

Tratto da "RisCh – sostanze e preparati pericolosi per la salute e la sicurezza dei lavoratori", Volume degli atti del convegno svoltosi a Bologna il 15 settembre 2005 nell'ambito di "AMBIENTE LAVORO" X° Salone della sicurezza e igiene in ambiente di lavoro.

FIBRE SOSTITUTIVE DELL'AMIANTO: STUDIO IN VITRO DEGLI EFFETTI BIOLOGICI INDOTTI

Carla Fanizza (1), Delia Cavallo (2), Giuseppe Spagnoli (1)

(1) Dipartimento Igiene del Lavoro – Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL) – Roma

(2) Dipartimento di Medicina del Lavoro – Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza del Lavoro (ISPESL) – Roma

INTRODUZIONE

Diversi tipi di fibre artificiali vetrose (Man-Made Vitreous Fibers MMVF) quali lana di vetro, di roccia, di scoria e fibre ceramiche, sono state negli ultimi anni introdotte in applicazioni sia industriali che residenziali (soprattutto come materiale isolante termico e di rinforzo) come sostitutive dell'amianto in quanto ritenute meno pericolose per la salute. Le fibre artificiali vetrose sono materiali inorganici fibrosi con struttura amorfa prodotte da vari tipi di minerali. In Europa il termine fibre artificiali vetrose comprende le lane minerali (vetro, roccia e scoria) e le fibre ceramiche refrattarie.

Studi epidemiologici condotti su operatori esposti hanno evidenziato eccessi di rischio di cancro polmonare, ma non è emersa una

consistente evidenza di associazione tra esposizione alle fibre e tumore polmonare o mesotelioma. [1, 2, 3, 4] Una recente meta-analisi di studi effettuata su diverse coorti mostra un aumento nel rapporto di mortalità standardizzata per i lavoratori esposti a lana di vetro e di roccia, ma non per quelli esposti alle fibre di vetro a filamento continuo [5].

Diversi studi riportano per l'esposizione a fibre artificiali vetrose l'induzione di vari tipi di cancro negli animali da esperimento. [6, 7, 8]

Il meccanismo mediante cui le fibre sostitutive dell'amianto possono indurre il processo di cancerogenesi rimane comunque ancora non chiaro. Tuttavia, molti autori sono concordi nell'attribuire una importanza determinante nell'attività biologica delle fibre a numerosi fattori:

le dimensioni, la composizione chimica, le proprietà superficiali, la solubilità e la biopersistenza.

Il diametro e la lunghezza influenzano la deposizione e l'epurazione. Infatti, solo le fibre che hanno una lunghezza 5 micron, diametro <3 micron, e rapporto lunghezza/diametro >3 micron, definite fibre respirabili o fibre WHO (World Health Organization), riescono a raggiungere gli alveoli polmonari. I risultati di studi in vitro ed in vivo dimostrano che le fibre più lunghe e più sottili sono le più pericolose [9], infatti, fibre con diametro inferiore a 3 micron e lunghezza superiore a 20 micron sono parzialmente fagocitate dai macrofagi alveolari provocando il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Anche la

composizione chimica delle fibre sono state riscontrate modificazioni

può contribuire all'effetto cancerogeno ad esempio la presenza di ferro può generare specie reattive dell'ossigeno che inducono danni ossidativi al DNA e modificazioni della superficie della cellula [10,11].

Studi recenti eseguiti sia in vivo che in vitro hanno evidenziato effetti citotossici e cancerogeni più evidenti per le fibre ceramiche e

per la lana di roccia. Nei macrofagi alveolari di ratto esposti a fibre artificiali vetrose sono stati mostrati effetti citotossici a livello della membrana cellulare, in particolare

morfologiche della membrana cellulare correlate con la fagocitosi di fibre [12]. Inoltre, in numerosi studi sono stati evidenziati effetti ossidativi in particolar modo per la

Tabella 1: Composizione chimica delle fibre utilizzate: percentuale in peso dei diversi elementi chimici					
ELEMENTI	LANA DI VETRO	LANA DI ROCCIA	LANA DI ROCCIA SOLUBILE	FIBRE CERAMICHE REFRATTARIE	CROCIDOLITE
SiO ₂	62-67	46.2	45.8	52-54	48.73
Al ₂ O ₃	1-4	13.0	14.9	46-48	0.07
FeO	0-1	7	7.6	0,1	36.94
MgO	3	9.25	10.9	-	3.81
CaO	7	16.9	14.3	-	10.4
Na ₂ O	16	2.64	2.0	-	4.43
K ₂ O	1	1.25	1.0	-	0.7
B ₂ O ₃	3-6	-	-	-	-
TiO ₂	-	2.95	1.6	0,1	0.7
P ₂ O ₅	0-1	-	0.4	-	-
MnO	-	0.16	<0.1	-	0.8

lana di roccia, e le fibre ceramiche [13,14,15,16,17], ed effetti genotossici per le fibre di vetro [18].

Le cellule mesoteliali sono particolarmente sensibili agli effetti tossici indotti dall'amianto e dalle fibre artificiali vetrose, ma, il meccanismo attraverso il quale queste sostanze sono in grado di provocare danni alle cellule, non è ancora del tutto chiaro. In studi in vitro su cellule mesoteliali esposte a fibre di amianto sono stati riscontrati numerosi effetti, come l'inibizione della crescita, l'induzione di danni al DNA, la rottura della membrana cellulare che conduce alla morte della cellula per necrosi [19,20], o per apoptosi e la suscettibilità ai danni ossidativi. [21,22,23]

Nel 1998 l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC) classificava la lana di roccia, di vetro, di scoria e le fibre ceramiche come possibili cancerogeni per l'uomo (gruppo 2B). Questa valutazione è stata sottoposta a revisione nel 2002 [24] e dal processo di rivalutazione è scaturita una nuova classificazione per la lana di roccia, di scoria, di vetro e le fibre di vetro a filamento continuo "non classificabili come cancerogeni per l'uomo" (gruppo 3); mentre le fibre ceramiche sono state riconfermate nel gruppo 2B.

L'Unione Europea con la pubblicazione della Direttiva 97/69/CE [25] per la classificazione ed etichettatura delle fibre artificiali vetrose, recepita in Italia, con il Decreto del Ministero della Sanità del 1 settembre 1998, ha classificato le fibre ceramiche refrattarie come cancerogeni di categoria 2 (probabili cancerogeni per l'uomo) e le lane minerali nella categoria 3 (possibili cancerogeni per l'uomo). Per la classificazione, la direttiva fa riferimento a parametri basati sulla composizione chimica (tenore in ossidi alcalini e alcalino-terrosi superiore o inferiore al 18% in peso) e sul diametro medio pesato sulla lunghezza. La classificazione di cancerogeno non si applica alle fibre il cui diametro geometrico medio ponderato sulla lunghezza (DLG) (nota R) meno due errori standard risulti maggiore di 6 micron, in quanto sono considerate non respirabili e perciò non in grado di raggiungere gli alveoli polmonari. Inoltre, la direttiva prevede la possibilità di deroga alla classificazione di cancerogeno (nota Q) in base a risultati di test di

biopersistenza a breve termine. Le prove citate nella nota Q sono relative a saggi di biopersistenza in vivo, cioè alla determinazione del periodo di ritenzione della fibra a livello polmonare a seguito di somministrazione per via inalatoria o intratracheale negli animali da laboratorio. Quindi l'interesse della comunità

scientifica e delle stesse ditte produttrici oggi è volto verso lo sviluppo di nuovi materiali fibrosi con una ridotta biopersistenza polmonare. Sono state, infatti, recentemente immesse sul mercato fibre con un elevato contenuto di alluminio e un basso contenuto di silice, denominate HT, con una solubilità superiore rispetto alle lane tradizionali. In particolare, sono stati studiati gli effetti citotossici valutando, tramite microscopia elettronica a scansione, i cambiamenti morfologici a livello della membrana cellulare indotti in cellule mesoteliali umane, dopo esposizione per 24 h a fibre artificiali vetrose e a crocidolite. Infatti, proprio le modificazioni morfologiche della membrana cellulare, come la perdita dei microvilli di membrana e la formazione di blebs, sono considerati marker di patologia cellulare, tossicità e stress ossidativo [26]. Inoltre, sono stati valutati, in cellule esposte a basse dosi (1, 2, 5, 10 µg/cm²) di fibre e per un breve periodo di tempo (2h), il danno diretto ed ossidativo al DNA tramite Comet test modificato con l'uso di enzimi che riconoscono e tagliano il DNA in corrispondenza delle basi ossidate.

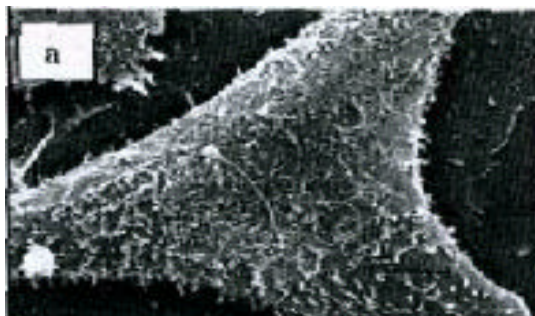
MATERIALI E METODI

In questo studio sono state utilizzate fibre ceramiche (FC), lana di vetro (LV), lana di roccia (LR) ed un particolare tipo di lana di roccia definita

Tabella 2: Principali parametri statistici dimensionali: (diametri e lunghezze) di tutte le fibre testate					
	LANA DI VETRO	LANA DI ROCCIA	LANA DI ROCCIA SOLUBILE	FIBRE CERAMICHE REFRATTARIE	CROCIDOLITE
Diametro					
Media aritmetica	4.3	2.3	3.7	3.3	0.27
Deviazione standard	3.5	1.6	2.5	1.9	N D *
Min	0.1	0.2	0.3	0.5	0.22
Max	27.5	11.0	12.9	13.6	0.64
Fibre con diametro <3µm	41%	74%	46%	52%	100%
Lunghezza					
Media aritmetica	57.3	52.1	96.9	44.5	10
Deviazione standard	58.6	52.8	62.8	38.3	N D *
Min	2.0	3.5	3.0	7.1	0.5
Max	517.5	410.0	345.3	255.8	1000
Dove: * = non disponibile					

dai produttori più solubile (LRS) e quindi meno tossica. Invece, come controllo positivo, cioè materiale cancerogeno, è stata impiegata la crocidolite NIEHS, caratterizzata dimensionalmente dal National Institute of Environmental Health Science. I campioni di fibre di (LR), (LV) e (LRS) utilizzati nello studio avevano un contenuto di ossidi alcalino e alcalino terrosi ($\text{Na}_2\text{O}+\text{K}_2\text{O}+\text{CaO}+\text{MgO}+\text{BaO}$) superiori al 18% in peso e non erano classificati come cancerogeni delle ditte produttrici in quanto rispondevano ad una delle condizioni del Decreto del Ministero della Sanità del 1 settembre 1998.

Nella tabella 1 è mostrata la composizione chimica, espressa come percentuale in peso dei diversi elementi chimici, delle fibre utilizzate.



Le fibre ceramiche, la lana di roccia e la lana di vetro sono state caratterizzate dimensionalmente prima dello studio in vitro. La riduzione della lunghezza è stata ottenuta con la tecnica del taglio del bisturi per i campioni di lana di vetro e di lana di roccia, mentre per le fibre ceramiche è stato impiegato il metodo della pressione. Dopo aver eseguito tale riduzione sono state preparate

sospensioni acquose delle fibre vetrose e sono stati misurati i diametri e le lunghezze di 200 fibre di ciascun campione, utilizzando come tecnica analitica la microscopia elettronica a scansione.

I materiali sono stati così caratterizzati dimensionalmente calcolando i valori dei principali parametri statistici. Il metodo della riduzione della lunghezza delle fibre e la successiva caratterizzazione dimensionale è descritto da Casciardi ed altri [27].

Per quanto riguarda la lana di roccia più solubile la caratterizzazione era già stata fornita dalla ditta produttrice.

Lo studio è stato effettuato su cellule mesoteliali umane (linea cellulare MeT-5A) per le quali è stata dimostrata una particolare sensibilità agli effetti provocati dall'esposizione a fibre di amianto. In



questo studio sono stati valutati gli effetti citotossico, genotossico ed ossidativo indotti in vitro da fibre di amianto (crocidolite) e materiali sostitutivi (lana di vetro, lana di roccia, lana di roccia solubile, fibre ceramiche) a diverse dosi e

tempi di esposizione. Il numero di fibre per unità di peso erano $3.16 \times 10^3 / \mu\text{g}$ per CR, $0.5 \times 10^3 / \mu\text{g}$ per LV, $1.8 \times 10^3 / \mu\text{g}$ per LR, $0.4 \times 10^3 / \mu\text{g}$ per LRS e $1 \times 10^3 / \mu\text{g}$ per FC. In particolare il numero di fibre WHO e WHO $>20 \mu\text{m}$ per unità di peso erano rispettivamente $1.52 \times 10^3 / \mu\text{g}$ e $0.36 \times 10^3 / \mu\text{g}$ per CR, $0.19 \times 10^3 / \mu\text{g}$ e $0.14 \times 10^3 / \mu\text{g}$ per LV, $1.3 \times 10^3 / \mu\text{g}$ per LR, $0.18 \times 10^3 / \mu\text{g}$ e $0.16 \times 10^3 / \mu\text{g}$ per LRS, $0.52 \times 10^3 / \mu\text{g}$ e $0.34 \times 10^3 / \mu\text{g}$ per FC.

La linea cellulare mesoteliale umana (MeT5A) è stata esposta a 2,5 e 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ di lana di vetro, lana di roccia, lana di roccia più solubile, fibre ceramiche e crocidolite per 24 ore e la presenza di alterazioni a livello della membrana cellulare è stata valutata tramite la microscopia elettronica a scansione (SEM).

Le cellule, dopo essere state fissate (glutaraldeide 2,5% in tampone fosfato; tetrossido di osmio al 1% nello stesso tampone), disidratate (serie crescente di alcol etilico e critici point dryer) e ricoperte con un sottile strato di oro, sono state osservate al microscopio elettronico a scansione LEO 44.

L'eventuale danno genotossico indotto dall'esposizione ad amianto (crocidolite) e fibre sostitutive è stato valutato, mediante Comet test modificato con l'uso dell'enzima Gpg che riconosce e taglia il DNA in corrispondenza delle basi ossidate, su cellule esposte a basse dosi (1, 2, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) di fibre per un breve periodo di tempo (2h).

Tale metodica molto sensibile consente di studiare gli effetti precoci di danno sia diretto che ossidativi al DNA. Il Comet test modificato prevede la preparazione, per ciascun campione da esaminare, di 2 vetrini su cui viene depositato uno strato di cellule inglobate in agarosio e successivamente si effettua l'analisi delle cellule in uno specifico tampone.

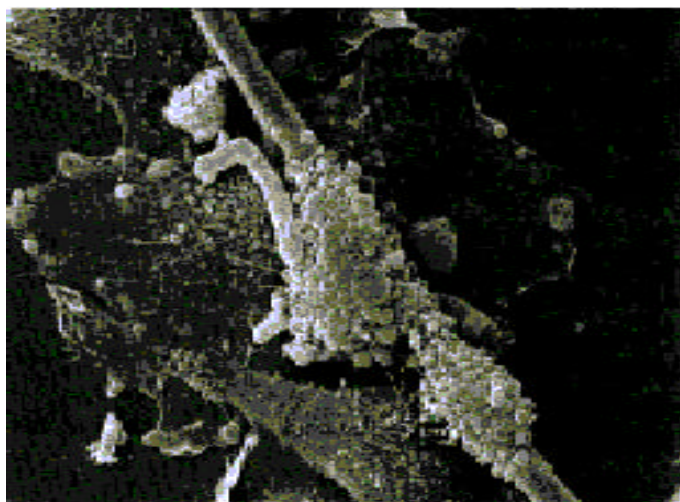


FIGURA 2: Cellule mesoteliali umane (MeT-5°) esposte a lana di roccia ($5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$).
Bar = $5 \mu\text{m}$

Per valutare il danno diretto al DNA (ossia la presenza di rotture sulla doppia elica) le cellule presenti nello strato di agarosio di uno dei due vetrini viene sottoposto direttamente ad elettroforesi e il DNA viene poi colorato con il colorante fluorescente etidio bromuro per la lettura al microscopio a fluorescenza. Mentre per evidenziare il danno ossidativo, le cellule presenti nello strato di agarosio del secondo vetrino, prima dell'elettroforesi e

della successiva colorazione e lettura al microscopio, vengono trattate con l'enzima Fpg che riconosce e taglia il DNA in corrispondenza delle basi ossidate, frammentando il DNA in corrispondenza di tali siti. Durante la corsa elettroforetica i frammenti di DNA, che nell'opportuno tampone di corsa in cui vengono immersi si caricano elettricamente, si spostano verso l'elettrodo di carica opposta con minore o maggiore velocità a seconda della lunghezza del frammento stesso generando una scia con i frammenti più piccoli (quindi più veloci) che si posizioneranno più lontani dal punto di deposizione del nucleo cellulare nello strato di agarosio. I nuclei con DNA danneggiato appaiono quindi in forma di comete la cui lunghezza ed intensità di fluorescenza della coda è proporzionale al numero delle rotture sulla doppia elica di DNA e quindi del danno di tipo diretto al DNA nel caso del vetrino non trattato con l'enzima Fpg, mentre è proporzionale al danno di tipo ossidativo nel caso del vetrino trattato con l'enzima. Il parametro del momento che esprime il prodotto dell'intensità di fluorescenza della coda della cometa per la sua lunghezza, è stato utilizzato come indice di valutazione del danno sia diretto che ossidativo ad DNA.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Nella tabella 2 sono riportati i principali parametri statistici dimensionali (diametri e lunghezze) di tutte le fibre testate.

Per quanto riguarda l'osservazione al SEM la membrana delle MeT5A non esposte, appariva ricoperta da sottili e lunghi microvilli (Figura 1 a).

Mentre già dopo esposizione alla dose di $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ di fibre di crocidolite si è osservata la perdita dei microvilli di membrana e la riduzione del volume cellulare (Figura 1 b).

Nella MeT5A trattate con $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ di fibre lana di vetro si è notato che la quantità dei microvilli di membrana, diminuiva considerevolmente, ed in modo più marcato nelle cellule trattate con lana di roccia, con lana di roccia solubile e con fibre ceramiche.

Nelle cellule trattate con lana di roccia solubile alle dosi più elevate non sono stati evidenziati altri evidenti cambiamenti morfologici, mentre in quelle esposte a lana di roccia si è notata la presenza in alcune cellule di blebs. (Figura 2).

Le cellule esposte a fibre ceramiche, alle stesse dosi, hanno evidenziato una ulteriore diminuzione del numero dei microvilli di membrana.

Per quel che riguarda le fibre minerali sostitutive si è evidenziato un significativo danno genotossico diretto al DNA indotto da fibre ceramiche evidente già a dosi molto basse ($1,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), mentre per le altre fibre la presenza di tale tipo di danno è evidente solo alle dosi più elevate.

Per quel che riguarda il danno ossidativo al DNA, non sembra esserci per le fibre minerali sostitutive una significativa induzione di danno alle dosi e tempi di esposizione utilizzate, eccetto che per la lana di roccia per la quale un evidente

presenza di danno ossidativo è stata individuata alle dosi più elevate (5 e 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$).

I risultati ottenuti hanno mostrato un elevato danno citotossico delle fibre di crocidolite a livello della membrana plasmatica e un danno sia diretto che ossidativo al DNA già a basse dosi. Tra le fibre sostitutive le ceramiche mostravano gli effetti più evidenti sia a livello citotossico che genotossico già alle dosi più basse.

Mentre un danno di tipo ossidativo a livello sia della membrana cellulare che del DNA è stato riscontrato solo per la lana di roccia. Per quanto riguarda la lana di vetro e la lana di roccia solubile sono stati evidenziati lievi effetti citotossici e genotossici solo alle dosi più elevate.

In conclusione tali risultati sembrano confermare per quanto riguarda sia le fibre ceramiche che la lana di vetro la più recente classificazione IARC (2002) che inserisce le prime nel gruppo 2B (possibili cancerogeni per l'uomo) e le seconde nel gruppo 3 ossia non cancerogene per l'uomo.

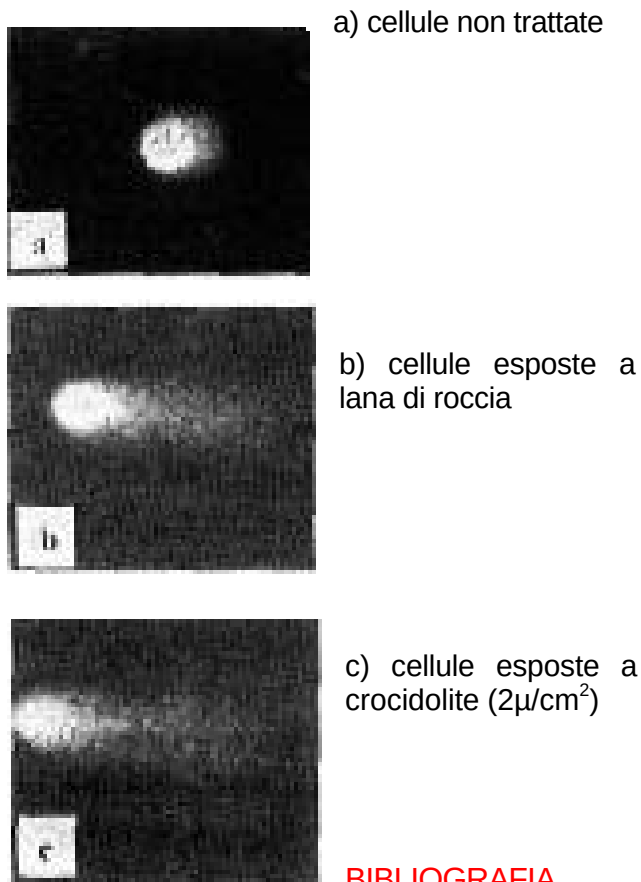
L'induzione di stress ossidativo cellulare da noi riscontrato per la lana di roccia tradizionale sembra non concordare con la classificazione nel gruppo 3 della IARC, mentre confermano l'effetto ossidativo già evidenziato per questo tipo di fibra di diversi studi.

Gli effetti genotossici ed ossidativi evidenziati nel nostro studio per alcuni tipi di fibre sostitutive necessitano di ulteriori ed approfonditi studi data la relazione tra

tali effetti e l'iniziazione del processo di cancerogenesi.

Figura 3:

Comet test con enzima Fpg:



BIBLIOGRAFIA

[1] LEE I.M., HENNEKENS C.H., TRICHOPOULOS D., BURING I.E. Manmade vitreous fibers and risk of respiratory system cancer: a review of the epidemiologic evidence, 1. Occupo

Environ. Med. 37/6, 725-738, 1995

[2] BOFFETTA P., ANDERSON A., HANSEN J., Cancer incidence among European man made vitreous production workers, Scano J. Work Environ. Health. 25,222-226, 1999

[3] MARSH G.M., YOUK A.O., STONE R.A., BUCHANICH I.M., CHURG A., COLBY T.V., Historical cohort study of US man-mode vitreous fiber production workers: IL Mortality from mesothelioma, J. Occupo Med. 43, 757-766, 2001

[4] LEMASTERS G.K., LOCKEY J.E., YIIN I.H., HILBERT T.J.; LEVIN L.S., RICE C.H., Mortality of workers Occupationally Exposed to Refractory Ceramic Fibers, 1. Occupo Environ. Med. 45, 440-450, 2003

[5] BERRIGAN D., Respiratory Cancer and Exposure to Man-Made Vitreous Fibers: A systematic Review. Am. 1. Ind. Med. 42, 354-362, 2002

[6] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), Man-Made Mineral fibres and Radon Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans Lyon, France Vol. 43, 1988

[7] HESTERBERG T.W., MILLER W.C., MAST R., MCCONNEL E.E., BERNSTEIN D.M., ANDERSON R., Relationship between lung biopersistence and biological effects of Man-Mode

vitreous fibers after chronic inhalation in rats, *Environ Health Perspect.* 102 Suppl. 5, 133-137, 1994

[8] KJAMSTRUP O., DA VIS 1 M.G., ELLEHAUGE A., GULDBERG M., The Biopersistence and Pathogenicity of Man-Made vitreous fibres after Short and Long-term inhalation, *Ann. Occup. Hyg.* 42/3, 191-199, 1998

[9] EVERITT 1.1 Mechanisms of fiber-induced diseases: implications for safety evaluation of synthetic vitreous fiber, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 20, S68-S75, 1994

[10] BROWN D.M., FISHER C.D., DONALDSON K., Free radical activity of synthetic vitreous fibers: iron chelation inhibits hydroxyl radical generation by refractory ceramic fiber, *J. Toxicol. Environ. Health* 53, 545-56, 1998

[11] FUBINI B., Use of physico-chemical and cell-free assay to evaluate the potential carcinogenicity of fibers. In: Mechanisms of fibre carcinogenesis. IARC Scientific Publications, Lyon France 140, 35-54, 1996

[12] LUOTO K., HOLOPAINEN M., SAVOLAINEN K., Scanning Electron Microscopic Study on the Changes in the Cell Surface Morphology of Rat Alveolar Macrophages after Their Exposure to Man-Made Vitreous Fibers, *Environ. Health* 66, 198-207, 1994

[13] LUTZ W., KRAJEWSKA B., Oxidative stress as a basic mechanism of the carcinogenic effect of man made mineral fibers on human body. *Med. Pr.* 46/3, 275-284, 1995

[14] GILMOUR P.S., BROWN D.M., BESWICK P.H., MACNEE W., RAHMAN I., DONALDSON K. Free radical activity of industrial fibers: role of iron in oxidative stress and activation of transcription factors, *Environ. Health Perspect.* 105 Suppl. 5, 1313-1317, 1997

[15] MURATA-KAMIY A.N., TSUTSUI T., FUJINO A. Determination of carcinogenic potential of mineral fibers by 8-hydroxydeoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage in mammalian cells, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 70, 321-326, 1997

[16] BROWN D.M., FISHER C., DONALDSON K. Free Radical activity of synthetic vitreous fibres: iron chelation inhibits hydroxyl radical generation by refractory ceramic fiber, *J. Toxicol. Environ. Health* 53, 545-561, 1998

[17] RUOTSALAINEN M., HIRVONEN M. R., LUOTO K., SAVOLAINEN K.M., Production of reactive oxygen species by Man-Made vitreous fibres in human polymorphonuclear leukocytes, *Hum. Exp. Toxicol* 18, 354-362, 1999

[18] ZHONG B., WHONG W., ONG T. Detection of mineral-dust-induced DNA damage in two mammalian cell lines

using the alkaline single cell gel/comet assay, *Mutat. Res.* 393, 181-187, 1997

[19] LECHNER 1F., TOKIWA A.T., LAVECK M., BENEDICT W.F., BANDSCHLEGELS., YEAGERH., BANERJEE A., HARRIS C.C., Asbestos-associated chromosomal changes in human mesothelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 3884-3888, 1985

[20] PELIN K., KIVIPENSAS P., LINNAINMAA K., Effects of asbestos and Man-Made vitreous fibers on cell division in cultured human mesothelial cells in comparison to rodent cells, *Environ. Mol. Mutagen.* 25, 118-125, 1995

[21] BROADBENT V.C., YANG L., SCAVO L.M., ERNST I.D., BOYLAND A., Asbestos induces apoptosis of human and rabbit pleural mesothelial cells via reactive oxygen species, *J. Clin. Invest.* 98/9, 2050-2059, 1996

[22] PUHAKKA A., OLLIKAINEN T., SOINI Y., KAHLOS K., SAIL Y M., KOISTINEN P., PAAKKO P., LINNAINMAA K., KINNULA V.L. Modulation of DNA single-strand breaks by intracellular glutathione in human lung cells exposed to asbestos fibers, *Mutat. Res.* 514, 7-17, 2002

[23] LIU W., ERNST J.D., BROADBENT C.V. Phagocytosis of crocidolite asbestos induces oxidative stress, DNA damage, and apoptosis in mesothelial cells, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 23, 371-378, 2000

[24] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC) Monographs on the Evaluation of carcinogenic Risk to Humans: Man-Made vitreous fibres. Lyon, France Vol. 81, 57-339, 2002

[25] DIRETTIVA 97/69/CE della Commissione del 5 dicembre 1997, recante ventitreesimo adeguamento al progresso tecnico della direttiva 67/548/CEE del Consiglio Concernente il ravvicinamento delle disposizioni legislative, regolamentali e amministrative relative alla classificazione, all'imballaggio e all'etichettatura delle sostanze pericolose, pubbl. su G.U. dell'Unione Europea n. L. 343 del 13/12/97.

[26] MALORNI W., DONELLI G., Cell death general features and morphological aspects, In: Annals New York Academy of Science, pp. 218-233, 1992.

[27] CASCIARDI S., CAMPOPIANO A., FIORAVANTI F., RAMIRES D., un esempio di caratterizzazione dimensionale di fibre vetrose artificiali. La Medicina del Lavoro, vol. 94, n. 6, 542-555, 2003.