

1. INTRODUZIONE

1.1 L'UTILIZZO DEGLI ACIDI MERCAPTURICI COME BIOMARCATORI DI ESPOSIZIONE A TOSSICI INDUSTRIALI

L'uomo è quotidianamente e, in genere, inconsapevolmente esposto ad una molteplicità di agenti nocivi, molti dei quali dotati di potere mutageno e/o cancerogeno. Il numero di tali agenti, presenti nell'ambiente di vita e/o di lavoro o introdotti dall'esterno attraverso gli alimenti, i farmaci e via dicendo, è in continuo incremento. La presenza di una molteplicità di situazioni a rischio impone da una parte l'adozione di misure volte, ove possibile, all'eliminazione delle fonti di rischio, alla prevenzione o alla minimizzazione degli effetti nocivi derivanti dall'esposizione a detti agenti, dall'altra richiede la disponibilità di un sistema di monitoraggio capace di individuare e valutare l'esposizione.

L'efficienza dei metodi di biomonitoraggio dipende dalla disponibilità di marcatori che riflettano l'entità dell'assorbimento, la suscettibilità dell'individuo in esame ed eventuali alterazioni patologiche. Un marcatore di esposizione ideale deve essere specifico della specie chimica considerata, determinabile anche quando presente in minime quantità, ottenibile con tecniche non invasive, deve essere determinabile mediante metodi analitici non troppo costosi e, infine, quantitativamente correlato all'esposizione principale^{1,2}. In tale ottica uno dei marcatori proposti negli anni scorsi, ovvero la determinazione non selettiva dei tioeteri urinari totali, risulta carente in termini di sensibilità e selettività, non essendo capace di fornire informazioni sufficienti circa la particolare natura dell'esposizione³. Al contrario, l'identificazione e la determinazione quantitativa degli acidi

mercapturici urinari forniscono precise informazioni farmacocinetiche⁴. Gli acidi mercapturici rappresentano i prodotti metabolici finali di un importante meccanismo di biotrasformazione degli xenobiotici, il cammino di coniugazione con il glutatione (GSH)⁵.

Il glutatione è un tripeptide fisiologico che può essere escreto nelle urine o nella bile direttamente o dopo ulteriore reazione con sostanze xenobiotiche, reazione che porta alla formazione di composti N-acetilcisteinici denominati acidi mercapturici (Figura 1). Il tripeptide glutationico è composto da cisteina, glicina e γ -glutammina e rappresenta il più abbondante composto sulfidrilico del citosol cellulare⁶⁻¹⁰. La sua concentrazione varia tra i diversi tessuti in dipendenza dello stato nutrizionale ed ormonale⁶. Le reazioni di coniugazione sono catalizzate da diversi isoenzimi glutatione-S-transferasici (GSH-S-transferasici) disponibili nei vari tessuti¹¹. Gli enzimi GSH-S-transferasici si dividono in classe- α (basici), classe- μ (neutri) e classe- π (acidi). Gli isoenzimi di classe- μ sono assenti in circa il 50% degli uomini¹². Al contrario, la classe- α è la principale classe di isoenzimi presenti nel fegato, nei reni, nell'intestino e nei glandi adrenalini umani. Gli isoenzimi di classe- π sono quasi assenti nel fegato e nei glandi adrenalini umani, ma si ritrovano in molti altri tessuti¹³.

La classe degli enzimi glutatione-S-transferasici catalizza la reazione tra il gruppo sulfidrilico nucleofilo del glutatione con molecole che contengono atomi di carbonio elettrofili. La formazione dell'acido mercapturico avviene dopo perdita enzimatica da parte del GSH dapprima della glutammina, poi della glicina, con formazione di coniugati allo zolfo cisteinico. Questo metabolita può subire diverse

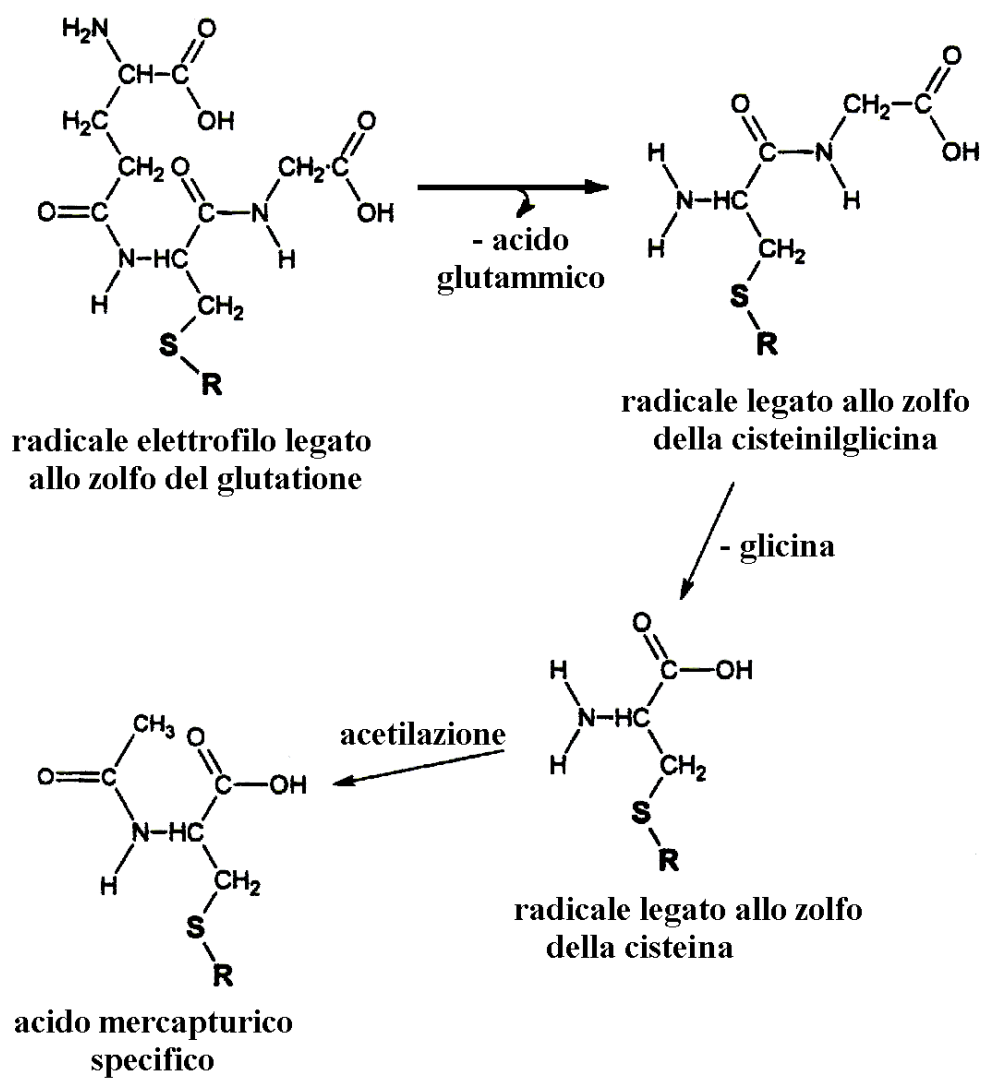


Figura 1. Schema generale di coniugazione tra sostanze xenobiotiche e glutathione: la formazione degli acidi mercapturici urinari.

reazioni, la più importante delle quali è l'acetilazione dell'ammino gruppo della cisteina, con formazione dell'acido mercapturico¹⁴.

Molti dei substrati noti delle GSH-S-transferasi sono xenobiotici sintetici¹⁵, ma la coniugazione può essere osservata anche con composti endogeni o naturali. Nonostante la natura di tali enzimi negli uomini non sia del tutto nota, esistono chiari dati circa la loro concentrazione ed attività specifica nei vari organi delle cavie di laboratorio⁶. Le reazioni di biotrasformazione dipendono dal tipo di esposizione, inoltre, la natura chimica della sostanza determina l'effetto di tossificazione o detossificazione in un organo rispetto ad un altro⁶.

Se lo xenobiotico in esame ha una natura idrofilica, il coniugato glutationico presenta le proprietà necessarie per essere escreto nella bile o essere convertito in acido mercapturico, escreto, poi, nelle urine o nella bile¹⁶. Se si è esposti ad un composto lipofilo, la biotrasformazione previene l'accumulo consentendone l'eliminazione¹⁰. Tale eliminazione è proporzionale alla concentrazione nel plasma, ovvero maggiore è la concentrazione nel plasma tanto più grande sarà l'escrezione renale per unità di tempo. La costante della velocità di eliminazione e il tempo di emivita per l'eliminazione renale possono essere calcolate dalla curva della concentrazione plasmatica rispetto al tempo.

La capacità dell'organismo di espellere le sostanze esogene varia nell'arco della giornata in relazione alla variazione della funzionalità renale, di qui la necessità di correggere i valori di concentrazione degli analiti urinari per un fattore di normalizzazione, capace di tenere in giusta considerazione la variata funzionalità dell'organismo. Molto diffusa è la correzione delle concentrazioni dei metaboliti urinari rispetto al valore della creatinina. La creatinina è un prodotto che deriva da

processi metabolici dei tessuti muscolari striati; una quantità di creatinina relativamente costante, circa 1.7 g, viene escreta nell'arco delle 24 h, indipendentemente dal volume di urina filtrato dal rene. Queste due proprietà sono alla base della correzione della concentrazione di un metabolita urinario per il valore di creatinina rilevato nel medesimo campione.

Dati di letteratura circa la stabilità degli acidi mercapturici in campioni di urina conservati in freezer (-20 °C) sono diversi a seconda della natura chimica della sostanza da cui si formano^{17,18}. Gli acidi mercapturici sono considerati metaboliti dal tempo di emivita relativamente breve (da un minimo di 2-3 h per i mercapturati dell' α -bromoisovalerurea¹⁹ ad un massimo di 8-16 h per gli acidi mercapturici derivanti dal *trans*-1,3-dicloropropene²⁰).

L'utilizzo dei coniugati della glutathione-S-transferasi, escreti come acidi mercapturici nelle urine (entro le 24 h successive all'esposizione), sembra essere un buon metodo per il monitoraggio dell'esposizione umana a tossici di origine industriale¹⁴.

La presente tesi di dottorato ha come obiettivo lo studio degli acidi mercapturici derivanti dalla coniugazione del glutathione con due tossici industriali, benzene e stirene, composti metabolizzati ad epossidi e, pertanto, dotati di elevata reattività nei confronti delle macromolecole informazionali.

1.2 BENZENE

1.2.1 ESPOSIZIONE PROFESSIONALE ED IN AMBIENTE URBANO

Il benzene è stato ampiamente utilizzato in ambito industriale come solvente o come materia prima, ma per le caratteristiche tossicologiche e in particolare per la

comprovata cancerogenicità, è stato progressivamente sostituito da altri solventi aromatici o alifatici. Permangono, tuttavia, alcune attività nelle quali è impiegato, ad esempio in alcune lavorazioni chimiche di sintesi, nei laboratori di analisi, nella raffinazione del petrolio, nonché nella preparazione e distribuzione dei distillati petroliferi²¹. Tali processi rappresentano una importante fonte di esposizione professionale a benzene.

La presenza nei carburanti in concentrazioni prossime all'1% e nei gas di scarico delle autovetture hanno contribuito a rendere il benzene un inquinante ubiquitario: i livelli di benzene nell'aria variano tra 0.1 e 17 ppb nelle regioni non industrializzate, ma crescono fino ad essere comprese tra 0.01 e 0.09 ppm nelle grandi città¹⁴.

Un'altra importante fonte di microinquinamento ambientale di tipo *indoor* è rappresentata dal fumo: dalla combustione di una sigaretta si liberano circa 50 µg di benzene, in parte assorbiti ed in parte liberati nell'ambiente. Ulteriori sorgenti ambientali di benzene sono rappresentate dalla combustione di legna ed altri materiali organici, liberati ad esempio dalle eruzioni vulcaniche.

Si stima che circa tre milioni di lavoratori siano potenzialmente esposti a benzene ed è stato valutato che in un giorno l'uomo assorba mediamente 0.02 µg di benzene dal cibo, 0.015 µg dall'acqua e 70 µg dall'aria ambiente²².

1.2.2 ASSORBIMENTO, METABOLISMO ED ESCREZIONE

Vista la natura volatile e la liposolubilità, il benzene è velocemente assorbito dall'organismo in seguito ad ingestione, inalazione o contatto dermico. Il benzene inalato diffonde rapidamente nei polmoni ed è velocemente assorbito dal flusso

sanguigno²³⁻²⁵. L'assorbimento cutaneo di benzene è risultato significativo in presenza di un contatto diretto tra il solvente liquido e la cute. Nell'uomo la velocità di assorbimento attraverso la pelle è pari a $0.4 \text{ mg}/(\text{cm}^2 \cdot \text{h})$ ^{25,26}. L'assorbimento gastroenterico di benzene è teoricamente molto elevato, vista la liposolubilità del solvente: non sono riportati studi sull'uomo, mentre per le cavie di laboratorio, cui si somministravano elevate dosi di [¹⁴C]benzene, si assisteva ad un assorbimento intestinale pari al 100%²⁷.

Molti autori hanno riportato che nell'uomo la frazione di benzene eliminata nell'aria espirata varia tra il 10 e il 50%, in dipendenza dall'attività metabolica e dalla quantità di grasso corporeo^{23,28}. Una quota inferiore all'1% della dose di benzene assorbito viene escreto immodificato nelle urine²¹. La restante frazione è metabolizzata dal sistema delle monossigenasi del citocromo microsomiale P-450 2E1 (CYP2E1) per dare luogo a benzene epossido²⁸. L'ossidazione a benzene epossido mediata dagli enzimi CYP2E1 e l'interazione del benzene con un radicale idrossilico per formare un radicale idrossicicloesadienile intermedio rappresentano le principali vie metaboliche del benzene²⁹. Il benzene epossido può, in alternativa, reagire con il glutathione per formare l'acido S-fenilmercapturico (S-PMA) escreto nelle urine. Il metabolismo completo del benzene, schematizzato in Figura 2, prevede la formazione di tre differenti classi di composti: metaboliti con anello idrossilato, metaboliti con anello dimerico e metaboliti ad anello aperto.

I metaboliti ad anello idrossilato, quali fenolo, *p*-idrochinone, catecolo e 1,4-benzotriolo, formano prevalentemente solfati e coniugati glucuronidici escreti nelle urine. Alcuni di questi metaboliti ad anello idrossilato possono essere ulteriormente ossidati ai corrispondenti semichinoni per reagire con le macromolecole cellulari²⁹.

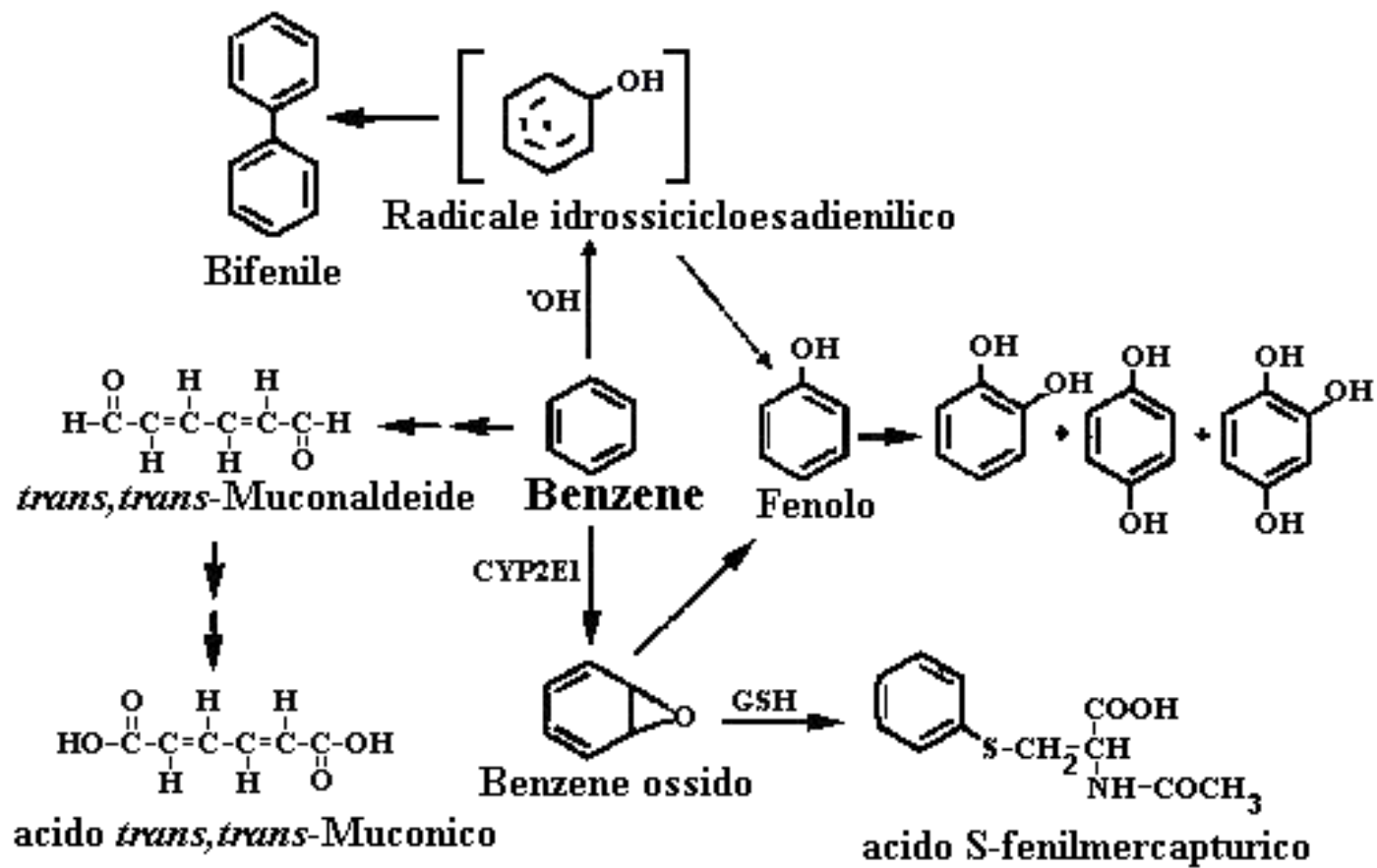


Figura 2. Metabolismo del benzene.

I metaboliti ad anello dimerico, tra cui 2,2'-bifenolo e 4,4'-bifenolo, possono formarsi a partire dal fenolo attraverso un meccanismo a radicali liberi. L'ulteriore metabolizzazione di tali bifenoli porta alla formazione di polimeri insolubili, che possono legarsi in maniera non covalente con le macromolecole cellulari²⁹. Anche gli intermedi idrossicicloesadienilici possono portare alla formazione di bifenoli, che possono essere ulteriormente metabolizzati a bifenoli o altri dimeri e prodotti polimerici²⁹.

I metaboliti ad anello aperto, come l'acido *trans,trans*-muconico (t,t-MA), derivano dalla *trans,trans*-muconaldeide²⁹. La quantità di benzene ritrovata nelle urine in forma di acido *trans,trans*-muconico è pari a circa il 2% della dose di solvente assorbito³⁰. Le velocità di formazione e di eliminazione di tale metabolita sono molto elevate nei ratti e nei topi (con un'emivita biologica di circa 60 minuti)³¹. Per l'uomo i dati sono contrastanti: in alcune ricerche si riportano valori elevati della concentrazione di t,t-MA al termine del turno di lavoro per poi ritornare ai valori fisiologici dopo 16 h, con una conseguente emivita del t,t-MA di 3-4 h²¹; in altre ricerche emerge una netta tendenza all'accumulo settimanale di acido *trans,trans*-muconico, come diretta conseguenza dell'esposizione prolungata a benzene^{21,32}.

L'escrezione urinaria di acido S-fenilmercapturico è stata presa in considerazione alla fine degli anni '80, quando alcuni esperimenti su animali hanno evidenziato che questo metabolita minore del benzene aumentava nelle urine anche dopo modeste esposizioni al solvente e sembrava derivare solo dal benzene²¹. In uno studio condotto su lavoratori di una fabbrica per la produzione di carbon coke, i campioni di urina raccolti ad inizio turno presentavano valori di S-PMA nell'intervallo dei valori di riferimento, mentre quelli raccolti a fine turno erano

correlati con l'entità dell'esposizione recente a benzene³². In uno studio condotto su lavoratori calzaturieri cinesi la cinetica urinaria dell'S-PMA presentava un'emivita di 12.8 h, con una tendenza all'accumulo nel corso della settimana lavorativa³³. Al contrario, le numerose e recenti esperienze sull'utilizzo di tale metabolita per il monitoraggio di soggetti professionalmente esposti a benzene sembrerebbero non evidenziare la tendenza all'accumulo settimanale²¹.

1.2.3 TOSSICITÀ E CANCEROGENICITÀ

Il benzene produce molte risposte biologiche. L'esposizione discontinua ad alte dosi può provocare effetti acuti, quali depressione del sistema nervoso centrale e perdita della coscienza²⁹. Il benzene, inoltre, sopprime il sistema immunitario umano^{34,35}.

Nel 1982 l'International Agency for Research on Cancer (IARC) ha stabilito che esiste una relazione tra esposizione ad alti livelli di benzene e insorgenza di anemia, leucopenia, trombocitopenia, linfocitopenia, anemia aplastica, leucemia, soprattutto leucemia mieloide acuta³⁶⁻³⁸. Inoltre, anche la possibilità di sviluppare cancro ai polmoni, morbo di Hodgkin's e linfomi è stata correlata all'esposizione a benzene³⁹⁻⁴¹. Studi su lavoratori esposti a bassi livelli di benzene non hanno ancora portato a risultati definitivi, ma hanno evidenziato l'insorgenza di un numero maggiore di mielomi multipli, leucemia mieloide acuta e altri tipi di leucemie⁴²⁻⁴⁶.

Negli esperimenti su animali, un'esposizione cronica a benzene per via inalatoria o per dosaggio orale produce neoplasie su siti multipli. Molti dei tumori hanno origine epiteliale, tra cui tumori della cavità oro-nasale, del polmone, del fegato, delle ghiandole mammarie e della pelle²⁹. La mielotossicità del benzene nei

topi è più pronunciata in seguito a dosaggio discontinuo rispetto ad un'esposizione prolungata⁴⁷.

Un altro tipo di risposta biologica registrata a seguito di esposizione a benzene è la produzione di aberrazioni cromosomiche^{48,49}, scambio di cromatidi fratelli⁵⁰, ed induzione di micronuclei^{51,52}. Infine, nel topo sono state rilevate mutazioni *in vivo* del gene *hprt* e del gene *lacI*⁵³.

Il meccanismo responsabile della tossicità e cancerogenicità del benzene non è stato ancora pienamente delucidato. Molti studi hanno evidenziato che la formazione di intermedi attivi rappresenti un prerequisito indispensabile per spiegare gli effetti tossici e cancerogeni⁵⁷⁻⁵⁸. I metaboliti del benzene responsabili in ultima analisi degli effetti tossici non sono ancora stati univocamente definiti, tuttavia, molte ipotesi sono state avanzate riguardo alle varie specie attive che si formano nel corso del metabolismo del benzene⁵⁹⁻⁶¹.

La comprovata cancerogenicità del benzene ha indotto l'ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) a classificarlo nella classe A1, carcinogeno riconosciuto per l'uomo⁶². Inoltre negli anni la stessa agenzia ha progressivamente diminuito i valori limite di soglia, mediati su periodo di esposizione di 8 ore lavorative per complessive 40 ore settimanali (Valore Limite di Soglia, Threshold Limit Value, TLV-TWA), fissandoli a 0.5 ppm (1.6 mg/m³)⁶³. I valori TLV-TWA, proposti dall'ACGIH, si riferiscono alle concentrazioni di inquinante alle quali si ritiene che pressoché tutti i lavoratori possano essere esposti senza subire effetti nocivi. L'allegato I[^] racchiude una schematizzazione degli attuali valori TLV-TWA per il benzene, nonché una lista dei valori di riferimento per gli indicatori biologici attualmente proposti.

1.2.4 BIOMARCATORI DI ESPOSIZIONE ED EFFETTO

La stima dell'esposizione a sostanze chimiche negli ambienti di lavoro è tradizionalmente realizzata mediante la misura delle loro concentrazioni nell'aria ambiente. Comunque, le difficoltà connesse nel correlare i parametri esterni con l'ammontare di sostanza realmente assorbita hanno fatto crescere l'interesse verso lo sviluppo di metodi incentrati sull'utilizzo dei metaboliti presenti nei vari fluidi biologici. Sono stati proposti molti biomarcatori per evidenziare un'esposizione a benzene, tra cui i più importanti sono: benzene non metabolizzato, fenolo, catecolo, *p*-idrochinone e benzentriolo escreti nelle urine, concentrazione urinaria dell'acido *trans,trans*-muconico e dell'acido S-fenilmercapturico, addotti emoglobinici.

Fino al 1995 l'ACGIH ha suggerito un TLV-TWA per il benzene pari a 10 ppm (32 mg/m³), tale valore è stato diminuito nel 2000 fissandolo a 0.5 ppm (1.6 mg/m³) e, contemporaneamente, per il monitoraggio biologico è stata proposta la determinazione di benzene nell'aria espirata o nell'aria alveolare. I campioni dovevano essere raccolti prima dell'inizio di un nuovo turno di lavoro ed il loro limite era pari a 0.08 ppm (0.26 µg/l) nell'aria espirata mista e di 0.12 ppm (0.38 µg/l) nell'aria alveolare. Tali indicatori erano considerati un indice semiquantitativo. L'utilizzo dell'aria alveolare nell'esposizione professionale a benzene di modesta entità non è stato ancora sufficientemente sperimentato. Non vi sono tuttavia dubbi che la concentrazione alveolare di benzene sia in equilibrio costante e dinamico con quella ematica, a sua volta correlata con quella urinaria²¹. La Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG)⁶⁴ ha introdotto anche la concentrazione di benzene in campioni di sangue, raccolti al termine del turno di lavoro, quale indicatore sufficientemente affidabile per il monitoraggio biologico dell'esposizione

professionale. Una correlazione lineare costantemente significativa tra la concentrazione ambientale di benzene e quella ematica o alveolare è stata rilevata da numerosi autori^{30,65-67}.

L'utilizzo relativamente recente della concentrazione urinaria di benzene per valutare l'esposizione al solvente ha fornito risultati incoraggianti e significativamente correlati con i livelli espositivi. La concentrazione di benzene in campioni di urina raccolti al termine del turno di lavoro rappresenta un parametro correlato con l'esposizione registrata durante il turno lavorativo stesso²¹. I livelli attesi sono piuttosto bassi, visto il basso valore del coefficiente di ripartizione urina/sangue del benzene, con conseguente limitato passaggio del solvente dal sangue all'urina. La determinazione del benzene urinario non è particolarmente complessa, ma la procedura di trattamento e conservazione del campione può influenzare drasticamente il risultato finale⁶⁸.

La concentrazione di fenolo nelle urine raccolte al termine del turno di lavoro ha rappresentato un utile Indicatore Biologico di Esposizione (Biological Exposure Index, BEI, valore della concentrazione di indicatore presente nei fluidi biologici di lavoratori sani, esposti per otto ore al giorno e per cinque giorni la settimana ad una concentrazione di sostanza pari al TLV-TWA) a benzene quando i limiti ambientali erano molto superiori a quelli attuali²¹. La presenza di apprezzabili livelli urinari di fenolo nella popolazione generale (prossime a $7 \text{ mg/l} \cong 5 \text{ mg/g creat}^{25}$) rende quest'indicatore poco sensibile per monitorare le dosi di benzene assorbite agli attuali limiti espositivi; il fenolo è, infatti, sensibile per esposizioni a benzene tendenzialmente superiori a 10 ppm (32 mg/m^3)²¹ e, pertanto, il suo utilizzo quale biomarcatore di esposizione a benzene è stato progressivamente abbandonato.

L'acido *trans,trans*-muconico risulta un buon indicatore di esposizione a benzene, ma può non essere specifico dell'esposizione a tale solvente visto che si forma anche nel metabolismo dell'acido sorbico³². L'ACGIH propone per l'acido *trans,trans*-muconico un BEI di 500 µg/g creat. Per esposizioni a concentrazioni ambientali di benzene di 0.6, 1, 2, 4 e 6 ppm la DFG raccomanda valori biologici equivalenti (BAT, Biologischen Arbeitsstoff Toleranz Wert) pari a 1, 6, 2, 3, 5 e 7 mg/l⁶⁴.

L'uso dell'acido S-fenilmercapturico come biomarcatore di esposizione a benzene risale al 1951 ad opera di Parke e Williams⁶⁹. Muller⁷⁰ ha studiato la relazione tra escrezione urinaria di S-PMA e benzene per concentrazioni del tossico superiori a 5 ppm, utilizzando i campioni di urina raccolti alla fine del turno lavorativo di un gruppo di operaie di un calzaturificio. L'esposizione a benzene variava da 0.3 a 4.5 ppm e la concentrazione di S-PMA nei campioni arrivava fino ad un valore massimo di 210 µg/l. La possibilità di usare l'acido S-fenilmercapturico come biomarcatore di esposizione a benzene è stata confermata dagli studi di van Sittert⁷¹, il quale ha esaminato campioni di dodici lavoratori di diverse industrie, indagando le caratteristiche di escrezione urinaria dell'S-PMA, la specificità e la sensibilità del metodo, le relazioni tra livelli di esposizione di benzene e concentrazione urinaria di S-PMA. I livelli di esposizione a benzene erano maggiori per i lavoratori delle industrie chimiche, 543 µg/g creat, mentre nelle raffinerie i livelli erano vicini a quelli ritrovati in campioni di controllo di fumatori e non fumatori, molto al di sotto del limite di rilevabilità (da 1 a 5 µg/g di creat). L'eliminazione dell'S-PMA avveniva in una singola fase, con un'emivita, in genere, pari a 9 h e i livelli maggiori si riscontravano alla fine del turno di lavoro di 8 h.

Eining⁷² ha utilizzato l'HPLC con rivelatore fluorimetrico per la determinazione dell'S-PMA: i limiti di rilevabilità riscontrati erano di circa 1 µg/l, permettendo di determinare il livello di S-PMA anche in soggetti non esposti. Successivamente la tecnica è stata migliorata utilizzando un metodo basato sulla gas cromatografia, più sensibile, consentendo di raggiungere limiti di 60 ng/l.

Bisogna sottolineare che per esposizioni ambientali molto basse, il fumo di sigarette può essere un fattore importante quando si valuti il livello di S-PMA, dal momento che esistono sensibili differenze tra i livelli del metabolita escreti da soggetti fumatori e quelli di soggetti non fumatori. In definitiva possiamo affermare che il livello di S-PMA urinario è proporzionale alla quantità di benzene assorbita dall'organismo e, per i lavoratori professionalmente esposti, la misura del livello di S-PMA è correlabile ad esposizioni a concentrazioni di benzene inferiori a 0.3 ppm per 8 h.

1.3 STIRENE

1.3.1 ESPOSIZIONE PROFESSIONALE ED IN AMBIENTE URBANO

Lo stirene, o vinilbenzene, è un composto aromatico volatile, liquido a temperatura ambiente, incolore, dall'odore pungente, poco solubile in acqua e ben solubile in alcol etilico, acetone ed etere⁷³. La prima produzione risale al 1831, ma solo nel 1925 si riuscì a produrre commercialmente stirene di elevata purezza. Nel corso degli ultimi 50 anni, la produzione di stirene ha assunto una crescente rilevanza industriale, tanto che oggi il numero di soggetti professionalmente esposti a stirene è molto elevato.