Nuovi indicatori per il monitoraggio biologico dell'esposizione ad IPA

Silvia Fustinoni
Azienda Ospedaliera "Istituti Clinici di Perfezionamento" (ICP) di Milano

MECCANISMO DI AZIONE GENOTOSSICO E CANCEROGENO

L'agenzia internazionale per la ricerca sul cancro (IARC), sulla base di evidenze epidemiologiche e di studi condotti in animali di laboratorio ha classificato alcuni idrocarburi policiclici aromatici come possibili cancerogeni (2A) e/o e probabili cancerogeni (2B) per l'uomo. Sei di questi composti sono etichettati come R45 dalla Unione Europea.

Sostanza	**IARC**	**UE**
Naphtalene	2B	
Benzo[*a*]antracene	2A	R45
Benzo[*b*]fluorantene	2B	R45
Benzo[*j*]flourantene	2B	R45
Benzo[*k*]flourantene	2B	R45
Benzo[*a*]pirene	2A	R45
Dibenzo[*a,h*]antracene	2A	R45
Dibenzo[*a,e*]pirene	2B	
Dibenzo[*a,h*]pirene	2B	
Dibenzo[*a,i*]pirene	2B	
Dibenzo[*a,l*]pirene	2B	
Indeno[1,2,3-*cd*]pyrene	2B	
5-Metilcrisene	2B	

Il meccanismo con cui questi composti agiscono come cancerogeni è ancora poco chiaro e diverse teorie sono state formulate a proposito. La più conosciuta è quella della *'bay region*", che riguarda, tra altri composti, il benzo[a]pirene, uno degli IPA con maggiore potenziale cancerogeno. Questa teoria si basa sul metabolismo del benzo[a]pirene ad opera degli enzimi ossidativi a formare, da prima un epossido e poi un diolo epossido In accordo con questa teoria, il diolo epossido formato deve possedere la funzione epossidica su un atomo di carbonio della baia e i due gruppi idrossilici che costituiscono il diolo preferenzialmente collocati nella regione pre-baia.

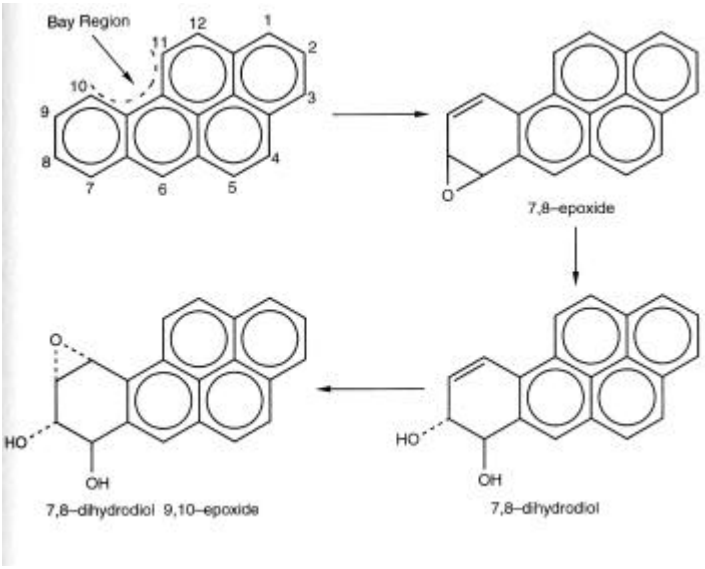

Figura 1. Metabolismo del benzo[a]pirene e formazione del dioloepossido

Il diolo epossido del benzo[a]pirene è un mutageno e viene ritenuto il responsabile della attività cancerogena di questo IPA. Il meccanismo con cui agirebbe è quello che passa attraverso la formazione di addotti.

ADDOTTI DEGLI IPA AL DNA E ALLE PROTEINE

Gli addotti sono il risultato di una reazione di addizione tra molecole molto reattive, generalmente elettrofile, ottenute da trasformazioni metaboliche ossidative degli xenobiotici e gruppi nucleofili presenti sul DNA e/o proteine. I dioli epossidi degli IPA, ad esempio quello derivato dal benzo[a]pirene, sono in grado di reagire con le macromolecole cellulari e dare gli addotti al DNA e alle proteine. Gli addotti al DNA, qualora non riparati, possono iniziare il processo di cancerogenesi attraverso la formazione di mutazioni. Su questa base alcuni ricercatori hanno suggerito che gli addotti al DNA possano essere utilizzati per la valutazione del rischio cancerogeno e che la loro quantificazione possa riflettere la dose biologicamente efficace.
Gli addotti al DNA e alle proteine vengono generalmente determinati in cellule ematiche ottenute da campioni di sangue periferico (linfociti, globuli rossi) o da plasma. Per evidenti ragioni etiche raramente questi addotti vengono determinati negli organi e/o tessuti bersaglio, dove si sviluppano i tumori. Inoltre, alcuni studi hanno mostrato come gli addotti misurati in campioni di sangue periferico e nell'organo bersaglio spesso non sono correlati. Per questo motivo quando gli addotti sono misurati in cellule di sangue periferico la valutazione del rischio cancerogeno appare molto incerta.
Gli addotti al DNA vengono generalmente determinati nei globuli bianchi, in particolare nei linfociti, che hanno un tempo di vita medio di circa 15 giorni. Nel caso delle proteine, in particolare albumina ed emoglobina, il tempo di vita medio è circa di 24 e 120 giorni, rispettivamente. Per questa ragione gli addotti possono essere considerati indicatori biologici di esposizione cumulativa.
Gli addotti tra IPA e proteine sono stati indagati fino ad ora in maniera molto superficiale, mentre numerosi studi sono stati condotti sugli addotti al DNA.

I metodi a disposizione per la valutazione degli addotti al DNA degli IPA sono di 3 tipi:

- Immunologici. Questi metodi sono basati sulla reazione antigene-anticorpo, sono generalmente poco sensibili (1-4 addotti/10^8 basi), e la possibilità di reazioni incrociate dell'anticorpo verso altri antigeni ne limita la specificità e rende problematica la determinazione quantitativa.
- Marcatura con atomi radioattivi. Questi metodi utilizzano la tecnica della post marcatura con ^{32}P del nucleotide modificato (addotto), sono molto sensibili (1 addotto/10^{10} basi) e richiedono piccole quantità di campione (µg). La maggiore limitazione di questa tecnica è la scarsa specificità.
- Cromatografici accoppiati con rivelatore a fluorescenza. In questo caso si sfrutta la fluorescenza specifica di alcuni IPA, come il benzo[a]pirene e i suoi metaboliti, che sono i composti generalmente determinati utilizzando questo metodo. La tecnica è specifica, anche se non applicabile a tutti gli IPA. La sensibilità del metodo è limitata a 1 addotto/10^7 basi.

I risultati ottenuti determinando gli addotti con ciascuno di questi metodi sono scarsamente correlati, questo significa, che, soprattutto alle basse esposizioni, le tecniche misurano composti differenti. Va inoltre specificato che queste tecniche, che richiedono l'estrazione del DNA, la sua purificazione e, talvolta, la sua marcatura con atomi radioattivi, sono complesse e richiedono tempi lunghi ed una notevole esperienza per essere eseguite. Inoltre la standardizzazione dei metodi, il controllo di qualità intra- e inter-laboratoriale sono spesso lacunosi. Per queste ragioni queste tecniche non possono essere considerate di routine.

IDROSSIDERIVATI DI IPA E IPA TAL QUALI NELLE URINE

A seguito dell'esposizione a IPA, la maggior parte di questi composti è eliminata nelle urine come fenoli, mentre una quota molto piccola è escreta come IPA non metabolizzati. La valutazione dell'esposizione a IPA attraverso il monitoraggio biologico è stata tradizionalmente effettuata utilizzando l'1-idrossipirene urinario, un metabolita del pirene, sostanza sempre presente nelle miscele di IPA che mostra buona correlazione con l'esposizione totale. Ciononostante, data la composizione variabile delle miscele di IPA derivanti da diverse sorgenti, il pirene, e di conseguenza l'1-idrossipirene urinario, può non essere rappresentativo per tutte le condizioni di esposizione. Inoltre il pirene non è un cancerogeno e perciò la misura di metaboliti di composti cancerogeni sono considerate più appropriate per il monitoraggio biologico dell'esposizione. Per queste ragioni è stata recentemente proposta la determinazione di altri derivati idrossilati degli IPA, con particolare riferimento al naftalene, al fenantrene e al benzo[a]pirene, date le loro caratteristiche di abbondanza e/o tossicità. Alcuni autori hanno anche proposto la misura simultanea di numerosi metaboliti, alla scopo di caratterizzare un profilo espositivo che tenesse conto anche delle differenti sorgenti.

La determinazione dei metaboliti idrossilati degli IPA viene effettuata con tecniche cromatografiche, quali HPLC e GC abbinate a rivelatori quali il fluorimetro e/o la massa. Queste tecniche sono sufficientemente specifiche per consentire una sicura identificazione degli analiti. Nel caso della determinazione dei metaboliti degli IPA meno abbondanti, quali ad esempio il benzo[a]pirene, è richiesta una sensibilità molto elevata, di conseguenza l'utilizzo di questi potenziali indicatori biologici è per ora stato limitato al monitoraggio di soggetti che presentano esposizioni ad IPA particolarmente elevate, quali ad esempio i lavoratori delle cokerie.

Un'alternativa alla misura dei metaboliti urinari è rappresentata dalla determinazione degli IPA non metabolizzati nell'urina. Questo approccio è stato già indagato in passato, seppure in

modo discontinuo e molto marginale per la valutazione dell'esposizione a IPA in lavoratori e nella popolazione generale. Da un punto di vista sperimentale la determinazione degli IPA non metabolizzati nell'urina presenta dei vantaggi legati alla possibilità di utilizzare sistemi analitici simili a quelli già sperimentati per la determinazione degli IPA aerodispersi (GC/MS e HPLC/fluorimetro), di poter disporre di standard commerciali, di non richiedere procedure di idrolisi e preparazione del campione e infine di portare all'ottenimento di profili di escrezione complessi, nei quali è possibile la determinazione simultanea di differenti specie chimiche.
L'approccio che è stato utilizzato nel nostro laboratorio per la determinazione degli IPA non metabolizzati nell'urina ha implicato una microestrazione in fase solida degli analiti dallo spazio di testa del campione, un successivo desorbimento termico effettuato nella camera di iniezione del sistema cromatografico, una separazione gascromatografica e una rivelazione utilizzando uno spettrometro di massa operante con ionizzazione elettronica. Tutte le operazioni sono state condotte in modo automatizzato, utilizzando un opportuno autocampionatore. In questo modo è stato possibile determinare simultaneamente 8 IPA urinari: naftalene, acenaftilene, acenaftene, fluorene, fenantrene, antracene, fluorantene e pirene. Le sensibilità ottenute sono nell'ordine dei ng/L, tali da consentire l'applicazione di questa metodica sia per lo studio di popolazioni esposte in ambito lavorativo, che della popolazione generale.