

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Ferri

**Modena, 28 Febbraio 2015**

## **REPORT FINALE**

### **TITOLO PROGETTO**

**“Valutazione di micro e nano particelle come possibili fattori causativi e/o prognostici nella sclerosi sistemica”.**

#### **1. INTRODUZIONE**

La Sclerosi Sistemica (SSc), è una malattia cronica del tessuto connettivo caratterizzata da alterazioni del sistema immunitario, disfunzione endoteliale ed accumulo di tessuto fibroso nella cute e negli organi interni, in particolare l'esofago, il tratto gastroenterico, i polmoni, il cuore e il rene. L'eziologia della SSc, ancora sconosciuta, è multifattoriale, ed è il risultato di una complessa interazione fra uno o più fattori ambientali e/o infettivi e una certa predisposizione genetica (1). Diversi studi epidemiologici hanno già dimostrato che l'aumento delle concentrazioni di particolato atmosferico sono legate ad un aumento di morbilità cardiovascolare, arteriosclerosi e mortalità per ischemia miocardica e infarto a breve termine (2). Il ruolo delle polveri sottili e ultrasottili di origine ambientale nella etiopatogenesi delle malattie è ancora ampiamente dibattuto. In virtù delle loro ridotte dimensioni, le micro e nano particelle (NPs) sono in grado di attraversare le barriere biologiche, penetrando nel corpo umano per inalazione, ingestione e via dermica; attraverso il torrente circolatorio e linfatico possono raggiungere molti organi e tessuti, compromettendone le normali funzioni. È stato dimostrato come la presenza di micro e NPs a livello polmonare e cutaneo possa innescare il rilascio di citochine e mediatori pro infiammatori, responsabili di danno endoteliale e/o fibrotico (3,4). Un recente studio ha dimostrato come particelle ultrasottili siano in grado di attraversare la barriera polmonare e diffondere rapidamente nella circolazione sistemica, esercitando effetti diretti sui vasi sanguigni e sul cuore, nonché sui componenti del sangue (5).

Le NPs, infatti, sono in grado di adsorbire sulla loro superficie proteine plasmatiche, formando un rivestimento chiamato “protein-corona”, che può influenzare la loro reattività biologica. Nel plasma umano, una tipica protein-corona si compone di proteine sieriche come albumina,

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Ferri

immunoglobuline, fibrinogeno e apolipoproteine. L'adsorbimento delle proteine del sangue su superfici inorganiche è dinamico: le proteine più abbondanti si legano per prime e vengono, in seguito, sostituite da proteine con maggiore affinità per quella superficie. A seconda della composizione della protein corona, l'internalizzazione delle NPs da parte delle cellule può avvenire tramite fagocitosi o endocitosi; una volta penetrate si possono accumulare in varie strutture cellulari. Molte delle proteine plasmatiche hanno caratteristiche opsonizzanti. La presenza di tali proteine sulla superficie delle NPs porta al riconoscimento, da parte del sistema immunitario, del complesso proteina-NPs (6) e all'attivazione dei fagociti professionali (7).

La silice ( $\text{SiO}_2$ ) è il principale fattore ambientale e occupazionale che produce anomalie nella risposta immunitaria. In letteratura sono presenti numerosi studi sulla correlazione tra esposizione occupazionale alla polvere di silice e lo sviluppo di SSc. Nel 1957, Erasmus ha segnalato una maggiore incidenza di sclerodermia in minatori d'oro sudafricani (8); negli anni '80 Sluis-Cremer ha rilevato che svolge un ruolo più significativo l'intensità dell'esposizione alla silice piuttosto che la sua durata (9), mentre nel '99 Parks ha suggerito che l'esposizione al silicio potrebbe essere un fattore di rischio per la SSc (10). Più recentemente, uno studio clinico ha descritto l'insorgenza di SSc variante cutanea limitata in un viticoltore che spesso filtrava i vini utilizzando terra di diatomee calcinate, composta per l'80-90% da silice (11). Le forme di SSc correlate probabilmente ad un'esposizione cronica alla silice sono state ritrovate con una maggiore incidenza nel sesso maschile (12), in conseguenza delle attività lavorative che espongono a questo tossico. In aggiunta, gli autoanticorpi anti-Topoisomerasi I si sono rivelati essere più frequenti nei soggetti sclerodermici maggiormente esposti al silicio (13); la produzione di questi anticorpi potrebbe essere innescata dalle particelle di silicio che sono in grado di agire come adiuvante del sistema immunitario.

Non è solo il silicio a determinare l'attivazione del sistema immunitario ma è stato dimostrato che anche altre NPs sono in grado di alterare la funzione immunitaria. Ad esempio, in uno studio del 2011 si è riscontrato che anche l'ossido di titanio poteva attivare sia la risposta innata che cellulo-mediata, provocando la stimolazione a lungo termine dei linfociti T  $\text{CD4}^+$  e  $\text{CD8}^+$  (14). In aggiunta, uno studio recente di Taccola e colleghi ha riportato che NPs di ossido di zinco potevano avere un'azione citotossica selettiva sulle cellule immunitarie proliferanti (15). Nonostante i numerosi lavori pubblicati sul possibile ruolo delle NPs nella genesi di alcune malattie, ad oggi non sono mai stati eseguiti studi sui valori quantitativi di micro e nano polveri metalliche e/o ceramiche utili ad identificare un eventuale limite di esposizione. Anche nella SSc non è mai stata

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni

dimostrata un'eventuale compartecipazione di tali nano o micro particelle inorganiche nel meccanismo patogenetico della malattia né un eventuale limite di esposizione alle NPs.

## **2. OBIETTIVI DELLO STUDIO**

L'obiettivo primario del presente progetto è quello di determinare la presenza e di caratterizzare micro e nano particelle in matrici biologiche di pazienti affetti da SSc e soggetti sani per individuare se l'esposizione a polveri è significativamente correlata all'eziopatogenesi della SSc e/o alle sue manifestazioni cliniche.

Lo studio si prefigge di valutare le possibili relazioni tra i parametri clinici dei pazienti affetti da SSc e presenza di particelle contaminanti ceramiche e metalliche con eventuale individuazione di sottogruppi per tipo di elementi. L'analisi mediante microscopia elettronica ed il dosaggio dei principali elementi in traccia potrebbero rappresentare un possibile esame predittivo nei soggetti "predisposti" alla malattia rivelandosi, nel futuro, come una delle metodiche utile a definire un indice predisponente/causativo/diagnostico/prognostico applicabile su larga scala.

Gli obiettivi secondari del presente studio consistono nel valutare l'eventuale affinità delle particelle maggiormente identificate presenti nei pazienti con SSc verso immunoglobuline umane e nell'individuare un loro possibile ruolo nella formazione di autoanticorpi specifici (anti-topoisomerasi I-Scl-70, anti-centromero-ACA).

## **3. MATERIALI E METODI**

### **3.1 Selezione dei pazienti**

È stato effettuato uno studio preclinico monocentrico reclutando cinquanta pazienti affetti da SSc, età media  $56 \pm 12$  anni (35-79), femmine/maschi: 45/11, durata malattia  $10 \pm 8$  anni, afferenti al reparto di Reumatologia del Policlinico di Modena. Tutti i soggetti soddisfano i criteri ACR-Eular del 2013 (16), e risultano residenti nella stessa area geografica (provincia di Modena) da più di 5 anni.

Sono stati selezionati anche trenta controlli costituiti da volontari sani provenienti dalla stessa area geografica. Il gruppo di controllo è comparabile per età e sesso ai pazienti sclerodermici.

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Ferri

### **3.2 Scelta delle matrici biologiche**

Si è operata una scelta per individuare le matrici biologiche più idonee su cui eseguire le analisi per rilevare le micro e NPs inorganiche. Le due principali matrici prese in considerazione sono state siero e capelli. Si è scelto il siero come matrice biologica primaria poiché rappresenta il liquido biologico d'elezione per la valutazione dell'esposizione ai metalli ed è normalmente usato sia per lo screening che per il bio-monitoraggio di contaminanti nel medio e nel lungo termine. La misura degli elementi in traccia nel siero, inoltre, è indicativa del livello dei metalli negli organi e nei tessuti bersaglio, fungendo da indicatore primario. I capelli, invece, sono stati scelti come matrice biologica poiché sono indicativi dell'esposizione a lungo termine grazie alla loro capacità di accumulare xenobiotici, come farmaci, sostanze d'abuso e metalli nel tempo. Inoltre il prelievo di capelli rispetto al siero rappresenta un approccio meno invasivo nei confronti del soggetto reclutato.

### **3.3 Valutazione dell'esposizione**

Ad ogni soggetto incluso in questo studio retrospettivo è stato sottoposto un questionario anamnestico formulato appositamente per individuare una possibile esposizione ad inquinanti micro e nano dimensionati.

Il questionario raccoglie informazioni riguardo la storia occupazionale e residenziale di tutti i soggetti considerati, nonché l'abitudine al fumo, l'impianto di protesi le vaccinazioni eseguite, le allergie e le intolleranze alimentari, terapie farmacologiche continuative ed eventuali indagini diagnostiche eseguite (ad es. TAC e risonanza magnetica) con mezzo di contrasto.

Sono state identificate quattro principali fonti di esposizione: l'esposizione occupazionale, l'esposizione ambientale, l'abitudine al fumo e l'impianto di protesi articolari e dentali.

Nella prima categoria rientrano tutti soggetti con una storia di impiego lavorativo in ceramica o nell'industria chimica, o tessile o delle costruzioni, e regolarmente esposti a polveri, vapori o aerosol durante il lavoro quotidiano per un periodo di almeno 5 anni. La seconda categoria, "esposizione ambientale", comprende tutti i soggetti esposti da almeno 5 anni all'inquinamento atmosferico e a particelle sospese nell'aria. Vi rientra chi risiede a meno di 4 chilometri di distanza da inceneritori, autostrade, aeroporti o altre fonti di polveri da combustione. La terza categoria, abitudine al fumo, considera fumatori i soggetti che fumano da un periodo superiore o uguale a 5

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni

anni. Si sono anche raccolte informazioni sul numero medio di sigarette o sigari fumati al giorno e il numero di anni di fumo attivo. Nella quarta categoria, infine, sono stati inclusi tutti i soggetti con impianti di articolari (ginocchio, femore, anca) e protesi dentali, in quanto studi precedenti hanno dimostrato che le protesi articolari e odontoiatriche sono soggette ad usura e nel tempo possono rilasciare detriti nel fegato, nel midollo osseo, nei linfonodi e nella milza (17).

### **3.4 Prelievo dei campioni biologici**

La raccolta dei campioni ematici è stata effettuata mediante un prelievo di circa 8 mL di sangue venoso in provette di polistirene sterili sottovuoto precedentemente valutate, prive di agenti chimici e di contaminanti esterni micro e nano dimensionati. Il siero è stato poi sottoposto ad analisi qualitativa e quantitativa per valutare rispettivamente la presenza di micro e nano particelle e dei principali elementi in traccia.

I campioni di capelli sono stati prelevati dalla zona nucale mediante pinze in plastica monouso sterili e conservati nelle provette di polistirene prive di contaminanti.

### **3.5 Analisi ultrastrutturale qualitativa dei campioni e microanalisi delle particelle**

La caratterizzazione morfologica del particolato è stata effettuata mediante Microscopia Elettronica a Scansione Ambientale - Environmental Scanning Electron Microscopy - ESEM (strumento Quanta 200, Fei company, Holland), mentre l'identificazione chimica delle particelle è stata attuata mediante Spettroscopia a raggi X per Dispersione di Energia (EDS: Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy della Oxford Instruments, Mannheim, Germany).

I campioni sierici sono stati analizzati su adesivi in carbonio privi di qualsiasi impurità ed analizzati all'ESEM a 25kV in condizioni di basso vuoto senza alcun ulteriore trattamento per non alterare la superficie del campione.

Per valutare il numero di zone positive del campione contenenti micro e nano particelle, è stato adottato il metodo di Fassina et al (18). Le analisi condotte sul siero di tutti i soggetti reclutati nello studio hanno permesso di ottenere informazioni sulla dimensione, il formato, la distribuzione, il numero, la superficie e la composizione chimica delle micro e nano particelle presenti.

### **3.6 Analisi strumentale quantitativa degli elementi in traccia presenti nei campioni sierici e nei capelli**

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni

La valutazione totale quantitativa degli elementi in traccia presenti nel siero e nei capelli è stata svolta attraverso Spettrometria di Massa al Plasma ad Emissione Atomica (ICP-AES) (Thermo iCAP 6000, Fisher Scientific, USA) basandosi sui protocolli approvati dall'Istituto Superiore di Sanità (19).

Sono stati misurati i principali elementi rilevati dall'analisi qualitativa: Al (Alluminio), Cr (Cromo), Cu (Rame), Fe (Ferro), Mg (Magnesio), Mn (manganese), Si (Silicio), Ti (Titanio), Zn (Zinco). L'ottimizzazione dell'ICP-AES è stata svolta utilizzando le lunghezze d'onda specificate dall'Istituto Superiore di Sanità ed i relativi limiti di rilevabilità per ciascun elemento. Le lunghezze d'onda sono state selezionate per ogni elemento in modo tale da evitare l'interferenza degli altri elementi e sono riportate nella Tabella 1. I campioni di siero sono stati diluiti 1:5 con acqua deionizzata a basso contenuto di silicio ed in seguito sono stati sottoposti a un processo di digestione utilizzando acido nitrico all'1% per solubilizzare la parte organica.

Per valutare quantitativamente gli elementi in traccia presenti nei capelli di tutti i soggetti inclusi nello studio è stato adottato il metodo di Varrica et al (20).

I risultati ottenuti dall'analisi quantitativa sono stati confrontati con i dati ottenuti mediante microscopia elettronica per valutare le differenze ed il ruolo delle particelle micro e nano dimensionate rispetto alla componente in traccia presente nel siero.

Elementi	Lunghezza d'onda (nm)	Limiti di rilevazione (µg/L)
Al	396.152	0.002
Cr	267.7	0.002
Cu	224.7	0.002
Fe	259.94	0.005
Mg	279.806	0.001
Mn	260.5	0.001
Si	251.611	0.08
Ti	336.1	0.002
Zn	213.856	0.002

Tabella 1. Lunghezze d'onda e limiti di rilevazione utilizzati per le analisi di ICP-AES.

### **3.7 Valutazione dell'interazione tra nano polveri e autoanticorpi mediante IFI**

Per verificare la possibile interazione tra nano particelle inorganiche e autoanticorpi è stato eseguito un saggio di immunofluorescenza indiretta (IFI). Sono state preparate delle soluzioni contenenti 500

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni

µg di nano particelle per mL di RPMI 1640, addizionato con il 20% di siero. Le nano particelle scelte per condurre l'analisi sono state scelte in base ai risultati ottenuti dall'analisi morfologica condotta alla microscopia elettronica: Silicio 7 nanometri, Silicio 70 nanometri e Silicio-Titanio <50 nanometri (Sigma Aldrich, Italia). Si sono scelti sieri di pazienti positivi ad autoanticorpi specifici per la SSc, in particolare positivi agli autoanticorpi anti-Topoisomerasi I (anti-Scl-70) e agli autoanticorpi anti-centromero (ACA). In aggiunta, sono stati utilizzati sieri di volontari sani per verificare se il silicio sia responsabile dell'interazione tra IgG e autoantigeni in vitro.

Oltre ai sieri addizionati con nano particelle, sono stati preparati dei sieri da utilizzare come controllo per l'immunofluorescenza di base del campione. Tutti i sieri sono stati incubati a 37°C per una settimana. Successivamente i campioni sono stati analizzati mediante EliA Tests for Diagnostic Use e Phadia System.

### **3.8 Analisi statistica dei dati**

L'elaborazione dei dati è stata effettuata utilizzando il software statistico GraphPad Prism 5.5 per Windows. Per le variabili qualitative è stata calcolata la distribuzione di frequenza utilizzando il software Image-Pro Plus. Le variabili quantitative sono riportate in termini di media e deviazioni standard ed analizzate mediante test di Student (T-test) ed Analisi di Varianza (ANOVA) con Bonferroni post test. I dati sulla valutazione del rischio sono stati analizzati mediante Odds Ratio (OR) ed intervallo di confidenza (CI) 95%.

## **4. RISULTATI**

### **4.1 Valutazione del rischio da esposizione a micro e nano particolato**

La tabella 2 mostra i risultati relativi al rischio di esposizione di cinquanta casi di sclerodermia e di trenta soggetti sani assunti come controlli in base ai dati raccolti dal questionario anamnestico. Sono state considerate le quattro principali categorie di esposizione e per ciascuna di essa sono riportati gli odds ratio e gli intervalli di confidenza al 95%. Un significativo aumento del rischio di SSc è stato associato con l'esposizione occupazionale (OR = 3.167 ; CI = 1.205 - 8.323). I dati sull'esposizione ambientale (OR = 1.055; CI = 0.4259 - 2.613), sull'abitudine al fumo (OR =

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni

0.4828 ; CI = 0.1921 - 1.213) e sulla presenza di impianti o protesi (OR = 0.500; CI = 0.1953 - 1.280) non sono risultati significativi.

Questo studio ha analizzato pazienti con SSc appartenenti alla provincia di Modena e residenti da almeno 5 anni. Tutti i trentotto pazienti inseriti nella categoria "esposizione occupazionale" hanno lavorato per oltre 5 anni in industrie locali. Dodici di questi pazienti hanno lavorato nel settore ceramico, altri dieci hanno lavorato nel settore manifatturiero tessile, sei nel settore metalmeccanico, sette in colorifici ed altri tre in imprese edili. I pazienti con SSc della categoria esposizione ambientale sono stati esposti principalmente all'inquinamento da traffico urbano (SMOG and DEP: Diesel Exhaust Particulates).

Categorie di esposizione	SSc pazienti (50)		Controlli (30)		OR*	95% CI
	n	%	n	%		
Esposizione occupazionale	38/50	76	15/30	50	3.167	1.205 to 8.323 (*P 0.027)
Esposizione ambientale	24/50	48	14/30	47	1.055	0.4259 to 2.613
Abitudine al fumo	21/50	42	18/30	60	0.4828	0.1921 to 1.213
Impianti e protesi	25/50	50	20/30	67	0.5000	0.1953 to 1.280

Tabella 2: Categorie di esposizione a micro e nano particelle e calcolo del rischio di insorgenza di SSc.

#### **4.2 Analisi qualitativa di micro e nano particelle nei campioni sierici**

Le analisi di microscopia elettronica ESEM sono state effettuate su campioni di siero di cinquanta pazienti SSc e di trenta controlli per individuare e caratterizzare le micro- nano- particelle presenti. Ogni zona (400x) contenente particolato si definisce positiva ed è stata suddivisa in regioni definite spot (800x). Ogni spot positivo è stato scansionato ad alto ingrandimento (da 3000x fino a 40000x) per determinare il diametro medio delle particelle. Un esempio dell'analisi ultrastrutturale condotta sul siero di due dei pazienti sclerodermici e di un controllo è riportata nella Figura 1 che mostra la morfologia del campione sierico e delle particelle a diversi ingrandimenti: sotto le immagini viene riportato lo spettro EDS della particella indicata dalla freccia.

Il primo caso a) si tratta di una paziente malata da 12 anni di SSc la cui età d'esordio è di 32 anni. Riporta di lavorare in ceramica: per più di 13 anni come addetta allo stampaggio e brasatura. Non fuma e possiede impianti protesici odontoiatrici. Nella foto a basso ingrandimento (Spot a 800x) si



**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

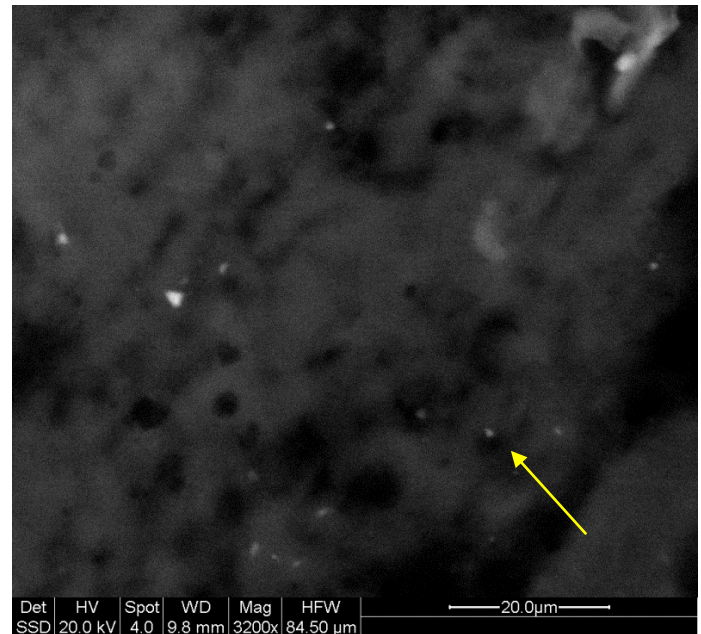
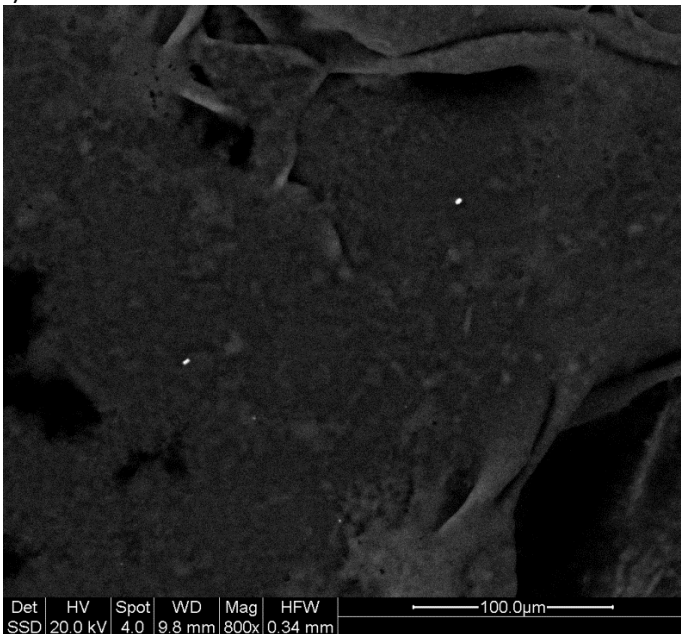
Direttore: Prof. Clodoveo Feni

rilevano in colore bianco alcune particelle mentre nella immagine ad alto ingrandimento (Spot a 3200x) si rileva un agglomerato di nanoparticelle principalmente di silicio e titanio. Il titanio è spesso usato nei processi industriali ceramici come sbiancante.

Il secondo caso b) si tratta di una paziente malata 15 anni di SSc la cui età d'esordio è di 48 anni. È impiegata da 15 anni in azienda con sede in zona industriale ed esposizione ambientale. Nella foto a destra ad alto ingrandimento (12000x) si osserva una particella micrometrica sferica costituita principalmente da alluminio e silicio, rivestita da altre particelle nanometriche di silicio. La forma sferica è una caratteristica morfologica tipica delle particelle derivate da processi di combustione.

Il terzo caso c) si tratta di un soggetto controllo non affetto da SSc. Ha lavorato per 20 anni come donna delle pulizie nella provincia di Modena. Viene riportata l'immagine di una delle poche particelle riscontrate all'analisi qualitativa in uno spot positivo ad alto ingrandimento (10000x).

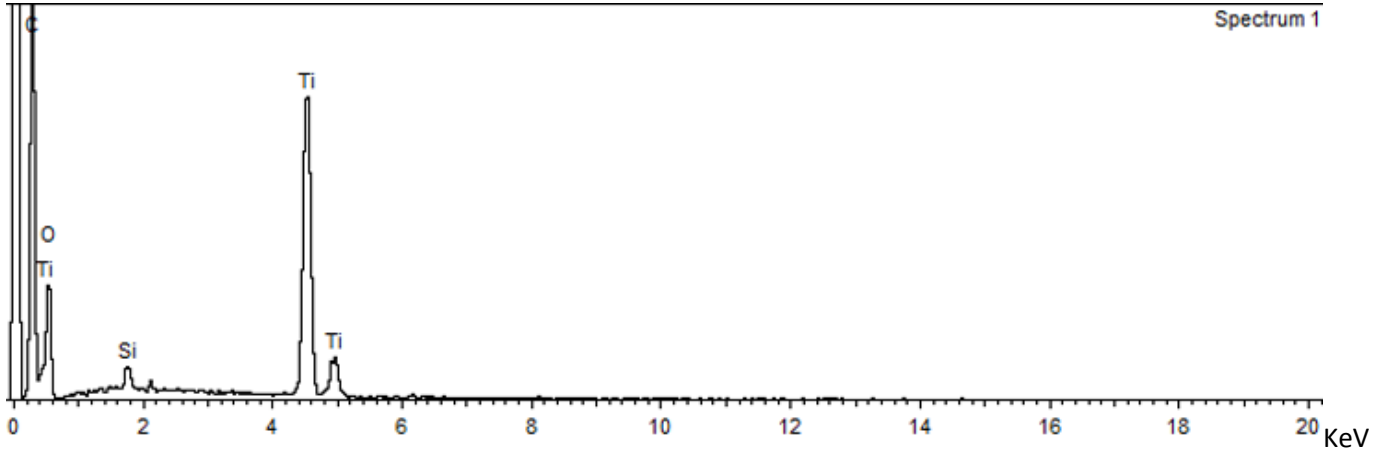
a)



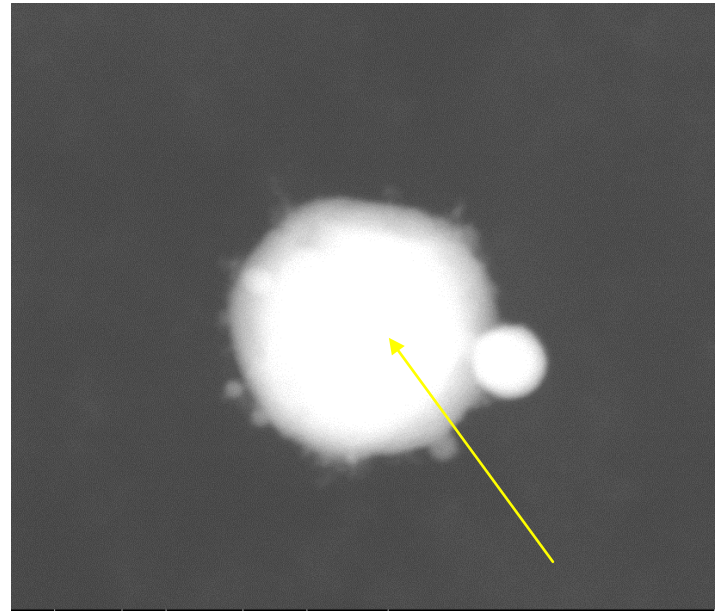
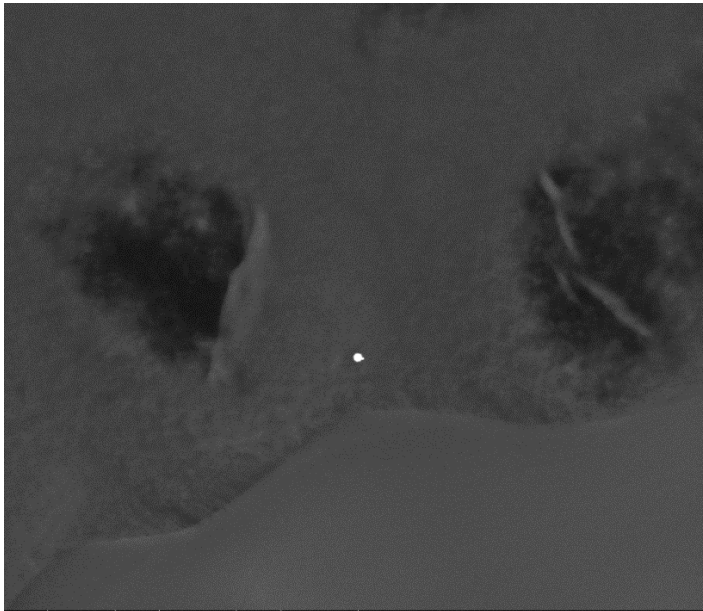
DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Femi

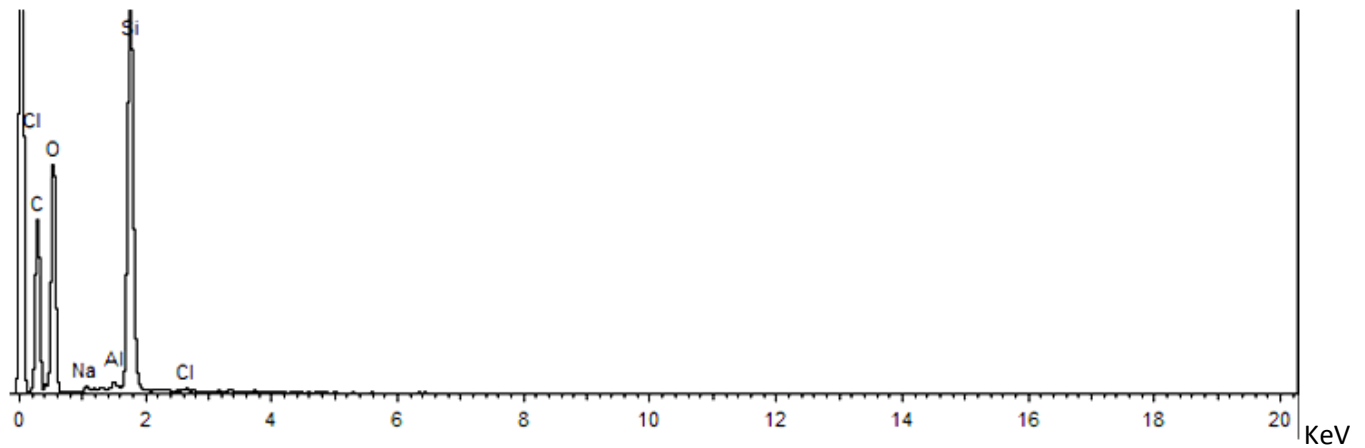


b)



Det	HV	Spot	WD	Mag	HFW
SSD	25.0 kV	4.0	10.9 mm	800x	0.34 mm

Det	HV	Spot	WD	Mag	HFW
SSD	25.0 kV	4.0	10.9 mm	12000x	11.27 μm



DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Femi

c)

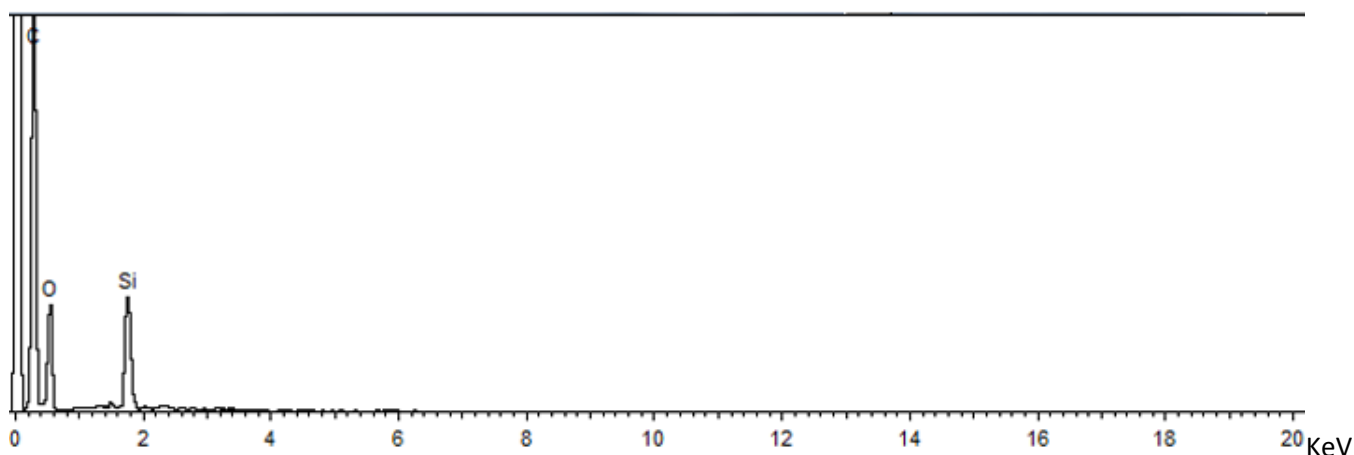
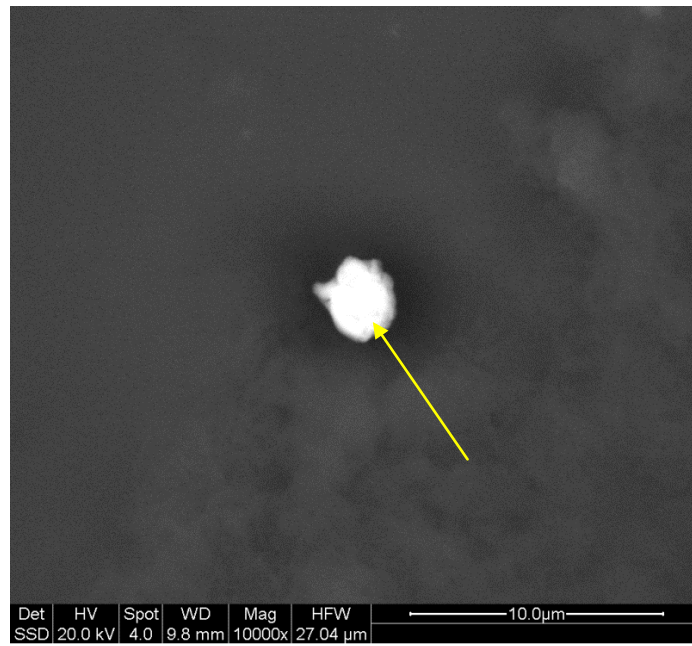
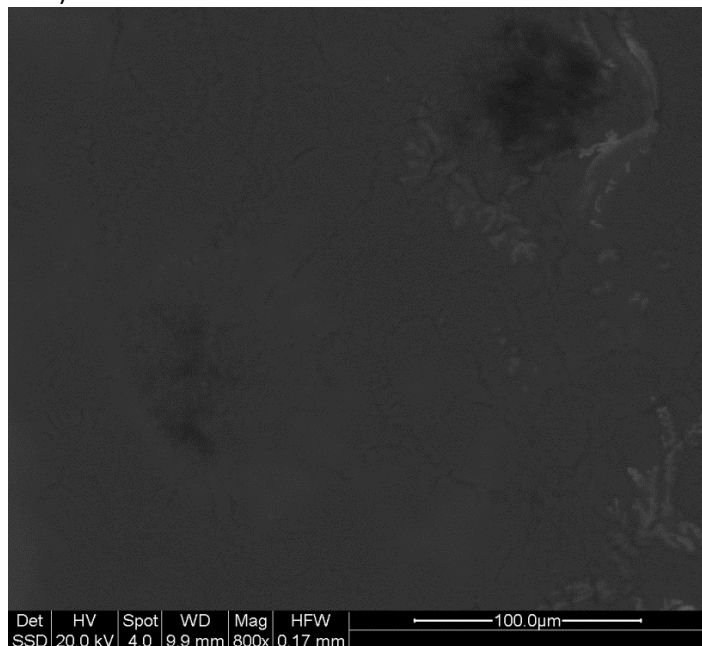


Figura 1: Analisi ESEM del siero di due pazienti a) e b) e di un controllo c). L'immagine a sinistra è a basso ingrandimento (Spot a 800x) mentre quella a destra è ad alto ingrandimento (Spot a 3000x o superiore). Sotto le immagini ESEM sono riportati gli spettri EDS delle particelle indicate con la freccia. Lo spettro di emissione, esito della microanalisi, mostra sull'asse delle ascisse il livello di energia dei raggi X caratteristico di ogni elemento, mentre sull'asse delle ordinate il numero di conteggi, ovvero di raggi X giunti allo spettrometro per ogni livello di energia.

Nei campioni dei pazienti SSc sono state identificate sia micro che nano particelle: il diametro eterogeneo delle particelle rilevate è compreso tra 30 nm e 3,9 micrometri. Le particelle sono presenti sia in singola forma che in forma di aggregati micrometrici. Il numero di spot (NS) positivi contenenti micro e nano particelle rilevato mediante analisi ESEM è risultato

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni

statisticamente significativo nei pazienti con SSc (NS =16.4±7.22) rispetto ai controlli (4.2±2.31) (p< 0.0001) indicando una gran quantità di polveri presenti nel siero dei pazienti.

La composizione delle polveri sottili riscontrate nei campioni sierici dei pazienti, ottenuta mediante microanalisi EDS, è risultata complessa ed eterogenea. L' elemento ritrovato con maggior frequenza è il Si che risulta presente nell'86% delle particelle identificate. Il Fe e l'Al risultano spesso associati al Si e sono presenti rispettivamente nel 24% e nel 20% delle particelle esaminate. Il Mg risulta presente nel 6% delle particelle rilevate e si trova spesso associato a complessi multi elementari. Tra gli altri elementi ritrovati si segnala il Ti presente in meno dell'1% delle particelle individuate ma che risulta nel 99% dei casi associato al Si.

**4.3 Analisi quantitativa dei principali elementi in traccia presenti nei campioni sierici**

La concentrazione degli elementi in traccia (µg/L o ppb) nel siero dei trenta controlli analizzati è stata confrontata con la concentrazione dei metalli nel siero rilevata dal rapporto dell'Istituto Superiore di Sanità (ISTISAN) nel periodo 1990-2009.

Elementi	Ref. ISTISAN Media ± DS (µg/L)	Controlli Media ± DS (µg/L)	Significatività (P value)
Al	6.01±0.36	8.14±2.26	* 0.0001
Cr	0.17±0.09	0.21±0.16	/
Cu	947±238	1138±316	/
Fe	1688±493	1589±592	/
Mg	17603±1779	23732±5560	* 0.0001
Mn	0.6±0.014	0.5±0.31	/
Si	132±63	158±45	/
Ti	/	1.43±1.68	/
Zn	922±68	1098±199	* 0.0001

*Tabella 3. Confronto tra rapporto ISTISAN e controlli sani del nostro studio riguardo la concentrazione dei metalli nel siero.*

Dai dati riportati in Tabella 3 si può notare un aumento significativo di Al e Mg e Zn nei controlli sani, residenti nella provincia di Modena, rispetto ai valori della popolazione italiana rilevati dal rapporto ISTISAN. Per il Ti non esiste un valore di riferimento, quindi non si può affermare che ci sia un aumento o una diminuzione significativa. Per gli altri elementi analizzati, invece, non c'è

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni

nessuna differenza significativa rispetto ai dati del rapporto ISTISAN, nonostante nei dati di riferimento riportati dal rapporto ISTISAN è presente una casistica più ampia e si riferiscono a controlli di età e sesso eterogenei rispetto alla casistica limitata da noi analizzata.

L'analisi comparativa degli elementi tra i trenta soggetti del gruppo di controllo ed i campioni di siero dei cinquanta pazienti SSc rivela che nei pazienti SSc vi è un aumento significativo di Si, Cr e Ti ( $P = 0.0001$ ), mentre si riscontra una diminuzione significativa del Fe ( $P = 0.01$ ) e del Mg ( $P = 0.0013$ ) rispetto ai controlli (Tabella 4).

Elementi	Controlli (N=30)		Pazienti con SSc (N=50)	
	Media $\pm$ DS ( $\mu\text{g/L}$ )		Media $\pm$ DS ( $\mu\text{g/L}$ )	P value
<b>Al</b>	8.14 $\pm$ 2.26		8.15 $\pm$ 3.10	/
<b>Cr</b>	0.21 $\pm$ 0.16		0.42 $\pm$ 0.22	* 0.0001
<b>Cu</b>	1138 $\pm$ 316		1084 $\pm$ 227	/
<b>Fe</b>	1589 $\pm$ 592		1305 $\pm$ 513	* 0.0119
<b>Mg</b>	23732 $\pm$ 5560		20432 $\pm$ 2588	* 0.0013
<b>Mn</b>	0.5 $\pm$ 0.31		0.4 $\pm$ 0.71	/
<b>Si</b>	158 $\pm$ 45		324 $\pm$ 168	*0.0001
<b>Ti</b>	1.43 $\pm$ 1.68		7.16 $\pm$ 5.19	*0.0001
<b>Zn</b>	1098 $\pm$ 199		1128 $\pm$ 341	/

Tabella 4. Risultati medi della determinazione degli elementi in traccia nei campioni sierici.  
\*Significatività statistica P value.

E' stato rilevato un aumento del 105% del Si nel siero dei pazienti SSc rispetto al siero dei controlli. La concentrazione totale sierica rilevata nel siero dei pazienti per il Si è stata di 324 $\pm$ 168  $\mu\text{g/L}$ , mentre nel caso dei controlli è stata rilevata una concentrazione di 158 $\pm$ 45  $\mu\text{g/L}$  di Si. E' stata calcolata una concentrazione di 0.42 $\pm$ 0.22  $\mu\text{g/L}$  di Cr e di 7.16 $\pm$ 5.19  $\mu\text{g/L}$  di Ti nel siero dei pazienti rispetto al gruppo di controllo dove si è rilevata una concentrazione di 0.21 $\pm$ 0.16  $\mu\text{g/L}$  di Cr e di 1.43 $\pm$ 1.68  $\mu\text{g/L}$  di Ti.

Il Fe è risultato essere significativamente diminuito del 17% rispetto ai controlli con un valore medio di 1305 $\pm$ 513  $\mu\text{g/L}$  nel siero dei pazienti SSc contro il valore di 1589 $\pm$ 592  $\mu\text{g/L}$  nei soggetti sani. Anche il Mg ha mostrato una diminuzione significativa del 14% nei pazienti con 20432 $\pm$ 2588  $\mu\text{g/L}$  rispetto ai controlli con 23732 $\pm$ 5560  $\mu\text{g/L}$ . Nello studio non sono state rilevate variazioni

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni

significative della concentrazione degli elementi in traccia tra maschi e femmine a causa del rapporto sbilanciato a favore delle femmine.

**4.4 Analisi quantitativa dei principali elementi in traccia presenti nei capelli**

La Tabella 5 riporta il confronto tra le concentrazioni dei metalli nei capelli rilevate dal rapporto ISTISAN, relativo alla popolazione italiana, e la concentrazione degli elementi in traccia ( $\mu\text{g/g}$ ) dei trenta controlli analizzati nel nostro studio, residenti nella provincia di Modena. Si può notare un aumento significativo dell'Al, del Fe e del Mg nei controlli sani rispetto ai dati del rapporto ISTISAN. Nel caso dell'Al c'è da sottolineare il fatto che il valore medio riscontrato dall'Istituto Superiore di Sanità non è stato rilevato tramite ICP-AES, ma mediante ICP-MS. Non sono presenti valori di riferimento per il Cromo (Cr) e per il Titanio (Ti) mentre per gli altri elementi analizzati non si riscontrano differenze significative tra controlli e valori del rapporto ISTISAN.

Elementi	Ref. ISTISAN Media $\pm$ DS ( $\mu\text{g/g}$ )	Controlli Media $\pm$ DS ( $\mu\text{g/g}$ )	Significatività (P < 0.05)
Al	3.24 $\pm$ 1.32	16.02 $\pm$ 2.9	*0.0001
Cr	/	3.47 $\pm$ 1.07	/
Cu	7.48 $\pm$ 3.41	9.004 $\pm$ 4.5	/
Fe	13.1 $\pm$ 7.11	17.58 $\pm$ 5.61	*0.0088
Mg	43.3 $\pm$ 29.1	79.18 $\pm$ 8.01	*0.0001
Mn	0.28 $\pm$ 0.20	0.04 $\pm$ 0.05	/
Si	29.4 $\pm$ 18.2	25.6 $\pm$ 9.62	/
Ti	/	4.22 $\pm$ 3.56	/
Zn	131 $\pm$ 47	143 $\pm$ 42.7	/

Tabella 5. Confronto tra rapporto ISTISAN e controlli sani del nostro studio riguardo la concentrazione dei metalli nei capelli.

Dall'analisi comparativa tra pazienti SSC e controlli sani si evidenzia un aumento di Cr, Mg, Si, Ti e Zn nei pazienti rispetto ai controlli. Il Si risulta essere l'elemento presente in maggiore quantità nei capelli dei pazienti rispetto ai controlli, con un aumento del 326%. Infatti, la quantità media nei campioni dei pazienti sclerodermici è di 109.54 $\pm$ 29.36  $\mu\text{g/g}$  contro i 25.6 $\pm$ 9.62  $\mu\text{g/g}$  nei controlli.

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni

Elementi	Controlli (N=30)	Pazienti con SSc (N=30)	
	µg/g	µg/g	Significatività (P < 0.05)
<b>Al</b>	16.02±2.9	16.53±4.05	/
<b>Cr</b>	3.47±1.07	4.63±2.41	*0.0192
<b>Cu</b>	9.004±4.5	6,41±3.21	/
<b>Fe</b>	17.58±5.61	17.05±6.98	/
<b>Mg</b>	79.18±8.01	98.35±14.6	*0.0001
<b>Mn</b>	0.04±0.05	1.0±0.91	/
<b>Si</b>	25.6±9.62	109.54±29.36	*0.0001
<b>Ti</b>	4.22±3.56	7.44±6.5	*0.0214
<b>Zn</b>	143±42.7	250±50.186	*0.0001

Tabella 6. Quantità medie degli elementi in traccia riscontrate nei capelli dei controlli e dei pazienti sclerodermici.

La concentrazione di Cr risulta di 4.63±2.41 µg/g nei pazienti rispetto ai controlli con 3.47±1.07 µg/g. La concentrazione di Mg riscontrata è di 98.35±14.6 µg/g nei malati contro i 79.18±8.01 µg/g nei controlli. Ti e Zn sono aumentati rispettivamente del 76% e del 74% nei malati. La quantità media del Ti è 7.44±6.5 µg/g nei malati contro i 4.22±3.56 µg/g nei controlli sani. La quantità media dello Zn rilevata nei capelli è 250±50.186 µg/g nei pazienti sclerodermici contro i 143±42.7 µg/g nel gruppo di controllo. Come nel caso del siero, anche l'analisi quantitativa degli elementi in traccia nei capelli non ha rilevato differenze significative tra maschi e femmine, a causa della preponderanza femminile.

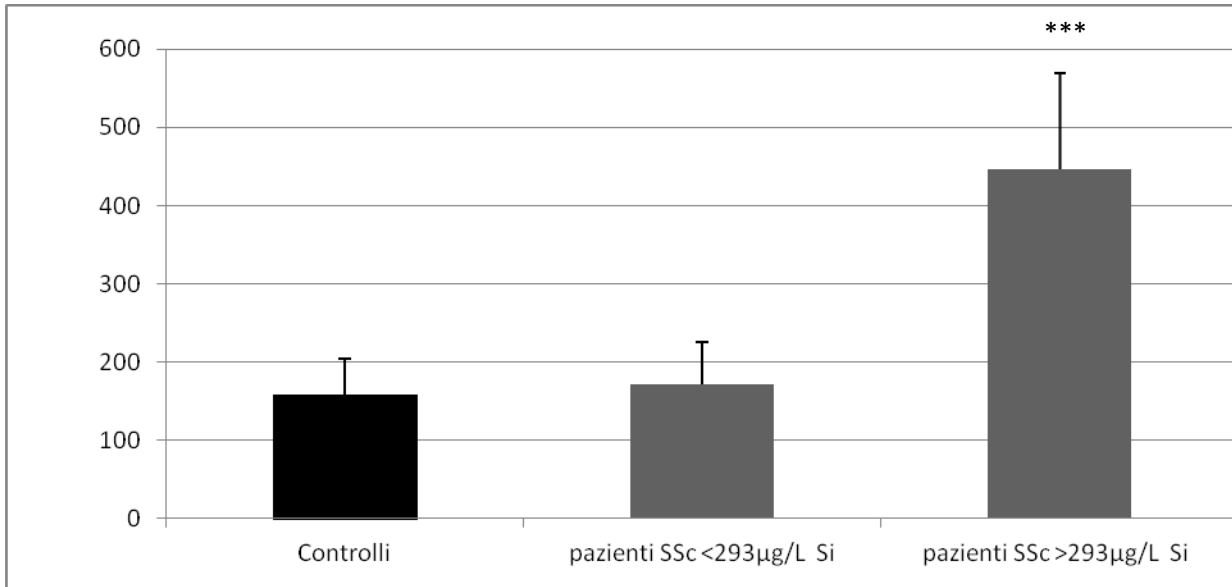
#### **4.5 Divisione dei pazienti SSc a seconda della concentrazione del silicio nel siero**

Mediante l'analisi quantitativa è stato possibile individuare il Si come l'elemento con la concentrazione maggiore nel siero dei pazienti SSc rispetto ai controlli. Il valore di soglia tra i pazienti positivi e negativi ad una concentrazione significativa di Si è stato definito come tre deviazioni standard sopra il valore medio della popolazione normale (158±45 µg/L) ovvero 293 µg/L. Nella figura 2 vengono confrontati i pazienti SSc con una concentrazione di Si >293 µg/L ovvero 26 pazienti su 50 totali analizzati.

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Ferri



*Figura 2: Confronto (media e SD) tra controlli e pazienti positivi per la presenza di Si oltre il valore soglia di 293 µg/L*

La concentrazione media ( $172 \pm 54$  µg/L) di Si rilevata nei pazienti al di sotto del valore soglia di 293 µg/L è risultata non statisticamente significativa se confrontata alla concentrazione media di Si nei controlli ( $158 \pm 45$  µg/L). I pazienti SSc con valori medi di Si al di sopra del valore soglia hanno mostrato invece una elevata concentrazione di Si ( $446 \pm 123$  µg/L) con dati estremamente significativi sia nei confronti dei controlli ( $P < 0.0001$ ) che dei pazienti sotto il valore soglia dei 293 µg/L ( $P < 0.0001$ ).

Ventisei dei ventisei pazienti appartenenti al primo gruppo caratterizzato da livelli di silicio superiori al valore soglia rientrano nel gruppo dei pazienti con esposizione occupazionale rilevata attraverso il questionario anamnestico, dimostrando che la clusterizzazione è simile per circa il 90%.

**4.6 Manifestazioni biochimiche e cliniche di pazienti affetti da SSc correlate alla concentrazione di silicio nel siero**

I pazienti affetti da SSc con concentrazioni di Si oltre il valore soglia 293 µg/L ( $n = 26$ ) sono stati confrontati ai pazienti con valori di Si al di sotto del valore soglia di 293 µg/L ( $n = 24$ ) per valutare le principali manifestazioni cliniche ed i parametri biochimici principali.

I pazienti con valori soglia di Si oltre 293 µg/L hanno mostrato una minore età media ( $P = 0.04$ )



**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Ferri

ed una significativa presenza della forma diffusa dell'SSc ( $P = 0.0324$ ) rispetto ai pazienti al di sotto del valore soglia. Inoltre la durata media della malattia ( $P = 0,01$ ) è significativamente inferiore rispetto a quella dei pazienti con livelli di silicio sotto la soglia. Le manifestazioni cliniche principali dei pazienti con concentrazioni di Si oltre il valore soglia sono un'aumentata presenza di ulcere digitali ( $P = 0.02$ ), un significativo aumento del Rodnan Skin Score ( $P = 0.01$ ) e della fibrosi polmonare ( $P = 0.01$ ). Non si è rilevata nessuna correlazione significativa tra i pazienti con un'alta concentrazione di Si e la possibile presenza di un sottotipo specifico di auto anticorpi. Non si sono riscontrate differenze significative tra pazienti maschi e pazienti femmine nella casistica analizzata. L'abitudine al fumo è stata esclusa come possibile fattore di confondimento poichè è risultata simile tra i due gruppi di pazienti ( $P = 0.952$ ).

**4.7 Interazione tra autoanticorpi e nano particelle inorganiche: valutazione mediante IFI**

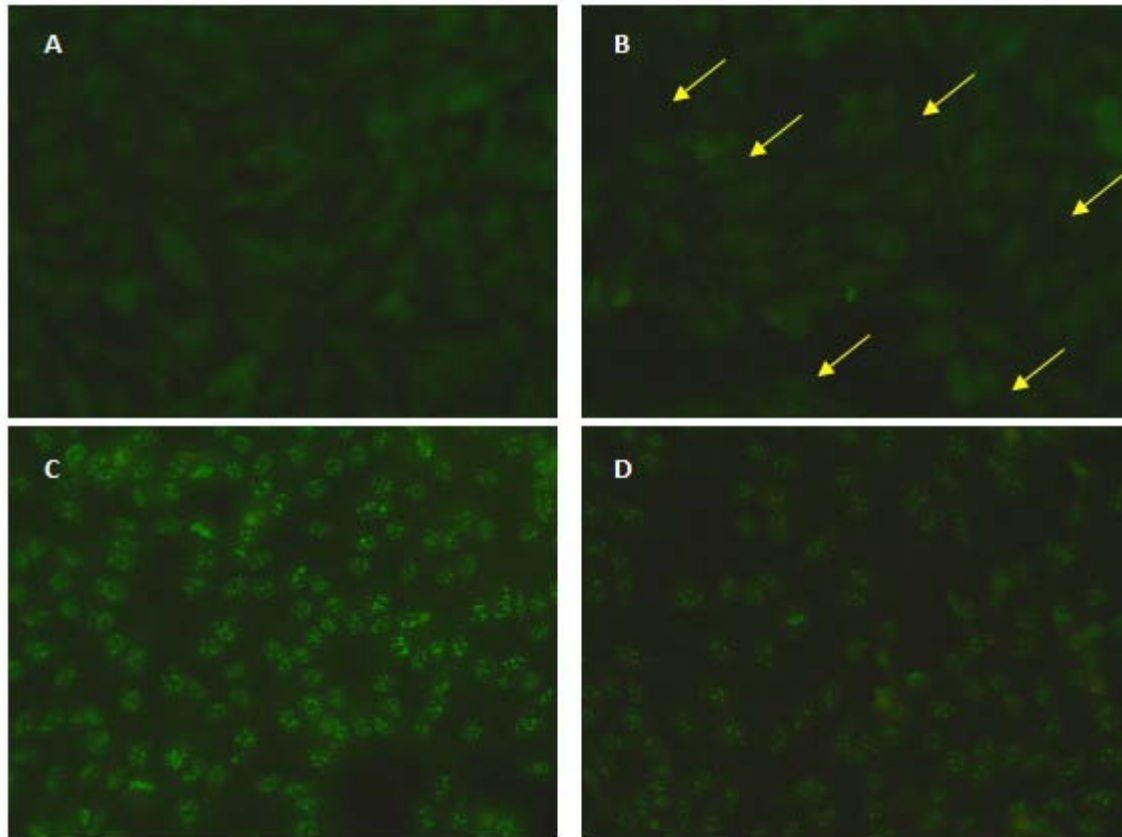
Il saggio di immunofluorescenza è stato eseguito su sei pazienti sclerodermici e su tre volontari sani. Tre dei pazienti sono positivi per gli autoanticorpi anticentromero (ACA) mentre gli altri tre per gli autoanticorpi Topoisomerasi I (anti-Scl-70). Si sono analizzati quattro campioni di siero per ogni soggetto:

- un campione di siero trattato con Silicio 7 nm
- un campione di siero trattato con Silicio 70 nm
- un campione di siero trattato con Silicio-Titanio <50 nm
- un campione di siero non trattato con nano particelle.

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni



*Figura 3. A. Immunofluorescenza di base di un campione dei volontari sani ovvero del Controllo. B. Immunofluorescenza del Controllo addizionato con Silicio 7 nm. Si possono notare le nano particelle di Si, indicate dalle frecce gialle, mentre non sono evidenti variazioni dell'immunofluorescenza di base. C. Immunofluorescenza di base del campione sierico di un paziente ACA positivo. D. Immunofluorescenza del campione ACA positivo addizionato con Silicio 7 nm. Si può notare una diminuzione dell'immunofluorescenza di base.*

Come visibile dalla figura 3, nel caso di un paziente positivo agli ACA è stata riscontrata una diminuzione del titolo anticorpale dei campioni di siero trattati rispetto al controllo non trattato. Infatti i dati quantitativi ottenuti mediante test EliA (Tabella 7), mostrano come il campione non trattato sia di  $285 \pm 12$  unità/mL, mentre il trattamento con Si 7 nm sia di  $171 \pm 16$  unità/mL, con Si 70 nm di  $196 \pm 21$  unità/mL e con SiTi di  $190 \pm 18$  unità/mL. Questo probabilmente è dovuto all'interazione tra nano particelle e autoanticorpi che si evidenzia nei valori ridotti riscontrati. Per i pazienti positivi agli anti-Scl-70, nonostante i trattamenti, non si rileva una significativa diminuzione o aumento del titolo anticorpale. Nel caso dei volontari sani sono state quantificate solamente le IgG. In seguito al trattamento del siero con Si 7, Si 70 e SiTi non si rileva la presenza di autoanticorpi ACA, anti-Scl-70. La presenza del silicio, infatti, non ha modificato l'interazione

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE**  
**CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Ferri

delle normali Immunoglobuline G (IgG) con gli antigeni specifici per gli autoanticorpi, come CENP-A, -B e -C e l'antigene Topoisomerasi I, dimostrando come il silicio non sia responsabile dell'interazione tra IgG e autoantigeni in vitro.

Campioni	Non trattato	Si 7 nm	Si 70 nm	SiTi <50 nm
ACA positivo	285±12 U/ml	171±16 U/ml P = 0.0006	196±21 U/ml P = 0.003	190±18 U/ml P = 0.001
Anti-Scl-70 positivo	195±14 U/ml	191±23 U/ml	189±12 U/ml	188±21 U/ml
Ig G Volontario sano	160±19 U/ml	/	/	/

*Tabella 7. Risultati quantitativi, ottenuti mediante test EliA, dei campioni sierici trattati con nano particelle e controlli non trattati (media ± SD).*

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Ferri

## 5. DISCUSSIONE

I risultati del nostro studio hanno mostrato una interessante correlazione fra i dati raccolti mediante il questionario anamnestico e gli esiti ottenuti mediante le metodiche analitiche applicate (ESEM-EDS, ICP-AES).

Dai dati anamnestici si evince infatti, che trentotto pazienti su cinquanta hanno un impiego nell'industria tessile, ceramica, metal meccanica o in serigrafie da almeno 5 anni, l'esposizione occupazionale è risultata l'unico fattore di rischio significativo correlato alla SSc. L'esposizione ambientale, il fumo e la presenza di protesi non sono risultati fattori di rischio significativi.

Le analisi qualitative effettuate mediante microscopia elettronica ESEM mostrano la presenza di micro e NPs di Al, Si, Ti, Fe, Cu, Cr e Mg nel siero dei pazienti SSc, rivelando la natura complessa e spesso multi elementare di tali particelle. Cu e Cr si riscontrano principalmente nei campioni sierici dei pazienti che hanno fumato regolarmente come è già noto in letteratura (21). La presenza invece di Ti insieme al Si risulta evidente nei pazienti che hanno lavorato in ceramica o che risiedono vicino al comprensorio ceramico modenese (<2km), mentre Al e Fe ricorrono più frequentemente nei pazienti che hanno lavorato nell'industria metalmeccanica.

Mediante l'analisi quantitativa applicata, nel siero dei pazienti con SSc, si è riscontrato un aumento del 105% di Si in traccia rispetto ai controlli. Questi dati indicano per la prima volta un valore quantitativo sierico ( $324 \pm 168 \mu\text{g/L}$ ) significativo di Si nei soggetti affetti da SSc rispetto ai valori di soggetti sani ( $158 \pm 45 \mu\text{g/L}$ ), comparabili per sesso, per età ed estrazione geografica. Tale aumento del silicio è stato confermato dalle analisi sui capelli ottenendo valori d'incremento superiori pari al 326% rispetto ai controlli.

La SSc è già stata associata in passato ad esposizione cronica alla silice (22) ma non è stato mai descritto un effetto dose dipendente. Mediante l'analisi quantitativa effettuata è stato possibile individuare un valore soglia rispetto alla popolazione normale di  $293 \mu\text{g/L}$  ed analizzare i parametri biochimici principali e le manifestazioni cliniche dei pazienti maggiormente esposti a Si. I risultati dell'analisi quantitativa hanno evidenziato un significativo aumento della forma diffusa della SSc tra i pazienti con valori soglia di Si oltre  $293 \mu\text{g/L}$ . I pazienti così selezionati sono caratterizzati inoltre da un significativo aumento di fibrosi polmonare, di ulcere digitali ed un valore più elevato del Rodnan Skin Score. I nostri dati preliminari sembrano inoltre indicare una minor aspettativa di

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni

vita dei soggetti con livelli sierici di Si elevati (conseguente anche alla maggior correlazione con la forma diffusa di SSc). La presenza significativa del Si, in oltre il 65% dei pazienti SSc analizzati, sia in forma particellare che come elemento in traccia nelle matrici biologiche analizzate (siero e capelli) sembrerebbe confermare il sospetto di un ruolo di tale elemento anche nell'eziopatogenesi della SSc.

L'analisi quantitativa del siero inoltre evidenzia un aumento della concentrazione di Cr (100%) e del Ti (400%) nei pazienti con sclerodermia rispetto ai controlli e nel caso dei capelli del 33% per il Cr ed del 76% per il Ti. Questo aumento coinvolge valori di poche ppb che potrebbero sovrapporsi alla soglia di sensibilità dello strumento e vanno assunti come significativi con molta prudenza. L'analisi quantitativa dei capelli ha inoltre rilevato un aumento significativo di concentrazione dello Zn pari al 74%, invece non presente nei campioni sierici. La ragione si potrebbe addebitare al fatto che i prodotti per la tintura contengono tale elemento. L'analisi quantitativa applicata ai campioni di capelli non ha rilevato alcuna diminuzione significativa di Fe, fornendo risultati discordanti rispetto ai valori sierici, dove si è riscontrata una diminuzione significativa di Fe del 17%. Il Mg ha mostrato un comportamento inverso nelle due matrici biologiche: nel siero è stata riscontrata una diminuzione della concentrazione dell'8% nei pazienti SSc rispetto ai controlli mentre nei capelli è stato riscontrato un aumento del 24%. La diminuzione sierica di Mg può essere dovuta alle eventuali manifestazioni cliniche legate alla malattia. L'aumento di Mg riscontrato nei capelli invece può dipendere alla presenza di magnesio solfato nei prodotti cosmetici quali shampoo, balsami e tinte.

Questi dati mostrano come valori quantitativi di inquinanti inorganici siano dipendenti dalla scelta della matrice biologica opportuna. Il siero è il liquido biologico primario d'elezione per la valutazione dell'esposizione a molti metalli: per lo screening, per la diagnostica e per il biomonitoraggio a lungo termine. L'analisi quantitativa relativa ai campioni sierici è indice di una esposizione stabile a medio termine in quanto riflette direttamente la concentrazione degli elementi chimici resi disponibili per gli organi ed i tessuti. I capelli sono bioindicatori utili per rilevare un'esposizione sia a breve che a medio e lungo termine, a seconda della lunghezza e della regione del capello. Nonostante ciò, le analisi quantitative effettuate sui capelli degli stessi pazienti e controlli analizzati per la matrice sierica hanno mostrato una specificità minore, rivelandosi meno efficaci nel dosare i principali elementi in traccia.

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Feni

Il saggio di immunofluorescenza indiretta, eseguito su pazienti con SSc e su volontari sani, ha dimostrato come il silicio non sia responsabile dell'interazione tra IgG e autoantigeni in vitro. Al contrario l'IFI ha messo in evidenza come nel caso di pazienti ACA positivi vi sia un'interazione tra nano particelle ed autoanticorpi in vitro mostrando una diminuzione del titolo anticorpale in corrispondenza dei trattamenti. Questo dimostra un'affinità diretta delle particelle di Si e SiTi con la frazione autoanticorpale, nello specifico con gli anticorpi ACA di pazienti sclerodermici. Le particelle di dimensioni più piccole (Si-7nm) hanno mostrato una selettività maggiore con una netta diminuzione degli anticorpi ACA rilevati dall'IFI rispetto alle particelle di diametro superiore.

## 6. CONCLUSIONI

Il nostro studio ha dimostrato una interessante correlazione tra le informazioni raccolte dall'indagine anamnestica e i risultati ottenuti dalle analisi qualitative e quantitative effettuate sulla presenza di NPs nei pazienti con SSc.

In particolare si è rilevata la presenza significativa di micro e NPs inorganiche nelle matrici biologiche di pazienti affetti da sclerodermia rispetto ai controlli comparabili per età, sesso e località geografica. I pazienti con SSc con alti livelli di Si presentano dei segni clinici e una gravità della malattia diversi se comparati ai soggetti con livelli inferiori di silicio. I risultati ottenuti mediante tecnica quantitativa ICP-AES sul siero umano di pazienti con SSc rivelano un valore soglia di Si di 293 µg/L indicativo per alcune manifestazioni cliniche specifiche tra le quali, la forma diffusa di SSc, la presenza di ulcere cutanee digitali e di fibrosi polmonare.

In conclusione i nostri dati indicano che l'esposizione a polveri ed in particolar modo a silice in forma cristallina micro e nano dimensionata, può essere considerata non solo un probabile fattore eziopatogenetico della malattia ma anche un parametro predittivo di severità clinica nei pazienti con SSc. L'esposizione occupazionale alla polvere di silice cristallina dovrebbe essere attentamente monitorata in tutti i pazienti sclerodermici. Nel futuro ci prefiggiamo di aumentare la casistica dei pazienti con SSc e dei controlli e di intraprendere uno screening specifico per valutare la presenza di Si in pazienti anche di aree geografiche diverse rispetto a quella presa in considerazione nello studio in oggetto.

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Ferri

## 7. RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Derk CT, Jimenez SA. Systemic sclerosis: current views of its pathogenesis. *Autoimmun Rev.* 2003;2(4):181–91.
2. Le Tertre A, Medina S, Samoli E, Forsberg B, Michelozzi P, Boumghar A, et al. Short-term effects of particulate air pollution on cardiovascular diseases in eight European cities. *J Epidemiol Community Health.* 2002 Oct;56(10):773–9.
3. Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ Health Perspect.* 2007;403–9.
4. Kennedy IM, Wilson D, Barakat AI, HEI Health Review Committee. Uptake and inflammatory effects of nanoparticles in a human vascular endothelial cell line. *Res Rep Health Eff Inst.* 2009 Jan;(136):3–32.
5. Nemmar A. Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation.* 2002 Jan 29;105(4):411–4.
6. Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnol [Internet].* 2013 [cited 2014 Oct 7];11(26). Available from: <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1477-3155-11-26.pdf>
7. Buzea C, Pacheco II, Robbie K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases.* 2007;2(4):MR17–71.
8. Erasmus LD. Scleroderma in goldminers on the Witwatersrand with particular reference to pulmonary manifestations. *South Afr J Lab Clin Med Suid-Afr Tydskr Vir Lab- En Kliniekw.* 1957 Sep;3(3):209–31.
9. Sluis-Cremer GK, Hessel PA, Nizdo EH, Churchill AR, Zeiss EA. Silica, silicosis, and progressive systemic sclerosis. *Br J Ind Med.* 1985;42(12):838–43.
10. Parks CG, Conrad K, Cooper GS. Occupational exposure to crystalline silica and autoimmune disease. *Environ Health Perspect.* 1999 Oct;107 Suppl 5:793–802.
11. Moisan S, Rucay P, Ghali A, Penneau-Fontbonne D, Lavigne C. Silica-associated limited systemic sclerosis after occupational exposure to calcined diatomaceous earth. *Joint Bone Spine.* 2010 Oct;77(5):472–3.
12. McCormic ZD, Khuder SS, Aryal BK, Ames AL, Khuder SA. Occupational silica exposure as a risk factor for scleroderma: a meta-analysis. *Int Arch Occup Environ Health.* 2010 Oct;83(7):763–9.
13. McHugh NJ, Whyte J, Harvey G, Haustein UF. Anti-topoisomerase I antibodies in silica-associated systemic sclerosis. A model for autoimmunity. *Arthritis Rheum.* 1994 Aug;37(8):1198–205.

**DIPARTIMENTO MISTO DI MEDICINE E SPECIALITÀ MEDICHE  
CATTEDRA E SERVIZIO DI REUMATOLOGIA**

Segreteria Tel. 059/4224199 – Fax 059/4224178

Direttore: Prof. Clodoveo Ferri

14. Gustafsson Å, Lindstedt E, Elfsmark LS, Bucht A. Lung exposure of titanium dioxide nanoparticles induces innate immune activation and long-lasting lymphocyte response in the Dark Agouti rat. *J Immunotoxicol.* 2011 Jun;8(2):111–21.
15. Taccola L, Raffa V, Riggio C, Vittorio O, Iorio MC, Vanacore R, et al. Zinc oxide nanoparticles as selective killers of proliferating cells. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:1129–40.
16. Alhajeri H, Hudson M, Fritzler M, Pope J, Tatibouet S, Markland J, Robinson D, Jones N, Khalidi N, Docherty P, Kaminska E, Masetto A, Sutton E, Mathieu JP, Ligier S, Grodzicky T, LeClercq S, Thorne C, Gyger G, Smith D, Fortin PR, Larché M, Baron M. The 2013 ACR/EULAR Classification Criteria for Systemic Sclerosis Out-perform the 1980 Criteria. Data from the Canadian Scleroderma Research Group. *Arthritis Care Res (Hoboken).* 2014 Sep 18.
17. Keegan GM, Learmonth ID, Case CP. Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: A review of current knowledge and future strategies. *J Bone Joint Surg Br.* 2007 May;89(5):567-73
18. Fassina A, Corradin M, Murer B, Furlan C, Guolo A, Ventura L, et al. Detection of silica particles in lung tissue by environmental scanning electron microscopy. *Inhal Toxicol.* 2009 Feb;21(2):133–40.
19. Alimonti A, Bocca B, Mattei D, Pino A. Biomonitoraggio della popolazione italiana per l'esposizione ai metalli: valori di riferimento 1990-2009. *Rapporti Istituzionali* 10/22; 2010.
20. Varrica D, Tamburo E, Milia N, Vallascas E, Cortimiglia V, De Giudici G, et al. Metals and metalloids in hair samples of children living near the abandoned mine sites of Sulcis-Inglesiente (Sardinia, Italy). *Environ Res.* 2014 Oct;134:366–74.
21. Bernhard D, Rossmann A, Wick G. Metals in Cigarette Smoke. *IUBMB Life.* 2005 Dec;57(12):805-9.
22. Sanchez-Roman J, Wichmann I, Salaberri J, Varela JM, Nuñez-Roldan A. Multiple clinical and biological autoimmune manifestations in 50 workers after occupational exposure to silica. *Ann Rheum Dis.* 1993 Jul;52(7):534–8.

**Dott.ssa Erica Artoni**

*Dipartimento di Scienze Biomediche, Metaboliche e Neuroscienze dell'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia, [erica.artoni@unimore.it](mailto:erica.artoni@unimore.it)*

**Dott. Gian Luca Sighinolfi**

*Dipartimento di Scienze della Vita, dell'Università degli Studi di Modena e Reggio Emilia*

**Dott.ssa Dilia Giuggioli**

*Reumatologia, Policlinico di Modena, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena*

**Dott. Michele Colaci**

*Reumatologia, Policlinico di Modena, Azienda Ospedaliero-Universitaria di Modena*

**Prof. Clodoveo Ferri**

*Direttore U.O.C. di Reumatologia, Policlinico di Modena, Azienda Ospedaliero-Universitaria Policlinico di Modena, [clferri@unimore.it](mailto:clferri@unimore.it)*