reference Values, International Federation of Clinical Chemistry, *Clin. Chim. Acta*, 165 (1987), 111 – 118;

Approved Recommendation on the Theory of Reference Values. Part 2. Selection of Individuals for the Production of Reference Values, International Federation of Clinical Chemistry, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 22 (1984), 203 – 208;

Approved Recommendation on the Theory of Reference Values. Part 3. Preparation of Individuals and Collection of Specimens for the Production of Reference Values, *Clin. Chim. Acta*, 171 (1988), S1 – S12;

Approved Recommendation on the Theory of Reference Values. Part 4. Control of Analytical Variation in the Production, Transfer and Application of Reference Values, *Clin. Chim. Acta*, 202 (1991), S1 – S12;

Approved Recommendation on the Theory of Reference Values. Part 5. Statistical Treatment of Collected Reference Values. Determinations of Reference Limits, *Clin. Chim. Acta*, 137 (1984), 97F – 114F;

Approved Recommendation on the Theory of Reference Values. Part 6. Presentation of Observed Values Related to Reference Values, *Clin. Chim. Acta*, 127 (1983), 441F – 448;

O. Senofonte. N. Violante, L. Fornarelli, E. Beccaloni, A. Powar, S. Caroli. Reference Values for Elements of Toxicological, Clinical and Environmental Interest in Hair of Urban Subjects. In: S. Caroli, H. Muntau, G. V. Iyengar (Editors), *Bioelements: Health Aspects*, *Ann. Ist. Super. Sanità*, 25 (1989), 385-392;

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

A. Stacchini, E. Coni, E. Beccaloni, L. Fornarelli, A. Alimonti, G. B. Bolis, E. Cristallini, E. Sabbioni, R. Pietra, S. Caroli. Criteria for Reference Value Assessment of Elements in Human Tissues. In: S. Caroli, H. Muntau, G. V. Iyengar (Editors), *Bioelements: Health Aspects*, *Ann. Ist. Super. Sanità*, 25 (1989), 379-384;

E. Coni, P. Falconieri, P. Semeraro, E. Beccaloni, A. Stacchini, S. Caroli. Reference Values for Essential and Toxic Elements in Human Milk. In: S. Caroli, E. Coni, E. Sabbioni (Editors), *Milk: Present Problems and Future Prospects*, *Ann. Ist. Super. Sanità*, 26 (1990), 119-130;

C. Minoia, E. Sabbioni, P. Apostoli, R. Pietra, L. Pozzoli, M. Gallorini, G. Nicolaou, L. Alessio. E. Capodaglio. Trace Element Reference Values in Tissues from Inhabitants of the European Community. I. A Study of 46 Elements in Urine, Blood and Serum of Italian Subjects. *Sci. Total Environ.*, 95 (1990), 89 – 105;

E. Sabbioni, P. Apostoli, C. Minoia. Assessment of Reference Values for 22 Trace Elements in Biological Fluids by GFAAS with Zeeman Correction. In: C. Minoia, S. Caroli (Editors), *Applications of Zeeman Graphite Furnace Absorption Spectrometry in the Chemical Laboratory and in Toxicology*, Pergamon Press, Oxford, New York, Seoul, Tokyo, 1992, 351 – 379;

E. Coni, A. Stacchini, S. Caroli, P. Falconieri. Analytical Approach to Obtaining Reference Values for Minor and Trace Elements in Human Milk. *J. Anal. At. Spectrom.*, 5 (1990), 581-586;

S. Caroli, O. Senofonte, N. Violante, L. Fornarelli, A. Powar. Assessment of Reference Values for Elements in Hair of Normal Urban Subjects. In: S. Caroli, R. Fuoco (Editors), *Special Issue devoted to the Fifth Italo-Hungarian Symposium on Spectrochemistry: Quality Control and Assurance in Life Sciences, 9-13 September 1991*, *Microchem. J.*, 46 (1992), 174-183;

S. Caroli, A. Alimonti, P. Delle Femmine, F. Petrucci, O. Senofonte, N. Violante, A. Menditto, G. Morisi, A. Menotti, P. Falconieri. Role of Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry in the Assessment of Reference Values for Trace Elements in Biological Matrices. *J. Anal. At. Spectrom.*, 7 (1992), 859-864;

E. Coni, A. Alimonti, G. B. Bolis, E. Cristallini, S. Caroli. An Experimental Approach to the Assessment of Reference Values for Trace Elements in Human Organs. *Trace Elem. Electrolytes*, 11 (1994), 84-91;

S. Caroli, A. Alimonti, E. Coni, F. Petrucci, O. Senofonte, N. Violante. The Assessment of Reference Values for Elements in Human Biological Tissues and Fluids: a Systematic Review. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 24 (1994), 363-398;

S. Caroli, N. Violante, A. Alimonti, O. Senofonte, L. Fornarelli, E. Coni, E. Sabbioni, R. Pietra. E. Cristallini, G. B. Bolis, P. Falconieri. An Overall Approach to the Assessment of Reference Values for Trace Elements in Human Tissues. In: P. Brätter, B. Ribas, P. Schramel (Editors), *Trace Elements Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, 6 (1994) 173-182;

P. Apostoli. Reference Values for Trace Elements in Biological Fluids. *Ann. Ist. Super. Sanità*, 31 (1995), 261-274;

Element Speciation in Bioinorganic Chemistry. S. Caroli (Editor), *John Wiley & Sons, Inc.*, New York, 1996, pp. 474;

A. Alimonti, F. Petrucci, S. Fioravanti, F. Laurenti, S. Caroli. Assessment of the Content of Selected Trace Elements in Serum of Term and Pre-term Newborns by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 342 (1997), 75-81;

C. Minoia, P. Apostoli. Activity of the Italian Society of Reference Values. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 72 (1999), 268–270;

O. Senofonte, N. Violante, S. Caroli. Assessment of Reference Values for Elements in Human Hair of Urban Schoolboys. *J. Trace Elem. Biol.*, 14 (2000), 6-13;

A. Alimonti, F. Petrucci, F. Laurenti, P. Papoff, S. Caroli. Reference Values for Selected Trace Elements in Serum of Term Newborns from the Urban Area of Rome. *Clin. Chim. Acta*, 292 (2000), 163-173;

A. Alimonti, F. Petrucci, M. Krachler, B. Bocca, S. Caroli. Reference Values for Chromium, Nickel and Vanadium in Urine of Youngsters from the Urban Area of Rome. *J. Environ. Monit.*, 2 (2000), 351-354;

The Determination of Chemical Elements in Food: Applications for Atomic and Mass Spectrometry. S. Caroli (Editor), *John Wiley & Sons, Inc.*, Hoboken, New Jersey, USA, 2007, xvi + 722 pp;

A. Apostoli, M. C. Ricossa. The Role and Significance of Reference Values in the Identification and Evaluation of Food Sources of Trace Elements. In: Sergio Caroli, Gyula Zárny (Editors), *Analytical Techniques for Clinical Chemistry: Methods and Applications*, 2010 (in press);

M. F. Boeniger, L. K. Lowry, J. Rosenberg. Interpretation of Urine Results Used to Assess Chemical Exposure with Emphasis on Creatinine Adjustment: A Review. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 54 (1993), 615 – 627.

## **XI. ANALISI DI BIOMARCATORI MOLECOLARI DI IMPATTO GENOTOSSICO E SUSCETTIBILITA' GENETICA**

**Responsabile:**

**Prof. Alberto Izzotti**

D.I.S.S.A.L. - Università di Genova  
Via A. Pastore, 1  
16132 Genova

## **1. Introduzione**

Il lavoro svolto da questa Unità Operativa (UO) è stato mirato ad analizzare nei soggetti in esame le variazioni di marcatori molecolari di impatto genotossico influenzabili dall'esposizione ad inquinanti ambientali. Gli esami sono stati eseguiti su DNA estratto da linfociti di sangue venoso periferico raccolti in Patria prima dell'invio (T0) ed in Te. Op. al termine della missione (T1). Sono stati analizzati biomarcatori di alterazioni del DNA e di suscettibilità genetica individuale ad alterazioni genotossiche.

Scopo del lavoro è stato verificare la presenza di alterazioni molecolari del DNA correlabili a situazioni ambientali tali da costituire un eventuale rischio per la salute dei soggetti. Al fine di aumentare quanto più possibile la sensibilità dell'indagine, sono state identificate ed indagate le sottopopolazioni di soggetti caratterizzate da una maggiore suscettibilità genetica ad alterazioni genotossiche.

## 2. Studio A. Addotti al DNA

### a. Introduzione

Gli addotti al DNA costituiscono la frazione di un genotossico ambientale che, avendo superato con successo tutte le difese dell'organismo, riesce a legarsi al suo bersaglio molecolare [1]. Gli addotti al DNA possono avere un diverso destino:

- (a) essere riparati efficacemente;
- (b) essere riparati in modo erraneo e quindi indurre una mutazione;
- (c) persistere in zone introniche del DNA senza avere effetti diretti sull'omeostasi cellulare.

Pertanto gli addotti al DNA non costituiscono direttamente un indice di rischio di patologia. Sono invece indicativi dell'esistenza di una situazione espositiva di rischio che se protratta nel tempo ed eccessiva nelle dosi può costituire fattore di rischio di malattia. La presenza di addotti al DNA e delle mutazioni a loro conseguenti costituisce in cellule ciclanti fattore patogenetico per l'insorgenza di tumore, in cellule differenziate non ciclanti fattore di rischio per l'insorgenza di patologie degenerative [1]. Gli addotti al DNA possono essere ricercati nelle popolazioni bersaglio in cui estrinsecano il processo patogenetico e dove quindi insorgerà la malattia correlata (popolazioni bersaglio). Negli studi su popolazioni sane gli addotti vengono invece ricercati in popolazioni cellulari campionabili in modo non invasivo funzionalmente correlate con il tessuto bersaglio del processo patogenetico (popolazioni surrogate).

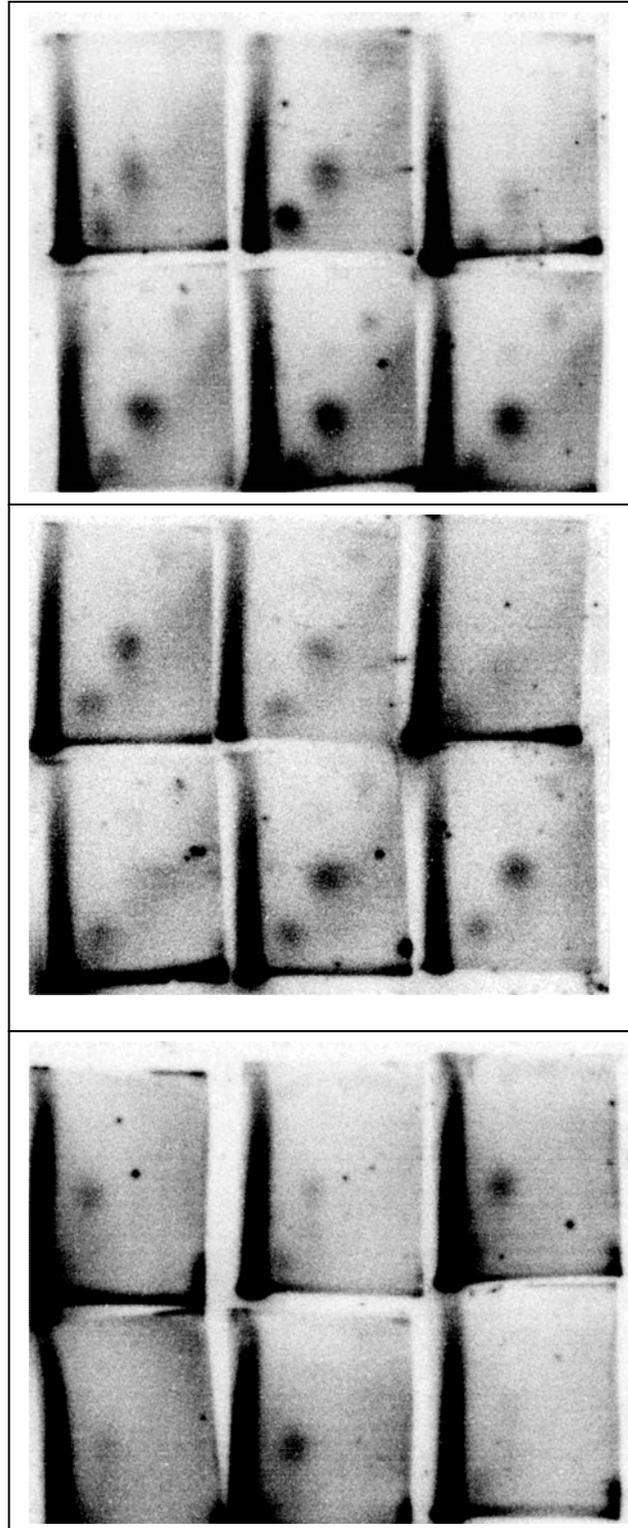
Nel presente studio gli addotti al DNA sono stati analizzati nei linfociti di sangue periferico. Tale popolazione in questo caso risultava particolarmente interessante poiché strettamente correlata dal punto di vista biologico e funzionale con il midollo emopoietico ed il sistema linfatico, sedi in cui è stata ipotizzata la possibilità di insorgenza di tumori dopo attività in teatri operativi. Inoltre sul linfocita convergono genotossici provenienti da diverse vie di esposizione (respirazione, ingestione, assorbimento transcutaneo) assicurando così la massima sensibilità allo studio.

Per la determinazione degli addotti al DNA è stata utilizzata la tecnica della postmarcatura con  $^{32}\text{P}$ . Tale metodo è stato scelto poiché risulta caratterizzato dalla maggiore sensibilità rispetto ad altri metodi impiegabili per studi di biomonitoraggio [3]. Inoltre tale metodo è in grado di rilevare la presenza di addotti al DNA anche di natura non conosciuta ma in grado di interferire con la normale omeostasi dell'acido nucleico e con la sua elaborazione da parte di enzimi nucleasici e polimerasici. E' stato così possibile indagare la presenza di addotti al DNA con la maggiore sensibilità oggi possibile includendo nell'analisi la ricerca di addotti a struttura molecolare incognita derivanti da eventuali esposizioni non note a priori.

#### **b. Risultati**

Gli addotti al DNA sono stati determinati in 851 soggetti sia a T0 che a T1. Per 127 soggetti di cui non era disponibile il campione sia a T0 che a T1 le analisi non sono state effettuate in quanto non rientranti nel disegno prospettico dello studio. Per 2 soggetti la valutazione degli addotti al DNA non è stata effettuata in quanto la quantità di campione è risultata insufficiente per l'analisi (DNA <5ug). Le analisi sono state effettuate in duplicato per un totale di 3404 saggi indipendenti. Inoltre in parallelo sono state effettuate altrettante determinazioni quantitative di nucleotidi normali negli stessi campioni sempre in duplicato (3404 analisi indipendenti) per un totale di 7808 test di postmarcatura con  $^{32}\text{P}$ . Un esempio dei cromatogrammi autoradiografici ottenuti è riportato in Figura XI - 1.

**Figura XI - 1.** Esempio di rilevazione di addotti al DNA (aree scure) in 18 campioni mediante postmarcatura con  $^{32}\text{P}$  e cromatografia multidirezionale su strato sottile.



La quantità totale media di addotti al DNA in tutti i soggetti esaminati è risultata essere a T0  $3.74 \pm 1.87$  (media  $\pm$  SD), a T1  $3.78 \pm 1.98$  addotti/ $10^8$  nucleotidi. Tale differenza non è statisticamente significativa.

Sono state quindi analizzate le influenze sui livelli di addotti al DNA delle diverse variabili analizzate disaggregando la popolazione generale in sottogruppi in base alla variabile analizzata. Nessuna influenza sul livello di addotti al DNA e sulla loro variazione tra T0 e T1 è risultata essere esercitata dal fototipo, dal fumo di sigaretta, dal consumo di frutta e verdura, dal consumo di bevande alcoliche. Tale risultato dimostra che le abitudini di vita non hanno esercitato un significativo effetto di confondimento indicando così l'adeguatezza del disegno prospettico dello studio. Assenza di effetto della variabile si è indicata sia quando le differenze non erano significative che quando variabili categorizzate in modo diverso esercitano un simile effetto sui livelli di addotti. Ad esempio il consumo di frutta e verdura sia raro che frequente induceva diminuzione nel livello di addotti.

Analogamente gli impieghi operativi categorizzati come numero di missioni, sede della base operativa e tipologia dell'impiego in teatro non sono risultati essere influenti sulla variazione del livello di addotti tra T0 e T1.

Ha invece esercitato influenza sulla variazione del livello di addotti l'età. Infatti nei soggetti con età <30 anni si è osservata una tendenza alla diminuzione del livello di addotti tra T0 e T1 ( $-0.02$ ,  $P = 0.02$ ) mentre nei soggetti con età >40 si è osservata una tendenza all'aumento ( $+0.21$ ,  $P=0.05$ ). Ciò avviene anche per 8-oxo-dG.

Nessuna correlazione significativa tra numero di vaccinazioni (da 0 a 9) e variazioni T0-T1 degli addotti al DNA è stata rilevata. Inoltre il numero di vaccinazioni è risultato non influente sul livello basale di addotti a T0.

Per quanto riguarda l'effetto specifico di differenti tipologie vaccinali nessun aumento di addotti è stato osservato in chi è stato sottoposto a vaccino vivo attenuato trivalente MRP rispetto ai non trattati.

Le variabili che hanno esercitato un effetto significativo sugli addotti al DNA sono riassunte in **Tabella XI - a**.

**Tabella XI-a.** Variabili che hanno esercitato effetto statisticamente significativo sulla variazione degli end point analizzati tra T0 e T1. Le frecce indicano se la variazione T0-T1 del biomarcatore è avvenuta nel senso dell'aumento (↑) o della diminuzione (↓).

<b>Variabile</b>	<b>Addotti al DNA (media ± SD) (T0 vs. T1)</b>	<b>Alterazioni ossidative al DNA (8-oxo-dG) (T0 vs. T1)</b>
Età >40	3.83±1.71 vs 4.05±1.74* ↑	
Età >30		3.52±4.22 vs. 5.07±5.73** ↑
Attività di pattugliatore		2.92±3.63 vs. 3.97±4.73** ↑
Attività esterna		2.90±3.58 vs. 3.92±4.67** ↑
Sesso maschile		2.69±2.96 vs. 3.89±3.33** ↑
Vaccinazioni ≥ 5		4.11±1.94 vs. 6.17±1.04* ↑
Vaccino MRP		4.08±5.46 vs. 5.81±8.55* ↑
<i>OGG1</i> (Cys326Cys)		6.39±6.40 vs. 8.01±7.96* ↑
<i>GSTM1/OGG1</i> (nullo/Cys326Cys)		9.02±8.33 vs. 11.77±12.98 ↑

\*P<0.05, \*\*P<0.001.

**c. Discussione**

I dati ottenuti indicano un'assenza di effetto della missione in Te. Op. sui livelli di addotti al DNA. Tali addotti, anche detti di grandi dimensioni o '*bulky adducts*' sono il prodotto di esposizioni a xenobiotici genotossici prevalentemente aventi dimensioni molecolari rilevanti, quali ad esempio gli idrocarburi policiclici aromatici omo- ed eterociclici. L'aumento di tali parametri è dovuto ad esposizioni professionali specifiche, a variazioni significative delle abitudini dietetiche e dello stile di vita con particolare riferimento al fumo di sigaretta. Nessuna di queste situazioni sembra avere avuto un impatto significativo sui livelli di addizione covalente al DNA linfocitario nella popolazione in esame. Questo indica un'adeguatezza del disegno prospettico dello studio che risulta quindi in grado di controllare l'effetto dei principali fattori di confondimento ed analizzare specificatamente l'effetto dell'attività in Te. Op..

L'unico elemento di un qualche rilievo è il modesto effetto dell'età. Infatti i soggetti >40 anni hanno avuto una modesta tendenza all'aumento anziché alla diminuzione degli addotti al DNA tra T0 e T1. L'entità di tale aumento (+0.21 addotti/10<sup>8</sup> nucleotidi) è assolutamente modesta e quindi priva di significato biologico. Tale tendenza è comunque in linea con la nota diminuzione nella capacità di rimuovere le alterazioni del DNA che si osserva con l'età e appare quindi riflettere il fisiologico accumulo di addotti endogeni nel soggetto >40 anni nel corso dell'intervallo di tempo trascorso tra T0 e T1.

Il livello di addotti al DNA osservato nella popolazione in esame è stato confrontato con quello rilevato in studi analoghi effettuati su altre popolazioni con lo stesso metodo (postmarcatura con <sup>32</sup>P su linfociti ematici) nello stesso laboratorio.

Il livello di addotti al DNA riscontrato nella popolazione in esame sia a T0 (3.74 ± 1.87) che a T1 (3.78 ± 1.98) è risultato inferiore rispetto a quello (4.65 ± 7.63) di una popolazione composta da 311 soggetti professionalmente esposta ad Idrocarburi Policiclici Aromatici in quanto operai in stabilimenti siderurgici ed analizzati nelle stesse cellule con lo stesso metodo nello stesso laboratorio (DISSAL) (Izzotti et al., Studio Brescia 2006, dati non pubblicati).

Il livello di addotti al DNA riscontrato nella popolazione in esame sia a T0 ( $3.74 \pm 1.87$ ) che a T1 ( $3.78 \pm 1.98$ ) è risultato maggiore rispetto ad una popolazione generale di 188 soggetti residenti in area rurale (Alberobello) o urbana ( $2.32 \pm 2.06$ ) come analizzati nelle stesse cellule con lo stesso metodo nello stesso laboratorio (DISSAL) (Izzotti et al., Studio Taranto 2005, Giorn. It Med Lav., 2003).

Non si è quindi riscontrato alcun aumento dei livelli di addotti riconducibile all'attività in Te. Op.. Anzi in alcune categorie (soggetti età <40 anni) la tendenza è verso una diminuzione.

Tale risultato è probabilmente dovuto all'effetto della dieta più povera in idrocarburi policiclici aromatici e pirolisati amminoacidici in Te. Op. rispetto a quanto accade in Patria.

L'assenza di influenza delle missioni in Te. Op. sui livelli di addotti al DNA nei linfociti ematici osservata nel presente studio è in linea con quanto ottenuto da altri autori in studi simili effettuati su unità militari impiegate in teatro bellico nel 1991 in Iraq [8].

### 3. Studio B. Alterazioni ossidative al DNA

#### a. Introduzione

Le alterazioni ossidative del DNA rappresentano un fenomeno comune nelle cellule sia eucariote che procariote conseguente alla produzione endogena di specie reattive dell'ossigeno. Negli eucarioti la principale fonte di alterazioni ossidative endogene è costituita dalla fosforilazione ossidativa mitocondriale. La produzione endogena di specie reattive dell'ossigeno aumenta nel caso di danno mitocondriale. Tale danno può derivare dall'esposizione a genotossici ambientali essendo il DNA mitocondriale assai più sensibile del DNA nucleare ai fenomeni di addizione covalente da xenobiotici e al danno clastogenico [2]. Un contributo importante al danno ossidativo può anche derivare dall'esposizione ambientale a fattori chimici, fisici e biologici in grado di attivare un meccanismo pro-ossidante a livello intra- ed extracellulare. Inquinanti chimici specifici, come il diepossibutano o miscele di inquinanti chimici, come il fumo di sigaretta, sono in grado di aumentare i livelli di alterazioni ossidative al DNA [4]. Fattori fisici come le radiazioni ionizzanti, diversi eccitanti e la stessa luce solare aumentano il danno al DNA sia nella cute che a livello sistemico [5]. Fattori biologici come ad esempio l'infezione cronica da *Helicobacter pylori* sono analogamente in grado di aumentare i livelli di danno ossidativo al DNA [6]. Le alterazioni ossidative al DNA costituiscono quindi un indice altamente aspecifico su cui convergono disparati meccanismi genotossici sia esogeni che endogeni. Per tale ragione i livelli di alterazioni ossidative nelle cellule eucariote umane sono solitamente molto elevati specie se paragonati con altre tipologie di alterazioni molecolari al DNA quali gli addotti di grandi dimensioni. Infatti la quantità di alterazioni molecolari ossidative al DNA è di circa 1000 volte superiore rispetto a quella degli addotti.

La cellula possiede importanti ed efficaci meccanismi di riparo per difendersi da un danno ossidativo così rilevante come ad esempio l'enzima 8-oxo-guanina-glicosilasi 1 (*OGG1*). L'insufficiente azione di tali sistemi di riparo può, soprattutto in cellule ciclanti, trasformare le lesioni molecolari ossidative in fenomeni mutazionali di trasversione o di formazione di siti apurinici. Data l'alta

capacità dell'organismo di difendersi dal danno ossidativo, un ruolo chiave nella trasformazione da danno ossidativo al DNA a mutazione è giocata dal persistere nel tempo di alti livelli di danno.

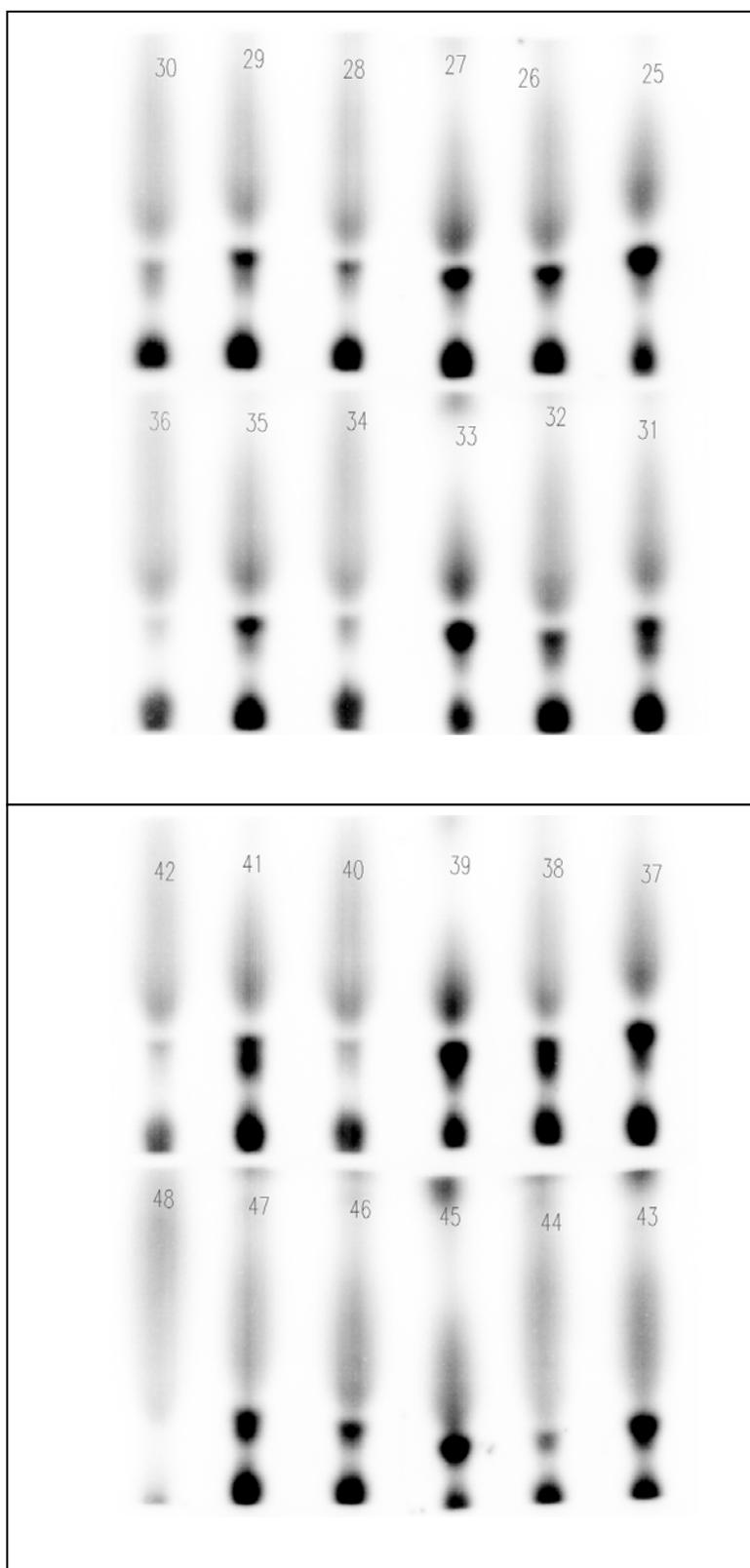
Una dei principali marcatori di alterazione ossidativa del DNA è la 8-idrossi-2'-desossiguanosina (8-oxo-dG). Questa lesione molecolare deriva dall'addizione di un radicale idrossilico al C8 della guanina. In condizioni di pH neutro l'8oxo-dG è presente nelle cellule sia in forma enolica (8-OH-dG) che chetonica (8-oxo-dG) (tautomeria cheto-enolica).

Nel presente studio la 8-oxo-dG è stata analizzata nei linfociti ematici a T0 e T1 mediante postmarcatura con  $^{32}\text{P}$ . Questa tecnica presenta alcuni vantaggi e svantaggi rispetto alla più classica analisi mediante HPLC seguita da detezione elettrochimica. Gli svantaggi sono rappresentati da una minore specificità dovuta alla possibilità che l'utilizzo di radioisotopi beta emittenti ( $^{32}\text{P}$ ) possa nel mezzo acquoso di reazione aumentare artificialmente i livelli di 8-oxo-dG. Per questa ragione la detezione con  $^{32}\text{P}$  dell'8-oxo-dG non è una tecnica quantitativa ma semi-quantitativa; viene cioè utilizzata non per quantificare la 8-oxo-dG ma per rilevarne alterazioni in due diverse popolazioni o in una stessa popolazione nel corso del tempo. Quest'ultima situazione è quella applicata allo studio SIGNUM. I vantaggi della detezione dell'8-oxo-dG con  $^{32}\text{P}$  sono invece rappresentati dalla elevatissima sensibilità e dalla necessità di utilizzare quantità di DNA minime per l'analisi, anche inferiori a 1 ug. E' stato così possibile effettuare questa analisi sulla quasi totalità della popolazione in esame, anche per quei soggetti in cui la quantità di DNA disponibile era minima, situazione non infrequente data la molteplicità degli *endpoint* analizzati.

## b. Risultati

L'8oxo-dG è stata determinata in 853 soggetti sia a T0 che a T1. Per 127 soggetti di cui non era disponibile il campione sia a T0 che a T1 le analisi non sono state effettuate in quanto non rientranti nel disegno prospettico dello studio. Le analisi sono state effettuate in duplicato per un totale di 3412 analisi indipendenti. Un esempio dei cromatogrammi autoradiografici ottenuti è riportato in **Figura XI - 2**.

**Figura XI - 2.** Esempio di rilevazione dell'8-oxo-dG in 24 campioni mediante postmarcatura con  $^{32}\text{P}$  e cromatografia unidirezionale su strato sottile. In ciascuna corsia lo spot inferiore è l'origine della corsa cromatografica, quello immediatamente superiore l'8-oxo-dG.



La quantità totale media in tutti i soggetti esaminati è risultata essere a T0  $2.70 \pm 2.94$  (media  $\pm$  SD), a T1  $3.35 \pm 3.79$  8-oxo-dG/ $10^5$  nucleotidi. Si è pertanto osservato un incremento differenziale pari a  $0.67$  8-oxo-dG/ $10^5$  nucleotidi risultato essere statisticamente significativo ( $P < 0.01$ ).

Sono state quindi analizzate le influenze sui livelli di 8-oxo-dG delle diverse variabili analizzate disaggregando la popolazione generale in sottogruppi in base alla variabile analizzata.

Nessuna influenza sul livello di alterazioni ossidative al DNA e sulla loro variazione tra T0 e T1 è risultata essere esercitata dal fototipo, dal fumo di sigaretta, dal consumo di frutta e verdura, dal consumo di bevande alcoliche, dal numero di missioni effettuate, dalla sede operativa.

L'età ha influenzato l'incremento di alterazioni ossidative tra T0 e T1. Tale incremento infatti è risultato essere in media 3.7 volte superiore nei soggetti con età maggiori di 30 anni rispetto a quelli di età inferiore. Tale differenza è risultata essere statisticamente significativa ( $P < 0.001$ ).

La tipologia di attività operativa è risultata correlata con un incremento di alterazioni ossidative specificatamente per quanto riguarda l'impiego in qualità di pattugliatore. Questa categoria ha infatti avuto un incremento di alterazioni ossidative linfocitario pari a  $1.57 \pm 2.57$  contro l'incremento medio di  $0.40 \pm 0.14$  osservato in media nelle altre categorie operative. Tale differenza è risultata statisticamente significativa ( $P < 0.001$ ). Analogamente l'attività prevalente in ambiente esterno alla base ha incrementato significativamente il livello di alterazioni ossidative rispetto ad attività prevalenti all'interno della base ( $+1.02$  vs  $+0.34$ ,  $P < 0.001$ ).

L'incremento di alterazioni ossidative T0-T1 è risultato maggiore nei maschi rispetto alle femmine ( $+0.69$  vs  $+0.19$ ,  $P < 0.001$ ).

E' stata osservata una correlazione tra aumento di alterazioni ossidative e numero di vaccinazioni (da 0 a 8) effettuato a partire dal 2003. Tale correlazione è risultata statisticamente significativa ( $r = +0.848$ ,  $P < 0.01$ ). La differenza maggiore si è osservata confrontando i 742 soggetti che avevano praticato un numero di vaccinazioni inferiori o uguale a 4 (8-oxo-dG T1-T0 =  $+0.55 \pm 0.25$ ) rispetto ai 100 soggetti che avevano praticato un numero di vaccinazioni

superiore (8-oxo-dG T1-T0 =  $+2.04 \pm 1.34$ ). Tra le vaccinazioni praticate il vaccino trivalente vivo attenuato MRP ha aumentato il differenziale di alterazioni ossidative tra T1 e T0. Infatti tale incremento è risultato essere  $+0.62 \pm 1.69$  nei 757 che non hanno effettuato tale vaccinazione rispetto a  $+1.16 \pm 3.47$  osservato negli 85 soggetti che hanno effettuato tale vaccinazione.

Le variabili che hanno esercitato un effetto significativo sulla variazione delle alterazioni ossidative al DNA tra T0 e T1 sono riassunte in Tabella XI - a.

### c. Discussione

I risultati ottenuti indicano che esiste una tendenza all'incremento di alterazioni ossidative linfocitarie correlato all'impiego in Te. Op.. Tale incremento è pari al 19.4% del valore basale e comporta un incremento medio differenziale quantificabile in 0.67 molecole di 8-oxo-dG/ $10^5$  nucleotidi. La sua entità appare quindi particolarmente modesta. A titolo di esempio e facendo riferimento alla letteratura scientifica pubblicata, fattori ossidanti ambientali quali il fumo di sigaretta, l'esposizione alla luce, agli inquinanti ambientali sono in grado di aumentare il livello basale delle alterazioni ossidative di diversi ordini di grandezza.

Le variabili che hanno maggiormente influito su tale incremento sono l'attività operativa e la immunoprofilassi attiva vaccinale.

Per quanto riguarda l'attività operativa, l'incremento si è osservato soprattutto nei soggetti di genere maschile impiegati in attività all'esterno della base come pattugliatori. Questo risultato è probabilmente riconducibile all'incremento del carico psicofisico a cui i soggetti impiegati in tali mansioni sottostanno in Te. Op.. E' infatti noto che l'attività fisica effettuata in condizioni non fisiologiche è un potente induttore di alterazioni ossidative. Questa situazione è dovuta all'incremento della fosforilazione ossidativa mitocondriale non adeguatamente compensata dalla progressiva induzione delle attività antiossidanti endogene. Anche lo stress psichico è correlato all'aumento dei livelli di alterazioni ossidative. Questa situazione è attribuibile all'increzione di corticosteroidi e

catecolammine ed al loro effetto sia a livello intracellulare che sul circolo sistemico.

Per quanto riguarda il numero di vaccinazioni l'incremento di alterazioni ossidative è risultato correlato sia alla quantità che alla qualità delle vaccinazioni. In particolare un numero di vaccinazioni totali uguale o superiore a 5 aumenta il livello di alterazioni ossidative. Tale effetto è soprattutto correlato all'utilizzo di vaccini vivi attenuati. Questa situazione è verosimilmente riconducibile all'induzione dell'attività immunostimolante esercitata sulle popolazioni linfocitarie dalle vaccinazioni, soprattutto vive attenuate. E' noto che l'incremento dell'attività metabolica cellulare, delle funzioni cellulari in generale e dell'attivazione dei processi infiammatori è in grado di aumentare significativamente i livelli di 8-oxo-dG.

I risultati ottenuti indicano quindi l'esistenza di un sovraccarico funzionale T0-T1 dovuto all'incremento di attività psico-fisica ed a profilassi vaccinali quantitativamente rilevanti. Tali situazione riflette fenomeni adattativi propri del linfocita e non direttamente situazioni patogenetiche di danno. Per verificare se tale modesto incremento di alterazioni ossidative è compensato dai fenomeni di riparo del DNA o meno è necessario verificare se esiste una correlazione tra incremento di 8-oxo-dG ed incremento di alterazioni citogenetiche (micronuclei).

#### 4. Studio C. Analisi di polimorfismi genetici

##### a. Introduzione

La suscettibilità individuale all'effetto di esposizioni ad agenti genotossici è condizionata da varianti genetiche polimorfiche. In base a tali varianti i singoli individui possono essere più o meno in grado di difendersi dall'impatto di genotossici ambientali. Le varianti di geni coinvolti nella detossificazione degli xenobiotici e nel riparo del danno al DNA giocano un ruolo fondamentale a questo proposito. Tali processi costituiscono solo alcuni tra i molteplici eventi necessari per la realizzazione di un processo patogenetico complesso quale la cancerogenesi. Pertanto alle varianti genetiche polimorfiche sfavorevoli è attribuito un rischio relativo di patologia piuttosto basso che normalmente oscilla tra 1.5 e 3 (bassa penetranza). L'interesse di tali varianti risiede però nel fatto che esse sono piuttosto frequenti nella popolazione, la loro frequenza oscillando tra 10 e 50% a seconda del genotipo considerato (alta frequenza).

Al fine di valutare l'eventuale impatto di agenti genotossici in soggetti particolarmente suscettibili, aumentando così la sensibilità dello studio, nel presente progetto sono stati analizzati tre diversi polimorfismi genetici.

Il primo è relativo alla glutatione transferasi M1 (*GSTM1*), gene fondamentale per il processo di detossificazione mediante coniugazione dei metabolici genotossici con glutatione ridotto. Tale gene è situato sul braccio corto del cromosoma 1 (1p13.3) ed esiste in due varianti polimorfiche caratterizzate dalla presenza (situazione normale wild type) o dalla delezione del gene (situazione di rischio, genotipo nullo). Quando la delezione della *GSTM1* si presenta in forma eterozigote l'effetto fenotipico è nullo. Quando la delezione si presenta in forma omozigote la proteina non può essere prodotta e si presenta quindi la situazione di rischio. La delezione omozigote di *GSTM1* è il più frequente polimorfismo di rischio noto essendo presente in quasi metà della popolazione.

Il secondo polimorfismo genetico indagato è relativo al gene *X-ray repair cross complementing protein 1* (*XRCC1*) sito sul braccio lungo del cromosoma 19 (19q13.2). Tale gene è coinvolto nel riparo di basi nucleotidiche del DNA danneggiate da radiazioni ionizzanti o da agenti alchilanti. Il riparo avviene per

interazione con la DNA ligasi III, la DNA polimerasi beta e la poli-ADP-ribosio-polimerasi. Questo gene svolge un ruolo importante nella difesa del danno da radiazioni e nella rimozione degli addotti al DNA. *XRCC1* presenta un polimorfismo G>A che determina nella proteina prodotta una sostituzione amminoacidica arginina-glutammina (Arg399Gln) da cui risulta una ridotta attività della proteina codificata. Pertanto il gene *XRCC1* può essere presente in tre diverse varianti alleliche:

- (1) omozigosi Arg399Arg (wild type);
- (2) eterozigosi Arg399Gln (eterozigoti);
- (3) omozigosi Gln399Gln (situazione di rischio).

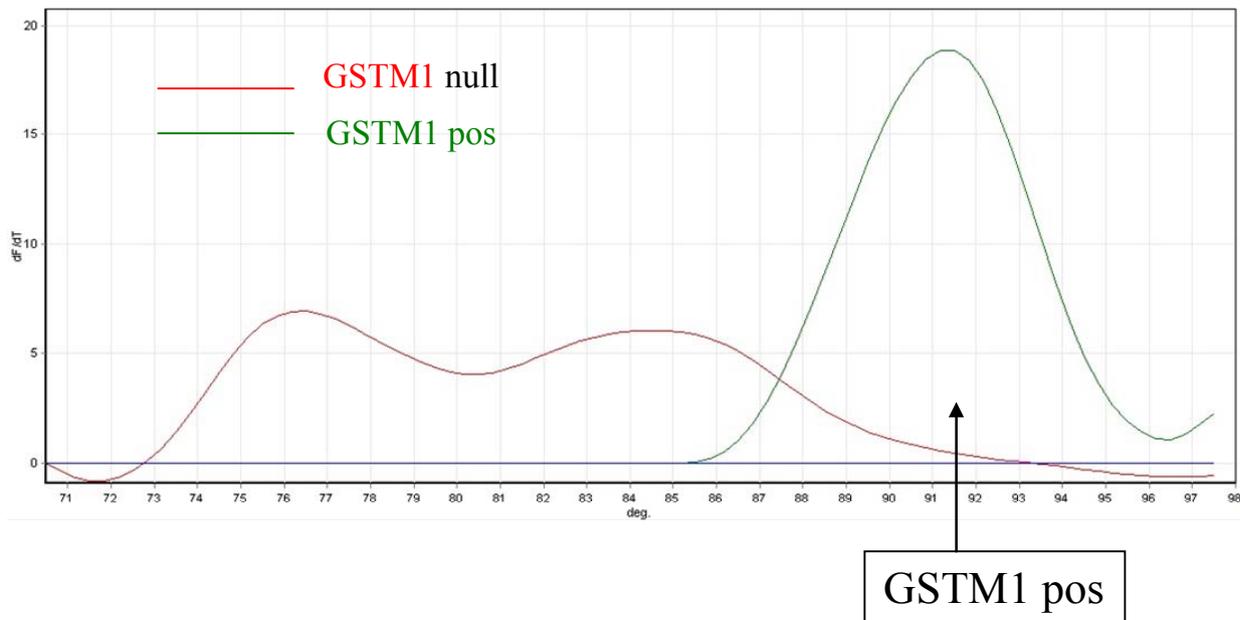
Il terzo polimorfismo genetico indagato è relativo al gene idrossi-guanina glicosilasi 1 (*OGG1*) sito sul braccio corto del cromosoma 3 (3p26.2). Tale gene è in grado di rimuovere la 8-oxo-dG dal DNA. Il principale polimorfismo noto per questo gene è un polimorfismo di singolo nucleotide C>G che determina nella proteina prodotta una sostituzione amminoacidica serina-cisteina (Ser326Cys) da cui risulta una ridotta attività della proteina codificata. Pertanto il gene *OGG1* può essere presente in tre diverse varianti alleliche:

- (1) omozigosi Ser326Ser (wild type);
- (2) eterozigosi Ser326Cys (eterozigoti);
- (3) omozigosi Cys326Cys (situazione di rischio).

## b. Risultati

- ***GSTM1***

Un esempio dei risultati ottenuti è riportato in Figura XI - 3.



**Figura XI - 3.** Rilevazione del polimorfismo di delezione omozigote del gene *GSTM1* mediante amplificazione quantitativa con PCR in tempo reale con sonde fluorescenti ed identificazione della sequenza amplificata tramite analisi delle curve di melting. Il prodotto di amplificazione di *GSTM1* misura 231bp ed ha una temperatura di melting pari a 91.8 °C.

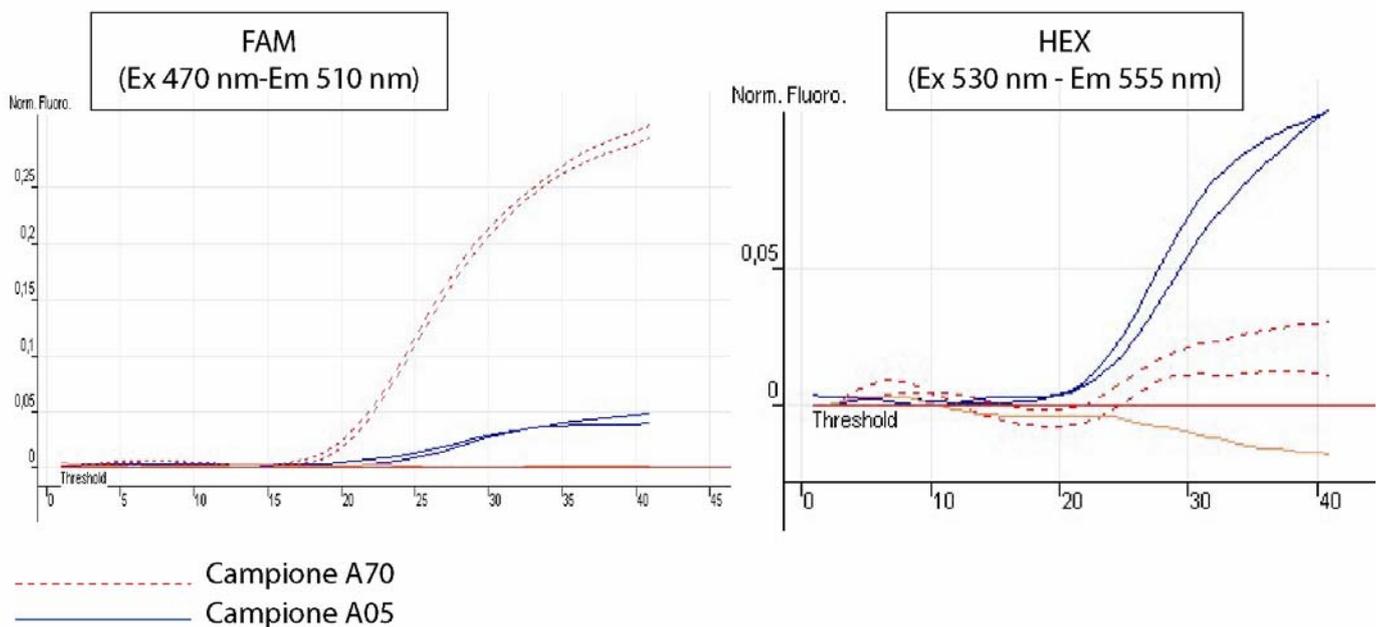
Degli 855 soggetti analizzati 385 hanno presentato un polimorfismo *GSTM1* positivo e 470 un polimorfismo *GSTM1* negativo. Pertanto la frequenza del polimorfismo di rischio *GSTM1* nullo è risultata pari al 55%. Tale polimorfismo non ha influenzato la variazione tra T0 e T1 né degli addotti al DNA né della 8-oxo-dG che sono variate in modo analogo sia nei *GSTM1* positivi che negativi.

Il livello di addotti al DNA è risultato essere maggiore nei soggetti *GSTM1* nulli che nei *GSTM1* positivi sia a T0 ( $4.07 \pm 1.86$  vs  $3.38 \pm 1.78$  addotti/ $10^8$  nucleotidi) che a T1 ( $4.07 \pm 1.91$  vs  $3.36 \pm 1.95$  addotti/ $10^8$  nucleotidi).

Analogamente il livello di 8-oxo-dG è risultato essere maggiore nei soggetti *GSTM1* nulli che nei *GSTM1* positivi sia a T0 ( $3.00 \pm 3.26$  vs  $2.29 \pm 2.42$  8-oxo-dG/ $10^5$  nucleotidi) che a T1 ( $3.70 \pm 4.07$  vs  $2.96 \pm 3.88$ -oxo-dG/ $10^5$  nucleotidi).

- ***XRCC1***

Un esempio dei risultati ottenuti è riportato in Figura XI - 4.



**Figura XI - 4.** Rilevazione del polimorfismo Arg399Gln del gene *XRCC1* mediante amplificazione quantitativa con PCR in tempo reale utilizzando sonde fluorescenti (FAM, HEX).

Degli 855 soggetti analizzati 406 (48%) hanno presentato un polimorfismo *XRCC1* wild type (omozigosi Arg399Arg), 371 (43%) un polimorfismo eterozigote (Arg399Gln), 78 (9%) un polimorfismo di rischio (omozigosi Gln399Gln).

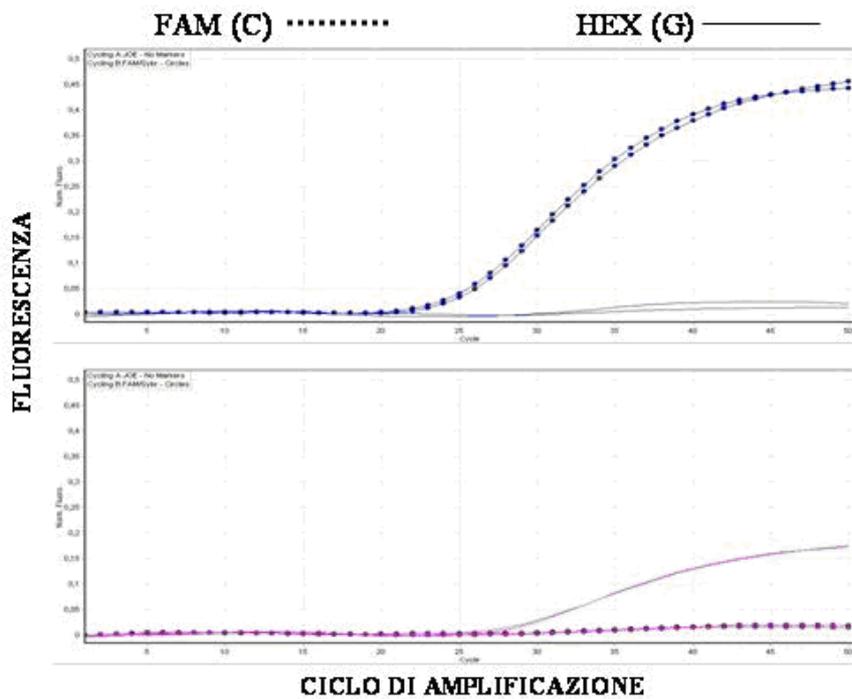
Tale polimorfismo non ha influenzato la variazione tra T0 e T1 né degli addotti al DNA né delle alterazioni ossidative al DNA.

Il livello di addotti al DNA è risultato essere maggiore nei soggetti con polimorfismo rischio sia omozigote che eterozigote rispetto ai soggetti wild type sia a T0 ( $5.84 \pm 2.28$  vs  $4.57 \pm 1.55$  vs  $2.60 \pm 1.04$  addotti/ $10^8$  nucleotidi) che a T1 ( $5.82 \pm 2.23$  vs  $4.57 \pm 1.87$  vs  $2.59 \pm 1.09$  addotti/ $10^8$  nucleotidi).

Il livello di 8-oxo-dG a T0 e a T1 non è risultato essere significativamente influenzato da questo polimorfismo.

- **OGG1**

Un esempio dei risultati ottenuti è riportato in Figura XI - 5.



**Figura XI - 5.** Rilevazione del polimorfismo Ser326Cys (C-G) del gene *OGG1* mediante amplificazione quantitativa con PCR in tempo reale utilizzando sonde fluorescenti (FAM, HEX).

Degli 855 soggetti analizzati 511 (60%) hanno presentato un polimorfismo *OGG1* wild type (omozigosi Ser326Ser), 294 (34%) un polimorfismo eterozigote (Ser326Cys), 50 (6%) un polimorfismo di rischio (omozigosi Cys326Cys). Tale polimorfismo non ha influenzato la variazione tra T0 e T1 degli addotti al DNA.

Una tendenza ad un maggiore aumento delle alterazioni ossidative al DNA tra T0 e T1 è stata osservata nei soggetti con polimorfismo di rischio (+1.62 vs +0.88 negli eterozigoti e +0.48 nei wild type).

Il livello di addotti al DNA non è risultato essere influenzato da questo polimorfismo né a T0 né T1.

Il livello di 8-oxo-dG è risultato essere maggiore nei soggetti con polimorfismo di rischio sia omozigote che eterozigote rispetto ai soggetti wild type sia a T0 ( $5.84 \pm 2.28$  vs  $4.57 \pm 1.55$  vs  $2.60 \pm 1.04$  8-oxo-dG/10<sup>5</sup> nucleotidi) che a T1 ( $8.00 \pm 7.96$  vs  $4.72 \pm 4.15$  vs  $2.14 \pm 1.88$  8-oxo-dG/10<sup>5</sup> nucleotidi).

- **Effetto combinato dei genotipi**

Nessun effetto di interazione tra i genotipi né sulla variazione differenziale di addotti T0-T1 né sul livello di addotti a T0 e a T1 è stato rilevato.

E' stato invece rilevato un effetto di interazione tra genotipi *GSTM1* e *OGG1* sui livelli di alterazioni ossidative al DNA. Infatti soggetti con genotipo protettivo combinato *GSTM1/OGG1* positivo/Ser326Ser omozigote tendevano ad avere un incremento minore di alterazioni ossidative tra T0 e T1. Tale incremento è risultato essere 2.7 volte minore nei soggetti con doppio genotipo protettivo rispetto agli altri. Infatti in media l'incremento dell'8-oxo-dG tra T0 e T1 è risultato essere  $+0.46 \pm 0.07$  nei 228 (27%) soggetti con doppio genotipo protettivo e  $+1.26 \pm 0.88$  nei 616 (73%) soggetti con assetti genotipici diversi.

Tale combinazione di assetti genetici ha influenzato anche il livello di alterazioni ossidative a T0 e a T1. Infatti a T0 il livello di alterazioni ossidative al DNA è risultato essere nei soggetti con doppio genotipo protettivo *GSTM1/OGG1*  $1.26 \pm 0.24$  contro  $4.50 \pm 2.66$  degli altri soggetti.

Analogamente a T1 il livello di alterazioni ossidative al DNA è risultato essere nei soggetti con doppio genotipo protettivo *GSTM1/OGG1*  $1.73 \pm 0.17$  contro  $5.76 \pm 3.77$  degli altri soggetti.

La combinazione del doppio genotipo di rischio *GSTM1/OGG1* nullo/Cys326Cys omozigote ha influenzato la variazione T0 -T1 di alterazioni ossidative. Infatti tale incremento è risultato essere nei soggetti con doppio genotipo sfavorevole  $2.88 \pm 0.88$  contro lo  $1.01 \pm 0.43$  osservato negli altri soggetti. I soggetti caratterizzati da questo doppio polimorfismo di rischio erano 28 e cioè solo il 3% della popolazione esaminata.

Tale combinazione di assetti genetici ha influenzato anche il livello di alterazioni ossidative a T0 e a T1. Infatti il livello di 8-oxo-dG è risultato essere nei soggetti con doppio genotipo sfavorevole *GSTM1/OGG1* a T0  $9.02 \pm 8.33$  e, a T1,  $11.77 \pm 12.98$ .

### c. Discussione

I risultati ottenuti indicano una frequenza di distribuzione dei polimorfismi genetici nella popolazione esaminati analoga a quella della popolazione generale. Infatti le frequenze di distribuzione osservate sono pressoché uguali a quelle attese sulla base dei dati di letteratura. Un lieve eccesso di soggetti *GSTM1* nulli (55%) è stato osservato rispetto alle frequenze attese sulla base dei dati di letteratura (40-45%).

Gli assetti genotipici hanno influenzato scarsamente la variazione di alterazioni molecolari tra T0 e T1. Un effetto è stato invece osservato sulla determinazione dei livelli di impatto genotossico sia a T0 che a T1. Questa tendenza indica che il disegno dello studio è idoneo a rilevare gli effetti dei genotipi e pertanto a valutare le conseguenze delle esposizioni a noxae ambientali di bassa entità in soggetti particolarmente suscettibili. Lo scarso effetto osservato nella variazione T0-T1 indica che l'entità della noxa ambientale correlata allo specifico effetto della missione in Te. Op. non è tale da indurre conseguenze sui livelli di alterazioni genotossiche nelle sottopopolazioni maggiormente suscettibili ad alterazioni genotossiche. Le eccezioni sono rappresentata dal polimorfismo *OGG1* omozigote di rischio Cys326Cys in cui il livello di alterazioni ossidative è

aumentato maggiormente (3.3 volte) rispetto alla restante popolazione. Tali soggetti sono piuttosto rari e costituiscono solo il 6% della popolazione esaminata.

L'effetto sui livelli di addotti a T0 e T1 da parte dei polimorfismi corrisponde a quanto atteso ed al significato funzionale dei genotipi esaminati. Infatti il polimorfismo di rischio *GSTM1* nullo è risultato essere associato ad un aumentato livello sia di addotti che di alterazioni ossidative. La coniugazione glutationica è infatti in grado di neutralizzare sia metaboliti genotossici derivanti da esposizione a xenobiotici in grado di generare addotti che specie reattive dell'ossigeno e metaboliti ossidanti in grado di generare 8-oxo-dG. La carenza di questa attività associata al genotipo *GSTM1* nullo determina quindi un incremento nel livello basale sia degli addotti al DNA che di alterazioni ossidative.

Il polimorfismo *XRCC1* ha influenzato il livello di addotti T0 e T1 che è risultato essere maggiore di circa 2 volte nei soggetti con polimorfismo di rischio sia omo- che eterozigote rispetto ai soggetti con omozigosi protettiva Arg399Arg. E' interessante notare l'aumento di addotti correlato anche alla situazione di eterozigosi, argomento piuttosto dibattuto in letteratura. Questi dati sono in linea con l'attività funzionale di *XRCC1* che è specificamente deputata alla rimozione degli addotti di grandi dimensioni.

La mancanza di un effetto specifico del polimorfismo *XRCC1* sulla variazione T0-T1 sia per gli addotti che per le alterazioni ossidative ha particolare rilevanza per la tipologia dello studio SIGNUM. Infatti una delle ipotesi di lavoro dello studio include la possibilità di esposizioni della popolazione esaminata a radioazioni ionizzanti emesse da radioisotopi. Il gene *XRCC1* (gene *X-ray repair cross complementing protein 1*) è specificatamente coinvolto nel riparo di questo tipo di danno al DNA. Pertanto l'assenza di un effetto della sua carenza funzionale sia etero- (Arg399Gln) che omozigote (Gln399Gln) indica che non vi è stato un danno specifico da radiazioni ionizzanti tale da richiedere l'intervento significativo di questa attività funzionale di riparo. Infatti la variazione di alterazioni genotossiche al DNA tra T0 e T1 non è stata influenzata dalla carenza funzionale di questo gene. Pertanto il riscontrato incremento del livello

di alterazioni ossidative al DNA tra T0 e T1 è riconducibile ad esposizioni e meccanismi diversi rispetto alle radiazioni ionizzanti.

Il polimorfismo *OGG1* ha influenzato il livello basale di alterazioni ossidative a T0 e T1 ma non quello di addotti. Questo risultato è in linea con la specifica attività di *OGG1*, selettivamente rivolta al riparo della 8-oxo-dG e non degli addotti di grandi dimensioni. Un maggiore livello di alterazioni ossidative sia a T0 che a T1 è stato osservato anche nei soggetti con situazione di rischio eterozigote Ser326Cys rispetto al genotipo protettivo omozigote Ser326Ser.

La combinazione di genotipi sfavorevoli *GSTM1/OGG1* ha influenzato la variazione di alterazioni ossidative T0-T1. I risultati ottenuti indicano infatti che i soggetti portatori del doppio genotipo protettivo *GSTM1/OGG1* positivo/omozigote hanno incrementi minori di 8-oxo-dG rispetto agli altri soggetti. Pertanto circa un terzo della popolazione esaminata risulta essere particolarmente protetta. Tale effetto protettivo si è concretizzato anche in un minore livello di alterazioni ossidative basali sia a T0 che a T1 che è risultato essere 3.4 volte inferiore in questi soggetti rispetto agli altri.

Il doppio genotipo sfavorevole *GSTM1/OGG1* nullo/omozigote Cys326Cys ha influenzato l'incremento di alterazioni ossidative T0-T1 che era maggiore di 2.8 volte in questi soggetti rispetto agli altri. Pertanto è stata rilevata la presenza di una sottopopolazione rara (3%) maggiormente suscettibile all'incremento di alterazioni ossidativo del DNA correlabile all'attività di missione. Tuttavia tale situazione di suscettibilità esiste a prescindere dall'attività di missione stessa. Infatti questa sottopopolazione è caratterizzata da un livello notevolmente maggiore di alterazioni ossidative già a T0, situazione in cui i livelli di 8-oxo-dG sono risultati essere 2.5 volte maggiori rispetto agli altri soggetti.

#### 4. Discussione analitica dei risultati ottenuti

I risultati ottenuti indicano che lo studio SIGNUM è stato disegnato in modo adeguato. Infatti il controllo dei confondenti si è dimostrato tale da filtrare l'effetto della attività di missione rispetto all'influenza degli stili di vita e della dieta.

L'analisi parallela di biomarcatori di effetto molecolare sul DNA (addotti, alterazioni ossidative) e dei polimorfismi genetici selezionati ha permesso di validare reciprocamente l'analisi effettuata. Infatti i genotipi che funzionalmente erano attesi come influenti sul livello di addotti al DNA (*GSTM1* e *XRCC1*) sono risultati tali sia a T0 che a T1. Analogamente i genotipi che funzionalmente erano attesi come influenti sul livello di alterazioni ossidative (*GSTM1* e *OGG1*) sono risultati tali sia a T0 che a T1. Pertanto le analisi sono state eseguite in modo qualitativamente adeguato e sono quindi strumenti idonei in grado di rilevare gli effetti di variazione T0-T1.

Nel disegno dello studio ogni sforzo è stato fatto per massimizzare la sensibilità. La dimensione del campione è stata la maggiore possibile compatibilmente con le esigenze operative e logistiche, nonché con la complessità delle tecniche di analisi impiegate. Questo ha influito sui tempi di esecuzione del progetto che si sono protratti proprio come conseguenza dello sforzo fatto al fine di mantenere alta la numerosità campionaria ed utilizzare tecniche di grande sensibilità. Lo studio ha avuto un disegno prospettico per controllare al meglio i confondenti e garantire così la capacità di identificare, se presenti, effetti biologici correlabili alla missione. Per la determinazione di alterazioni molecolari ossidative e da addizione covalente al DNA sono state utilizzate tecniche di postmarcatura con  $^{32}\text{P}$ , cioè le tecniche più sensibili oggi disponibili. Infine lo studio è stato effettuato caratterizzando geneticamente gli individui suscettibili in modo da osservare eventuali effetti di intensità così bassa da potere essere rilevati non nella popolazione generale ma solo in sottopopolazioni suscettibili.

I risultati sono stati prodotti per rispondere al quesito se l'attività di missione potesse essere correlata ad un'alterazione di marcatori biologici. In caso di eventuale risposta affermativa il secondo quesito posto era se tali alterazioni potessero costituire fattori di rischio per un'alterazione dello stato di salute.

Le analisi effettuate indicano che non esistono variazioni correlate all'attività di missione (differenza T0-T1) per gli addotti al DNA. L'attività di missione di per sé non comporta quindi esposizione a xenobiotici di grandi dimensioni che possano prevaricare il carico genotossico indotto dagli stili di vita (fumo, dieta). Va notato che l'analisi degli addotti al DNA mediante postmarcatura con  $^{32}\text{P}$  è in grado di identificare contemporaneamente fino a diverse decine di addotti al DNA anche di natura sconosciuta. Pertanto l'assenza di variazioni in questo parametro indica la non sussistenza di esposizione specifiche a genotossici ambientali ivi inclusi non solo quelli analizzati dalle altre UO ma anche altri la cui natura non sia stata specificamente indagata.

Inoltre l'attività di missione non sembra comportare, almeno in base agli end-points analizzati da questa UO, esposizioni specifiche a radioisotopi. Infatti il genotipo di riparo del danno da radiazioni *XRCC1* non ha esercitato alcuna influenza sulla variazione T0-T1 dei marcatori molecolari esaminati.

Un effetto dell'attività di missione è stato invece osservato sui livelli di alterazioni ossidative del DNA. Tale effetto è stato rilevato solo nelle unità impiegate in attività esterne alla base come pattugliatori. Tale effetto è risultato evidente nei soggetti portatori di genotipi di rischio per la detossificazione delle specie reattive dell'ossigeno e il riparo della 8-oxo-dG.

Le alterazioni ossidative del DNA costituiscono un marcatore totalmente aspecifico è pertanto una sua alterazione può risultare da molteplici fattori. Nel contesto dello studio SIGNUM i fattori identificabili come maggiormente influenti sulla variazione dei livelli di alterazioni ossidative T0-T1 sono stati l'impiego operativo e le vaccinazioni.

L'impiego operativo in attività di pattugliamento è verosimilmente correlabile con l'attivazione di fattori come l'incremento dell'attività fisica, l'incremento dello stress psico-fisico, l'alterazione del ritmo sonno-veglia. Questi fattori sono riconosciuti come in grado di aumentare in modo significativo i livelli di alterazioni ossidative endogene senza necessità di esposizione esogene aggiuntive.

L'attività di missione ha comportato una profilassi vaccinale importante. Nei soggetti che hanno subito 5 o più cicli vaccinali tale situazione è risultata associata con un incremento delle alterazioni ossidative linfocitarie. L'esistenza di un'associazione tra

carico ossidativo linfocitario e vaccinazione è resa plausibile dall'evidenza che tale associazione sussiste a livello maggiore nel caso di utilizzo di vaccini vivi attenuati anziché inattivati ad antigeni purificati. L'effetto pro-ossidativo rilevato sembra quindi riconducibile all'attivazione linfocitaria indotta dall'attività vaccinale con un gradiente dose/risposta dipendente dalla tipologia del vaccino. Un effetto analogo di tipo adattativo è stato riportato in letteratura per vaccini vivi attenuati [9].

L'incremento di alterazioni ossidative correlabile all'attività di missione è risultato maggiore nei soggetti resi suscettibili dal particolare assetto genotipico con particolare riferimento al genotipo sfavorevole per *OGG1* ed alla sua combinazione con la delezione omozigote di *GSTM1*. Tuttavia tali soggetti costituiscono una parte largamente minoritaria della popolazione (3%).

L'indicazione che emerge quindi dai dati ottenuti è che non sembra appropriato l'uso di trial vaccinali con più di 5 diversi cicli nei rari soggetti caratterizzati da genotipi di rischio *OGG1/GSTM1* combinati. Inoltre l'utilizzo di questi soggetti in attività di pattugliamento, se effettuato, andrebbe sottoposto a particolare attenzione. Eventualmente in tali situazioni dovrebbe essere consigliata la cessazione di esposizioni complementari (fumo di sigaretta) e l'assunzione di livelli adeguati di antiossidanti (dieta ricca in antiossidanti o farmaci antiossidanti).

Anche l'età sembra avere una certa influenza essendo maggiore l'incremento di alterazioni ossidative in teatro nei soggetti >30 anni rispetto ai <30 anni. Anche questo elemento suggerisce un ruolo prevalente dei fattori endogeni nella variazione dei livelli di alterazione ossidativa T0-T1.

I pattugliatori hanno il maggior incremento di alterazioni ossidative T0-T1. Non è plausibile che a questo incremento contribuiscano inquinanti ambientali specifici quali ad esempio l'esposizione in ambiente confinato (interno veicoli corazzati) a scarichi diesel. Infatti gli addotti al DNA sono tipicamente indotti in modo massiccio dall'esposizione a scarichi diesel e inoltre questa tipologia di addotti è rilevata con grande sensibilità dall'arricchimento con butanolo utilizzato nello studio SIGNUM [7]. I risultati ottenuti non indicano alcuna variazione T0-T1 di questo biomarcatore indicando che questo tipo di esposizione non è significativo. Prevalgono quindi nel determinare l'aumento di alterazioni ossidative probabilmente fattori come lo stress psico-fisico o l'alterazione dei ritmi circadiani. Tali fattori sono notoriamente in grado

di incrementare i livelli di 8-oxo-dG. Anche il fatto che l'aumento del carico ossidativo sia maggiore nei maschi che nelle femmine depone in questo senso.

Avendo quindi i risultati ottenuti dimostrano l'esistenza di un certo incremento di alterazioni ossidative correlato all'attività di missione si pone il quesito se tale incremento sia tale da costituire fattore di rischio per l'alterazione dello stato di salute.

Il solo incremento di alterazioni ossidative non costituisce di per sé un fattore di rischio per patologie oncologiche e cronico-degenerative. Infatti l'alterazione può essere rimossa efficacemente dai sistemi di riparo, la mutazione conseguente essere silente in quanto collocata su regioni introniche non espresse, la mutazione può non avere effetto in quanto riguardante la seconda o la terza base del codone che sono poco influenti sulla codifica dell'aminoacido per il fenomeno della ridondanza del codice genetico. Anche se poi la mutazione risultasse fenotipicamente efficace la cellula mutata può essere rimossa per apoptosi. Se non rimossa e avviata alla cascata patogenetica della cancerogenesi questo fenomeno può essere bloccato a livelli successivi ad esempio dall'inibizione dell'espressione di oncogeni da parte di geni soppressori o di addittività endocellulari di silenziamento (microRNA). Per tutte queste ragioni brevemente accennate non è possibile affermare che la presenza di alterazioni ossidative incrementate costituisca di per sé un fattore di rischio di rilevanza patogenetica. Perché ciò accada è necessario che l'alterazione genotossica abbia conseguenze ai livelli successivi della cascata della cancerogenesi inducendo mutazioni fenotipicamente espresse non controllate che risultano con il tempo alterare gravemente l'omeostasi del DNA, dell'espressione genica, della trasduzione del segnale e infine del ciclo cellulare. E' necessario quindi valutare se l'osservato incremento di carico ossidativo è correlato con l'alterazione di altri biomarcatori. E' solo infatti nel caso in cui diversi biomarcatori convergano che, realizzandosi a livello molecolare un processo patogenetico completo, si può identificare l'esistenza di una specifica situazione di rischio.

Tra le variabili influenti sul livello di alterazioni ossidative del DNA alcune risultano influenzare, seppure in modo molto modesto, anche la differenza del livello di alterazioni citogenetiche tra T0 e T1. Infatti i micronuclei per cellule binucleate

risultano significativamente aumentati nei pattugliatori. La differenza T0-T1 del numero di micronuclei per cellule binucleate è significativa anche tra maschi e femmine.

Un aumento significativo (+0.45) dei soli micronuclei per cellule binucleate T0-T1 è stato infine osservato solo nel caso di vaccini vivi attenuato MPR<sup>7</sup>. In nessuno di questi casi è stata riscontrata alterazione dei altri marcatori di danno citogenetico con particolare riferimento ai transriarrangiamenti cromosomici ed alle aberrazioni cromosomiche.

Inoltre in nessun caso è stata riscontrata l'esistenza di un'associazione tra i biomarcatori di esposizione o di effetto analizzati e la rilevazione di metalli ed isotopi nel siero.

Nel caso delle vaccinazioni MPR la presenza di danno ossidativo accompagnato da modesto incremento nei micronuclei di cellule binucleate indica quindi la presenza di una situazione di sovraccarico funzionale nel linfociti con presenza di attività cellulare metabolica incrementata (danno ossidativo). L'attivazione linfocitaria seguendo meccanismi fisiologici si concretizza anche in una aumentata citodiersi del linfocita stesso, soprattutto conseguente a stimolo da vaccini vivi attenuati, che determina l'osservato incremento dei micronuclei per cellula binucleata. Pertanto le alterazioni molecolari osservate indicano la presenza di fenomeni adattativi indotti dai vaccini che esitano nell'instaurarsi dell'immunità attiva protettiva, scopo specifico della profilassi vaccinale attuata.

Per quanto riguarda l'attività di pattugliatore è stato rilevato un aumento modesto ma significativo nei livelli di danno ossidativi al DNA e nei livelli di micronuclei tra T0 e T1.

Non è stata rilevata alcuna relazione tra alterazioni ossidative e micronuclei da un lato e addotti al DNA da xenobiotici sconosciuti e presenza di xenobiotici metallici dall'altro.

Quindi l'osservato incremento di danno ossidativo e micronuclei non appare influenzato da alcuna esposizione ambientale derivante da metalli o xenobiotici genotossici. Appare pertanto evidente l'origine prevalentemente endogena dell'incremento di alterazione ossidativa tra T0 e T1. Tale situazione è quindi

---

<sup>7</sup> Morbillo, Parotite, Rosolia

correlabile con l'aumentato stress psicofisico proprio di questa categoria, anche indotto da particolari condizioni climatiche. Esclusivamente in questa specifica situazione l'attività di missione incrementa il livello di alterazioni ossidative e di micronuclei. Tuttavia nessuna correlazione significativa esiste tra questi due *endpoint* nè a livello di popolazione, nè tantomeno a livello individuale. Inoltre non si è riscontrato in questa categoria alcun aumento di marcatori di danno citogenetico maggiormente predittivi di patologia rispetto ai micronuclei e cioè dei transriarrangiamenti e delle aberrazioni cromosomiche. Pertanto si può affermare che la situazione di stress a livello molecolare non è tale da completare di per sé la complessa sequela di eventi patogenetici necessari a completare un processo di cancerogenesi completo. L'osservato incremento del livello di alterazioni ossidative T0 -T1 va quindi interpretato come un prevalente fenomeno adattativo e non tale da costituire specificatamente un rischio per l'alterazione dello stato di salute.

Appare comunque opportuno prestare attenzione a questa categoria operativa adottando misure idonee a limitarne il carico ossidativo compatibilmente con la necessità di eseguire l'attività di missione.

## 5. Conclusioni

I risultati prodotti da questa UO indicano che nella popolazione esaminata l'attività in Te. Op. non costituisce di per sé variabile tale da determinare incremento rilevante della frequenza di addotti al DNA e di induzione del danno ossidativo. Nessuna esposizione a specifici inquinanti si verifica in Te. Op. tale da avere influenza sui biomarcatori esaminati. Alcune attività connesse con l'esecuzione della missione (vaccinazioni in numero maggiore di 5, attività di pattugliatori) aumentano i livelli di carico ossidativo sul DNA. Tale fenomeno è maggiore nella piccola frazione della popolazione esaminata (4% circa) geneticamente suscettibile. Tale situazione costituisce prevalentemente un fenomeno adattativo al carico funzionale indotto nel linfocita e nell'organismo in toto da vaccinazioni specie se vive attenuate e da attività di pattugliamento.

---

Hanno contribuito alle attività di questa Unità operativa:

Cristina Cartiglia  
Mariagrazia Longobardi  
Anna Camoirano

## **Bibliografia**

1. De Flora S., Izzotti A., Randerath K., Randerath E., Bartsch H., Nair J., Balansky R., van Schooten F., Degan P., Fronza G., Walsh D., e Lewtas J.: DNA adducts and chronic degenerative diseases. Pathogenetic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res. (Rev. Genetic Toxicol.)*(1996), 366: 197-238;
2. Balansky R., Izzotti A., Scatolini L., D'Agostini F. e De Flora S.: Induction by carcinogens and chemoprevention by *N*-acetylcysteine of adducts to mitochondrial DNA in rat organs. *Cancer Res.*, (1996). 56: 1642-1647;
3. Izzotti A. Detection of modified DNA nucleotides by postlabeling procedures. *Toxicol. Meth.*, (1998). 8: 175-205;
4. Izzotti A., Cartiglia C., Longobardi M., Balansky R.M., D'Agostini F., Lubet R.A., De Flora S.: Alterations of gene expression in skin and lung of mice exposed to light and cigarette smoke. *FASEB J.*, (2004). 18: 1559-1561;
5. Izzotti A., D'Agostini F., Balansky R., Degan P., Pennisi T.M., Steele V.E., De Flora S. Exposure of mice to cigarette smoke and/or light causes DNA alterations in heart and aorta. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* (2008). 644: 38-42;
6. Izzotti A., Durando P., Ansaldi F., Gianiorio F., Pulliero A. Interaction between *Helicobacter pylori*, diet, and genetic polymorphisms as related to non-cancer diseases *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 667: (2009). 142-157;
7. Izzotti A., Camoirano A., D'Agostini F., Sciacca S., De Naro Papa F., Cesarone C.F. e De Flora S.: Biomarker alterations produced in rat lung by intratracheal instillations of air particulate extracts, and chemoprevention with oral *N*-acetylcysteine. *Cancer Res.*, (1996). 56: 1533-1538;
8. Poirer M.C., Weston A., Schoket B., Shamkhani H., et al., Biomonitoring of US Army soldiers serving in Kuwaot in 1991. *CEBP*, (1998) 7: 545-551;
9. Phillips M., Cataneo R.N., Chaturvedi A., Danaher P.J., Devadiga A, Legendre DA, Nail KL, Schmitt P and Wai J. Effect of influenza (live-attenuated) vaccination on oxidative stress products in breath. *J. Breath Res.* (2010). 4, 026001;
10. Mhlanga M.M., Malmberg L. Using molecular beacons to detect single nucleotide polymorphisms with Real-Time PCR; *Methods* . (2001). 25: 463-471;
11. Zhong S, Wyllie AH, Barnes D, Wolf CR, Spurr NK. Relationship between the GSTM1 genetic polymorphism and susceptibility to bladder, breast and colon cancer. *Carcinogenesis*, (1993).14: 1821-1824.

UNITA' OPERATIVA

ISTITUTO NAZIONALE PER LA RICERCA SUL CANCRO DI GENOVA

UNIVERSITA' DI PISA

## **XII. RICERCA DI MICRONUCLEI IN LINFOCITI PERIFERICI**

### **Responsabili:**

**Dr. Claudia Bognesi**

Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro  
Largo Rosanna Benzi, 10  
16132 Genova

**Prof. Lucia Migliore**

Università di Pisa  
Via S. Giuseppe, 22  
56126 Pisa

## 1. Introduzione

Le strategie di monitoraggio basate sull'applicazione di biomarcatori di genotossicità in popolazioni potenzialmente esposte ad agenti mutageni e/o cancerogeni sono state ampiamente utilizzate negli ultimi decenni anche al fine di determinare eventi precoci predittivi del rischio di cancro e di malattie degenerative. I biomarcatori di danno cromosomico ed il test del micronucleo in particolare, determinati in linfociti di sangue periferico sono i più comunemente applicati.

L'induzione di un danno genotossico riferito ad un'esposizione ad agenti chimici o fisici durante le varie fasi del ciclo cellulare, se non riparato o riparato in modo errato, può essere espresso come danno cromosomico ed evidenziabile come presenza di micronuclei dopo una divisione cellulare.

I micronuclei rappresentano piccoli nuclei accessori morfologicamente identici al nucleo principale originati da frammenti cromosomici o da cromosomi interi che, ritardando la migrazione in anafase, restano esclusi dai nuclei principali durante la divisione cellulare. Il test del micronucleo permette quindi di valutare sia gli eventi clastogeni, cioè la frammentazione dei cromosomi, sia fenomeni di aneuploidia.

La presenza di micronuclei può essere valutata in interfase in qualsiasi popolazione di cellule proliferanti. Il sangue periferico rappresenta il tessuto di elezione negli studi di biomonitoraggio in popolazioni umane: i linfociti circolando attraverso tutto l'organismo rappresentano un adeguato surrogato dell'esposizione corporea totale.

I linfociti da sangue periferico sono in larga maggioranza in fase G<sub>0</sub>, ma possono essere stimolati alla divisione *in vitro* per trattamento con fitoemoagglutina, permettendo l'espressione del danno cromosomico misurabile come frequenza di micronuclei.

Il test del micronucleo, messo a punto nei linfociti di sangue periferico da Countryman and Heddle nel 1976 [1], ha avuto un più ampio sviluppo come biomarcatore negli studi di monitoraggio con la messa a punto di una metodica che prevede il blocco delle cellule in citodieresi mediante citocalasina B (*cytokinesis-block micronucleus* CBMN) [2], [3], permettendo di distinguere le cellule che hanno effettuato una divisione *in vitro* (cellule binucleate) esprimendo un danno genotossico associato ad un'esposizione recente, da quelle che non si sono

replicate (cellule mononucleate) che sono indice di esposizioni pregresse non riferibili al periodo immediatamente precedente il campionamento. La frequenza di micronuclei nelle cellule mononucleate non sempre è valutata negli studi di monitoraggio considerata l'incertezza di questo parametro in una popolazione cellulare di origine eterogenea comprendente cellule non replicate per l'effetto di eventi tossici (stati precoci dell'apoptosi) o sfuggite al blocco della citocalasina [4]. Anche se di origine e significato differente la frequenza di micronuclei nelle cellule mononucleate fornisce comunque un'informazione complementare al dato relativo alle cellule binucleate.

Attualmente la metodica attraverso studi di validazione su modelli sperimentali si è evoluta in una analisi più completa denominata "Cytome", che permette di valutare, non solo differenti eventi a livello cromosomico (*endpoint* citogenetici) quali micronuclei, ponti nucleoplasmatici e bud, ma anche effetti di tossicità quali necrosi ed apoptosi o di citostasi mediante la determinazione dell'indice di proliferazione cellulare in vitro (PI) [5], [6].

In particolare i ponti nucleoplasmatici (NPB) evidenziabili tra i due nuclei nelle cellule binucleate originano da cromosomi dicentrici risultanti dalla errata riparazione del DNA e fusione dei telomeri [7], mentre per bud si intendono le evaginazioni nucleari, caratterizzati dalla stessa struttura dei micronuclei ma collegati al nucleo principale, considerati come biomarcatori di amplificazione genica [8], [9].

L'espressione dei micronuclei può essere alterata quando la proliferazione cellulare è ridotta per le condizioni di conservazione dei campioni o di cultura delle cellule: la valutazione del PI e della percentuale di cellule binucleate è quindi rilevante nella valutazione dei risultati del test del micronucleo.

Un progetto collaborativo internazionale – Human Micronucleus (HUMN) project ([www.humn.org](http://www.humn.org)) – stabilito nel 1997<sup>8</sup>, ha permesso di determinare le principali variabili metodologiche e di stabilire protocolli standardizzati e criteri di valutazione attraverso studi di intercalibrazione tra i principali laboratori coinvolti nell'applicazione del test del micronucleo nei linfociti di sangue periferico nelle popolazioni umane.

---

<sup>8</sup> Le Unità IST di Genova ed UNIFI di Pisa hanno entrambe preso parte al progetto HUMN.

La valutazione dei preparati al microscopio si è rivelata essere la fase più critica del protocollo sperimentale: è essenziale quindi l'adozione degli stessi criteri [10] e la pianificazione di un esercizio di intercalibrazione nell'organizzazione di studi multicentrici coinvolgenti più laboratori.

Lo studio internazionale di intercalibrazione ha inoltre evidenziato che in condizioni ottimali, pur adottando gli stessi criteri di valutazione di vetrini derivanti dalle stesse colture preparate a livello centralizzato, permanevano ampie differenze nelle frequenze di micronuclei tra laboratori e tra lettori [11].

Il progetto HUMN ha permesso di definire le principali variabili che influenzano i livelli basali per questo biomarcatore.

Il sesso e l'età rappresentano i fattori confondenti più importanti: le frequenze di micronuclei aumentano con l'età e sono più elevate nei soggetti di sesso femminile. L'effetto dell'età sul danno cromosomico, misurato come frequenza di micronuclei, è ampiamente dimostrato in letteratura [12]. I livelli basali della frequenza di micronuclei nelle popolazioni valutate nei laboratori afferenti al programma, in assenza di esposizioni specifiche, dimostrano un incremento associato all'età più marcato dopo i 30 anni [13].

La maggior parte degli studi di biomonitoraggio in popolazioni umane disponibili in letteratura non evidenziano incrementi significativi della frequenza di micronuclei associati al fumo di tabacco. Questa evidenza è stata confermata nell'ambito del progetto HUMN che dimostra un effetto solo nei forti fumatori [14].

E' stato altresì dimostrato che fattori nutrizionali importanti nel metabolismo e nel riparo del DNA, quali acido folico, vitamina B12, zinco hanno un ruolo protettivo rilevante nella prevenzione del danno cromosomico. Carenze nutrizionali possono quindi indurre incrementi della frequenza di micronuclei [15], [16], [17], [18].

Ad oggi il test del micronucleo applicato ai linfociti di sangue periferico rappresenta un biomarcatore validato nella valutazione della potenziale esposizione ad agenti genotossici e cancerogeni. Associazioni positive tra frequenza di micronuclei nei linfociti di sangue periferico sono state descritte per esposizione professionale o ambientale a differenti agenti mutageni quali radiazioni, inquinanti atmosferici, benzene ed idrocarburi policiclici aromatici, metalli pesanti, farmaci antiblastici, pesticidi.

Il test del micronucleo rappresenta un metodo validato per la determinazione della dose assorbita in esposti ad alte dosi di radiazioni ionizzanti (IAEA, 2001) [19].

La frequenza di micronuclei, essendo il risultato dell'interazione di eventi genotossici e fattori di suscettibilità individuale, rappresenta anche un indicatore di rischio per il cancro ed altre malattie degenerative. Uno studio di coorte su 6718 soggetti da 10 diversi paesi per i quali era disponibile la frequenza di micronuclei nei linfociti del sangue periferico valutata nei laboratori facenti parte del progetto HUMN, ha dimostrato un incremento significativo dell'incidenza per tutti i tumori nei soggetti con elevate frequenze [20].

Nell'organizzazione di uno studio di monitoraggio di gruppi eterogenei di soggetti, quali i militari reclutati nell'ambito del progetto SIGNUM, allo scopo di evidenziare gli effetti genotossici indotti da potenziali esposizioni non caratterizzate nel Te. Op., un disegno di studio che preveda determinazioni ripetute prima e dopo il periodo di missione è sicuramente il più adeguato.

Le dimensioni della popolazione reclutata nell'ambito del progetto SIGNUM, unico a livello internazionale, hanno reso necessario il coinvolgimento di due laboratori: la struttura di Cancerogenesi Ambientale dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova e il laboratorio di Genetica del Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente dell'Università di Pisa.

## 2. Risultati

### a. **Struttura di Cancerogenesi Ambientale dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro di Genova.**

- Campioni prelevati prima della partenza per l'Iraq (T0).  
Complessivamente nel periodo dal 17/8/04 al 7/11/04 sono stati ricevuti 490 campioni di sangue intero. Tutti i preparati relativi a T0 sono risultati valutabili.
- Campioni prelevati in Te. Op. prima del rientro in Italia (T1).  
In data 10/3/05 sono stati ricevuti i campioni (leucociti conservati in metanolo) di 432 militari, allestiti a Tallil-Iraq, appartenenti al contingente in rientro dalla missione (T1). La prima fase di preparazione dei campioni ematici destinati alla determinazione dei micronuclei e cioè fino alla loro stabilizzazione in metanolo era stata effettuata presso il laboratorio allestito in Te. Op. in Iraq. Tali campioni sono stati processati per la preparazione dei vetrini.

I campioni risultavano per la maggior parte di qualità discreta.

Il numero dei campioni per cui sono stati allestiti i preparati sono stati 432.

La valutazione dei campioni relativi al rientro (T 1) ha richiesto in alcuni casi l'analisi di più vetrini per il minore numero di cellule binucleate presenti nei preparati. Complessivamente sono stati valutati 432 campioni di cui per 3 campioni (cod 67, 883 e 647) sono state lette meno di 2000 cellule binucleate. Anche questi campioni sono stati inclusi nell'analisi statistica, avendo considerato la lettura di 1000 cellule binucleate come valore limite per l'inclusione.

Nella Tabella XII - a sono riportati i risultati relativi ai diversi parametri considerati nella applicazione più estesa del test del micronucleo (citome) nel campione di soggetti analizzati nel laboratorio di Genova

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella XII-a** Dati relativi alla frequenza media di micronuclei nei linfociti mononucleati e binucleati, ponti nucleoplasmici e buds, indice di proliferazione cellulare e percentuale di cellule binucleate rilevati sui campioni di sangue periferico a T0 e T1 Risultati relativi ai campioni analizzati nel laboratorio di Genova.

	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	
<b>T0</b>	PI	490	1,56	0,22	0,84	2,03
	bimi_1000bi	490	3,36	2,16	0,00	13,50
	mitot_1000bi	490	3,55	2,34	0,00	15,00
	momi_1000mo	490	1,07	0,99	0,00	6,50
	mitot_1000mo	490	1,15	1,10	0,00	8,00
	bibud_1000bi	490	0,30	0,48	0,00	3,00
	budtot_1000bi	490	0,30	0,50	0,00	3,00
	npbtot_1000bi	490	0,60	0,72	0,00	5,00
	binpbmi_1000bi	490	0,04	0,14	0,00	1,00
	bi_perc	490	33,90	10,30	9,13	54,6
	binpb_1000bi	490	0,60	0,71	0,00	5,00
		<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>
<b>T1</b>	PI	432	1,79	0,17	1,23	2,30
	bimi_1000bi	432	4,03	2,26	0,38	16,50
	mitot_1000bi	432	4,28	2,46	0,38	16,50
	momi_1000mo	432	0,85	0,93	0,00	5,97
	mitot_1000mo	432	0,90	0,99	0,00	6,00
	bibud_1000bi	432	0,11	0,25	0,00	1,33
	budtot_1000bi	432	0,11	0,25	0,00	1,33
	npbtot_1000bi	432	0,54	0,76	0,00	6,00
	binpbmi_1000bi	432	0,01	0,08	0,00	0,50
	bi_perc	432	40,69	5,85	16,80	57,9
	binpb_1000bi	432	0,54	0,75	0,00	6,00

PI	Proliferation index
bimi_1000bi	<b>binucleate con micronuclei x1000 binucleate</b>
mitot_1000bi	<b>micronuclei tot x1000 binucleate</b>
momi_1000mo	<b>mononucleate con micronuclei x1000 mononucleate</b>
mitot_1000mo	<b>micronuclei tot x1000 mononucleate</b>
bibud_1000bi	n° cell con BUD x 1000 binucleate
budtot_1000bi	n° tot bud x 1000 binucleate
npbtot_1000bi	n° tot ponti nucleoplasmatici x 1000 binucleate
binpbmi_1000bi	n° cellule con ponti nucleoplasmatici e micronuclei x 1000 binucleate
bi_perc	% binucleate
binpb_1000bi	n° cell con ponti nucleoplasmatici x 1000 binuclea

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

La frequenza media di cellule binucleate con micronuclei e di micronuclei per 1000 cellule binucleate è  $3,36 \pm 2,16$  e  $3,55 \pm 2,34$  e di  $4,03 \pm 2,26$  e  $4,28 \pm 2,46$  rispettivamente a T0 e T1 dimostrando un modesto incremento. La frequenza media di cellule mononucleate con micronuclei e di micronuclei per 1000 cellule mononucleate è di  $1,07 \pm 0,99$  e  $1,15 \pm 1,10$  e di  $0,85 \pm 0,92$  e  $0,90 \pm 0,99$  rispettivamente a T0 e T1 non dimostrando alcun incremento.

Le frequenze delle altre alterazioni nucleari considerate (bud e ponti nucleoplasmatici) erano particolarmente basse ( $< 1$ ) e non rivelavano differenze tra T0 e T1.

I parametri relativi alla capacità proliferativa dei linfociti in vitro (% di cellule binucleate e indice di proliferazione) sono compresi nel range dei valori descritti in letteratura e non rivelano comunque decrementi per i campioni a T1.

Nella Tabella XII - b è riportata l'analisi statistica dei dati sulle differenze (T1-T0) per i diversi parametri considerati. Differenze positive statisticamente significative si osservano solo per quanto riguarda la frequenza di micronuclei nelle cellule binucleate (0,70; range - 7,0 - 15) e di cellule binucleate con micronuclei (0,63; range - 6,5 - 15,00)  $p < 0,0001$ .

L'incremento delle frequenze di micronuclei tra T0 e T1, se pur statisticamente significativa, è inferiore al 20% e rientra nella fluttuazione casuale per analisi ripetute.

	<b>N</b>	<b>MEAN</b>	<b>SD</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>wilcoxon</b>	<b>p-value</b>
PI	432	0,23	0,25	-0,50	0,98	14,14	<b>0,000</b>
bimi_1000bi	432	<b>0,63</b>	2,74	-6,50	15,00	3,62	<b>0,000</b>
mitot_1000bi	432	<b>0,70</b>	2,95	-7,00	15,00	3,72	<b>0,000</b>
momi_1000mo	432	<b>-0,24</b>	1,28	-5,00	5,00	-3,36	<b>0,000</b>
mitot_1000mo	432	<b>-0,28</b>	1,42	-6,50	5,50	-3,45	<b>0,000</b>
bibud_1000bi	432	-0,19	0,54	-3,00	1,33	-2,30	<b>0,000</b>
budtot_1000bi	432	-0,20	0,56	-3,00	1,33	-2,29	<b>0,000</b>
npbtot_1000bi	432	-0,07	1,03	-4,33	4,50	-1,54	<b>0,017</b>
binpbmi_1000bi	432	-0,03	0,17	-1,00	0,50	-0,14	<b>0,000</b>
bi_perc	432	6,79	11,33	-17,60	41,40	10,53	<b>0,000</b>
binpb_1000bi	432	-0,07	1,02	-4,33	4,50	-1,55	<b>0,016</b>

**Tabella XII-b** Differenza media (T1-T0) della frequenza di micronuclei e di altri parametri nucleari nei linfociti di sangue periferico per i soggetti con entrambe le misure

**b. Sezione di Genetica del Dipartimento di Scienze dell'Uomo e dell'Ambiente di Pisa**

- Campioni prelevati prima della partenza per l'Iraq (T0).

Complessivamente sono stati ricevuti 488 campioni di sangue intero dal 17.08.04 al 09.11.04.

- Campioni prelevati in Te. Op. prima del rientro in Italia (T1).

In data 10.03.05 sono stati consegnati i campioni (leucociti conservati in metanolo) di 420 militari allestiti a Tallil-Iraq appartenenti al contingente in rientro dalla missione (T1)

In totale, a fronte dei 488 soggetti campionati a T0, è stato possibile valutare a Pisa, a T1 i campioni di 425 soggetti, considerando il fatto che alcuni campioni, erroneamente inviati a Genova, sono stati riallineati al laboratorio di Pisa.

Di 26 campioni sono risultate leggibili meno di 1000 cellule binucleate; di 104 campioni sono risultate leggibili meno di 1000 cellule mononucleate, per cui, avendo considerato la lettura di 1000 cellule binucleate come valore limite per l'inclusione, questi campioni non sono stati considerati nell'analisi statistica.

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella XII-c.** Dati relativi alla frequenza media di micronuclei nei linfociti mononucleati e binucleati, ponti nucleoplasmici e buds, indice di proliferazione cellulare e percentuale di cellule binucleate rilevati sui campioni di sangue periferico a T0 e T1 Risultati relativi ai campioni analizzati nel laboratorio di Pisa

	N	MEAN	SD	MIN	MAX	
<b>T0</b>	PI	488	1,75	0,19	1,26	3,23
	bimi_1000bi	488	4,41	2,51	0,49	24,50
	mitot_1000bi	488	4,81	2,85	0,49	24,50
	momi_1000mo	487	1,35	0,99	0,00	5,50
	mitot_1000mo	487	1,64	1,33	0,00	9,00
	bibud_1000bi	488	0,42	0,55	0,00	3,19
	budtot_1000bi	488	0,45	0,59	0,00	3,50
	npbtot_1000bi	488	0,78	0,75	0,00	4,50
	binpbmi_1000bi	488	0,04	0,16	0,00	2,13
	bi_perc	488	39,21	7,70	15,92	64,29
	binpb_1000bi	488	0,74	0,70	0,00	4,50
	<b>T1</b>	PI	423	1,83	0,23	1,11
bimi_1000bi		394	5,27	3,20	0,00	23,40
mitot_1000bi		394	6,00	3,94	0,00	28,94
momi_1000mo		315	2,34	1,63	0,00	10,50
mitot_1000mo		315	2,75	2,06	0,00	11,44
bibud_1000bi		394	0,39	0,62	0,00	4,00
budtot_1000bi		394	0,40	0,65	0,00	4,00
npbtot_1000bi		394	0,36	0,61	0,00	4,00
binpbmi_1000bi		394	0,03	0,18	0,00	2,14
bi_perc		423	46,23	10,30	0,70	66,08
binpb_1000bi		394	0,35	0,57	0,00	3,50

PI	Proliferation index
bimi_1000bi	<b>binucleate con micronuclei x1000 binucleate</b>
mitot_1000bi	<b>micronuclei tot x1000 binucleate</b>
momi_1000mo	<b>mononucleate con micronuclei x1000 mononucleate</b>
mitot_1000mo	<b>micronuclei tot x1000 mononucleate</b>
bibud_1000bi	n° cell con BUD x 1000 binucleate
budtot_1000bi	n° tot bud x 1000 binucleate
npbtot_1000bi	n° tot ponti nucleoplasmatici x 1000 binucleate
binpbmi_1000bi	n° cellule con ponti nucleoplasmatici e micronuclei x 1000 binucleate
bi_perc	% binucleate
binpb_1000bi	n° cell con ponti nucleoplasmatici x 1000 binucleate

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

Dei parametri considerati dall'analisi statistica, si riportano nella Tabella XII - c quelli ritenuti più significativi, da cui risulta, per il campionamento pre-impiego (T0):

- un PI di 1,75;
- una % di cellule binucleate di 39,21;
- una frequenza di cellule binucleate micronucleate di 4,41 per 1000 binucleate;
- una frequenza di cellule mononucleate micronucleate di 1,35 per 1000 mononucleate.

Inoltre la frequenza di cellule con ponti nucleoplasmatici per 1000 binucleate è di 0,74, mentre la frequenza di cellule con bud per 1000 binucleate è di 0,42.

Le variabili del campionamento post-impiego (T1) risultano essere: un PI di 1,83, una % di cellule binucleate di 46,23, una frequenza di cellule binucleate micronucleate di 5,27 per 1000 binucleate, una frequenza di cellule mononucleate micronucleate di 2,34 per 1000 mononucleate. Inoltre la frequenze di cellule con ponti nucleoplasmatici per 1000 binucleate è di 0,35, mentre la frequenza di cell con bud per 1000 binucleate è di 0,39.

**Tabella XII - d** Differenza media (T1-T0) della frequenza di micronuclei e di altri parametri nucleari nei linfociti di sangue periferico per i soggetti con entrambe le misure campionati a Pisa

	<b>N</b>	<b>MEAN</b>	<b>SD</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>wilcoxon</b>	<b>p-value</b>
PI	<b>N</b>	0,07	0,29	-1,35	0,63	6,13	0,000
bimi_1000bi	423	0,83	3,59	-8,50	17,40	3,86	0,000
mitot_1000bi	394	1,18	4,41	-10,80	22,94	4,51	0,000
momi_1000mo	394	0,92	1,93	-4,50	7,50	7,16	0,000
mitot_1000mo	314	1,03	2,47	-6,50	8,94	6,38	0,000
bibud_1000bi	314	-0,06	0,77	-2,50	3,00	-0,70	0,163
budtot_1000bi	394	-0,07	0,83	-3,00	3,63	-0,78	0,130
npbtot_1000bi	394	-0,40	1,01	-4,50	3,50	-5,04	0,000
binpbmi_1000bi	394	0,00	0,24	-2,13	1,99	-0,01	0,648
bi_perc	394	7,13	12,07	-37,25	35,56	10,94	0,000
binpb_1000bi	423	-0,36	0,94	-4,50	3,00	-5,02	0,000

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

- per l' indice PI di 0,07,
- per la % di cellule binucleate: 7,13,
- per la frequenza di cellule binucleate micronucleate/1000 binucleate: 0.83 SD 3,59),
- per la frequenza di cellule mononucleate micronucleate per 1000 mononucleate: 0,92 SD 1,93).

Tutti questi incrementi risultano statisticamente significativi.

Inoltre la differenza tra le frequenze di cellule con ponti nucleoplasmatici per 1000 binucleate è di -0,36 (decremento statisticamente significativo), mentre per la frequenza di cellule con bud per 1000 binucleate è di -0,06 (decremento che non risulta statisticamente significativo).

**c. Risultati aggregati dei laboratori di Genova e di Pisa**

L'analisi stratificata è stata condotta su tutto il campione su un database derivato dall'aggregazione di quelli di Genova e Pisa comprendente i dati relativi a solo due parametri comunemente considerati negli studi di biomonitoraggio:

- la frequenza di cellule binucleate con micronuclei (BNMN/1000 cellule binucleate);
- la frequenza di cellule mononucleate con micronuclei (MOMOMN/1000 cellule mononucleate).

Sono stati inclusi solo i casi con letture di almeno 1000 cellule binucleate o 1000 cellule mononucleate come valore complessivo sulla valutazione delle due culture.

Nell'analisi su 826 dati appaiati si è osservato un incremento statisticamente significativo della frequenza media di cellule binucleate micronucleate (BNMN) nei campioni valutati a T1 (4,62 ‰) rispetto a quella rilevata a T0 (3,89‰)

L'incremento si osserva, se pur di minore entità, anche nelle cellule mononucleate: la frequenza media su 746 campioni appaiati è 1,48‰ a T1, rispetto ad 1,23‰ a T0 (Tabella XII - e & Tabella XII - f).

**LEGENDA**

Le tabelle XIII – e & XIII - f che riassumono i risultati di tali analisi statistiche descrittive contengono i seguenti indicatori :

**N** Numero complessivo di soggetti (con dati appaiati T1 – T0)

**media** Valore medio stimato sugli N soggetti. Valori positivi corrispondono a incrementi differenziali tra T0 e T1.

**stdev** Deviazione standard, associata alla dispersione dei valori per gli N soggetti intorno al valore medio

**min** Valore minimo riscontrato tra gli N soggetti

**max** Valore massimo riscontrato tra gli N soggetti

**wilc\_std** Statistica test di Wilcoxon applicata per testare la significatività delle differenze (T1 – T0). Equivalente non parametrico del test t di Student, da utilizzare in luogo di quest'ultimo quando i dati non siano distribuiti in modo gaussiano

**w\_ps** P-value associato alla statistica test di Wilcoxon

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella XII - e.** Database Micronuclei complessivo (Genova e Pisa ). Numerosità (N), valori medi (mean), deviazione standard (SD) e valori minimi e massimi misurati nei campioni

DB complessivo (Pisa+Genova)		misure NON appaiate					misure appaiate (T0 – T1)				
		Pre-Impiego (T0)					Pre-Impiego (T0)				
		N	MEAN	SD	MIN	MAX	N	MEAN	SD	MIN	MAX
CBP_ind	CBP index	978	1,65	0,23	0,84	3,23	855	1,65	0,23	0,84	3,23
	<b>binucleate con micronuclei x1000</b>										
bimi_1000bi	<b>binucleate</b>	978	<b>3,89</b>	2,40	0,00	24,50	826	<b>3,89</b>	2,32	0,00	18,00
mitot_1000bi	<b>micronuclei tot x1000 binucleate</b>	978	<b>4,18</b>	2,68	0,00	24,50	826	<b>4,17</b>	2,62	0,00	23,50
	<b>mononucleate con micronuclei x1000</b>										
momi_1000mo	<b>mononucleate</b>	977	<b>1,21</b>	1,00	0,00	6,50	746	<b>1,23</b>	1,03	0,00	6,50
mitot_1000mo	<b>micronuclei tot x1000 mononucleate</b>	977	<b>1,40</b>	1,24	0,00	9,00	746	<b>1,41</b>	1,26	0,00	9,00
bibud_1000bi	n° cell con BUD x 1000 binucleate	978	0,36	0,52	0,00	3,19	826	0,37	0,53	0,00	3,19
budtot_1000bi	n° tot bud x 1000 binucleate	978	0,38	0,55	0,00	3,50	826	0,39	0,57	0,00	3,50
npbtot_1000bi	n° tot ponti nucleoplasmatici x 1000 binucleate	978	0,69	0,74	0,00	5,00	826	0,68	0,75	0,00	5,00
	n° cellule con ponti nucleoplasmatici e										
binpbmi_1000bi	micronuclei x 1000 binucleate	978	0,04	0,15	0,00	2,13	826	0,04	0,15	0,00	2,13
bi_perc	% binucleate	978	36,55	9,47	9,13	64,29	855	36,47	9,39	9,35	60,82
binpb_1000bi	n° cell con ponti nucleoplasmatici x 1000 binuclea	978	0,67	0,71	0,00	5,00	826	0,66	0,72	0,00	5,00
		Post-Impiego (T1)					Post-Impiego (T1)				
		N	MEAN	SD	MIN	MAX	N	MEAN	SD	MIN	MAX
CBP_ind	CBP index	855	1,81	0,20	1,11	2,32	855	1,81	0,20	1,11	2,32
	<b>binucleate con micronuclei x1000</b>										
bimi_1000bi	<b>binucleate</b>	826	<b>4,62</b>	2,82	0,00	23,40	826	<b>4,62</b>	2,82	0,00	23,40
mitot_1000bi	<b>micronuclei tot x1000 binucleate</b>	826	<b>5,10</b>	3,36	0,00	28,94	826	<b>5,10</b>	3,36	0,00	28,94
	<b>mononucleate con micronuclei x1000</b>										
momi_1000mo	<b>mononucleate</b>	747	<b>1,48</b>	1,47	0,00	10,50	746	<b>1,48</b>	1,47	0,00	10,50
mitot_1000mo	<b>micronuclei tot x1000 mononucleate</b>	747	<b>1,68</b>	1,79	0,00	11,44	746	<b>1,68</b>	1,79	0,00	11,44
bibud_1000bi	n° cell con BUD x 1000 binucleate	826	0,25	0,48	0,00	4,00	826	0,25	0,48	0,00	4,00
budtot_1000bi	n° tot bud x 1000 binucleate	826	0,25	0,50	0,00	4,00	826	0,25	0,50	0,00	4,00

**Misure appaiate** sono da intendersi quelle relative a soggetti per i quali erano disponibili sia il campione T0 che quello T1 con i relativi valori

**Tabella XII - f.** Database Micronuclei complessivo (Genova e Pisa). Differenze tra valori T0 e T1.

	<b>N</b>	<b>MEAN</b>	<b>SD</b>	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>	<b>wilcoxon</b>	<b>p-value</b>
CBP index	855	0,15	0,28	-1,35	0,98	14,6	<b>0,00</b>
<b>binucleate con micronuclei x1000 binucleate</b>	826	<b>0,72</b>	3,18	-8,50	17,40	5,3	<b>0,00</b>
<b>micronuclei tot x1000 binucleate</b>	826	<b>0,92</b>	3,73	-10,80	22,94	5,8	<b>0,00</b>
<b>mononucleate con micronuclei x1000 mononucleate</b>	746	<b>0,25</b>	1,68	-5,00	7,50	2,3	<b>0,01</b>
<b>micronuclei tot x1000 mononucleate</b>	746	<b>0,27</b>	2,03	-6,50	8,94	1,7	<b>0,04</b>
n° cell con BUD x 1000 binucleate	826	-0,13	0,66	-3,00	3,00	-2,3	<b>0,00</b>
n° tot bud x 1000 binucleate	826	-0,14	0,70	-3,00	3,63	-2,3	<b>0,00</b>
n° tot ponti nucleoplasmatici x 1000 binucleate	826	-0,23	1,04	-4,50	4,50	-4,4	<b>0,00</b>
n° cellule con ponti nucleoplasmatici e micronuclei x 1000 binucleate	826	-0,02	0,20	-2,13	1,99	-0,1	<b>0,00</b>
% binucleate	855	6,97	11,70	-37,25	41,40	15,1	<b>0,00</b>
n° cell con ponti nucleoplasmatici x 1000 binuclea	826	-0,22	1,00	-4,50	4,50	-4,4	<b>0,00</b>

L'effetto delle caratteristiche individuali e degli stili di vita, quali abitudine al fumo, dieta e consumo di alcool, sulla frequenza di micronuclei è stato analizzato attraverso un'analisi stratificata per sottogruppi di soggetti.

La frequenza di micronuclei incrementa con l'età nelle cellule binucleate (Tabella XII - g): l'effetto si osserva sia per le determinazioni effettuate a T0 che a T1, pur non influenzando la differenza media. Nel sottogruppo di soggetti di età <30, che comprende il 75% della popolazione analizzata, la frequenza media BNMN risulta essere 3,58‰ a T0 e 4,40‰ a T1, con un incremento di 0,82 (p= 0). Nei sottogruppi appartenenti a classi di età > 40 le frequenze a T0 e a T1 sono 6,04 ‰ e 6,79, con una differenza non statisticamente significativa.

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella XII – g.** Dati relativi alla frequenza media di micronuclei nelle cellule binucleate, rilevati sui soggetti prima e dopo la missione in Te. Op. ed alla differenza media. Stratificazione per le caratteristiche individuali e stili di vita.

Stratificazione	livello	n	Media T0	Media T1	Media diff T1-T0	p- test Wilcoxon
Età	<30	619	3,58	4,40	0,82	0,000
	30-39	153	4,39	4,71	0,32	0,288
	40+	54	6,04	6,79	0,75	0,473
Sesso	F	23	3,98	4,25	0,27	0,768
	M	803	3,89	4,63	0,74	0,000
T0 fumo	ND	8	4,00	3,83	-0,17	0,844
	0	349	4,04	4,75	0,71	0,001
	1-19	229	3,67	4,71	1,05	0,000
	20+	135	3,78	4,33	0,55	0,034
	EX	105	4,01	4,39	0,38	0,231
Fototipo	ND	20	3,72	5,24	1,52	0,019
	I	1	2,50	8,00	5,50	1,000
	II	76	3,82	4,47	0,65	0,047
	III	362	3,88	4,58	0,70	0,000
	IV	210	3,84	4,57	0,73	0,001
	V	47	4,14	4,97	0,82	0,054
T0 frutta	VI	6	5,85	5,06	-0,79	0,500
	1V/die	414	3,87	4,66	0,78	0,000
	PIU'V/die	219	3,81	4,72	0,90	0,000
T1 frutta	RAR	193	4,02	4,42	0,40	0,118
	ND	2	4,00	2,79	-1,21	1,000
	1V/die	378	3,92	4,88	0,96	0,000
	PIU'V/die	131	4,10	4,55	0,45	0,102
T0 verdura	RAR	315	3,77	4,34	0,57	0,002
	ND	1	2,50	4,00	1,50	1,000
	1V/die	411	3,91	4,73	0,81	0
	PIU'V/die	130	4,04	4,41	0,37	0,04
T1 verdura	RAR	284	3,80	4,56	0,76	0
	ND	4	4,13	3,52	-0,61	0,750
	1V/die	310	3,93	4,85	0,92	0
	PIU'V/die	104	4,21	4,32	0,11	0,860
T0 UEQAlcol	RAR	408	3,78	4,52	0,74	0
	0	491	3,84	4,63	0,79	0
	0-0.5	286	4,09	4,68	0,59	0,003
T1-UEQAlcol	0.5+	49	3,26	4,12	0,87	0,194
	0	637	3,77	4,54	0,77	0,000
	0-0.5	151	4,29	5,02	0,73	0,018
	0.5+	38	4,40	4,35	-0,04	0,926

**LEGENDA**

La **stratificazione** dei dati laboratoristici è stata effettuata in base alle seguenti variabili contenute nel file **storico/anamnestico** :

1. **Fototipo** (I, II,..VI ed eventuali 'missing')
2. **Età** (<30, 30-39, 40+)
3. **Fumo** (NSIG) numero di sigarette die (0,1-19,20+)
 

Fumo, a **T0** (P\_FUMO 2) variabile alternativa (0, 1-19,20+,ex)
4. Consumo **T0 frutta, prima** della missione (P\_FRUTTA\_2) e **T1 durante** la missione (D\_FRUTTA\_2)
5. Consumo di **T0 verdura, prima** della missione (P\_VERDURA\_2) e **T1 durante** (D\_VERDURA\_2)
6. Consumo di **alcol** (somma di birra,vino e superalcolici convertiti in unità equivalenti) **T0, prima** della missione (P\_UEQ\_ALCOL) e **T1 durante** la missione (D\_UEQ\_ALCOL)
7. **Numero di missioni** effettuate (N\_MI) (da 1 a 9)
8. **Sede** di impiego in Iraq (D\_SEDE1R)
9. Categoria di **impiego** (CATEGORIE\_ISS) : armieri, conduttori, logistica, pattuglia, officina meccanica (mec), mezzi terrestri (mt), ufficio, trasmissioni, elicotteristi, sminamento (smi), lavanderia (lav), disinfettori, genio, nucleare/batteriologico/chimico (nbc).
10. Categoria di **impiego in relazione all'ambiente prevalente di lavoro** in 3 classi : interno, esterno e misto interno/esterno (CATISS3).
11. **Sesso**
12. **Polimorfismi**: si sono considerati sia i 3 polimorfismi distinti (GSTM1,XRCC1,OGG1), che la combinazione dei tre nell'ordine GSTM1-XRCC1-OGG1, dando luogo alla variabile GXO con 18 diverse modalità.
13. **Vaccinazioni**: ad eccezione del vaccino trivalente (tenuto separato) tutte le altre tipologie di vaccino sono state aggregate in un unico contatore. Per le vaccinazioni effettuate **prima** della missione, si sono escluse tutte quelle con data antecedente al 2003. Poiché in circa un terzo dei record la data di vaccinazione era mancante, si è proceduto a conteggiarle tutte, incluse quelle con data mancante (p\_vacc, p\_triv), oppure a conteggiare solo quelle con data > = 2003 (p\_vacc\_2003, p\_triv\_2003). Le vaccinazioni effettuate durante la missione sono solo di due tipi (d\_vacc, d\_triv).

Il sottogruppo di soggetti di sesso femminile è poco rappresentato (23 su 826) e presenta, comunque, a T0 frequenze comparabili ed a T1 valori minori rispetto a quelli di sesso maschile.

Nei maschi è presente una differenza statisticamente significativa (sia per MN totali/1000 binucleate sia per MNtotali/1000mononucleate) tra T0 e T1. Nelle femmine è pure presente un incremento, anche se inferiore, che però non risulta statisticamente significativo (23 F contro 803 M).

L'abitudine al fumo non si dimostra essere un confondente rilevante. La frequenza media di BNMN a T0 è più elevata nei soggetti non fumatori e negli ex-fumatori (4,04 e 4,01 rispettivamente) rispetto al gruppo dei fumatori moderati (3,67) e dei forti fumatori (3,78). La differenza più elevata T1-T0 si osserva nel gruppo dei fumatori moderati (1,05) mentre è significativamente inferiore nei forti fumatori (0,55) e nel gruppo degli ex-fumatori (0,38).

Non si osserva alcun effetto rilevante sulle frequenze medie di micronuclei né sulla loro differenza indotto dal fototipo.

Il consumo di frutta prima della missione non risulta avere un effetto sulla frequenza di micronuclei. La maggiore differenza T1 - T0 si osserva nel gruppo di soggetti che dichiarava di consumare frutta più volte/die (0,90) rispetto a chi la consumava raramente (0,40) o una sola volta/die (0,90). Diverso effetto si osserva per quanto riguarda il consumo durante la missione, con un incremento più basso nel sottogruppo che dichiarava a fine missione il consumo di frutta più volte/die (0,45) rispetto a valori 0,57 o 0,96 per chi consumava frutta raramente o una volta/die.

Il consumo di verdura, sia prima che durante la missione risulta invece avere un effetto protettivo sull'induzione di danno cromosomico. Nel sottogruppo di soggetti che dichiarava di consumare verdura più volte/die prima della missione si osservava un minore incremento di cellule binucleate con micronuclei a fine missione ( T1 - T0 = 0,37 rispetto a 0,81 osservato nel sottogruppo che dichiarava il consumo di 1 volta/die). Lo stesso effetto è evidente anche nella valutazione dei consumi dopo la

missione dove la differenza T1 - T0 non raggiunge la significatività nel sottogruppo che dichiarava consumi più volte/die (0,11p = 0,860).

Un moderato incremento della frequenza di micronuclei nelle cellule binucleate in rapporto al consumo di bevande alcoliche si osserva nelle determinazioni effettuate prima della missione ed in minore entità dopo, pur non influenzando le differenze.

Per quanto riguarda le vaccinazioni, valori medi più elevati sia in termini di frequenze a T0 e T1 che di differenze sono evidenti per i soggetti che erano stati sottoposti a 1 o 5 vaccinazioni (differenze medie 1,17 ed 1,58 rispettivamente) che risultavano statisticamente significativi nel primo caso e non nel secondo a causa della scarsa numerosità del sottogruppo. Si osservava anche un incremento nel caso di somministrazione di vaccino trivalente dopo il 2003 con differenze T1-T0 di 1,465 nei soggetti vaccinati rispetto a 1,014 degli altri.

La valutazione delle frequenze di BNMN in rapporto alle diverse tipologie di impiego dei soggetti nel Te. Op. ha dimostrato una differenza media statisticamente significativa nella categoria dei conduttori (1,04 p= 0,001) e dei pattugliatori (0,95 p=0). E' da rilevare tuttavia che le differenze medie maggiori si osservano nel sottogruppo dei trasmettitori (1,15) ma non raggiungono la significatività statistica per la scarsa numerosità dei sottogruppi (Tabella XII - h).

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella XII - h.** Dati relativi alla frequenza media di micronuclei nelle cellule binucleate, rilevati sui soggetti prima e dopo la missione in Te. Op. ed alla differenza media. Stratificazione per impiego e numero di missioni.

STRATIFICAZIONE	LIVELLO	N	MEDIA T0	MEDIA T1	DIFF MEDIA T1-T0	P- TEST WILCOXON
<b>IMPIEGO</b>	arm	27	4,24	4,99	0,75	0,371
	blank	28	3,44	4,35	0,90	0,446
	cond	77	3,64	4,69	1,04	0,001
	disinf	3	1,67	4,67	3,00	0,250
	eli	2	6,75	4,25	-2,50	1,000
	gen	8	3,81	2,63	-1,19	0,375
	lav	1	3,50	3,00	-0,50	1,000
	log	144	3,91	4,52	0,61	0,070
	mec	20	3,61	3,40	-0,21	0,708
	mt	16	3,88	4,33	0,45	0,709
	nbc	2	2,75	2,04	-0,70	0,500
	pat	385	3,84	4,79	0,95	0,000
	smi	8	4,29	4,68	0,39	0,844
	trasm	23	3,89	5,04	1,15	0,138
uff	70	4,34	4,39	0,06	0,992	
<b>N° MISSIONI</b>	0	231	3,91	4,47	0,56	0,006
	1	162	3,68	4,82	1,14	0,000
	2	124	3,79	4,41	0,62	0,062
	3	121	4,28	4,88	0,60	0,062
	4	69	3,73	4,35	0,62	0,136
	5	47	3,61	5,15	1,54	0,010
	6	32	4,40	3,85	-0,54	0,150
	7	16	3,19	4,52	1,33	0,060
	8	18	4,55	5,61	1,05	0,397
	9	6	4,49	3,97	-0,52	0,844

Sono stati altresì categorizzati i soggetti in rapporto all'attività prevalente in Te. Op.: esterna, interna o mista. Si osservano differenze maggiori e statisticamente significative per attività prevalente in ambiente esterno o misto. La categorizzazione dei soggetti in rapporto alle missioni svolte in Te. Op. ha permesso di rilevare incrementi maggiori della frequenza di cellule binucleate con micronuclei (T1 - T0) nei sottogruppi che avevano effettuato 5 o 7 missioni: 1,54 e 1,33 rispettivamente, paragonati al sottogruppo, peraltro più numeroso, che era alla prima missione in Te. Op. (T1 - T0 = 1,14). In altri sottogruppi la differenza T1 - T0 erano inferiori o negative rivelando frequenze minori al tempo T1 rispetto a T0, come nei sottogruppi con 6 o 9 missioni alle spalle.

Per l'analisi statistica relativa alle frequenze di micronuclei nelle cellule mononucleate, ci si è riferiti ad un campione complessivo di 746 soggetti. Nell'analisi eseguita sui dati appaiati si è osservato un lieve incremento, statisticamente significativo ( $0,25 \pm 1,685 \text{ ‰}$ ,  $P=0,01$ ), della frequenza media di cellule mononucleate micronucleate nei campioni valutati a T1 ( $1,48 \pm 1,47 \text{ ‰}$ ) rispetto a quella rilevata a T0 ( $1,23 \pm 1,03 \text{ ‰}$ ) (Tabella XII - e, Tabella XII - f).

I dati corrispondenti alla frequenza dei micronuclei nelle cellule mononucleate sono riportati nella Tabella XII - i e nella Tabella XII - j, dalle quali si evince un lieve incremento a T1 per pattugliatori e per soggetti alla prima missione in Te. Op.

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella XII – i.** Dati relativi alla frequenza media di micronuclei nelle cellule mononucleate, rilevati sui soggetti prima e dopo la missione in Te. Op. ed alla differenza media. Stratificazione per le caratteristiche individuali e stili di vita

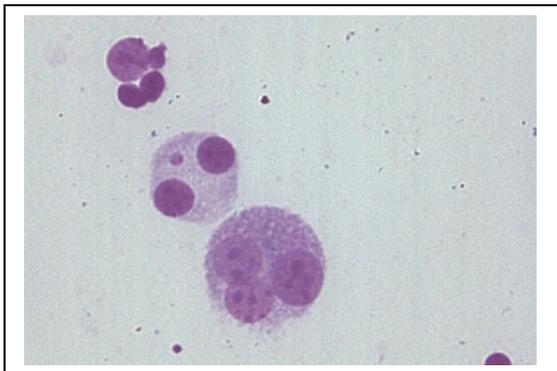
Stratificazione	livello	n	Media T0	Media T1	Media diff T1-T0	p- test Wilcoxon
<b>ETA'</b>	<b>&lt;30</b>	551	1,14	1,46	0,32	0,000
	<b>30-39</b>	143	1,44	1,42	-0,02	0,343
	<b>40+</b>	52	1,61	1,75	0,14	0,403
<b>Sesso</b>	<b>F</b>	22	1,04	1,47	0,43	0,342
	<b>M</b>	724	1,24	1,48	0,24	0,008
<b>T0 fumo</b>	<b>ND</b>	7	1,43	1,13	-0,29	0,641
	<b>0</b>	320	1,22	1,53	0,31	0,029
	<b>1-19</b>	204	1,25	1,62	0,37	0,013
	<b>20+</b>	124	1,18	1,30	0,12	0,813
	<b>EX</b>	91	1,26	1,25	-0,02	0,870
<b>Fototipo</b>	<b>ND</b>	20	1,38	1,72	0,34	0,535
	<b>I</b>	1	1,00	4,50	3,50	1,000
	<b>II</b>	80	1,15	1,56	0,40	0,041
	<b>III</b>	373	1,22	1,43	0,21	0,198
	<b>IV</b>	217	1,26	1,44	0,17	0,302
	<b>V</b>	49	1,19	1,62	0,43	0,117
<b>T0 frutta</b>	<b>VI</b>	6	1,58	2,37	0,79	0,813
	<b>1V/die</b>	373	1,31	1,49	0,19	0,283
	<b>PIU'V/die</b>	201	1,19	1,56	0,37	0,010
<b>T1 frutta</b>	<b>RAR</b>	172	1,12	1,35	0,23	0,151
	<b>ND</b>	2	1,00	1,14	0,14	1,000
	<b>1V/die</b>	341	1,23	1,56	0,33	0,037
	<b>PIU'V/die</b>	125	1,40	1,47	0,08	0,572
<b>T0 verdura</b>	<b>RAR</b>	278	1,15	1,37	0,22	0,070
	<b>ND</b>	1	1,00	1,50	0,50	1,000
	<b>1V/die</b>	363	1,28	1,59	0,31	0,019
	<b>PIU'V/die</b>	120	1,16	1,32	0,16	0,192
<b>T1 verdura</b>	<b>RAR</b>	262	1,19	1,39	0,20	0,288
	<b>ND</b>	4	1,38	1,44	0,07	1,000
	<b>1V/die</b>	276	1,27	1,50	0,23	0,164
	<b>PIU'V/die</b>	98	1,39	1,59	0,20	0,326
<b>T0 UEQAlcol</b>	<b>RAR</b>	368	1,16	1,43	0,27	0,029
	<b>0</b>	448	1,21	1,51	0,30	0,010
	<b>0-0.5</b>	256	1,26	1,46	0,20	0,172
<b>T1-UEQAlcol</b>	<b>0.5+</b>	42	1,23	1,22	-0,02	0,959
	<b>0</b>	581	1,21	1,45	0,24	0,010
	<b>0-0.5</b>	132	1,34	1,59	0,25	0,316
	<b>0.5+</b>	33	1,20	1,48	0,28	0,649

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

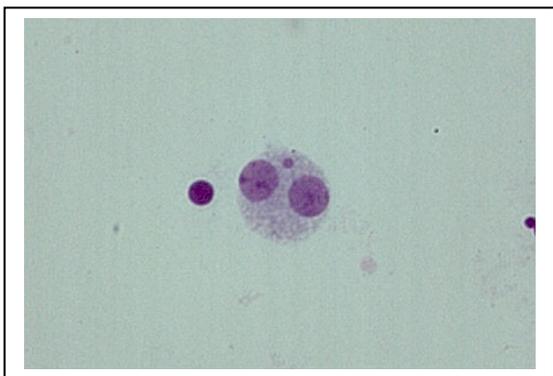
**Tabella XII - j.** Dati relativi alla frequenza media di micronuclei nelle cellule mononucleate, rilevati sui soggetti prima e dopo la missione in Te. Op. ed alla differenza media. Stratificazione per impiego e numero di missioni.

STRATIFICAZIONE	LIVELLO	N	MEDIA T0	MEDIA T1	DIFF MEDIA T1-T0	P- TEST WILCOXON
<b>IMPIEGO</b>	<b>arm</b>	28	1,19	1,12	-0,07	0,934
	<b>blank</b>	25	1,17	1,10	-0,07	0,846
	<b>cond</b>	71	1,16	1,25	0,09	0,904
	<b>disinf</b>	3	0,33	0,50	0,17	1,000
	<b>eli</b>	2	2,52	2,23	-0,28	0,500
	<b>gen</b>	8	1,38	0,99	-0,38	0,641
	<b>lav</b>	1	1,50	0,00	-1,50	1,000
	<b>log</b>	133	1,16	1,50	0,34	0,090
	<b>mec</b>	15	0,77	1,19	0,42	0,285
	<b>mt</b>	14	1,59	1,81	0,22	0,606
	<b>nbc</b>	1	0,00	0,00	0,00	
	<b>pat</b>	346	1,27	1,59	0,33	0,014
	<b>smi</b>	6	1,89	1,72	-0,17	0,906
	<b>trasm</b>	18	1,44	2,17	0,73	0,077
<b>uff</b>	65	1,14	1,31	0,16	0,712	
<b>N° MISSIONI</b>	<b>0</b>	210	1,27	1,46	0,19	0,532
	<b>1</b>	145	1,21	1,63	0,42	0,019
	<b>2</b>	109	1,27	1,35	0,08	0,889
	<b>3</b>	111	1,29	1,46	0,17	0,379
	<b>4</b>	65	1,00	1,47	0,46	0,112
	<b>5</b>	43	1,10	1,49	0,39	0,074
	<b>6</b>	26	1,25	1,23	-0,02	0,605
	<b>7</b>	15	1,37	1,14	-0,24	0,460
	<b>8</b>	17	1,38	2,09	0,72	0,110
	<b>9</b>	5	0,90	0,97	0,07	1,000

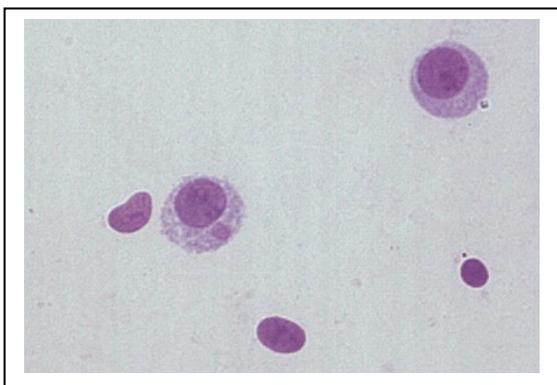
Esempi di cellule micronucleate e di altre alterazioni nucleari osservate nei preparati analizzati per il progetto SIGNUM.



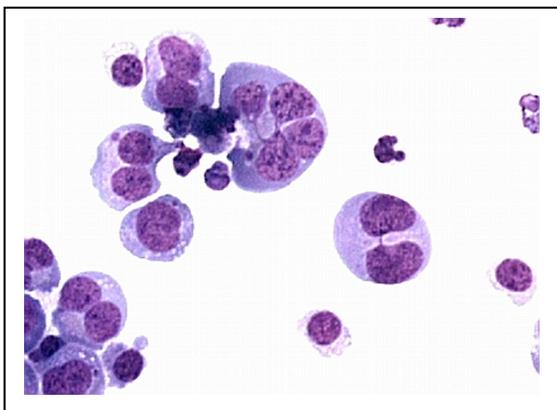
Cellula binucleata con micronucleo



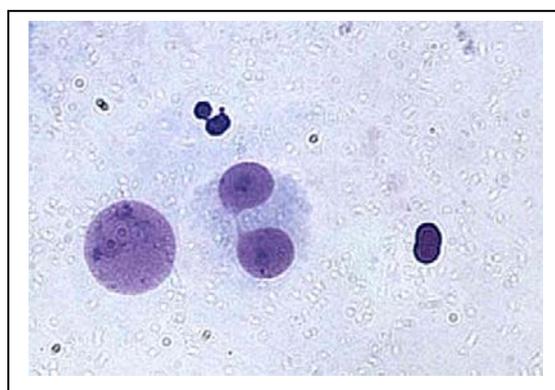
Cellula binucleata con micronucleo



Cellula mononucleata con micronucleo



Ponti nucleoplasmatici



### 3. **Discussione e conclusioni**

L'intervallo di riferimento per un test citogenetico, quale la frequenza di micronuclei nei linfociti di sangue periferico non può essere definito in modo univoco, considerata la consistente variabilità tra laboratori associata alla procedura di scoring, come già descritto.

Il valore mediano della frequenza basale di micronuclei, valutata in uno studio condotto nell'ambito del progetto HUMN su 25 database da altrettanti laboratori per un numero totale di 7000 soggetti in un range di età 10-62 anni, è di 6,5 per 1000, con ampia variabilità tra laboratori. Quest'analisi valutava dati ottenuti con diversi protocolli, su colture di linfociti isolati o di sangue intero [13].

Nello studio di intercalibrazione della procedura di scoring che ha coinvolto 34 laboratori nella valutazione di vetrini derivanti dalla stessa coltura di linfociti preparati in laboratorio centrale il valore mediano era di 7.0 (range 1-19). Maggiori differenze interlaboratorio nello stesso studio sono state ottenute per gli altri parametri nucleari, quali ponti nucleoplasmatici e bud [11]. La differenza nelle frequenze tra laboratori è associata al protocollo utilizzato, ma soprattutto ad una lettura soggettiva dei criteri e ad una diversa esperienza nello scoring.

L'intervallo di riferimento (*baseline*) per le frequenze di micronuclei deve essere comunque definito per le classi di età del gruppo dei soggetti analizzati, considerando che l'età è una dei principali confondenti per il test del micronucleo.

Nel presente studio sono rappresentate 3 classi di età:

- < 30 anni, che include la maggior parte dei soggetti (619),
- 30-39 anni, che comprende un discreto numero di individui(153),
- 40 anni, rappresentata da un gruppo limitato di soggetti.

I livelli baseline per queste classi descritti nello studio internazionale di comparazione sono:

- 5,73 e 4,38 per la classe < 30 anni,
- 8,77 e 4,66 per soggetti di età da 30-39.

- 9,62 e 7,46 nella classe >40 anni, rispettivamente per i laboratori di Pisa e Genova.

Studi più recenti condotti nel laboratorio di Genova utilizzando lo stesso protocollo del progetto SIGNUM, mostrano valori medi delle frequenze di base in diverse popolazioni di controllo nell'intervallo da 1.83 ‰ [21] a 12,1 ‰ [22] associato a differenti caratteristiche individuali ed a differenti esposizioni ambientali. Altri studi condotti a Pisa facevano riferimento a valori a valori medi delle frequenze basali di cellule binucleate micronucleate di 6,2 [23] e 9,2 [24].

Queste considerazioni dimostrano come i valori medi delle frequenze di cellule micronucleate relative al campionamento a T0 (3,89 ‰) e a T1, dopo la missione (4,62 ‰), per il gruppo di militari reclutati nell'ambito del progetto SIGNUM siano inclusi nell'intervallo di valori riportati nelle popolazioni non esposte.

E' stato osservato come l'età abbia effetto sulle frequenze medie di cellule binucleate e mononucleate con micronuclei, sia nel campionamento prima che dopo la missione in Te. Op., ma non influenzi le differenze medie.

Il sottogruppo di soggetti di sesso femminile è poco rappresentato (23 su 826) e presenta frequenze comparabili a T0 e a T1 con valori minori al rientro rispetto a quelli di sesso maschile.

Nell'analisi dei risultati sono stati considerati anche gli altri principali fattori confondenti per la frequenza di micronuclei: abitudine al fumo, dieta ed alcol . Nessun effetto rilevante è evidenziabile sull'incremento di frequenza di micronuclei da parte del differente fototipo, abitudine al fumo, e consumo di alcol, dimostrando come la variazione di abitudini voluttuarie o della dieta nel periodo di missione non induca variazioni dei potenziali effetti dell'esposizione.

L'influenza di altri fattori concomitanti, quali il numero e la tipologia delle vaccinazioni effettuate dal 2003 è stata osservata solo in sottogruppi a scarsa numerosità e non permette di trarre conclusioni.

Un biomarcatore di danno cromosomico, quale la frequenza di micronuclei, rappresenta l'effetto finale indotto dall'esposizione ad agenti genotossici

esogeni ed endogeni e può essere modulato da un ampio numero di fattori individuali, quali l'efficienza metabolica nella detossificazione dei composti esogeni, la capacità di riparare il danno al DNA ed i meccanismi di difesa dal danno ossidativo che ne definiscono la suscettibilità ai mutageni, nonché da fattori legati a stili di vita ed abitudini voluttuarie. A questo riguardo il disegno di studio del progetto SIGNUM, che prevede misure ripetute, consente di verificare le differenze tra i livelli di danno cromosomico prima e dopo la missione.

Le differenze nelle frequenze di BNMN osservate nella popolazione totale considerata rivela complessivamente un aumento tra prima e dopo la missione del 18%. Differenze maggiori sono state osservate nei gruppi che svolgevano prevalentemente attività esterna. Le analisi stratificate per sottogruppi di soggetti in riferimento alle attività svolte nel Te. Op., alla sede della missione ed al numero di missioni effettuate rivelano incrementi maggiori in alcune categorie (conduttori, pattugliatori, e trasmettitori) peraltro non caratterizzate per l'esposizione.

---

Hanno contribuito alle attività di questa Unità operativa:

IST - GE

Cristina Balia,  
Paola Roggieri,  
Elena Giordano,  
Andrea Sciutto,  
Samantha Volpi

UNIFI

Renato Colognato  
Martina Bibbiani  
Gaia Boni  
Maura Carrai  
Ilaria Fontana  
Doriana Saracino

**Bibliografia**

1. Countryman PI and Heddle JA The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 1976. 41, 321-32;
2. Fenech, M. and Morley, A.A. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* 1985. 43, 233–246;
3. Fenech, M. & Morley, A.A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat.Res.* 1985. 147, 29–36;
4. Kirsch-Volders M, Fenech M. Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*. 2001. 16:51-8;
5. Fenech M Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res*. 2006. 600:58-66;
6. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay . *Nature Protocols* 2007. vol. 2, n. 5: 1084;
7. Thomas P, Umegaki K, Fenech M. Nucleoplasmic bridges are a sensitive measure of chromosome rearrangement in the cytokinesis-block micronucleus assay. *Mutagenesis*. 2003.18:187-94;
8. Shimizu, N., Shimuara, T. & Tanaka, T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat. Res.* 2000. 448:81–90;
9. N. Shimizu. Extrachromosomal double minutes and chromosomal homogeneously staining regions as probes for chromosome research. *Cytogenet Genome Res.* 2009. 124: 312-326;
10. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*. 2003. 534:65-75;
11. Fenech M, Bonassi S, Turner J, Lando C, Chang WP, Holland N, Kirsh-Volders M, Zeiger E, Bigatti MP, Bolognesi C, Cao J, De Luca G, Di Giorgio M, Ferguson LR, Fucic A, Lima OG et al Intra and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. *Mutat.Res.* 2003. 534: 45-64;
12. Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Casalone R, Dalprà L, DeFerrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Migliore L, Padovani P, Pasquini R, Puntoni R, Sbrana I, Stella M, and Bonassi S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei. *Cancer Epidemiol Biomarker and Prev.* 1997. 6; 249-256;
13. Bonassi S, Fenech M, Lando C, Lin Y, Ceppi M, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti MP, Bolognesi C, Jia C, Di Giorgio M, Ferguson L, Fucic A, Lima OG, Hrelia P, Krishnaja AP, , Lee TK, Migliore L, Mikhalevich L, Mirkova E, Mosesso P, Müller WU, Odagiri Y, Scarffi MR, Szabova E, Vorobtsova I, Vral A, Zijno A HUMAN MicroNucleus Project: International Database Comparison for Results With the Cytokinesis-Block Micronucleus Assay in Human Lymphocytes: I. Effect of Laboratory Protocol, Scoring Criteria, and Host Factors on the Frequency of Micronuclei.

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

*Environ Mol Mutagen.* 2001. 37(1):31-45,

14. Bonassi S, Neri M, Lando C, Ceppi M, Lin YP, Chang WP, Holland N, Kirsch-Volders M, Zeiger E, Fenech M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human MicroNucleus project. *Mutat Res.* 2003. 543:155-66;
15. Kimura M, Umegaki K, Higuchi M, Thomas P, Fenech M. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism, folic acid and riboflavin are important determinants of genome stability in cultured human lymphocytes. *J Nutr*, 2004. 134: 48-56;
16. Lindberg HK, Wang X, Jarventaus H, Falck GC, Norppa H, Fenech M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat Res*, 2007. 617: 33-45;
17. Fenech M, Baghurst P, Luderer W, Turner J, Record S, Ceppi M, Bonassi S. Low intake of calcium, folate, nicotinic acid, vitamin E, retinol, beta-carotene and high intake of pantothenic acid, biotin and riboflavin are significantly associated with increased genome instability--results from a dietary intake and micronucleus index survey in South Australia. *Carcinogenesis.* 2005. 26, 991-9;
18. Wang X., Thomas P, Xue J, Fenech M. Folate deficiency induces aneuploidy in human lymphocytes in vitro-evidence using cytokinesis-blocked cells and probes specific for chromosomes 17 and 21. *Mutat Res.* 2004. 551:167-180;
19. IAEA, 2001. Cytogenetic analysis for radiation dose assessment. A manual. Technical reports series n.405. *International Atomic Energy Agency*, Vienna.
20. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, Lando C, Chang W, Holland N, Kirsch M, Zeiger E, Ban S, Barale R, Bigatti M, Bolognesi C, Cebulska A, Fabianova E, Fucic A, Hagmar L, Joksic G, Martelli A, Migliore L, Mirkova E, Scarfi M, Zjino A, Norppa H, Fenech M, An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis* 2007. 28:625-631;
21. Bolognesi C, Carrasquilla G, Volpi S, Solomon KR, Marshall EJ. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. *J Toxicol Environ Health. A.* 2009. 72: 986-97;
22. Bolognesi C., Nucci M., Colacci A., Grilli S., Ippoliti F., Mucci N., Spica V., Barbieri A., Canitano N., Chiozzotto D., Di Renzo L., Giordano E., Horn W., Roggieri P., Risi A., Silingardi P., Vaccarim., Violante F. Identificazione di marcatori specifici di esposizione professionale a farmaci antitumorali usati in polichemioterapia: progetto IMEPA. *Epidemiol. Prev.* 2005. 29(suppl):91/95;
23. Migliore L, Naccarati A, Coppedè F, Bergamaschi E, De Palma G, Voho A, Manini P, Järventaus H, Mutti A, Norppa H, Hirvonen A.. *Pharmacogenet Genomics.* 2006, 16(2): 87-99;
24. Migliore L, Colognato R, Naccarati A, Bergamaschi E. *Mutagenesis.* 2006 Mar;21(2):149-52.

**XIII. RICERCA DI ABERRAZIONI CROMOSOMICHE IN  
LINFOCITI PERIFERICI**

**Responsabili:**

**Prof. Bruno Dallapiccola**

Istituto CSS-Mendel  
Viale Regina Margherita 261  
00198 Roma  
(attualmente Direttore scientifico dell'Ospedale pediatrico "Bambino Gesù" in  
Roma)

**Dr. Antonio Novelli**

Istituto CSS-Mendel  
Viale Regina Margherita 261  
00198 Roma

## 1. Introduzione

L'analisi della frequenza delle anomalie "cromosomiche" sulle metafasi ottenute da colture di linfociti arrestate in vitro in seconda giornata viene considerata da molti anni un ideale e sensibile strumento di dosimetria biologica. Le premesse di questo tipo di analisi si basano sulla sensibilità dei preparati cromosomici all'azione di agenti clastogeni (cioè in grado di indurre rotture sui cromosomi) e, per molti di questi agenti, sulla possibilità di stabilire correlazioni tra la dose dell'agente mutageno e l'effetto sul fenotipo cromosomico. Le radiazioni ionizzanti in particolare agiscono con un meccanismo causa-effetto sul DNA, inducendo danni proporzionali alla dose che ha colpito le cellule. Questo vale sia per le radiazioni assorbite in vitro, quanto in vivo, con una linearità dell'effetto che appare ben dimostrabile per le esposizioni acute, ma che rivela un analogo trend anche per le radiazioni assorbite in maniera cronica. In base a queste caratteristiche, l'analisi quantitativa delle rotture cromosomiche presenti in una coltura in vitro fornisce una idea abbastanza precisa dell'effetto biologico di eventuali agenti clastogeni (fisici, chimici e biologici) ai quali una persona può essere stata accidentalmente o professionalmente esposta in vivo. Sebbene non esista al momento nessuna possibilità di stabilire una correlazione cariotipo-fenotipo, cioè definire uno specifico rischio di malattia correlato ad un aumento delle anomalie cromosomiche non clonali, un loro significativo aumento (oltre il valore indicativo di 0,5% atteso nella popolazione generale) viene correntemente considerato un indicatore di un generico rischio, tale da allontanare un lavoratore professionalmente esposto dal luogo di lavoro e di sottoporlo a specifici accertamenti, soprattutto di carattere internistico ed ematologico.

## 2. Tipologia delle Aberrazioni Cromosomiche

Le mutazioni cromosomiche strutturali possono essere distinte in due classi principali: le aberrazioni di tipo cromosomico e quelle di tipo cromatidico.

### a. Aberrazioni strutturali cromosomiche

Le aberrazioni cromosomiche sono rotture che coinvolgono entrambi i cromatidi fratelli. Si osservano in cellule esposte all'agente mutageno allo stadio G0 o G1 del ciclo cellulare, prima cioè della replicazione. Al momento della replicazione il danno viene trasmesso anche all'elica neosintetizzata. Si possono verificare anche in cellule trattate durante il primo stadio della fase S, quando solo una parte di DNA è già stata duplicata.

Di seguito vengono riportate le aberrazioni cromosomiche(**chr**) più comuni secondo ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) rilevate con colorazioni standard (*non banded preparation*).

Un'aberrazione cromosomica coinvolge entrambi i cromatidi di un singolo cromosoma allo stesso locus.

- **Chromosome gap** (letteralmente intervallo cromosomico), (**chrg**), è una regione non colorata (lesione acromatica) a livello dello stesso locus in entrambi i cromatidi di un singolo cromosoma nel quale è presente un disallineamento minimo dei cromatidi. Il termine chromosome gap è sinonimo di isolocus gap e isochromatid gap.
- **Chromosome break** (rottura cromosomica) (**chr**b****) è una discontinuità a livello dello stesso locus in entrambi i cromatidi di un singolo cromosoma e dà origine ad un frammento acrocentrico e ad un cromosoma monocentrico anormale. Questo frammento è quindi un tipo particolare di frammento acentrico (**ace**), e il termine chr**b** dovrebbe essere usato solo quando la morfologia indica che il frammento sia il risultato di un evento singolo. Il termine *chromosome break* è sinonimo di *isolocus break* e *isochromatid break*.

- **Chromosome exchange** (scambio cromosomico ) (**chre**), è il risultato di due o più lesioni cromosomiche con una conseguente rilocalizzazione di entrambi i cromatidi di un singolo cromosoma in una nuova posizione sullo stesso cromosoma o su un cromosoma differente. Può essere simmetrico (ad esempio nelle traslocazioni reciproche) o asimmetrico (ad esempio nelle formazioni dicentriche).
- **Minute**, (**min**), è un frammento acentrico più piccolo rispetto all'ampiezza di un singolo cromatide. Può essere singolo o doppio. Nel caso specifico in cui doppi *minutes* sono presenti clonalmente in cellule tumorali, viene utilizzata l'abbreviazione (**dmin**).
- **Pulverization** (**pvz**) indica una situazione in cui una cellula contiene sia *gaps* cromatidici/cromosomici che *breaks*, non sono normalmente associati a scambi e sono presenti in numero tale da non poter essere contati. Occasionalmente uno o più cromosomi in una cellula sono polverizzati, mentre i cromosomi rimanenti hanno morfologia normale; es. pvz (1) indica un cromosoma 1 polverizzato.
- **Condensazione cromosomica prematura** (**pcc**) si verifica quando un nucleo in interfase è prematuramente indotto ad entrare in mitosi. Una pcc può coinvolgere i nuclei sia in fase G1 che in fase G2. La cromatina dei nuclei in fase S che va in contro a pcc appare spesso polverizzata.
- **Divisione centromerica prematura** (**pcd**) potrebbe essere usato per descrivere una separazione prematura dei centromeri durante la metafase. La pcd può coinvolgere uno o più cromosomi in una frazione di cellule.
- **Marker cromosomico** (**mar**) è un cromosoma strutturalmente riarrangiato del quale non può essere identificata nessuna parte.

**b. Aberrazioni strutturali cromatidiche**

Sono rotture che coinvolgono un solo cromatidio. Si osservano in cellule esposte

all'agente mutageno durante la fase G2 o S del ciclo cellulare, cioè quando il DNA è già stato duplicato ed il danno permane solo su un filamento.

Di seguito vengono riportate le aberrazioni cromatidiche(**cht**) più comuni secondo ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature*) rilevate con colorazioni standard (*non banded preparation*).

- **Gap cromatidico (chtg)** è una regione non colorata di un singolo cromatide(lesione acromatica)in cui c'e' un disallineamento minimo di uno dei cromatidi.
- **Break cromatidico (chtb)** è una discontinuità di un unico cromatide in cui vi è un chiaro disallineamento di uno dei cromatidi.
- **Scambio cromatidico (chte)** è il risultato di due o piu' lesioni cromatiche e susseguente riarrangiamento del materiale cromatico. Gli scambi possono essere di cromatidi di cromosomi diversi (interscambi) o tra cromatidi o all'interno di un cromosoma (intrascambi).  
Nei casi di interscambi se ci sono tre bracci per ogni pattern si puo' definire triradiale (**tr**), se ce ne sono 4 quadriradiale (**qr**) e complesso (**cx**) se ce ne sono piu' di quattro.
- **Sister Chromatid Exchange (sce)** sono evidenziabili con colorazioni speciali, il risultato è l'interscambio fra segmenti omologhi di due cromatidi di un cromosoma.

### 3. Risultati

Sono state analizzate complessivamente circa 20800 cellule. La tabella XIII-a presenta il numero di cellule con **chtb** (*break cromatidico*), **chrb** (*chromosome break*), **ace** frammento acentrico, **chre** (*chromosome exchange*) (*scambio cromosomico*), **tr** (*triradiale*), **qr** (*quadriradiale*), **mar** (*marker cromosomico*) riscontrati nei campioni prelevati a T0 e T1, per i 98 soggetti per i quali entrambi i campioni sono risultati disponibili.

**Tabella XIII - a.** Frequenza di aberrazioni cromosomiche riscontrate in 98 soggetti con campioni disponibili, prelevati T0 e T1.

	T0		T1		Differenza	
	media	dev.st.	media	dev.st.	media	T
<b>chtb</b> ( <i>break cromatidico</i> )	2.07	1.69	1.47	1.14	-0.60	-3.08
<b>chrb</b> ( <i>chromosome break</i> )	0.69	0.98	0.56	1.20	-0.13	-1.01
<b>ace</b> frammento acentrico	0.01	0.10	0.00	0.00	-0.01	-0.99
<b>chre</b> ( <i>chromosome exchange</i> )	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
<b>tr</b> ( <i>triradiale</i> ) <b>qr</b> ( <i>quadriradiale</i> )	0.01	0.10	0.00	0.00	-0.01	-0.99
<b>mar</b> ( <i>marker cromosomico</i> )	0.03	0.22	0.04	0.20	0.01	0.33

I risultati mostrano che la proporzione di rotture cromosomiche su 100 cellule analizzate è in media inferiore al valore atteso in popolazione generale (0.5%). Inoltre, confrontando la campionatura T0 con quella T1, non sono emerse sostanziali differenze. Fa eccezione la percentuale di **chtb**, che risulta superiore a T0 rispetto a T1 (2.07% vs. 1.47%,  $p < 0.01$ ), pur essendo sempre al di sotto del valore di riferimento.

### 4. Discussione

Sono stati analizzati completamente, in quanto presenti in quantità sufficiente sia nel campionamento a T0 che in quello a T1, 98 campioni, rispetto al numero preventivato di 100. Tuttavia questa piccola differenza non è in grado di interferire nella valutazione e nell'interpretazione dei risultati. Sono state analizzate complessivamente circa 20.800 cellule.

Dai risultati ottenuti dal presente studio confrontando i campioni a T0 e T1, non sono emerse sostanziali differenze, e non c'è stato un significativo aumento anche rispetto alla percentuale di anomalie cromosomiche rilevabili nella popolazione generale: infatti le indagini citogenetiche effettuate mostrano che non vi sono modificazioni significative connesse alla missione (diversità tra T0 e T1) per la frequenza delle anomalie cromosomiche.

## **5. Conclusioni**

I risultati delle indagini citogenetiche non supportano l'ipotesi che la permanenza in Te. Op. nel periodo in studio abbia incrementato la frequenza di aberrazioni cromosomiche. Al contrario la frequenza di rotture cromatidiche appare significativamente diminuita nella popolazione esaminata al termine del dispiegamento in area di operazioni (T1). Le cause di questa ridotta frequenza di danno cromosomico non sono chiaramente identificabili, anche se le variazioni dello stile di vita (es. dieta) potrebbero giustificare questo risultato.

---

Hanno contribuito alle attività di questa Unità operativa:

Anna Capalbo  
Laura Bernardini  
Iolanda Spasari  
Caterina Ceccarini

**Bibliografia generale**

ISCN. An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. *Birth Defects*. 2009. 21: 1-118;

Alexanin SS, Slozina NM, Neronova EG, Makarova NV. Chromosomal aberrations and sickness rates in Chernobyl clean-up workers in the years following the accident. *Health Phys*. 2010 Feb; 98(2):258-60.

Alimena G, Dallapiccola B, De Cuià MR, Gallo E, Gastaldi R, Nanni M, Franchi A, Mandelli F. Cytogenetic findings in acute promyelocytic leukaemia. A report of 25 cases. *Scand J Haematol*. 1984 Aug; 33(2):135-43;

Boffetta P, van der Hel O, Norppa H, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Puskaierova D, Znaor A, Kelecsenyi Z, Kurtinaitis J, Rachtan J, Forni A, Vermeulen R, Bonassi S. Chromosomal aberrations and cancer risk: results of a cohort study from Central Europe. *Am J Epidemiol*. 2007 Jan 1;165(1):36-43;

Bolognesi C., Abbondandolo A., Barale R., Casalone R., Dalpra' L., De Ferrari M., Degrassi F., Forni A., Lamberti L., Lando C., Migliore L., Padovani P., Pasquini R., Puntoni R., Sbrana I., Stella M., and Bonassi S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.*, 6: 249-256, 1997;

Bonassi S, Norppa H, Ceppi M, Strömberg U, Vermeulen R, Znaor A, Cebulska-Wasilewska A, Fabianova E, Fucic A, Gundy S, Hansteen IL, Knudsen LE, Lazutka J, Rossner P, Sram RJ, Boffetta P. Chromosomal aberration frequency in lymphocytes predicts the risk of cancer: results from a pooled cohort study of 22 358 subjects in 11 countries. *Carcinogenesis*. 2008 Jun;29(6):1178-83;

Bonassi S, Znaor A, Norppa H, Hagmar L. Chromosomal aberrations and risk of cancer in humans: an epidemiologic perspective. *Review. Cytogenet Genome Res*. 2004;104(1-4):376-82;

Cavusoglu K, Yalcin E. Radioprotective effect of lycopene on chromosomal aberrations (CAs) induced by gamma radiation in human lymphocytes. *J Environ Biol*. 2009. Jan;30(1):113-7;

Dallapiccola B, Porfirio B, Mokini V, Alimena G, Isacchi G, Gandini E. Effect of oxidants and antioxidants on chromosomal breakage in Fanconi anemia lymphocytes. *Hum Genet*. 1985;69 (1):62-5;

Edwards AA, Purrott RJ, Prosser JS, Lloyd DC. The induction of chromosome aberrations in human lymphocytes by alpha-radiation. *Int J Radiat Biol* 1980;38:83-91;

Fucić A, Znaor A, Strnad M, van der Hel O, Aleksandrov A, Miskov S, Grah J, Sedlar M, Jazbec AM, Ceppi M, Vermeulen R, Boffetta P, Norppa H, Bonassi S. Chromosome damage and cancer risk in the workplace: the example of cytogenetic surveillance in Croatia. *Toxicol Lett*. 2007 Jul 30;172(1-2): 4-11;

Hagmar L, Bonassi S, Strömberg U, Brøgger A, Knudsen LE, Norppa H, Reuterwall C. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res*. 1998 Sep 15;58(18): 4117-21;

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

Iarmarcovai G, Bonassi S, Sari-Minodier I, Baciuchka-Palmaro M, Botta A, Orsière T. Exposure to genotoxic agents, host factors, and lifestyle influence the number of centromeric signals in micronuclei: a pooled re-analysis. *Mutat Res.* 2007 Feb 3;615 (1-2):18-27;

Milacic S. Chromosomal aberrations after exposure to low doses of ionizing radiation. *J BUON.* 2009 Oct-Dec;14(4): 641-6;

Norppa H, Bonassi S, Hansteen IL, Hagmar L, Strömberg U, Rössner P, Boffetta P, Lindholm C, Gundy S, Lazutka J, Cebulska-Wasilewska A, Fabiánová E, Srám RJ, Knudsen LE, Barale R, Fucic A. Chromosomal aberrations and SCEs as biomarkers of cancer risk. *Mutat Res.* 2006 Aug 30;600(1-2):37-45;

Porfirio B, Dallapiccola B, Gandini E. The effect of aphidicolin on Fanconi's anemia lymphocyte chromosomes. *Mutat Res.* 1985 Dec;144(4): 257-63;

Rossi AM, Hansteen IL, Skjelbred CF, Ballardini M, Maggini V, Murgia E, Tomei A, Viarengo P, Knudsen LE, Barale R, Norppa H, Bonassi S. Association between frequency of chromosomal aberrations and cancer risk is not influenced by genetic polymorphisms in GSTM1 and GSTT1. *Environ Health Perspect.* 2009 Feb;117(2): 203-8. Epub 2008 Sept 1;

Rössner P, Boffetta P, Ceppi M, Bonassi S, Smerhovsky Z, Landa K, Juzova D, Srám RJ. Chromosomal aberrations in lymphocytes of healthy subjects and risk of cancer. *Environ Health Perspect.* 2005 May;113(5): 517-20;

Schmid E, Hieber L, Heinzmann U, Roos H, Kellerer AM. Analysis of chromosome aberrations in human peripheral lymphocytes induced by in vitro alpha-particle irradiation. *Radiat EnvironBiophys.* 1996; 35:179-84;

Stephan G, Kampen WU, Nosske D, Roos H. Chromosomal aberrations in peripheral lymphocytes of patients treated with radium-224 for ankylosing spondylitis. *Radiat Environ Biophys* 2005; 44:23-8;

Tedeschi B, Porfirio B, Vernole P, Caporossi D, Dallapiccola B, Nicoletti B. Common fragile sites: their prevalence in subjects with constitutional and acquired chromosomal instability. *Am J Med Genet.* 1987 Jun;27(2):471-482.

UNITA' OPERATIVA CENTRO STUDI E RICERCHE DI SANITA' E  
VETERINARIA ESERCITO ITALIANO

**XIV. RICERCA DEI TRANSRIARRANGIAMENTI  
VGAMMA-JBETA IN LINFOCITI PERIFERICI**

**Responsabile:**

**Col. Me Florigio Lista**

Centro Studi e Ricerche di Sanità e Veterinaria E.I.  
Via Santo Stefano Rotondo 4  
00184 Roma

## 1. Introduzione

La ricombinazione V(D)J, unico evento di ricombinazione somatica nei vertebrati, consiste in un processo di riarrangiamento del DNA fra i diversi segmenti Variabili (V), Diversità (D) e Unione (J) dei loci dei recettori per gli antigeni durante i precoci stadi maturativi dei linfociti B e T [1-4]. La finalità di tale evento è di creare il maggior numero possibile di combinazioni per far fronte alle innumerevoli strutture antigeniche. Il riarrangiamento del DNA, in questo caso, è linfocita specifico ed irreversibile. Perciò, il genoma che codifica per un'immunoglobulina o per il recettore TCR non è più lo stesso rispetto a quello di una cellula non linfoide perché è stato riconfigurato e nella maggior parte dei casi è andato incontro ad ulteriori modificazioni consistenti in delezioni e/o inserzioni di nucleotidi (Figura XIV - 1). Questi riarrangiamenti avvengono solitamente all'interno dello stesso locus (riarrangiamenti intralocus o cis riarrangiamenti) ma, seppure ad una frequenza molto più bassa, possono coinvolgere segmenti situati in loci differenti e per questo definiti riarrangiamenti interlocus o meglio transriarrangiamenti (TRS) (Figura XIV - 2).

La controparte citogenetica di queste ricombinazioni molecolari è stata descritta nelle alterazioni cariotipiche da metafasi di linfociti del sangue periferico. In questo contesto la Ricombinazione V(D)J può essere vista fondamentalmente come una forza destabilizzante. Nella popolazione generale la frequenza di queste ricombinazioni interlocus, per esempio il riarrangiamento Vgamma-Jbeta, è minore o uguale ad **una per 10000 metafasi** di linfociti periferici stimolati con fito-emoagglutinina, così come saggiato da un'intensa analisi cariotipica di centinaia o migliaia di metafasi provenienti dallo stesso individuo. Quantificando lo stesso transriarrangiamento con la PCR (Reazione Polimerasica a Catena), la stima si aggira intorno a **5 per 150000 cellule**, questo evidenzia che l'analisi con la PCR è consistente con quella cariotipica ma ha l'indiscutibile vantaggio di essere più sensibile ed infinitamente più rapida. Da ciò si ricava che la quantificazione della frequenza dei riarrangiamenti interlocus può essere una misura valida dell'instabilità genomica linfocita-specifica.



Studi pilota [5-7] hanno dimostrato che esiste un'associazione tra i livelli di rischio di tumore ed i livelli dei TRS in:

- 1) condizioni ereditarie come atassia-telengectasia dove il livello dei trans riarrangiamenti riscontrati è di circa 10 - 100 volte superiore rispetto a quello riscontrabile negli individui normali ed inoltre l'ordine di grandezza dell'aumento di questi riarrangiamenti è perciò uguale a quel del rischio di tumore linfoide che questi pazienti hanno;
- 2) condizioni acquisite come esposizioni ambientali ai pesticidi, come dimostrato da uno studio condotto su un gruppo di agricoltori della fascia a rischio per tumori linfoidi del Minnesota del sud e dell'Iowa del nord in cui l'aumento dei livelli delle ricombinazioni interlocus Vgamma-Jbeta è stata messa in relazione con l'uso, da parte di questi individui, di combinazioni di agenti chimici (fosfine, malathion, acido diclorofenossiacetico, cloropicrina e captan), noti come comuni pesticidi impiegati nella lavorazione dei campi. Nello stesso studio, è stata messa in evidenza non solo la correlazione con i livelli di esposizione ai pesticidi ma anche, cosa più rilevante, è stata documentata una variazione stagionale, indicando che questo tipo di aumento nei livelli di trans-riarrangiamenti è un fenomeno transitorio, legato appunto all'esposizione ai pesticidi. In questi agricoltori si è rilevato un livello di riarrangiamenti interlocus di 15-30 volte superiore alla popolazione di controllo (costituita da individui non esposti), mentre il loro rischio di tumori linfoidi è di circa 2-4 volte superiore rispetto a quello della popolazione generale. Un aumento dei livelli dei trans-riarrangiamenti, però, non significa necessariamente che l'individuo ha o avrà un tumore linfoide, ma che il rischio di contrarlo è molto aumentato;
- 3) condizioni acquisite come esposizioni iatrogeniche di pazienti con linfoma di Hodgkin trattati con chemioterapia.

Esistono quindi una gran varietà di agenti esogeni capaci di modificare la configurazione cromatinica, la riparazione del DNA, e perciò, l'accessibilità. Le condizioni necessarie e sufficienti per l'occorrenza dei riarrangiamenti interlocus o TRS non sono altro che una variazione sul tema di quelle

condizioni necessarie e sufficienti per l'occorrenza delle traslocazioni oncogeniche, che avverrebbero ad una minore frequenza.

Per tali motivi, la misura degli "innocenti" TRS Vgamma-Jbeta può essere considerato un marcatore del rischio per lo sviluppo delle neoplasie linfoidi.

Al fine di verificare l'ipotesi che una condizione di esposizione presunta (missione in area in precedenza "contaminata" da uranio depleto) possa far aumentare il rischio per lo sviluppo di neoplasie linfoidi, sono stati valutati i TRS prima e dopo la missione.

## **b. Risultati e Discussione**

Il riscontro dei TRS nella popolazione normale è occasionale e un aumento significativo a livello di popolazione esprime una maggiore predisposizione allo sviluppo di neoplasie linfoidi. Si stima che una minoranza di soggetti normali possa avere nei linfociti del sangue periferico una frequenza di TRS pari o inferiore a 1/30.000 cellule linfoidi.

La valutazione dei TRS con la metodica PCR real time, da noi messa a punto e applicata su un campione ben più ampio, ha permesso di stimare un valore "fisiologico" di frequenze TRS (*baseline*) in accordo con la letteratura precedente.

Infatti in una popolazione di soggetti di circa 870 unità, si è notato che circa il 97% dei soggetti aveva un valore inferiore a 30 TRS ogni milione di cellule linfoidi, corrispondenti a 1/30.000 cellule linfoidi. Tale dato è stato desunto dalla popolazione reimpiego (tabella XIV – a). Il restante 3% del gruppo valutato aveva un valore circa 10 volte maggiore, corrispondente a 30-476 TRS per milione di cellule. Questi alti valori potrebbero essere espressione di occasionali espansioni clonali di linfociti attivati per determinati antigeni. Ciò potrebbe essere dovuto a stimolazioni antigeniche fisiologiche ovvero a ripetuti cicli di vaccinazioni.

INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

**Tabella XIV - a.** Distribuzione di frequenza dei TRS nella popolazione a T0  
(m5pmedgbr = media sonde gamma + beta, T0).

m5pmedgbr (TRS x 10 <sup>6</sup> cell. linfoidi)	Frequenza	Percentuale	Frequenza cumulata	Percentuale cumulata
0	724	83.31	724	83.31
1	67	7.71	791	91.02
2	1	0.12	792	91.14
3	20	2.30	812	93.44
4	2	0.23	814	93.67
5	2	0.23	816	93.90
10	2	0.23	818	94.13
11	2	0.23	820	94.36
12	4	0.46	824	94.82
15	2	0.23	826	95.05
16	1	0.12	827	95.17
17	1	0.12	828	95.28
18	1	0.12	829	95.40
19	1	0.12	830	95.51
21	4	0.46	834	95.97
22	4	0.46	838	96.43
23	1	0.12	839	96.55
26	2	0.23	841	96.78
29	1	0.12	842	96.89
30	1	0.12	843	97.01
32	1	0.12	844	97.12
35	1	0.12	845	97.24
37	3	0.35	848	97.58
42	2	0.23	850	97.81
43	2	0.23	852	98.04
50	1	0.12	853	98.16
54	1	0.12	854	98.27
59	1	0.12	855	98.39
63	1	0.12	856	98.50
68	1	0.12	857	98.62
112	1	0.12	858	98.73
125	1	0.12	859	98.85
128	1	0.12	860	98.96
135	1	0.12	861	99.08
147	1	0.12	862	99.19
158	1	0.12	863	99.31
199	1	0.12	864	99.42
226	1	0.12	865	99.54
288	1	0.12	866	99.65
307	1	0.12	867	99.77
352	1	0.12	868	99.88
476	1	0.12	869	100.00

**Tabella XIV - b.** Distribuzione di frequenza dei TRS nella popolazione a T1  
(**m5pmedgbr** = media sonde gamma + beta, T0).

<b>m5dmedgbr= Media sonde gamma+beta, dopo la missione</b>				
<b>m5dmedgbr (TRS x milione di cellule linfoidi)</b>	<b>Frequenza</b>	<b>Percentuale</b>	<b>Frequenza cumulata</b>	<b>Percentuale cumulata</b>
<b>0</b>	765	79.36	765	79.36
<b>1</b>	105	10.89	870	90.25
<b>3</b>	46	4.77	916	95.02
<b>4</b>	13	1.35	929	96.37
<b>5</b>	4	0.41	933	96.78
<b>6</b>	1	0.10	934	96.89
<b>10</b>	1	0.10	935	96.99
<b>12</b>	1	0.10	936	97.10
<b>13</b>	1	0.10	937	97.20
<b>14</b>	1	0.10	938	97.30
<b>17</b>	1	0.10	939	97.41
<b>20</b>	2	0.21	941	97.61
<b>21</b>	1	0.10	942	97.72
<b>22</b>	1	0.10	943	97.82
<b>23</b>	1	0.10	944	97.93
<b>26</b>	1	0.10	945	98.03
<b>29</b>	4	0.41	949	98.44
<b>33</b>	1	0.10	950	98.55
<b>40</b>	1	0.10	951	98.65
<b>44</b>	1	0.10	952	98.76
<b>49</b>	1	0.10	953	98.86
<b>56</b>	1	0.10	954	98.96
<b>68</b>	1	0.10	955	99.07
<b>92</b>	1	0.10	956	99.17
<b>94</b>	1	0.10	957	99.27
<b>98</b>	1	0.10	958	99.38
<b>109</b>	1	0.10	959	99.48
<b>123</b>	1	0.10	960	99.59
<b>246</b>	1	0.10	961	99.69
<b>392</b>	1	0.10	962	99.79
<b>408</b>	1	0.10	963	99.90
<b>664</b>	1	0.10	964	100.00

**c. Conclusioni**

Il numero assoluto di TRS dopo la missione rapportato sia ai valori dei singoli positivi TRS gamma e TRS beta che ai valori dei TRS gamma+beta sostanzialmente non cambia (Tabella XIV – b).

Si evidenzia che la maggior parte dei soggetti (98%) riporta l'occorrenza dei TRS nei limiti sopradescritti (inferiori o pari a 1/30.000 cellule linfoidi) ed anche quel 2% che possiede valori fino a 30 volte il limite fisiologico, è consistente con i valori di “outliers” riportati per la popolazione pre impiego.

Le differenze appaiate mostrano, per le tre serie di misure, valori addirittura inferiori al rientro in Italia (T1) rispetto alla partenza (T0), seppure non significativi. In Tabella XIV - a e Tabella XIV - b sono riportati i valori assoluti e la loro distribuzione per TRS x milione di cellule linfoidi.

Anche nel caso di analisi multivariate, prendendo in considerazione il possibile aumento dei TRS fra andata (T0) e ritorno (T1) con varie condizioni come il consumo di cibo (frutta, verdura), alcool, fumo di sigarette, ecc. non si hanno aumenti o diminuzioni significative dai fisiologici livelli di TRS.

Per quanto riguarda i valori dei TRS messi in relazione al numero delle vaccinazioni, anche se statisticamente costituiscono una sottopopolazione trascurabile, non si osservano differenze significative tra pre-impiego che post-impiego.

---

Hanno contribuito alle attività di questa Unità operativa:

Magg. co. ing. Nino D'Amore  
1° Mrs. Carlo Battista  
App. CC. Giovanni Spataro  
Riccardo De Santis  
Lavinia Stefanini

**Bibliografia generale**

Allam A, Kabelitz D. TCR-trans-rearrangements: Biological Significance Antigen Recognition vs the role as Lymphoma Biomarker. *J Immunol.* (2006) 176: 5707-12;

Bassing CH, Swat W, Alt FW. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* (2002) 109 Suppl: S45-55;

Lista F, Bertness V, Guidos C J, Danska JS, Kirsch IR. The absolute number of trans-rearrangements between the TCRG and TCRB loci is predictive of lymphoma risk: a severe combined immune deficiency (SCID) murine model. *Cancer Res.* (1997) 57: 4408-13;

Kirsch IR, Lista F. Transrearrangements as biomarkers for risk of lymphoid malignancy. *Cancer Surv.* (1996) 28: 311-27;

Lipkowitz S, Stern M.H, Kirsch I.R. Hybrid T cell receptor genes formed by interlocus recombination in normal and ataxia-telangiectasis lymphocytes. *J Exp Med.* (1990) 172: 409-18;

Lipkowitz S, Garry VF, Kirsch I.R. Interlocus V-J recombination measures genomic instability in agriculture workers at risk for lymphoid malignancies. *Proc Natl Acad Sci USA* (1992) 89: 5301-5;

Abdallah JM, Lombardi DP, Kirsch I.R. Genetic instability in patients with Hodgkin's disease undergoing chemotherapy. *J Clin Invest.* (1995) 96: 2744-7.

**XV. VALUTAZIONE AMBIENTALE DELLE POSSIBILI FONTI DI ESPOSIZIONE**

---

Contributo a cura dell'Ufficio Medical Situation Awareness  
dello Stato Maggiore Difesa RIS-CII:

Col. CSArn Vincenzo LA GIOIA  
GM (San) Onofrio ZACCARIA

## 1. Dati ambientali

### a. Caratteristiche naturali ed antropiche dell'ambiente operativo. Generalità.

L'area di An Nasiriyah, nella provincia meridionale irachena di Dhi-Qar, è stata la sede del contingente nazionale dispiegato, con rotazioni grossolanamente quadrimestrali, nel contesto dell'Operazione "Antica Babilonia", che ha avuto inizio alla metà del luglio 2003, giungendo a termine nel corso del mese di dicembre 2006.

Tutta l'area, attraversata dall'ansa del fiume Eufrate, in corrispondenza della città di An Nasiriyah, risulta in prevalenza pianeggiante e desertica, a seguito del prosciugamento antropico della vicina grande Palude centrale, avvenuta durante il regime di Saddam Hussein, con grande impatto negativo sulla biodiversità ambientale, trattandosi di un'area di stazionamento e transito di fauna selvatica.

### b. Zone di interesse

La topografia delle zone d'interesse presenti nell'area periferica di An Nasiriyah è riportata nel rapporto di fotoannotazione, prodotto dallo Stato Maggiore della Difesa, Reparto Informazioni e Sicurezza (Annesso VI).

#### 1) Aree di dispiegamento

Per la gran parte delle forze di terra l'area di stazionamento è stata, all'incirca fino alla seconda metà del 2004, il campo denominato "White Horse" (coordinate 30°59'40" – 31°00'00"N; 46°12'00" – 46°12'20"E), alla periferia sud a circa 2 km dalla città di An Nasiriyah.

Questa sede è stata quindi progressivamente abbandonata dal contingente nazionale, nella seconda metà del 2004, con correlato spostamento degli uomini a sud-ovest, nel nuovo "Family quarter" denominato "Camp Mittica", prospiciente l'aeroporto di Nasiriyah

(coordinate 30°57'00" – 30°57'40"N; 46°06'55" – 46°08'00"E), fino alla fine dell'Operazione.

Il compound di "White Horse" è stato ceduto alle Forze Armate irachene, per venire incontro alle esigenze logistiche militari del Paese ospitante, oltre che per ottenere l'incremento delle distanze di sicurezza del compound dai siti industriali di maggior rilievo, in armonia con il vigente STANAG 2909<sup>9</sup>.

L'area occupata da Camp Mittica si trova a nord-est dell'aeroporto di Tallil e a sud-ovest di una zona occupata da numerosi bunker che ospitavano munizionamento ed altri armamenti (vds Deposito munizioni iracheno)

## 2) Aree di rischio potenziale

- CENTRALE TERMOELETTICA

In un quartiere sud-occidentale urbano della città di An Nasiryah era presente una centrale termoelettrica, a circa 4.3 km a nord dell'area di "White Horse", e circa 11.2 km a nord-est di "Family Quarter" (coordinate 31°02'05" – 31°02'20"N; 46°11'05" – 46°12'00"E). Tale centrale, alimentata ad olio pesante, operava – all'epoca del dispiegamento – su quattro gruppi combustori alimentabili anche con gas naturale, sviluppando mediamente una produzione elettrica dell'ordine di 14.000 MWh, in condizioni di sicurezza generalmente accettabili. Gli scarichi dei gruppi combustori erano collegati a due camini di emissione in atmosfera di altezza pari a circa 100 metri.

- RAFFINERIA

Nell'area suburbana di An Nasisiryah era presente una raffineria, funzionante nel periodo 2004 – 2005, a distanza di 1.8 km est dal

---

<sup>9</sup> Commanders guidance on defensive measures against Toxic Industrial Chemicals (TICs) ( 1 – 5 km, fino a 50 ton rilascio)

compound di “White Horse” e a circa 10,1 km da “Family Quarter” (Camp Mittica).

La raffineria era costituita da:

- a) tre gruppi di produzione (di cui, all’epoca, solo uno risultava operativo al 60-70% della capacità nominale produttiva),
- b) serbatoi di stoccaggio, di capacità pari alcune decine di migliaia di metri cubi di derivati petroliferi,
- c) tubazioni varie,
- d) impianti tecnologici vari (camino di scarico con fiamma pilota) ed un impianto per la produzione di benzina ad alto numero di ottani (con piombo).

Le attività di raffinazione, effettuate in condizioni di sicurezza inferiori a quelle occidentali, risultavano dedicate alla produzione di derivati petroliferi quali:

- “*reduced crude oil*”, destinato alla vicina centrale termoelettrica, per la produzione di corrente elettrica;
- cherosene;
- gasolio;
- nafta pesante, destinata alle esigenze interne alla raffineria (riscaldamento e condizionamento dei fluidi di processo);
- nafta leggera, destinata alla produzione di benzina ad elevato numero di ottani, ottenuta miscelando la nafta leggera con piombo tetraetile (TEL<sup>10</sup>), componente ad altissima tossicità per gli esseri viventi, stoccato in raffineria in quantitativi variabili fra 2 e 15 barili (ognuno da 360 kg).

I sopralluoghi effettuati hanno rilevato la presenza di significative quantità di prodotti industriali potenzialmente tossici in caso di rilascio accidentale o attentato terroristico.

- DEPOSITO MUNIZIONI IRACHENO (coordinate 30°56’20”-30°58’20”N; 46°08’20”-46°11’20”E)

---

<sup>10</sup> TetraEthylLead

Si trattava di una vasta area, a circa 8 km a sud-ovest dell'abitato di Nassiryah e a 5.9 km a sud-ovest di "White Horse", relativamente vicina all'aeroporto di Tallil ed al "Family Quarter" di Camp Mittica, distante meno di 3.5 km ad ovest, disseminata di riserve e strutture di deposito. Il deposito munizioni veniva anche utilizzato dal contingente nazionale per il brillamento di ordigni inesplosi mediante allestimento dei c.d. "fornelli".

- SITO DI INCENERIMENTO (indicato come "INCENERITORE") IN SEDIME AEROPORTO DI TALLIL (coordinate 30°55'40"-30°55'50"N; 46°05'45"-46°06'15"E).

Si tratta di un sito (fossa) per l'incenerimento grossolano di rifiuti collocato all'interno del sedime aeroportuale, in prossimità del recinto orientale dell'aerodromo, a poche centinaia di metri dal vertice settentrionale, distante circa 11 km sud-ovest di "White Horse" e 2.8 km ovest di Camp Mittica.

- SITO DI BRILLAMENTO UXO<sup>11</sup> IN SEDIME AEROPORTO DI TALLIL (coordinate 30°54'15"-30°55'00"N; 46°05'45"-46°06'15"E).

All'interno del sedime aeroportuale, in prossimità del vertice sud-orientale era individuato un sito per il brillamento di ordigni inesplosi. Tale sito è posizionato a circa 14 km a sud-ovest di "White Horse" e a 5.6 km a sud-ovest di Camp Mittica.

- DEPOSITO CARBURANTI (coordinate 31°00'15"-31°00'35"N; 45°16'00"-45°16'25"E)

In prossimità dell'autostrada denominata denominata "Alternative Supply Route (ASR) Appia", in prossimità dell'incrocio con l'autostrada denominata "Dallas", a sud-est dell'abitato di An Nasiryha e a circa 6 km a est di "White Horse", era sito un deposito di carburante, che, originariamente costituito da 13 cisterne per lo

---

<sup>11</sup> UneXploded Ordnance

stoccaggio di prodotti petroliferi, in esito agli eventi operativi presentava 6 residue cisterne, della capacità di alcune decine di migliaia di metri cubi, totalmente o parzialmente integre.

- AREA CARRI NEL QUARTIERE AL KABLUAT

Nelle vicinanze dell'autostrada (ASR) n. 8 "Dallas", erano reperibili tre relitti di carri armati iracheni, probabilmente utilizzati e colpiti durante la prima guerra del Golfo.

Di questi tre relitti, due, rispettivamente a nord e sud di quello centrale, non risultavano colpiti da munizionamento a DU, mentre quello centrale (31°00'41"N; 46°15'49"E), arenato su un terrapieno artificiale aperto da un solo lato, riportava evidente contaminazione dovuta a 2 colpi di proiettili anticarro in lega DU, pur non essendo esploso dopo il bersagliamento (il carro era probabilmente non operativo o privo di proiettili o combustibili al momento del bersagliamento). Il terreno circostante era argilloso e in parte sabbioso, presentando solo verso nord vecchie coltivazioni di palma da datteri. Il sito, nonostante le segnalazioni di pericolo, era meta di attività locali di recupero di materiale ferroso, mediante impiego di fiamma ossidrica ed asportazione di parti dei carri. Il carro contaminato, presentante i fori di ingresso dei proiettili (anteriore e posteriore), risultava infatti privo di parti interne e di motore, già rimossi abusivamente (fotografia di seguito riportata).



In relazione alla citata attività illegale, i due carri non contaminati risultavano essere stati completamente rimossi alla successiva data di marzo 2006.

L'hot spot contaminato da DU risultava sito a 5.9 km est di "White Horse" e circa 14.6 km nord-est-est di Camp Mittica ("Family Quarter"). Tali dati di contaminazione da DU coincidevano con quelli in possesso delle Autorità locali irachene.

- DEPOSITO DI RELITTI DI CARRI ARMATI IRACHENI (31°00'04"N; 46°11'41"E)

A circa 380 m ad ovest del compound "White Horse" (e circa 9 km nord-est di Camp Mittica), era presente una piccola area di deposito di relitti di quattro carri armati iracheni e veicoli militari, sistemati in terrapieni artificiali, in prossimità di una torre idrica. Nessuno dei carri, fra le decine di quelli controllati nella provincia, è risultato positivo per contaminazione da DU.

## 2. Monitoraggio della contaminazione chimica, fisica e biologica nell'ambiente operativo.

I dati inerenti a tali attività, prodotte dal 7° Reggimento “Cremona” Difesa NBC di Civitavecchia e dal Centro Tecnico Logistico Interforze NBC di Civitavecchia – in possesso del Comando Operativo di vertice Interforze – e dal Centro Studi e Applicazioni Militari di S. Piero a Grado (Divisione Protezione Ambientale), sono stati resi disponibili per il tramite del coordinatore del progetto “SIGNUM”, C.A. Mario Tarabbo.

A far data dalla immissione in Te. Op. della prima aliquota del cd. “advanced party”, nel giugno 2003, e fino alla chiusura, nel dicembre 2006 dell’Operazione “Antica Babilonia”, il monitoraggio per l’identificazione di rischi ambientali significativi, soprattutto di natura chimica, fisica e biologica nell’area di responsabilità nazionale (AOR<sup>12</sup>) nel teatro iracheno e stata condotta dalla unità di una Compagnia difesa NBC<sup>13</sup>, dotata di strumentazioni portatili, di un laboratorio campale di analisi per l’identificazione di agenti biologici e chimici, campionati in loco, nonché di attrezzature per la delimitazione e decontaminazione.

A questa unità, supportata da risorse del “7° RGT NBC Cremona” di Civitavecchia, sono stati periodicamente affiancati team, a peculiare qualificazione nel settore chimico e radiologico, supportati rispettivamente dal Centro Tecnico Logistico Interforze NBC di Civitavecchia (CeTLI) e dal Centro Interforze Studi e Applicazioni Militari (CISAM) di S. Piero a Grado, allorquando il Comando Operativo di vertice Interforze, responsabile del controllo operativo delle attività in teatro, ritenesse necessario disporre di peculiari tipologie di controllo o verifica per una più precisa mappatura dei rischi ambientali presenti nell’area.

Il personale di questi Centri, peraltro, ha potuto avvalersi delle sofisticate attrezzature analitiche presenti in Madrepatria (*reach-back capabilities*), effettuando spesso in loco soltanto campionamenti mirati da sottoporre ad analisi al rientro in Italia.

---

<sup>12</sup> Area of Responsibility

<sup>13</sup> Nucleare Biologica Chimica

Le attività condotte ed i risultati ottenuti sono riportati nella documentazione allegata:

- documenti vari su attività di campionamento e monitoraggio CBRN ed ambientale in “Operazione Antica Babilonia” (“7° RGT NBC Cremona”; CeTLI, CISAM). Files in formato elettronico su supporto informatico allegato al presente rapporto (Allegato “C”);
- documentazione “IRAQ” 2003-2006 – Parte A e Parte B area di An-Nasiriyah. (CISAM). Annesso VII ed Annesso VIII;
- documentazione “Utilizzo di campionatori alternativi per il controllo della radioattività nel particolato atmosferico. (attività sperimentale)”. (CISAM). Annesso IX.

I controlli sono stati eseguiti in modo concentrico centrifugo, a far vertice dai “compounds” dei campi stanziali delle truppe nazionali e dall’abitato di An Nasiriyah, per poi allargarsi alle aree più periferiche della provincia di Dhi-Qar.

I siti esaminati sono stati quelli preliminarmente individuati per la presenza di relitti militari (risalenti alla 1<sup>a</sup> o 2<sup>a</sup> Guerra del Golfo) o con evidenti segni di impatto di munizionamento cinetico (DU), depositi veri o sospetti di aggressivi NBC di guerra, nonché fabbriche, ospedali, laboratori, raffinerie, centrali elettriche, depositi, aree di brillamento di munizioni, per la identificazione di eventuali rischi ROTA<sup>14</sup> (sostanze o agenti rilasciati accidentalmente nell’ambiente in conseguenza o in coincidenza con attività operative), includenti i materiali tossici industriali (TIM<sup>15</sup>), inclusi i composti organici volatili (idrocarburi e derivati aromatici e alifatici), il piombo tetraetile (TEL), le polveri aerodisperse, e le sorgenti di LLR<sup>16</sup> (radiazioni a bassa intensità).

I campioni, periodicamente prelevati secondo procedure previste dai manuali NATO SIBCA<sup>17</sup> e SIRA<sup>18</sup>, nonché IAEA 1092, hanno riguardato le seguenti matrici ambientali e non:

- terreno (top soil), polveri, ceneri, residui solidi, sedimenti fluviali;

---

<sup>14</sup> Release Other Than Attack

<sup>15</sup> Toxic Industrial Materiel

<sup>16</sup> Low Level Radiation

<sup>17</sup> AEP-10 NATO Handbook for sampling and identification of Biological and Chemical Warfare Agents;

<sup>18</sup> AEP-49 Sampling and identification of radiological agents.

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

- acque superficiali e piovane;
- acque destinate al consumo umano;
- fanghi;
- matrici vegetali: licheni e cortecce di albero (capaci di bioaccumulare selettivamente alcuni radionuclidi), erba, radici;
- contaminazione superficiale asportabile (smear test);
- aria (particolato e nanoparticolato atmosferico), campionata con “Air Volume Totaliser” mod H-810;
- aria, utilizzando per la prima volta come “campionatore massivo” di aria, n. 2 filtri aria motore di autoveicoli militari impiegati nel Te. Op. iracheno nel periodo in esame, con percorrenze medie individuali di circa 500 km prima dell’esame, ammettendo – a titolo di maggiore tutela – fattori di risospensione della contaminazione sul terreno pari a  $10^{-3}$ .

Per quanto riguarda l’eventuale contaminazione riferita alla catena alimentare, il competente servizio veterinario militare in Iraq, in armonia con quanto previsto nel Regolamento sul Servizio Veterinario Militare<sup>19</sup>, effettuava la verifica delle derrate di competenza in arrivo dall'Italia le quali, se provenienti da Paesi Terzi, avevano già subito una verifica sanitaria di rispondenza ai parametri sanitari comunitari all’ingresso in Europa presso i Posti di Ispezione Frontaliera (PIF), risultando pertanto “comunitarizzate”.

Non esistevano nel corso dell’operazione “Antica Babilonia” canali di approvvigionamento diversi da quelli nazionali. Non si è ritenuto pertanto procedere ad accertamenti mirati a rilevare peculiari stati di contaminazione ambientale per il tramite di analisi delle derrate alimentari.

Per l’identificazione di sostanze chimiche volatili, i campioni sono stati prelevati mediante fiale di vetro caricate con materiale adsorbente carbonioso e di membrane filtranti di materiale inerte (fibra di vetro).

All’interno dei “compound”, estremamente estesi, i punti di prelievo sono stati scelti in modo da assicurare la migliore rappresentatività della concentrazione media dei contaminanti eventualmente presenti.

---

<sup>19</sup> ILE - NL - 4210 - 0023 - 12 - 00B01 ed. 2000

## INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE

I campioni sono stati sottoposti alle analisi con le strumentazioni (tarate sotto supervisione di CISAM e CeTLI) di seguito indicate:

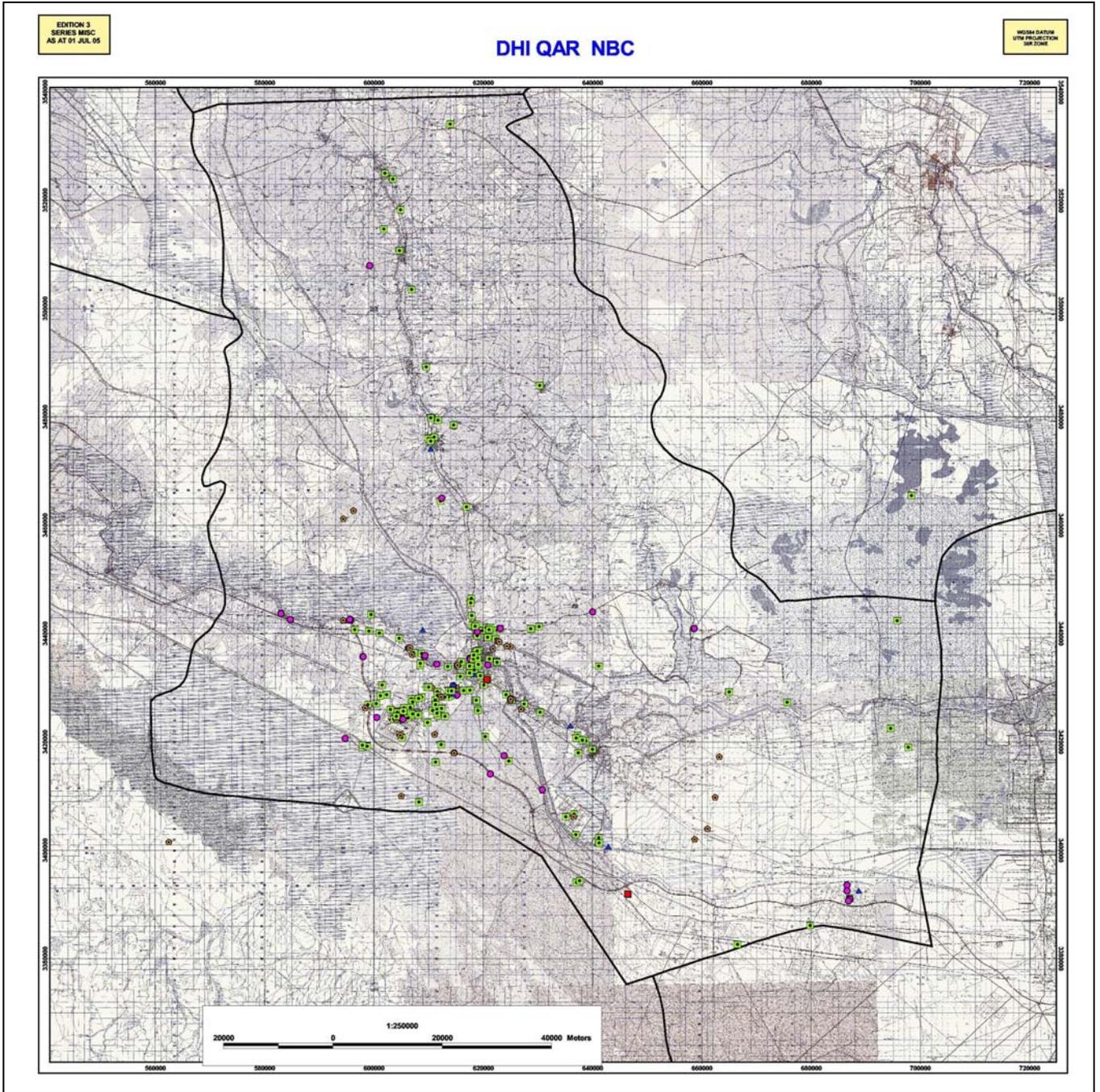
- contatori campali geiger del tipo “pancake”, ROTEM RAM GENE-1, per rilevare irraggiamenti  $\geq 0.2 \mu\text{Sv/h}$ ;
- spettrometria gamma campale (field spect);
- radiometro campale polivalente con sonda gamma-beta e sonda speciale alfa (ANPDR/77);
- spettrometria gamma da banco, con rivelatori a Ge iperpuro, finalizzata a valutare le concentrazioni dei radioisotopi presenti (ad esempio U, Cs, Co, Th, K) e determinare la eventuale presenza di DU, con sensibilità fino a 3 Bq/kg;
- spettrometria gamma a basso fondo, con rivelatori a Ge iperpuro, accoppiata a rivelatori plastici per la radiazione beta, finalizzata alla radiometria su filtri aria (n. 2) di motori ai autoveicoli militari impiegati in Te. Op. iracheno, per rilevare radionuclidi della catena di decadimento di U ( $^{238}\text{U}$ ,  $^{235}\text{U}$  e  $^{232}\text{Th}$ ), nonché  $^{40}\text{K}$  (radioisotopo naturale) e  $^{137}\text{Cs}$  (radioisotopo artificiale) presumibilmente in modo uniforme sul terreno;
- apparati da banco per la determinazione delle attività alfa e beta totali su filtri da campionamento di particolato e campioni vegetali (ALBA, con efficienza per radiazione beta= 32%; NT200, con efficienza per radiazione beta = 15%);
- gascromatografo interfacciato a spettrometro di massa, da banco, per l'individuazione di sostanze chimiche tossiche (modello Polaris-ThermoFinnigan);
- spettrometria campale a mobilità di ioni per il monitoraggio di agenti chimici e di guerra, nonché tossici industriali (CAM);
- pompa Draeger multi gas detector mod 21/23, con motor fuel detector, gasoline detector, trichloroethylene detector, toluene detector ISO 9001;
- fluorescenza a raggi X (XRF) con spettrometro, da banco, per l'identificazione di elementi chimici;
- test strips immunoenzimatici per l'identificazione provvisoria di agenti biologici;

- deposimetri per micro-nanoparticelle;
- PCR-realttime (Rapid) per l'identificazione biologica di conferma;
- microscopia elettronica a scansione ambientale (ESEM)<sup>20</sup> accoppiata con microanalisi a raggi X.

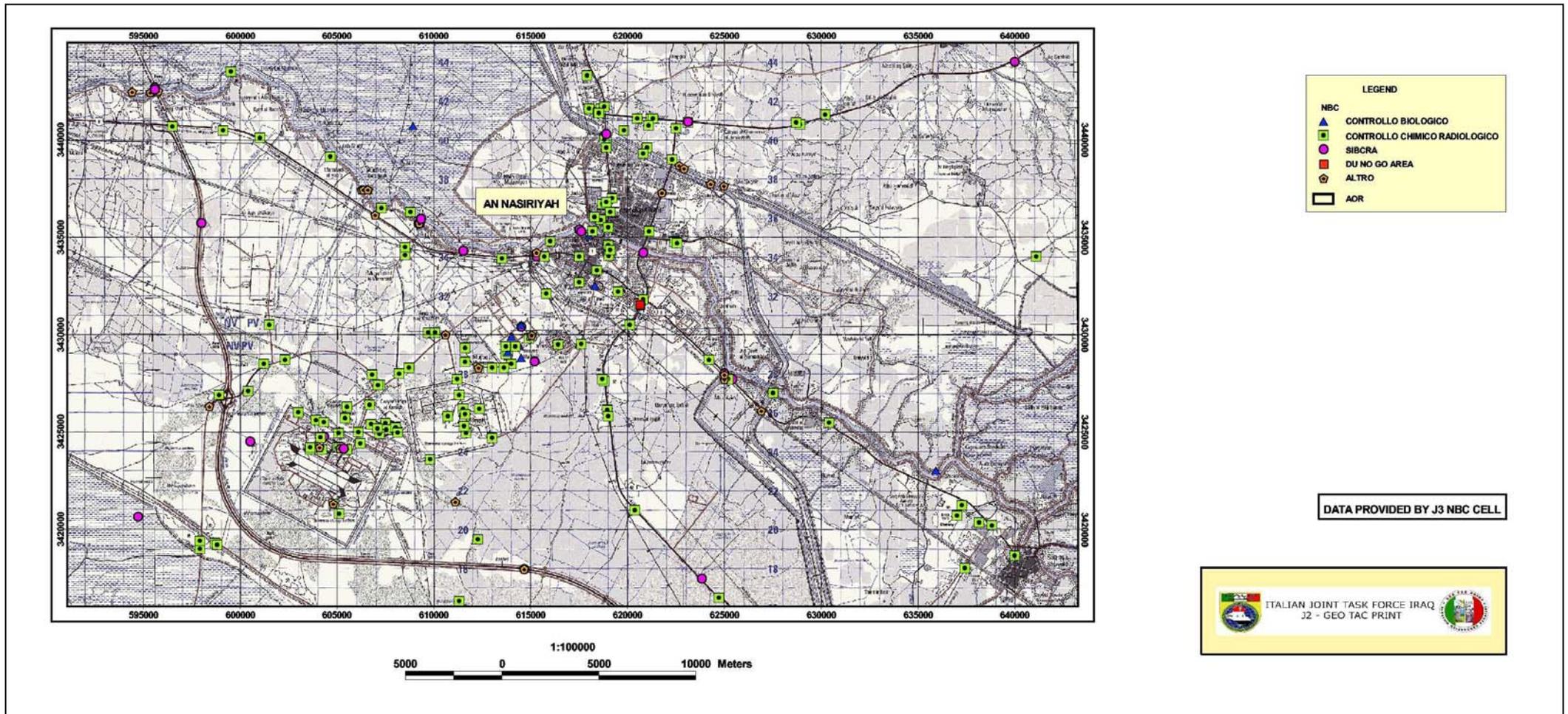
Alla data di luglio 2005 (in prossimità, quindi, del rientro definitivo in Italia del contingente nazionale campionato per il progetto "SIGNUM"), i siti presso i quali risultano essere state effettuate attività di campionamento e le conseguenti analisi ritenute necessarie, per alcune o tutte le matrici segnalate, a far data dal giugno 2003, sono riportati nelle mappe di seguito riportate.

---

<sup>20</sup> Eseguita da Nanodiagnosics srl., su mandato della Commissione parlamentare di inchiesta sui casi di morte e gravi malattie che hanno colpito il personale militare italiano nelle missioni internazionali di pace, nel corso della XIV Legislatura.



INFORMAZIONI NON CLASSIFICATE CONTROLLATE



### 3. Risultati del monitoraggio ambientale radiologico, chimico e biologico.

Dai risultati del monitoraggio è emerso che, in un'area di 15 km circostante i campi delle truppe nazionali ("White Horse", "Camp Mittica"), includente l'abitato di An Nasiriyah, **solo un sito presentava contaminazione da munizionamento a DU.**

In dettaglio, si tratta del sito corrispondente ad un relitto di tank iracheno, di costruzione sovietica, un T-55, colpito da 2 proiettili anticarro in lega DU, di tipo APFSDS (10 kg complessivi), con coordinate 31°00'41"N; 46°15'49"E, sezionato in più parti con fiamma ossidrica e progressivamente spogliato da componenti strutturali da parte della popolazione locale, nonostante le segnalazioni apposte dal personale italiano, indicanti il rischio radiologico dell'area (DU NO GO AREA).

Il relitto del carro presentava i fori di ingresso/uscita dei proiettili, sbrecciati, sulla torretta, in prossimità del cannone e posteriormente. I valori di contaminazione, limitata ai fori (soprattutto di ingresso), sono risultati alcune (2) decine di volte superiore al fondo ambientale (50-500 Bq/cm<sup>2</sup>).

Il carro inoltre conteneva al suo interno terriccio, ruggine, fango e frammenti metallici o di ossidazione contaminati con DU, con attività specifica da 2 a 5 volte (20 Bq/cm<sup>2</sup>) superiore al fondo naturale.

All'esterno del relitto i rilievi effettuati su campioni di terra superficiale hanno evidenziato valori inferiori al "fondo" strumentale, anche se non si poteva escludere che la terra al di sotto dello scafo potesse risultare contaminata in misura paragonabile al materiale presente al suo interno.

Utilizzando un modello di simulazione<sup>21</sup> per risospensione del pulviscolo, è stato valutato come comunque il transito giornaliero sulla contigua ASR "Appia", non comportasse rischi particolari (e, conseguentemente, necessità di specifiche protezioni) per il personale in transito, potendo la risospensione nel peggiore dei casi non superare un fattore 1/1000.

Tutti gli altri siti, sedi di campionamento e monitoraggio, inclusi i "compounds" ove le truppe nazionali risiedevano ("White Horse" e "Camp Mittica"), non

---

<sup>21</sup> Programma Hot-Spot (LLNL, USA)

presentavano tracce di contaminazione da DU per quanto rilevabile con le attrezzature impiegate.

In queste ultime aree le misure del rateo di Kerma in aria e di intensità di dose, in vari punti del suolo o per contatto con superfici di muratura, hanno evidenziato valori indistinguibili dal “fondo naturale” ( $< 0.2 \mu\text{Gy/h}$ ), peraltro non difforme da quello rilevato in Italia.

Non sono state rilevate contaminazioni ambientali da agenti biologici critici o bellici.

Per quanto riguarda la contaminazione da sostanze organiche volatili, soprattutto correlabili alla centrale termoelettrica ed alla raffineria, allocate in prossimità di “White Horse”, mentre le misure dirette di emissione gassosa condotte con strumentazione campale (Draeger) non hanno evidenziato valori al di sopra del limite di sensibilità delle strumentazioni, le indagini analitiche da banco (eseguite dal CeTLI) hanno mostrato come – in talune condizioni meteo (vento dalla raffineria verso il compound) – nella base italiana fosse rilevabile la presenza di tracce di idrocarburi (sia alifatici che aromatici, in particolare benzene, toluene, xileni e alchilbenzeni) in quantità  $\leq 1 \mu\text{g/m}^3$ , comunque – anche in queste condizioni – tale da non superare i limiti ammessi dalla vigente normativa nazionale per la popolazione civile.

Le indagini condotte presso il “Family Quarter” di Camp Mittica, assai più distante dai siti industriali rispetto a “White Horse”, non hanno evidenziato invece alcun tipo di inquinamento industriale.

In entrambi i compounds, inoltre, è stata esclusa la presenza di Cloro ed Ammoniaca in concentrazioni rilevabili con i sistemi in uso.

I rilievi ambientali del micro-nanoparticolato in prossimità dei “fornelli” di brillamento di ordigni inesplosi sono stati effettuati successivamente al dicembre 2005 ed hanno evidenziato particelle di diametro compreso fra 150 – 0.1 micrometri, contenenti Sr, C, S, Fe, Si, Pb, Zr, nonché Au, Ag, Hg, anche in scala nanometrica ed aggregata a 100 m di distanza sottovento dal sito di esplosione (200 kg esplosivo ad alto potenziale). Simili particelle (contenenti Fe, Pb, Si, Zr), nonché particolato più fine (80 – 0.1 micrometri) contenente Cu, Cd, Ni e sferule nanometriche, sono state campionati in quantità significativamente

inferiore anche a 200 m di distanza sottovento. Il campionamento a 300 m di distanza ha evidenziato particelle mediamente più piccole (50 – 1 micrometri) e assai più rade, non essendo rilevabili nano particelle. Tali dati evidenziano come la concentrazione di nanoparticelle sia da ritenersi elevata nelle adiacenze ai siti di esplosione, riducendosi significativamente a breve distanza dal medesimo.

Anche i risultati della radiometria eseguiti sui filtri aria motore di autoveicoli militari impiegati nel Te. Op. nel medesimo periodo (percorrenze medie di 500 km), ipotizzando – per maggiore sicurezza – la risospensione della eventuale contaminazione sul terreno con fattori pari a  $10^{-3}$ , non ha rilevato presenza di radioisotopi della catena di decadimento di U, né radioattività ambientale di livello significativo riferibile ad altri radionuclidi.

Questa metodica innovativa, mai utilizzata in precedenza, sfrutta i citati filtri come *prelevatori massivi* di particolato aerodisperso – raccomandati per il controllo della radioattività ambientale a maglia larga. Essa merita di essere affinata non solo per la rilevazione fisica ma anche per quella chimica, potendo costituire uno strumento quanto mai fedele per integrare – per un definito periodo di tempo e per una determinata area – le caratteristiche del particolato inalato da una popolazione residente nei Te. Op., dove non sempre le situazioni operative consentono controlli ambientali dedicati.

#### 4. Fattori ambientali concorrenti – Aspetti meteo-climatici.

A cura del Centro Nazionale di Meteorologia e Climatologia A.M. (CNMCA) di Pratica di Mare è stato sviluppato uno studio inerente alla valutazione degli aspetti meteo-climatici concorrenti ad una migliore definizione del rischio ambientale (Annesso X).

Lo studio testimonia come il contributo della *smart climatology* possa risultare essenziale per la migliore definizione della *situation awareness* e per l'analisi del rischio in scenari d'interesse nazionale.

In particolare sono stati presi in considerazione gli aspetti inerenti a:

- irraggiamento solare nel periodo di dispiegamento nell'area di An Nasiriyah del contingente nazionale reclutato per lo studio;
- venti prevalenti nel medesimo periodo, in riferimento alle potenziali fonti di rischio ambientale e alle aree-bersaglio, costituite dai "compounds" nazionali ("White Horse" e "Family Quarter").

Dallo studio si evidenzia che:

- l'energia radiativa solare incidente alla quale i militari del contingente nazionale dispiegato fra il mese di agosto 2004 e il mese di febbraio 2005 sono stati esposti nella provincia di Dhi-Qar (con peculiare riferimento alle basi di "White Horse" e "Family Quarter") era notevolmente superiore a quella alla quale risultava esposta la popolazione italiana residente in Italia centrale (riferimento geografico: Vigna di Valle, Roma). Nel dettaglio veniva a cumularsi una differenza totale di energia radiativa (da agosto 2004 a marzo 2005) pari ad oltre 380 kW/h, soprattutto sostenuta dai mesi di ottobre, novembre e dicembre 2004;
- il vento prevalente, per tutto il periodo in esame, aveva una provenienza Nord-Ovest – il c.d. vento "Shamal" del Golfo Persico – facendo sì che entrambi i Compounds risultassero sopra-vento a tutti i siti, fonte di potenziali "hazards" industriali od operativi, identificati nel raggio di 15 km dalle basi medesime.

## **XVI. CONCLUSIONI**

### **1. *Xenoelementi***

I risultati dello studio hanno evidenziato una significativa riduzione della concentrazione totale di uranio campionata nelle urine e nel siero nel periodo post-missione (T1) rispetto al periodo pre-impiego (T0), sia nella popolazione nella sua interezza sia nelle diverse categorie di impiego. I livelli di concentrazione totale di U misurati nel gruppo in studio sono risultati estremamente ridotti, al punto di rendere impossibile – nelle urine e nel siero – l'esame analitico del rapporto di specie isotopica. Tali concentrazioni non supportano ragionevolmente l'ipotesi di un'esposizione a uranio impoverito durante il periodo di missione in esame. L'analisi dei campioni di capelli, non utilizzabile a causa dei pochi campioni disponibili, ha dimostrato però la validità di questo materiale biologico come bioindicatore dell'esposizione a U a basse concentrazioni totali.

Per quanto riguarda gli altri xenoelementi investigati, modesti incrementi statisticamente significativi sono stati osservati nelle concentrazioni di Cd, Mo, Ni, e Zr, mentre decrementi, parimenti statisticamente significativi, sono stati osservati per As, Pb, W e V. Tali variazioni, di limitata importanza sotto il profilo tossicologico (i livelli medi e mediani di concentrazione riscontrati rientrano all'interno degli intervalli riportati nella letteratura come normali per popolazioni non esposte professionalmente), possono essere plausibilmente ascritte a cambiamenti nelle abitudini di vita tra le condizioni di pre-impiego e quelle di post-impiego. In particolare gli incrementi riscontrati per Cd, Mo e Ni sono risultati positivamente correlati con il consumo di verdura e/o frutta.

Anche nei soggetti che hanno evidenziato gli incrementi più marcati di concentrazione di xenoelementi non si sono rilevate associazioni con variazioni di frequenza dei marcatori di effetto biologico precoce.

## **2. Addotti e stress ossidativo**

Nella popolazione in studio l'attività in teatro operativo non è risultata costituire di per sé variabile tale da determinare incremento significativo della quantità di addotti al DNA. I risultati ottenuti indicano che nessuna esposizione a specifici inquinanti si verifica in teatro operativo tale da avere influenza sui biomarcatori esaminati. Alcune attività connesse con l'esecuzione della missione (attività di pattugliatori e vaccinazioni in numero maggiore di 5 o con vaccini vivi attenuati) aumentano i livelli di carico ossidativo sul DNA linfocitario. Il fenomeno ha origine endogena ed è maggiore nella piccola frazione della popolazione esaminata geneticamente suscettibile (4% circa). Tale situazione costituisce presumibilmente un fenomeno adattativo al carico funzionale indotto nel linfocita rispettivamente dall'attività psico-fisica correlata all'attività di pattugliatore, dalle condizioni climatiche ed al conferimento di immunità protettiva specifica indotta dai cicli vaccinali.

## **3. Micronuclei**

I valori medi delle frequenze di cellule micronucleate nella popolazione in studio - sia nel campionamento pre-impiego (T0) che nel post-impiego (T1) - sono compresi nell'intervallo di valori riportati per popolazioni non occupazionalmente esposte di pari età e sesso.

Il confronto delle frequenze di BNMN osservate nella popolazione totale a T0 e T1 rivela un aumento significativo a fine missione pari al 18%. Tale incremento non è risultato associato al fototipo, abitudine al fumo, consumo di alcol. Altri fattori concomitanti, quali il numero e la tipologia delle vaccinazioni effettuate dal 2003, appaiono associati ad una maggiore frequenza di BNMN anche se questa osservazione si riferisce a sottogruppi di scarsa numerosità e non permette di trarre conclusioni definitive sulla causalità di questo risultato.

Incrementi maggiori sono stati osservati nei gruppi che svolgevano prevalentemente attività esterna. Le analisi stratificate per sottogruppi di soggetti in riferimento alle attività svolte nel Te. Op., alla sede della missione ed al numero di missioni effettuate rivelano incrementi maggiori in alcune categorie

(conduttori, pattugliatori e trasmettitori). Gli aumenti osservati non sono caratterizzate dalla presenza di esposizione a specifici xenobiotici genotossici.

#### **4. *Aberrazioni cromosomiche in linfociti periferici***

I risultati delle indagini citogenetiche non supportano l'ipotesi che la permanenza in Te. Op. nel periodo in studio abbia incrementato la frequenza di aberrazioni cromosomiche. Al contrario la frequenza di rotture cromatidiche appare significativamente diminuita nella popolazione esaminata al termine del dispiegamento in area di operazioni (T1). Le cause di questa ridotta frequenza di danno cromosomico non sono chiaramente identificabili, anche se le variazioni dello stile di vita (es. dieta) potrebbero giustificare questo risultato.

#### **5. *Transriarrangiamenti V $\gamma$ - J $\beta$ in linfociti periferici***

La maggior parte dei soggetti esaminati (98%) riporta una frequenza di transriarrangiamenti nei limiti fisiologici (inferiori o pari a 1/30.000 cellule linfoidi). Il numero assoluto di transriarrangiamenti dopo la missione (T1) non presenta differenze statisticamente significative rispetto ai valori pre-impiego (T0), anche tenendo in considerazione la variazione di abitudini individuali (consumo di frutta, verdura, alcool, fumo di sigarette). Nel gruppo di soggetti che ha effettuato un elevato numero di vaccinazioni non sono state rilevate variazioni statisticamente significative né per frequenza di transriarrangiamenti né per l'entità della differenza fra pre-impiego (T0) e post-impiego (T1).

**XVII. CONCLUSIONI GENERALI**

I dati ottenuti non supportano la presenza in Te. Op. di esposizioni a fattori genotossici, nè la variazione conseguente della frequenza dei biomarcatori esaminati dallo studio. Tale conclusione è basata sui dati di chimica analitica che non rivelano differenze tossicologicamente rilevanti fra T0 e T1, ma anche sui livelli di addotti al DNA – metodica estremamente sensibile nel rivelare esposizioni a xenobiotici genotossici – non coerenti con eventuali esposizioni a fattori genotossici di natura non nota.

Lo studio SIGNUM è stato disegnato in modo da ottenere la massima sensibilità per identificare esposizioni ad agenti genotossici ed i conseguenti effetti biologici precoci. E' stato possibile infatti identificare nella popolazione in esame un significativo incremento delle alterazioni ossidative e dell'instabilità genetica al termine del periodo di impiego in Te. Op.. Gli incrementi osservati sono risultati maggiori in alcuni sottogruppi connotati da prevalente attività *outdoor*.

Questi incrementi non sono risultati associati a variazioni di esposizione ad agenti xenobiotici genotossici e, pertanto, non possono essere attribuiti a questa causa. Fra le ipotesi più probabili da prendere in considerazione vi sono le condizioni legate al rilevante carico psico-fisico e climatico a cui i partecipanti alla missione sono stati sottoposti.

L'elevata sensibilità dello studio ha permesso inoltre di confermare gli effetti fisiologici dell'invecchiamento oltre ad evidenziare gli effetti adattativi relativi all'intenso trattamento con vaccini.

Le alterazioni ossidative e la presenza di instabilità genetica (misurata tramite la frequenza di cellule micronucleate) sono eventi estremamente precoci nella storia naturale di diverse malattie. Come tali devono essere considerati alla stregua di "campanelli di allarme" in grado di segnalare una situazione potenzialmente evolutiva, usualmente controllata dai sistemi endogeni di riparazione. E' da considerare inoltre che gli incrementi osservati per entrambi i marcatori rientrano pienamente nei valori fisiologici per la

popolazione generale, per cui non appare evidente un rischio per la salute riferibile all'impiego nel Te. Op. in esame.

In sintesi, la *lesson learned* ricavabile dal progetto "SIGNUM" evidenzia come l'esposizione a xenobiotici non sia necessariamente un rischio prioritario cui viene esposto il personale militare dislocato in un Te. Op.. Gli incrementi osservati nei marcatori di alterazioni ossidative e di instabilità genetica indicano la presenza di condizioni, non ancora comprese, in grado di aumentare il rischio dell'attività operativa. Pertanto è sicuramente necessario approfondire la conoscenza in merito agli *stressors* riferibili a queste condizioni specifiche, esplorando in maggior dettaglio sia le condizioni operative che lo stile di vita durante tali missioni. Quest'obiettivo può essere perseguito sviluppando o applicando metodologie di indagine più specifiche. Infine, sebbene il rischio per la salute non sia tangibile, è ragionevole considerare l'opportunità di adottare misure preventive orientate a contrastare gli eventi genotossici precoci, sia tramite il ricorso a modifiche nelle abitudini di vita (dieta) o nelle condizioni in cui si svolge l'attività operativa medesima (fotoprotezione), sia valutando l'opportunità di impiego di trattamenti preventivi con agenti antiossidanti.

La conduzione di uno studio di coorte combinato con l'effettuazione di visite mediche e di accertamenti strumentali periodici pianificato nel protocollo dello studio SIGNUM (follow up trentennale), offre un ulteriore potenziale per evidenziare l'impatto su vari parametri sanitari della partecipazione del personale militare a missioni nel teatro operativo iracheno.