

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

SANITA' PUBBLICA E MEDICINA DEL LAVORO

Ciclo XXI

Settore scientifico disciplinare di afferenza: MED/44

TITOLO TESI

**VALUTAZIONE DEL DANNO DA STRESS OSSIDATIVO COME
INDICATORE DI EFFETTO BIOLOGICO DELL'ESPOSIZIONE
PROFESSIONALE A XENOBIOTICI**

Presentata da: Dott.ssa Anna Barbieri

Coordinatore Dottorato

Chiar.ma Prof.ssa Maria Pia Fantini

Relatore

Chiar.mo Prof. Francesco S. Violante

Esame finale anno 2009

Indice

<i>1. Introduzione.....</i>	<i>pag. 2</i>
<i>2. La determinazione analitica: validazione del metodo e prove inter-laboratorio.....</i>	<i>pag. 5</i>
<i>3. Valutazione cronobiologica (intra- e inter- individuale) e importanza della correzione per la creatinina.....</i>	<i>pag. 16</i>
<i>4. Valutazione del danno ossidativo in lavoratori esposti a farmaci chemioterapici antitumorali.....</i>	<i>pag. 21</i>
<i>5. Discussione e conclusioni.....</i>	<i>pag. 28</i>
<i>Bibliografia.....</i>	<i>pag. 31</i>
<i>Ringraziamenti.....</i>	<i>pag. 35</i>

1. Introduzione

Tutte le cellule viventi sono costantemente esposte a specie radicaliche potenzialmente dannose, le quali possono avere origine endogena, prodotte cioè dal normale metabolismo cellulare, sia esogena, originate per esempio dall'esposizione a radiazioni o a sostanze tossiche (Pilger, 2006).

Di particolare interesse risultano le specie reattive all'ossigeno (ROS), quali il radicale idrossile $\cdot\text{OH}$, estremamente reattivo, il radicale superossido $\text{O}_2^{\cdot-}$ e il perossido di idrogeno (H_2O_2). Queste specie sono in grado di produrre modificazioni ossidative su proteine, lipidi, polisaccaridi e acidi nucleici e loro azione dipende da numerosi fattori, quali il sito di produzione dei ROS, la capacità delle biomolecole di essere ossidate, la disponibilità di ioni metallici etc. (Evans, 2004). Per combattere gli attacchi delle specie reattive all'ossigeno e dei radicali liberi in generale, le cellule hanno a disposizione diverse modalità di difesa. La più semplice è sotto forma di molecole a basso peso molecolare e con capacità antiossidanti, quali la vitamina C ed E, le quali intercettano i radicali liberi divenendo esse stesse radicali potenzialmente molto meno reattivi (Gackowski, 2005). Altre forme di difesa risultano più complesse e si esplicano attraverso sistemi enzimatici, quali la dismutasi superossidativa, la catalasi e la glutatione perossidasi. In condizioni fisiologiche normali i sistemi cellulari mantengono generalmente un equilibrio redox tra gli ossidanti e gli antiossidanti endogeni, anche se i ROS hanno una naturale propensione ad evadere queste difese generando un livello base di danno che, nel breve periodo, non sembra essere eccessivamente nocivo per le cellule. Quando invece si crea un forte sbilanciamento fra la produzione di ROS o di fattori pro-ossidanti e la presenza di difese antiossidanti, a favore dei primi, si parla di *stress ossidativo*. In questa situazione, oltre alla produzione di mutazioni, possono verificarsi alterazione dei segnali cellulari e dell'espressione genica, promozione dell'instabilità di brevi sequenze di DNA (microsatelliti) e aumento dell'accorciamento telomerico. Il DNA è quindi nelle condizioni di essere costantemente danneggiato e modificato. Le rotture del doppio o del singolo filamento (DSB e SSB), la formazione di legami crociati con proteine e la modificazione di zuccheri e basi nella struttura portante del DNA sono i principali danni generati dai ROS (Wu, 2004).

Mentre le proteine e i lipidi modificati possono essere eliminati tramite un normale processo di rinnovamento cellulare, i danni al DNA devono necessariamente essere riparati, seguendo diversi processi che possono assolvere a questa funzione. La presenza di DNA modificato, infatti, è associato a un gran numero di fenomeni degenerativi e stati patologici, quali malattie neoplastiche, neurodegenerative, cardiovascolari e autoimmuni.

Le lesioni al DNA devono essere quindi rapidamente rilevate e, a questo scopo, viene attivato un complesso sistema di controllo chiamato *risposta al danno al DNA*. Lo step fondamentale di questo sistema è rappresentato dall'imposizione di punti di controllo del ciclo cellulare (cell-cycle check-points) grazie ai quali la cellula tenta di massimizzare le opportunità per la riparazione o, in alcuni casi, programmare la morte cellulare (apoptosi) (Barzilai, 2004).

I meccanismi di riparazione preposti alla rimozione delle lesioni ossidative al DNA si attuano essenzialmente attraverso due principali attività: la rimozione della singola lesione per azione dell'enzima glicosilasi (Base Excision Repair, BER) oppure tramite una ricognizione delle distorsioni sulla forma dell'elica che portano alla rimozione di brevi segmenti di filamento contenenti l'oligonucleotide lesionato (Nucleotide Excision Repair, NER). I prodotti di riparazione possono essere diversi e variare in funzione del meccanismo attivato e della presenza della base danneggiata nel DNA, nell'RNA o nel pool dei nucleotidi (Cooke, 2005). Nonostante siano stati individuati più di 20 prodotti derivati dal danno ossidativo delle basi puriniche e pirimidiniche, solamente alcuni di questi sono stati investigati nel dettaglio. La base modificata maggiormente indagata è sicuramente la 8-idrossiguanina (8-OH-Gua) e in particolare il suo corrispondente nucleoside ossidato, la *8-idrossi-2'-deossiguanosina* (*8-OH-dG*) (Figura 1).

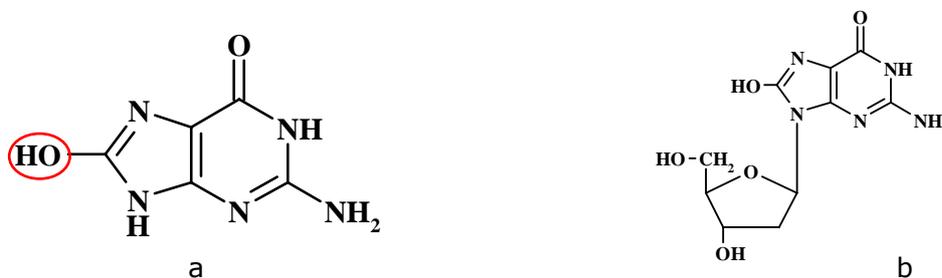


Fig.1: 8-idrossiguanina (a) e 8-idrossi-2'-desossiguanosina (b)

Le principali ragioni che hanno portato a focalizzare l'attenzione su questo indicatore sono diverse. Innanzitutto la guanina è la base del DNA che presenta il potenziale di

ossidazione più basso ed è quindi la più suscettibile agli attacchi degli agenti ossidanti e in particolare dei ROS. In secondo luogo l'8-OH-dG ha evidenziato un documentato potenziale mutageno che si esplica in vari modi, tra cui errori o perdita di specificità di accoppiamento fra le basi, transversioni quali GC→AT, errori di lettura sulle basi adiacenti (Cooke, 2000). In ultimo, questo addotto è quantitativamente il più presente in matrici biologiche extracellulari facilmente accessibili, come sangue e urine, e negli ultimi anni sono stati messi a punti numerosi metodi analitici che ne permettono una sensibile e specifica determinazione con diverse tecniche. Il rationale di misurare l'8-OH-dG in urina deriva dal fatto che, oltre ad essere un metodo non-invasivo, non si producono artefatti durante le procedure di estrazione o derivatizzazione, non avvengono ulteriori processi di metabolizzazione ed è stata osservata un'alta stabilità di questo addotto nella matrice urinaria. Poiché la 8-OH-dG escreta in urina ha origine nel DNA ossidato, si può ipotizzare che vi sia una relazione diretta tra stress ossidativo cellulare ed escrezione in urina: è per questi motivi che l'8-OH-dG è stata utilizzata come potenziale biomarcatore in moltissimi studi di esposizione ambientale e occupazionale (Pilger, 2006). Inoltre è stata ampiamente indagata la possibile relazione tra il livello di danno ossidativo e la patologia tumorale. E' emerso che elevati livelli di danno possono essere ricondotti a due principali situazioni: una quantità molto bassa di enzimi antiossidanti nel sito tumorale da un lato e una forte riduzione delle capacità riparative del DNA dall'altra. Rimangono comunque ancora da chiarire molti meccanismi e molti dati sperimentali. Nonostante elevati livelli di danno ossidativo siano stati riscontrati in presenza di una grande quantità di patologie e di esposizioni a sostanze tossiche o radiazioni, dimostrare una precisa correlazione tra l'incidenza di malattie e la presenza di prodotti di ossidazione resta piuttosto complicato. Nell'uso di queste sostanze come indicatori di danno biologico, anche in campo occupazionale, restano quindi da valutare ancora molti aspetti. Tra questi, non ultimi, le metodiche di campionamento e di analisi, l'interpretazione dei dati e dei fattori di confondimento, la mancanza di valori di riferimento che permettano di identificare un limite oltre il quale si possa parlare di danno precoce o effettivo.

Per questi motivi oggetto della tesi saranno l'analisi e l'approfondimento della misura, del significato e dell'uso dell'8-OH-dG come biomarcatore di esposizione a sostanze tossiche in campo tossicologico e occupazionale.

2. La determinazione analitica: validazione del metodo e prove inter-laboratorio

Per chiarire completamente il significato e l'importanza dell'8-OH-dG come prodotto del danno ossidativo coinvolto nell'insorgenza di patologie e nell'invecchiamento cellulare, fondamentali sono i metodi per la sua determinazione nelle matrici biologiche. Numerose tecniche analitiche, in questi ultimi anni, sono state utilizzate per sviluppare metodi di quantificazione: la gas-cromatografia accoppiata a detector di massa (GC-MS) (Lin, 2004), la cromatografia liquida accoppiata a detector elettrochimico (HPLC-ECD) (Shigenaga, 1990), la cromatografia liquida accoppiata a detector di massa (HPLC-MS o HPLC-MS/MS) (Ravanat, 1998; Sabatini 2005), l'elettroforesi capillare con detector elettrochimico (Mei, 2005), il metodo immunoenzimatico ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbant Assay) (Ertola, 1997).

Sebbene i valori di 8-OH-dG ottenuti con tutte queste tecniche abbiano permesso di discriminare tra gruppi di soggetti sani e con patologie, i risultati evidenziano spesso discrepanze nei valori basali in urina di questo indicatore, in particolare quando si confrontano i dati ottenuti con i metodi cromatografici classici e i metodi immunoenzimatici. Già i risultati pubblicati dall' European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD) relativi alle analisi effettuate in DNA puro e isolato da cellule o tessuti, avevano evidenziato un'alta variabilità dei valori dei diversi indicatori di danno ossidativo misurati con le diverse tecniche (ESCODD, 2000).

La risoluzione dei problemi legati al dosaggio è fondamentale per arrivare ad interpretare il significato di questo marcatore e valutare i possibili effetti legati alla sua presenza. Questo è il primo degli obiettivi del progetto ESCULA (European Standards Committee of Urinary (DNA) Lesion Analysis (<http://escula.org>), il quale si prefigge di confrontare l'affidabilità e la robustezza di diversi metodi analitici ($n > 4$) per la determinazione della 8-OH-dG in urina. Per questo motivo il nostro laboratorio, insieme ad altri laboratori europei con esperienza analitica in questo campo, è stato coinvolto in un programma di prove interlaboratorio. Infatti il nostro gruppo di ricerca ha messo a punto e pubblicato un metodo analitico originale in micro-HPLC/ESI-MS/MS per la determinazione specifica e sensibile di questo indicatore in urina (Sabatini, 2005). Il metodo, utilizzato di routine nelle nostre attività di ricerca, viene di seguito descritto.

2.1. Metodo per la quantificazione routinaria di 8-idrossi-2'-deossiguanosina basato sull'estrazione in fase solida (SPE) e la micro cromatografia liquida ad alte prestazioni accoppiata alla spettrometria di massa tandem con sorgente elettrospray (μ HPLC/ESI-MS/MS)

Materiale e Metodi

Tutti i reagenti utilizzati erano di grado analitico. L'acqua deionizzata ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) è stata prodotta con il sistema Direct-Q Millipore (Waters).

Strumentazione: per l'evaporazione degli estratti è stato utilizzato l'evaporatore EZ-2 Plus della GeneVac. L'analisi dei campioni è stata condotta sul sistema di μ HPLC Serie 1100 di Agilent Technologies (dotato di autocampionatore e comparto colonne termostatati) collegato al detector di massa API 2000 della PE Sciex corredato di sorgente ionica TurboIonSpray™. Il flusso di azoto è stato ottenuto da un generatore Whatman modello 75-72.

Preparazione del campione: i campioni di urina sono stati raccolti e conservati a -20°C . Prima dell'analisi ogni campione è stato scongelato e centrifugato a $1500 g$ per 10 minuti per ottenere un supernatante limpido. Di questo $500 \mu\text{L}$ sono stati caricati per la purificazione su una cartuccia SPE Isolute® Env+ (50 mg , 1 mL) precedentemente condizionata con metanolo e tampone fosfato a pH 5.5. Dopo il lavaggio degli interferenti con tampone e acqua deionizzata, il letto della cartuccia viene seccato con il vuoto e ulteriormente lavato con acetonitrile. Infine l'8-OH-dG è stata recuperata con due aliquote da $300 \mu\text{L}$ di metanolo. L'eluato ottenuto è stato seccato sotto vuoto a 40°C nell'evaporatore EZ-2 e successivamente ridisciolti in $50 \mu\text{L}$ di soluzione avente la stessa composizione della fase mobile utilizzata per la cromatografia (ammonio acetato 10 mM a pH 4.3 contenente il 2% di metanolo). Un volume pari a $0.5 \mu\text{L}$ di questo estratto è stato iniettato nel sistema μ -HPLC per l'analisi.

Separazione Cromatografia: l'analisi è stata condotta ad un flusso di $10 \mu\text{L}/\text{min}$ usando come fase mobile ammonio acetato 10 mM a pH 4.3 (Fase A) e metanolo (fase B). La colonna capillare impiegata per la separazione in fase inversa è stata una C_{18} SB Zorbax dell'Agilent Technologies (diametro interno: 0.5 mm ; lunghezza: 150 mm), mantenuta alla temperatura costante di 21°C . Il gradiente di eluizione è stato impostato come segue: da 0 a 10 minuti la fase B passa dal 10 al 40% e viene

così mantenuta per 5 minuti; in 5 minuti. si passa poi al 10% di B, mantenuto per 10 minuti fino a fine corsa (tempo totale: 25 minuti).

Analisi in spettrometria di massa: il flusso in uscita dalla colonna cromatografica è stato collegato alla sorgente TurboIonSpray™ per il processo di ionizzazione in positivo e la successiva analisi con il triplo quadrupolo.

Per l'analisi sono stati ottimizzati in infusione tutti i parametri sia della sorgente che dello spettrometro e impostati come segue. Sorgente: ion-spray voltage 5500 V; curtain gas (azoto) 20 psi; nebulizing gas (aria) 40 psi; turbo-gas ausiliario (aria) 10 psi a 250°C. Spettrometro di massa: potenziale di declustering 15 V; energia di collisione 19 eV; potenziale di focusing 400 V; potenziale di entrata 5 V. L'acquisizione è stata condotta in modalità Multiple Reaction Monitoring (MRM): per la quantificazione si è utilizzato lo ione m/z 168, prodotto più abbondante risultante dal precursore $[M+H]^+$ con valore m/z 284. I dati sono stati acquisiti e processati con il software Analyst® 1.3.

Le Figure 2 e 3 mostrano rispettivamente lo spettro di massa della 8-OH-dG e il cromatogramma di un campione urinario processato e analizzato con il metodo descritto.

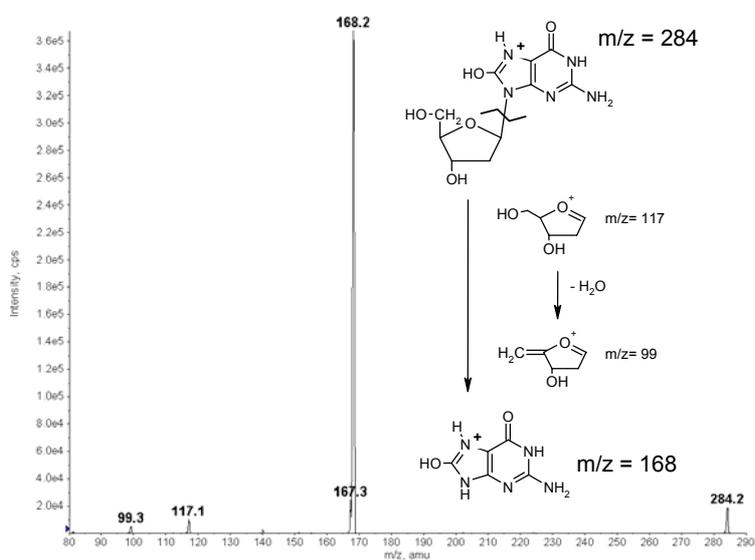


Fig. 2: spettro di massa acquisito in modalità positiva (product ion spectrum) di una soluzione standard di 8-OH-dG (2.0 µg/mL in fase mobile)

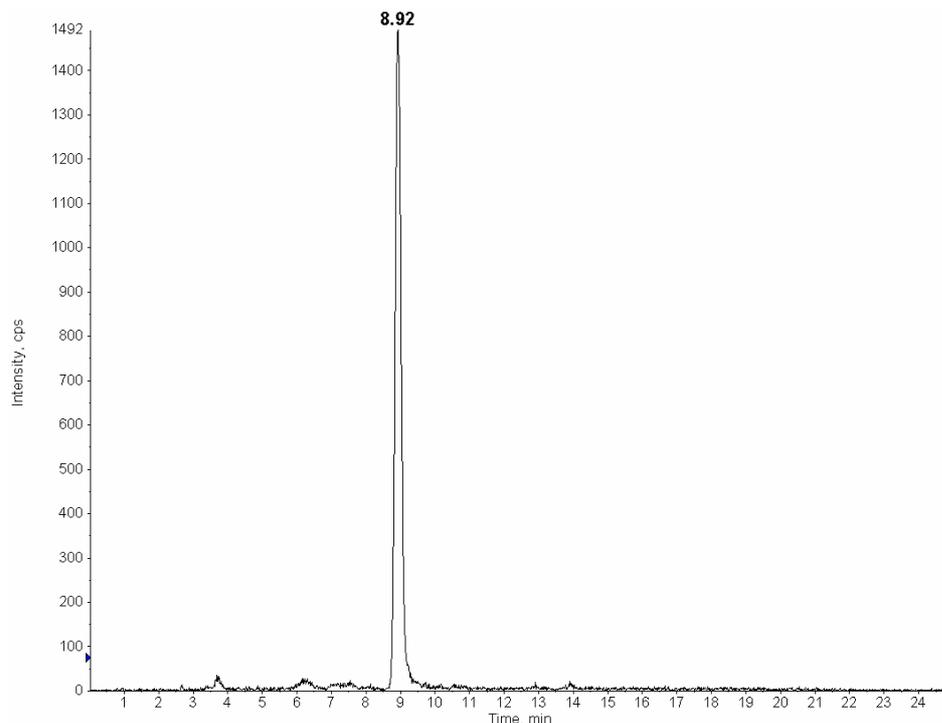


Fig. 3: cromatogramma di un campione di urina addizionato con 10 ng/mL di analita e analizzato con il metodo SPE μ HPLC-ESI-MS/MS (volume iniettato: 0.5 μ L).

Curva di calibrazione: è stata ottenuta addizionando all'urina, ottenuta da un pool di 6 volontari sani, concentrazioni note di 8-OH-dG da soluzioni standard acquose. Si sono così ottenuti 6 standard urinari (0, 0.2, 0.4, 1.0, 5.0, 10.0 ng/mL), purificati ed analizzati come descritto.

L'accuratezza del metodo è stata valutata usando 12 diversi campioni di urina, addizionati con 8-OH-dG a tre diverse concentrazioni (0.4, 1.0 e 10.0 ng/mL).

Un aspetto importante considerato nella messa a punto e validazione del metodo è quello del cosiddetto *effetto matrice*. La HPLC-MS/MS è infatti una tecnica che presenta una elevata specificità e sensibilità, ma l'utilizzo di matrici biologiche complesse come sangue ed urina impongono di valutare la presenza di eventuali sostanze endogene co-eluenti o interferenti che possono alterare l'efficienza della ionizzazione in sorgente e rendere i risultati analitici poco affidabili. In assenza di standard interni marcati isotopicamente disponibili commercialmente che possono ovviare in parte a questo problema, la ripetibilità dell'intero metodo è stata determinata con prove intra- e inter-assay su 12 campioni di urina ottenuti da 6 diversi soggetti (2 campioni ciascuno in differenti giornate), estratti ed analizzati nella stessa giornata e in 12 giorni diversi (con un intervallo di una settimana l'uno

dall'altro) e a tre diverse concentrazioni di analita (0.4, 1.0 e 10.0 ng/mL). La ripetibilità, espressa come media della deviazione standard percentuale, è risultata $\leq 10\%$ (vedi Tabella 1).

E' stato inoltre acquisito un cromatogramma in full-scan per tracciare l'eventuale presenza di interferenti in urina in corrispondenza del tempo di ritenzione dell'8-OH-dG e non rilevabili con l'acquisizione in MRM. Anche l'ottimizzazione del processo di estrazione in fase solida ha permesso di migliorare la sensibilità e la specificità del metodo. La scelta finale delle cartucce SPE Isolute® Env⁺ è stata quindi valutata dopo la comparazione di tre diversi tipi di substrato.

Il recupero dell'estrazione è stato quindi calcolato preparando tre diverse soluzioni standard a concentrazione nota (0.4, 1.0 e 10.0 ng/mL), estratte in triplicato e analizzate come i campioni con il metodo descritto (Recupero finale = $83.2 \pm 5.3\%$).

Le caratteristiche analitiche finali del metodo SPE μ HPLC/ESI-MS/MS sono descritte in Tabella 1.

Tab.1 Caratteristiche analitiche del metodo SPE μHPLC/ESI-MS/MS	
Equazione curva di calibrazione	$y = mx + b$ $m = 1333.4 \quad b = 79.0$ $R^2 = 0.999$
Limite di Rivelazione (LOD)	0.2 ng/mL
Limite di Quantificazione (LOQ)	0.4 ng/mL
Intra-assay RSD% (n=12)^a	8.7 (6.5 - 12.5)
Inter-assay RSD% (n = 12)^a	9.9 (7.1 - 13.3)
Accuratezza ^a	90.2 (84.9 - 94.9)
Recupero ^b	83.2 ± 5.3

RSD %: deviazione standard percentuale

a: media (range) a tre diverse concentrazioni (0.4, 1.0 e 10.0 ng/mL)

b: media \pm RSD a tre diverse concentrazioni (0.4, 1.0 e 10.0 ng/mL)

2.2. Prove inter-laboratorio (Progetto ESCULA)

Per partecipare alle prove inter-laboratorio, il metodo descritto è stato ulteriormente migliorato in termini di accuratezza della misura grazie all'introduzione dell'analogo marcato ($[^{15}\text{N}_5]$ -8-OH-dG) come standard interno. La molecola, non disponibile commercialmente, ci è stata fornita dal laboratorio dell'Università di Leicester che

ha organizzato e tenuto le fila delle prove all'interno del progetto ESCULA. La sintesi dello standard è descritta dettagliatamente in letteratura (Singh, 2003).

A tutti i laboratori partecipanti sono stati inviati 3 gruppi di campioni:

A-G: concentrazioni standard (0 – 200 µg/L) di 8-OH-dG in soluzione tampone (PBS: Phosphate Buffered Saline);

H-N: campioni di urina con aggiunte standard (0 – 200 µg/l) di 8-OH-dG;

O-W: campioni di urina con concentrazioni incognite di 8-OH-dG.

Per le analisi in PBS il nostro laboratorio non ha assicurato risultati accurati in quanto il metodo da noi sviluppato è stato validato solamente in matrice urinaria. Le soluzioni tampone, infatti, sono assai critiche per le analisi in LC/ESI-MS/MS, in quanto la ionizzazione in sorgente è fortemente influenzata dalla presenza di sali e dal valore di pH. I campioni in PBS sono comunque stati processati e analizzati con lo stessa procedura analitica validata e utilizzata per i campioni di urina. Tutti i campioni sono inoltre stati quantificati sulla curva di calibrazione costruita in matrice urinaria utilizzando lo standard interno marcato (IS) alla concentrazione finale in urina di 2.9 µg/L. La transizione monitorata in MRM per l'IS è stata $m/z\ 289 \rightarrow 173$. La curva di calibrazione ottenuta è mostrata in Figura 4.

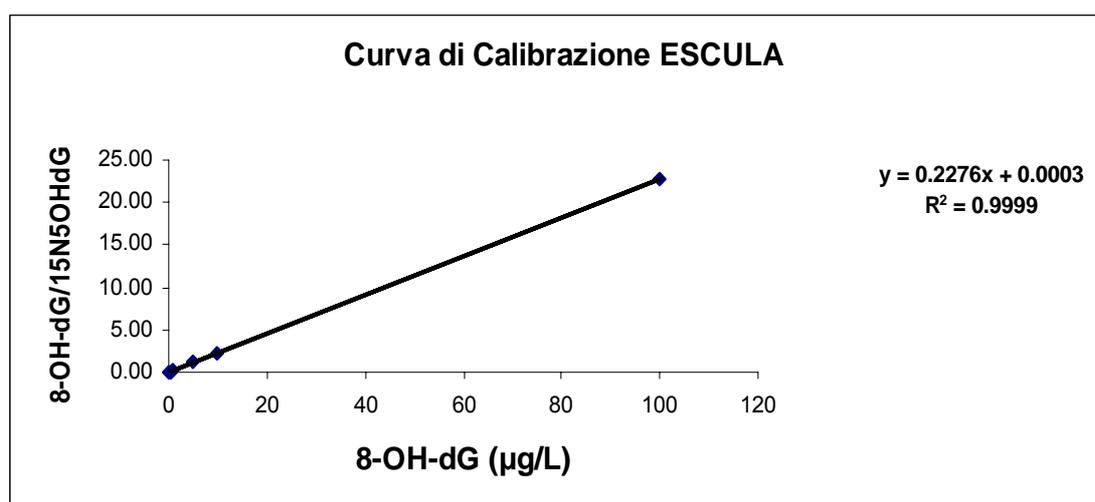


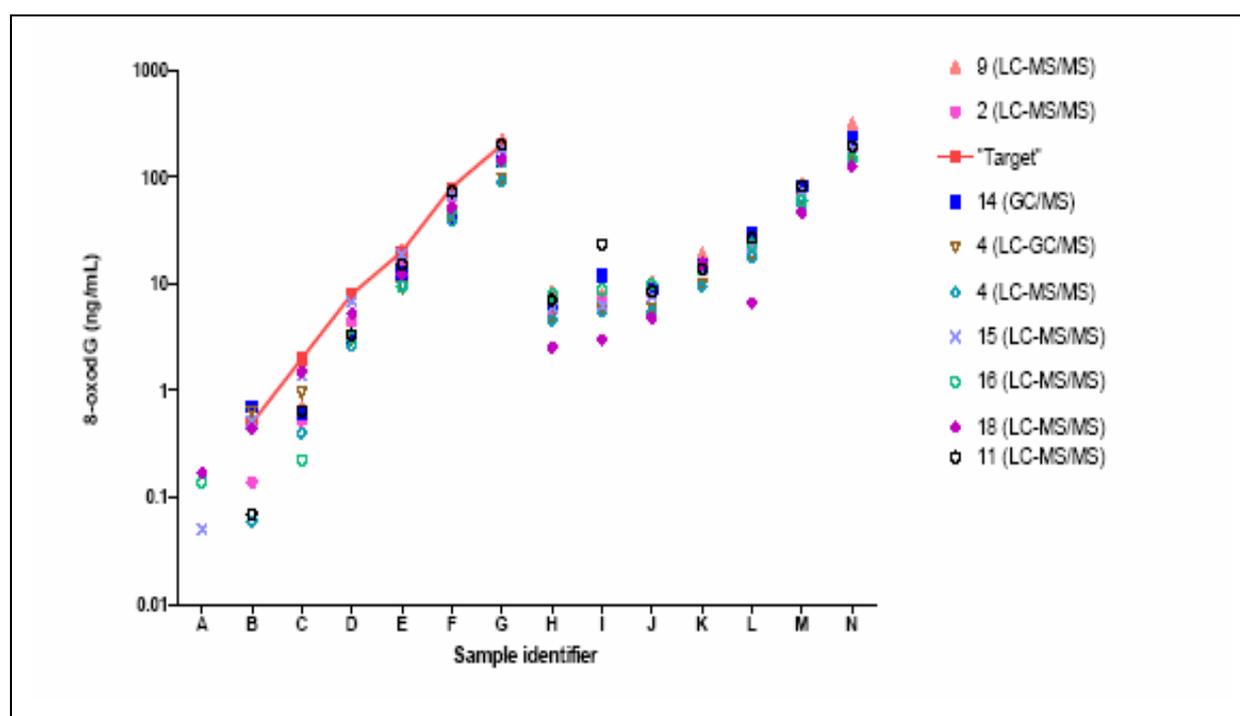
Fig. 4: curva di calibrazione a 6 punti per la determinazione di 8-OH-dG nei campioni del progetto ESCULA.

I risultati delle analisi sono presentati, per maggiore chiarezza interpretativa, divisi in 3 gruppi di tecniche analitiche: a) LC-MS/MS, LC-GC/MS, GC/MS; b) HPLC-EC; c) ELISA.

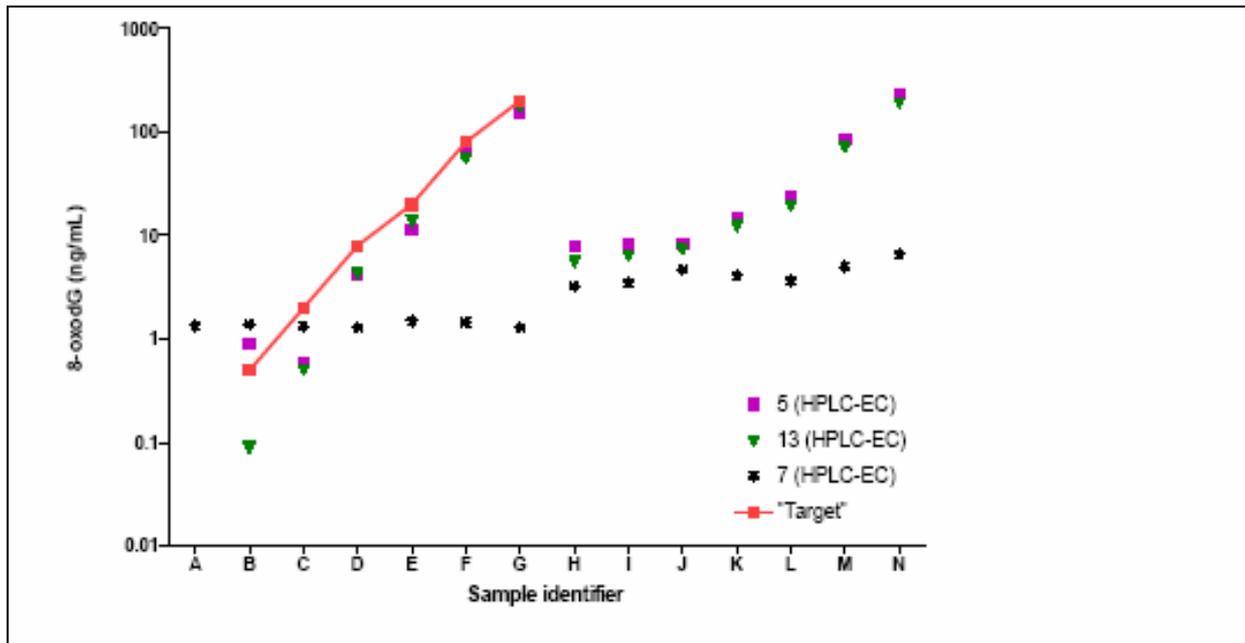
I Grafici 1.a, 1.b e 1.c mostrano i risultati ottenuti dai laboratori partecipanti, utilizzando i 3 gruppi di tecniche, sugli standard in tampone (A – G) e in urina (H – N).

Il nostro laboratorio è stato etichettato con il numero 2.

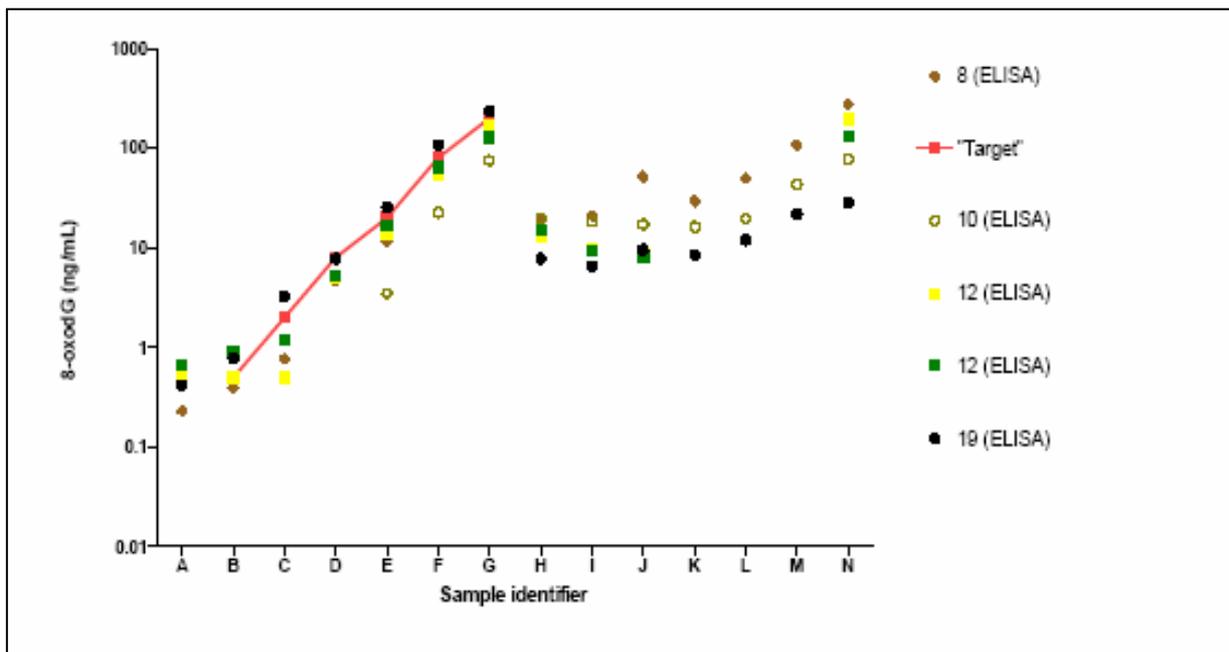
Gli standard in urina e PBS inviati per l'analisi sono stati addizionati per avere concentrazioni teoriche pari a 0.5, 2.0, 8.0, 20.0, 80.0, 200.0 ng/mL. La linea rossa "target" indica il valore vero solamente per gli standard in tampone in quanto l'urina presenta un valore endogeno basale di 8-OH-dG non noto (che si somma alle aggiunte standard).



Graf. 1.a: risultati dei laboratori che utilizzano tecniche LC-MS/MS, LC-GC/MS, GC/MS sugli standard in tampone (A – G) e in urina (H – N) nel range 0.5 – 200 ng/mL.



Graf. 1.b: risultati dei laboratori che utilizzano tecniche HPLC- EC sugli standard in tampone (A – G) e in urina (H – N) nel range 0.5 – 200 ng/mL.



Graf. 1.c: risultati dei laboratori che utilizzano tecniche immunoenzimatiche ELISA sugli standard in tampone (A – G) e in urina (H – N) nel range 0.5 – 200 ng/mL.

Dai grafici appare chiaro che, sui campioni in tampone, tutte le tecniche appaiono abbastanza accurate rispetto al "target" e relativamente precise tra di loro. Anche il nostro metodo, non validato per questa matrice, grazie ad un accurato clean-up pre-analitico che abbatta la concentrazione salina, mostra un'ottima performance in termini di accuratezza e precisione (vedi Grafico 1.a). L'unica eccezione è

rappresentata dal laboratorio 7 (tecnica HPLC-EC), che restituisce valori evidentemente non accurati. Quando si passa alla matrice urinaria, le tecniche che utilizzano la cromatografia accoppiata al detector di massa mostrano una minore dispersione dei valori e una maggiore linearità al crescere della concentrazione. Le altre tecniche sono al contrario caratterizzate da una curva non-lineare e da un ampio range dinamico (curva ad andamento logaritmico).

In Figura 5 è mostrata una tipica curva di standard per l'analisi ELISA (determinazione indiretta) (Hu, 2004).

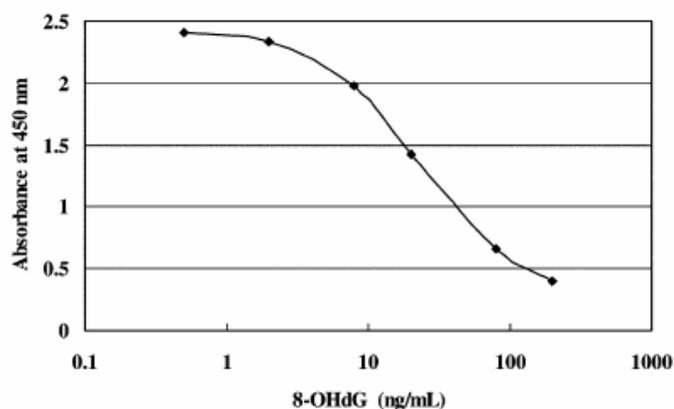
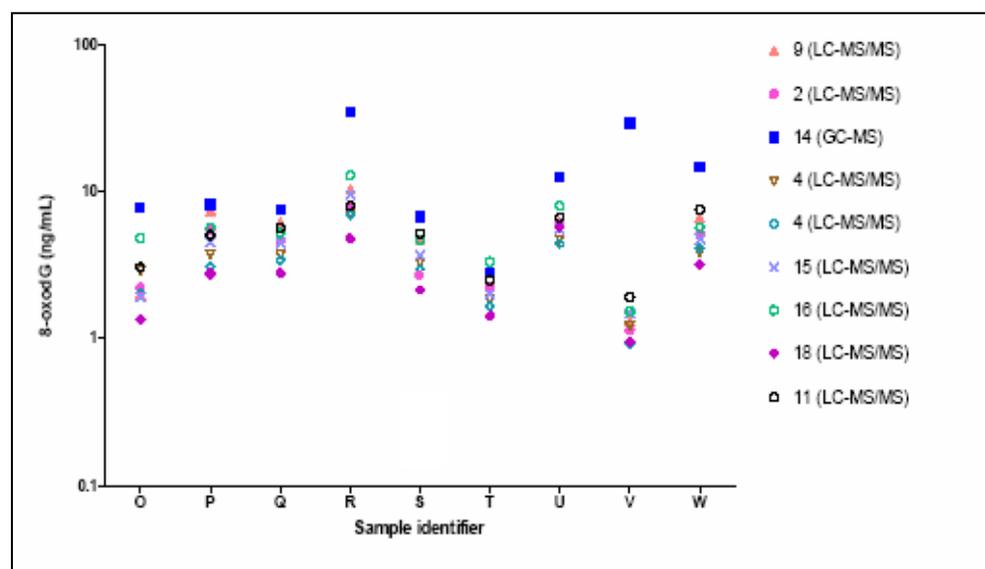
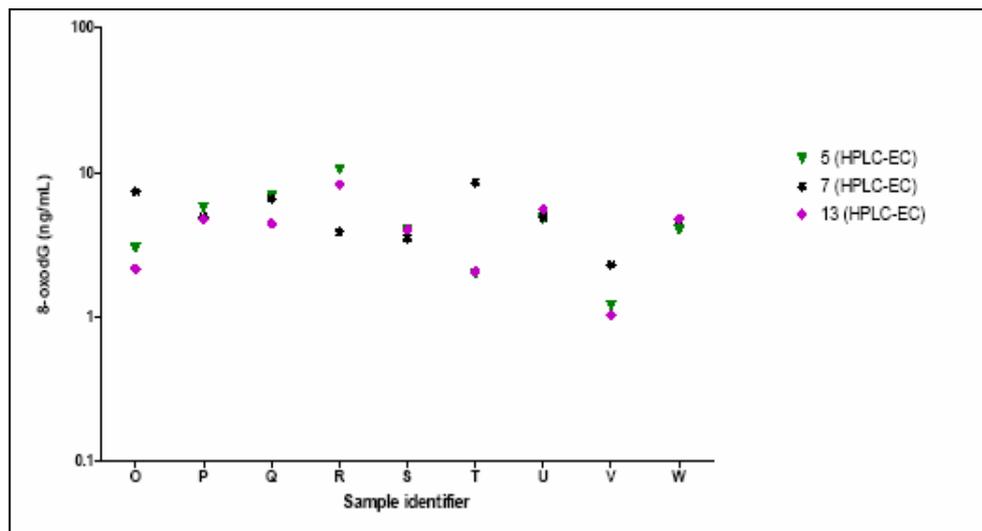


Fig. 5: tipica curva di standard per l'analisi in ELISA (Wu, 2004).

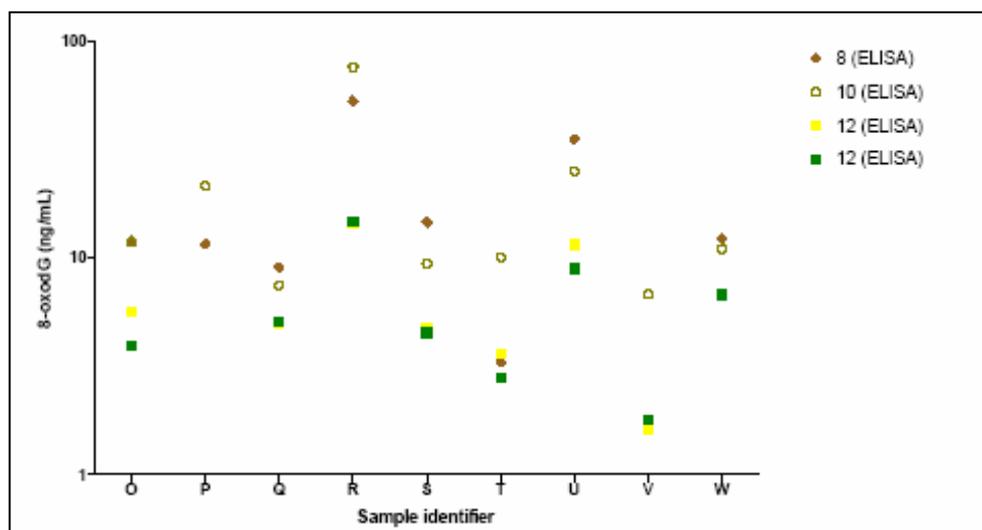
I risultati delle prove sui campioni a concentrazione incognita in urina (O – W) sono mostrati nei Grafici 2.a, 2.b e 2.c.



Graf. 2.a: risultati dei laboratori che utilizzano tecniche LC-MS/MS, LC-GC/MS, GC/MS sui campioni di urina a concentrazione incognita.



Graf. 2.b: risultati dei laboratori che utilizzano tecniche HPLC- EC sui campioni di urina a concentrazione incognita



Graf. 2.c: risultati dei laboratori che utilizzano tecniche immunoenzimatiche ELISA sui campioni di urina a concentrazione incognita.

Nelle prove incognite le differenze tra le tecniche analitiche si evidenziano ulteriormente.

Tra le tecniche cromatografiche la GC/MS sembra sovrastimare, rispetto agli altri metodi, la concentrazione di tutti i campioni, mentre i metodi ELISA mostrano una ampia dispersione sia dei valori tra di loro che rispetto a quelli degli altri metodi.

Questi risultati confermano che la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa consente di ottenere, rispetto alle altre tecniche, alta specificità e

sensibilità. Infatti, da un lato la purificazione del campione e la cromatografia consentono la separazione dell'analita da altri costituenti della complessa matrice urinaria; dall'altro il detector di massa permette il riconoscimento specifico dell'analita e l'uso di uno standard interno isotopico che assicura elevata accuratezza e la valutazione dell'effetto matrice. Le tecniche immunoenzimatiche hanno sicuramente il vantaggio di essere veloci, poco costose e utilizzabili su larga scala e su una grande varietà di matrici. Per questo tipo di applicazioni esse appaiono però molto poco specifiche e accurate, soprattutto nelle determinazioni in matrici complesse come sangue e urina, dove la presenza di macromolecole e interferenti inficia maggiormente il risultato.

In una analisi comparata di 8-OH-dG in urina mediante LC-MS/MS con diluizione isotopica e la tecnica ELISA (Hu, 2004) su una popolazione di lavoratori di una cokeria, sono emerse in modo evidente le criticità legate all'uso delle due diverse tecniche. Una differenza significativa nei livelli urinari di 8-OH-dG tra esposti e controlli è stata trovata solamente usando il metodo della diluizione isotopica in LC-MS/MS ma non con il kit commerciale ELISA. I risultati del lavoro sono mostrati in Figura 6. I valori trovati con il kit immunoenzimato sono generalmente 2 volte più alti rispetto a quelli ottenuti in LC-MS/MS e, a differenza di questi ultimi, non mostrano una differenza statisticamente significativa tra esposti e controlli.

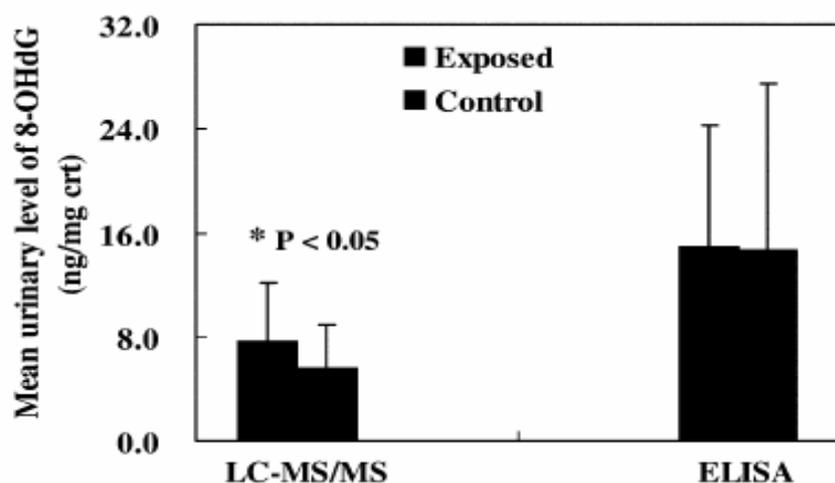


Fig. 6: Valore medio in urina di 8-OH-dG (corretti per la creatinina) in 140 lavoratori di cokeria misurati tramite diluizione isotopica in LC-MS/MS e con kit commerciale ELISA (Wu, 2004)

3. Valutazione cronobiologica (intra- e inter- individuale) e importanza della correzione per la creatinina

L'8-OH-dG è considerato un indicatore di risposta (o effetto) in quanto, secondo la definizione dell' NRC (National Research Council), è una alterazione biochimica, misurabile nell'organismo, a seguito dell'esposizione ad un determinato fattore di rischio. Poiché di questo indicatore non sono stati ancora chiariti tutti gli aspetti, tra cui i diversi possibili meccanismi di formazione, la tossicocinetica e la tossicodinamica, diventa fondamentale studiare non solo il suo background nella popolazione e la variabilità inter- e intra- individuale, ma anche il profilo di escrezione e la validità dei dati corretti per la creatinina urinaria. In letteratura sono presenti lavori in cui vengono confrontati valori di concentrazione di 8-OH-dG sia espressi per le 24 ore, sia corretti per i grammi (o moli) di creatinina. Poulsen, in uno studio del 1998, ha riportato che i valori di 8-OH-dG corretti per la creatinina in campioni spot del mattino e quelli misurati sulle urine delle 24 ore mostravano, anche se bassa, una correlazione ($r=0.5$, $p<0.05$) (Poulsen, 1998). Non esistono però studi approfonditi riguardo l'influenza dei ritmi circadiani sull'escrezione e sulla variabilità inter- e intra- individuale. Dato che i meccanismi di riparazione del DNA sono generalmente regolati da enzimi, la variabilità inter-individuale potrebbe essere molto influenzata dalla suscettibilità individuale, come ad esempio dalla presenza di forme polimorfiche degli enzimi stessi. D'altro canto anche rispetto al singolo individuo, l'escrezione giornaliera può essere influenzata da diverse variabili e fattori di confondimento (esposizione a inquinanti, fumo passivo, traffico, dieta, attività sportiva etc.) e non essendo noto dopo quanto tempo dall'insulto tossico si può avere un aumento dell'escrezione dei prodotti di riparazione, il tempo di campionamento e la correzione della diluizione del campione possono assumere un ruolo fondamentale. In generale, valori di 8-OH-dG corretta per la creatinina potrebbero essere quindi adeguati in studi con campionamenti ripetuti sugli stessi soggetti (cross-over), mentre l'escrezione assoluta misurata sulle 24 ore per gli studi trasversali (cross-sectional).

Andreoli et al. (Andreoli, 2005) in uno studio finalizzato a valutare il profilo di escrezione giornaliero e la variabilità inter-individuale di alcuni indicatori di danno ossidativo, tra cui la 8-OH-dG, concludono che il tempo di campionamento non sembra essere influenzato dai ritmi circadiani e che la variabilità, sia intra- che inter-individuale risultano modeste. Da uno studio preliminare condotto nel nostro

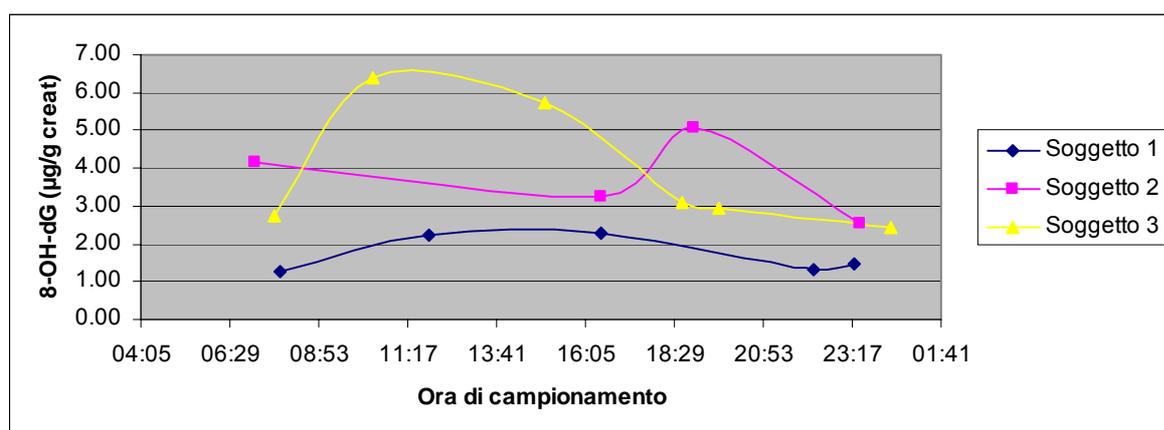
laboratorio emergono però dati non in linea con questi risultati. Dall'analisi dei valori di escrezione di 8-OH-dG in spot raccolti sulle 24 ore in 3 diversi soggetti (1, 2, 3) non esposti professionalmente a tossici, il ritmo circadiano sembrerebbe in parte influire, almeno in uno dei soggetti (3).

In Tabella 2 sono riportati i risultati del campionamento (sono stati eliminati gli spot con valori di creatinina non compresi nel range 0.3 – 3.0 g/l).

Tab. 2: valori di 8-OH-dG in spot raccolti nelle 24 ore di 3 soggetti diversi

Soggetto	8-OH-dG ($\mu\text{g}/\text{g}_{\text{creatinina}}$)			Volume totale (ml)	Escrezione 24 h (μg)
	media ($\pm\text{ds}$)	Mediana	CV%		
1	1.71 (± 0.5) (n=5)	1.45	29.3	2200	2.3
2	3.75 (± 1.11) (n=4)	3.70	29.5	800	4.4
3	3.88 (± 1.70) (n=6)	3.01	43.8	1700	6.8

Il coefficiente di variazione percentuale del soggetto 3, riferito ai 6 spot raccolti nell'arco delle 24 ore, appare piuttosto alto (43.8%). I valori di 8-OH-dG nell'intervallo di tempo tra le ore 10:20 e le 15:00 risultano circa 2.5 volte più alti rispetto a quelli della mattina presto (7.40) o della notte (00.20). Al contrario il soggetto 1 mostra un andamento con minore variazione (29.3%) e solo un leggero aumento nell'arco temporale centrale della giornata (ore 11:50 – 16:30). Tutti e tre i soggetti, comunque, non mostrano valori di picco all'inizio e alla fine della giornata (vedi Grafico 3).

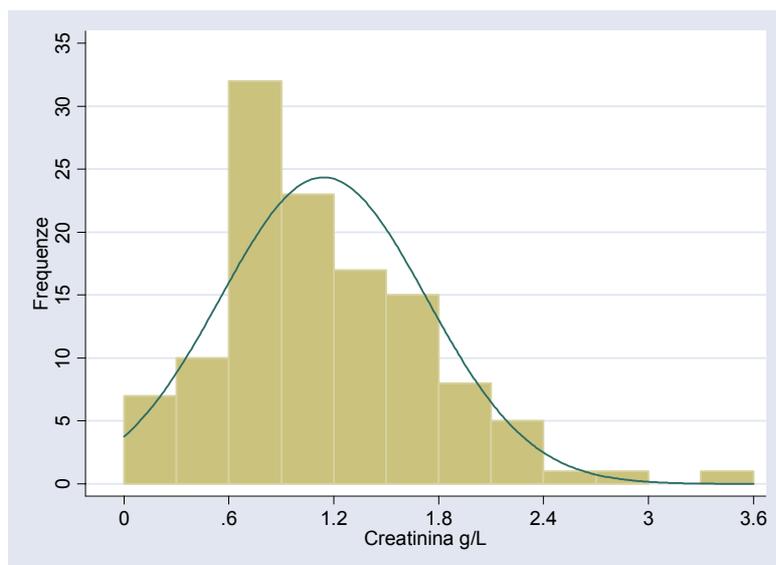


Graf. 3: andamento della concentrazione di 8-OH-dG corretta per la creatinina nell'arco delle 24 ore in 3 diversi soggetti.

Anche se le misure sono state effettuate solo su tre soggetti, si può affermare che l'escrezione giornaliera della 8-OH-dG deve essere approfonditamente studiata per poter valutare quale sia lo spot più rappresentativo del danno ossidativo "basale" e quale momento della giornata possa essere eventualmente raccomandato per la raccolta dei campioni.

Per quanto riguarda la correzione del dato analitico per la creatinina, il terzo obiettivo che si propone l'European Standards Committee of Urinary (DNA) Lesion Analysis è proprio "*Evaluate correcting urinary lesion measurements for (i) creatinine, (ii) collection over a 24 hr period*" (<http://escula.org>). Comunemente il monitoraggio biologico dell'esposizione a sostanze chimiche prevede la raccolta di singoli spot che tengono conto della tossicocinetica della sostanza e della sua emivita. Poiché il volume urinario è influenzato da molti fattori (filtrazione glomerulare, secrezione tubulare e riassorbimento, alimentazione, introduzione di liquidi e sudorazione), la concentrazione delle sostanze escrete può subire sostanziali variazioni. La diluizione o concentrazione dei campioni può quindi portare a una sottostima o sovrastima dell'analita nei singoli volumi di campionamento (Alessio, 1985; Carrieri, 2001). L'attendibilità della correzione dei valori determinati in spot di urina rispetto alla diluizione o alla concentrazione del campione è stata spesso dibattuta ma comunemente accettata. In medicina del lavoro si utilizza di norma la correzione rispetto al valore di creatinina per tutti gli indicatori la cui concentrazione dipende dal volume di urina (ma non per quelli escreti per diffusione), convenzione generalmente applicata anche negli Indici di Esposizione Biologica (BEI) proposti dall' American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), tenendo conto del fatto che campioni di urina molto diluiti o molto concentrati non sono in genere idonei per il monitoraggio biologico, ha adottato dei valori di riferimento: un campione urinario è accettabile se il valore di creatinina è compreso tra 0.3 e 3.0 g/l (per il peso specifico tra 1,010 e 1,030). Campioni con valori che cadono fuori da questo range devono essere scartati e raccolti nuovamente. In realtà non vi sono evidenze scientifiche che questi criteri siano validi per tutti gli indicatori determinati con il monitoraggio biologico e riferiti a sostanze con metabolismi spesso molto diversi. E' comunque pratica comune eliminare campioni con valori di creatinina al di sotto di 0.5 g/L e al di sopra di 3.0 g/L (Alessio, 1985; Carrieri, 2001). I valori di creatinina urinaria sono in funzione della massa e dell'attività muscolare ed è stata osservata

una variabilità intra-individuale nell'escrezione giornaliera, influenzata anche dalla dieta. E' stata inoltre dimostrata l'influenza del sesso e dell'età sull'escrezione di creatinina urinaria. Valori significativamente più alti ($p < 0.001$) sono stati trovati negli uomini rispetto alle donne, le quali hanno un'alta prevalenza di valori sotto 1.5 g/L rispetto agli uomini. Per quanto riguarda l'età, i soggetti con età superiore ai 50 anni hanno mostrato valori significativamente più bassi ($p < 0.02$), anche se non si è trovata una correlazione età - escrezione di creatinina (Carrieri, 2001). Questi risultati sono molto importanti quando si devono comparare gruppi non omogenei di lavoratori, per evitare di attribuire esposizioni maggiori o minori ad alcuni gruppi: le donne e gli over 50 potrebbero apparire maggiormente esposti in quanto i loro valori di creatinina, essendo generalmente più bassi, correggono in eccesso le concentrazioni di analita nei singoli spot. Anche l'opportunità di eliminare i campioni troppo diluiti o troppo concentrati appare evidente. Abbiamo misurato un valore giornaliero di 8-OH-dG e di creatinina nell'urina di 12 soggetti non professionalmente esposti (campioni A-N, 11 maschi, 1 donna) nell'arco di 10 giornate. La distribuzione dei valori di creatinina urinaria ($n=120$) è mostrata nel Grafico 4. Come si può vedere solo un valore supera la concentrazione di 3.0 g/L, mentre gli spot inferiori a 0.3 hanno frequenza 7. In questo gruppo di campioni troppo diluiti, 4 appartengono all'unica donna della popolazione in esame (che ha anche il valore medio più basso, pari a 0.7 g/L). Questi risultati si allineano con le osservazioni già trovate in letteratura (Carrieri, 2001).



Graf. 4: distribuzione delle frequenze dei valori di creatinina urinaria (g/L) negli spot di 12 soggetti su 10 giornate ($n=120$)

La necessità di misurare in ogni spot la creatinina e di stabilire un range di accettabilità del campione, si evince ulteriormente dall'andamento dei valori di 8-OH-dG corretti e non corretti per la creatinina nei soggetti da noi presi in esame. Il soggetto F (donna), nell'arco dei 10 giorni di monitoraggio, mostra, senza correzione per la creatinina degli spot, un andamento di 8-OH-dG con un coefficiente di variazione pari al 25%, completamente diverso dal profilo che si ottiene eliminando i 4 valori di creatinina inferiori a 0.3 g/L e correggendo gli altri per la creatinina (CV% 89.6). Vedi Figura 7.

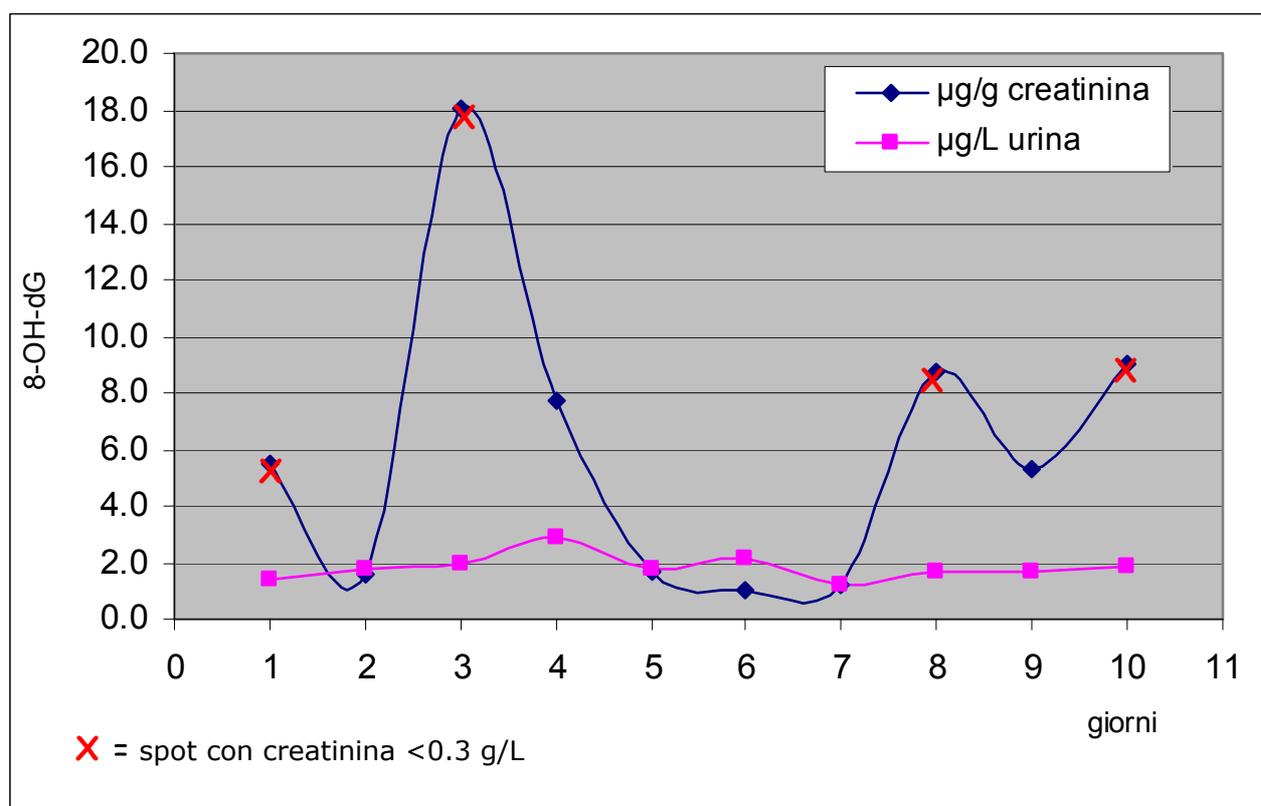


Fig. 7: andamento nell'arco di 10 giorni dei valori di 8-OH-dG corretti e non corretti per il valore di creatinina urinaria nel soggetto F (donna).

Anche nei soggetti che avevano in tutti gli spot valori di creatinina nel range previsto, si possono osservare andamenti dei valori di 8-OH-dG corretti e non corretti per la creatinina molto diversi. Due esempi sono riportati nella Figura 8.

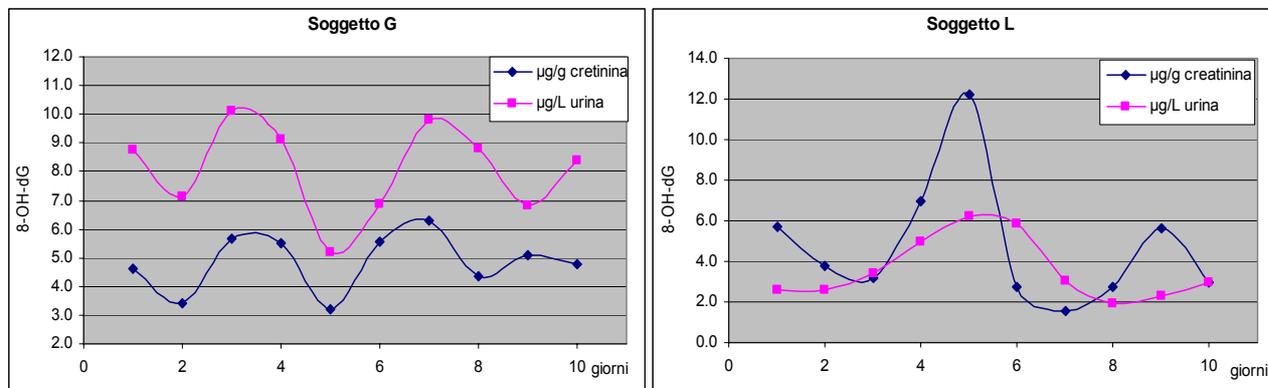


Fig. 8: andamento dei valori di 8-OH-dG (espressi in µg/g creatinina e µg/L urina) in due soggetti (G, L) in 10 giorni di campionamento.

Questi dati risultano interessanti rispetto ad indagini future sia per quanto riguarda l'opportunità della correzione per la creatinina, sia per la definizione di un opportuno cut-off di valori per poter considerare accettabili i campioni in esame, anche rispetto al sesso e all'età. Inoltre mettono evidentemente in rilievo la variabilità intra-individuale inter-day dei valori di 8-OH-dG urinaria, problematica anch'essa oggetto di studio.

4. Valutazione del danno ossidativo in lavoratori esposti a farmaci chemioterapici antitumorali

I farmaci chemioterapici antineoplastici costituiscono un'ampia classe eterogenea di sostanze in grado di inibire, con diversi meccanismi, la crescita delle cellule tumorali interrompendo la fase di divisione e quindi la loro proliferazione. L'azione dei chemioterapici è solo parzialmente selettiva, per cui anche le cellule normali possono riportare alterazioni al DNA come conseguenza dell'azione del farmaco. In virtù della capacità di questi farmaci di interagire con il materiale genetico della cellula, alcuni di questi farmaci possono avere quindi effetti citotossici (mutageni, teratogeni e cancerogeni). Per questo motivo sulla base di approfonditi studi epidemiologici, studi di cancerogenesi in vivo su animali e di test di mutagenesi a breve termine, l'Agenzia

Internazionale per la Ricerca sul Cancro (IARC, International Agency for Research on Cancer) ha classificato numerosi chemioterapici e terapie combinate come "cancerogeni per l'uomo" (Gruppo 1), mentre altri risultano "probabili cancerogeni" (Gruppo 2) o "possibili cancerogeni" per l'uomo (Gruppo 2B) (IARC, 1987, 1990, 2000). Inoltre questi farmaci possono indurre la formazione di ROS, con conseguente induzione di genotossicità (Murata, 2004). In particolare la ciclofosfamide, antineoplastico largamente usato per il trattamento di linfomi, leucemia e altre patologie maligne, sembra generare un idroperossido altamente instabile che porta alla formazione non solo di cross-links ma anche alla frammentazione del DNA. A causa dell'impiego sempre più frequente di questi farmaci, destano allarme i potenziali rischi sanitari legati all'esposizione professionale a questi composti da parte di lavoratori dell'industria farmaceutica, di farmacisti ospedalieri e di infermieri addetti alla loro preparazione e somministrazione. Infatti, anche se gli operatori sanitari sono esposti a dosi molto più basse se confrontate con quelle dei pazienti oncologici, l'esposizione professionale a miscele di composti potenzialmente mutageno/cancerogeni può comportare un aumento dei rischi sanitari per la sua cronicità e l'impossibilità di individuare una dose-soglia sotto la quale il rischio viene annullato.

Numerosi studi sono stati condotti per valutare il rischio genotossico nei lavoratori che manipolano farmaci antineoplastici. I risultati hanno rivelato un incremento di aberrazioni cromosomiche, scambi di cromatidi fratelli, frequenza di micronuclei nei linfociti, danno al DNA rivelato al comet assay e un'alta frequenza di mutazioni geniche (Fucic, 2004; Undeđer, 1999; Maluf, 2000). Il danno al DNA indotto dalle specie reattive all'ossigeno è stato invece poco indagato. È stata valutata la superossido dismutasi (Sod), la catalasi (Cad) e i prodotti della perossidazione misurati con il test delle sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) (Rombaldi, 2009), ma ancora non sono stati condotti studi mediante la misura di basi o nucleosidi ossidati come biomarcatori di stress ossidativo per il monitoraggio dell'esposizione ad antineoplastici.

4.1 PRIN 2005: Valutazione Dei Rischi Mutageno/Cancerogeni Occupazionali in Soggetti Esposti a Farmaci Antiblastici (Programma di Ricerca Scientifica di Rilevante Interesse Nazionale finanziato dal Ministero dell'istruzione, dell'Università e della Ricerca)

Lo scopo del progetto di ricerca è stata la valutazione dei rischi mutageno/cancerogeni derivanti dall'esposizione professionale a farmaci antiblastici. La ricerca, a cui hanno partecipato 5 Unità di Ricerca (UR) è stata effettuata seguendo un approccio integrato di monitoraggio ambientale e di monitoraggio biologico. Il monitoraggio ambientale è stato effettuato mediante analisi di ciclofosfamide (come tracciante di dose esterna) sulle superfici di lavoro (wipe tests) e sul corpo delle persone esposte (pads). Il monitoraggio biologico è stato effettuato mediante lo studio di bioindicatori di esposizione (determinazione di ciclofosmamide in urina come tracciante di dose interna), di dose biologica efficace (danno primario e da stress ossidativo al DNA nei linfociti), di effetto (8-OH-dG ed alterazioni citogenetiche valutate come micronuclei ed aberrazioni cromosomiche nei linfociti) e di suscettibilità genetica individuale (polimorfismi genetici nei linfociti). Lo studio ha coinvolto gli addetti alla preparazione e alla somministrazione di chemioterapici operanti in strutture ospedaliere pubbliche selezionate dalle 5 UR: circa 70 soggetti di sesso femminile, non fumatrici e professionalmente esposte a chemioterapici antiblastici da almeno un anno hanno rappresentato il gruppo di esposti. Un gruppo di pari numerosità di non esposti ad agenti genotossici ma con le stesse caratteristiche (appaiati per le principali caratteristiche individuali, quali il sesso e l'età) è stato selezionato come gruppo di controllo. La popolazione in esame è stata reclutata su base volontaria mediante consenso informato. Tutti i soggetti reclutati sono stati inoltre intervistati con l'ausilio di questionari, per conoscerne la storia lavorativa, le eventuali malattie pregresse o in atto, la presenza di fattori confondenti che possono interferire sui risultati delle indagini (consumo di alcol e di caffè, assunzione di farmaci, introduzione di mutageni e/o cancerogeni con la dieta, etc.). E' stata inoltre effettuata un'analisi approfondita dei requisiti ambientali dei locali di lavoro (presenza di cappe, smaltimento corretto dei rifiuti, etc.), della buona pratica lavorativa degli esposti (uso di DPI, pulizia dei locali e delle superfici, rispetto delle norme di sicurezza) e delle quantità di farmaci manipolati (sia di routine che nelle 24/48 ore precedenti al prelievo). I dati raccolti sono estremamente importanti per valutare la reale esposizione del personale, in quanto in molti lavori è stato

evidenziato che un significativo aumento di genotossicità si rileva in lavoratori che operano senza sistemi di protezione e che al contrario un'appropriate tecnica di lavoro riduce o elimina il rischio (Fuchs, 1995; Undeđer, 1999).

Per l'analisi statistica dei risultati ottenuti sono state applicate sia tecniche univariate che multivariate, tramite l'utilizzo del programma di analisi statistica Stata 10 (Stata Corporation, College Station, TX). Per i dati con distribuzione normale sono stati usati il test t di Student o ANOVA, mentre per i dati non normalmente distribuiti le differenze fra le medie sono state analizzate tramite i test di Wilcoxon o Kruskal-Wallis. Valori di p inferiori a 0.05 sono stati considerati significativi.

I valori di ciclofosfamide (CF) ottenuti dal monitoraggio ambientale (Carrieri, 2000, 2003), effettuato sui piani della cappa, sulle aste delle flebo e sull'avambraccio degli operatori (preparatori e somministratori), sono mostrati in Tabella 3.

Tab. 3: valori medi e range di concentrazione di ciclofosfamide sui piani di lavoro e sulle aste delle flebo durante le somministrazioni (**wipe tests**) e sugli avambracci degli operatori (**pads**).

	Concentrazione media (range) (ng/cm²)
<i>Wipe tests</i>	
Piano lavoro cappa	157.5 (0.01-1368)
Asta delle flebo	0.31 (0.01-2.62)
<i>Pads</i>	
Avambraccio Preparatori	3.1 (0.03-64.4)
Avambraccio Somministratori	0.72 (0.03-6.18)

Come si può osservare il range di concentrazione è piuttosto ampio in tutte le misure e i preparatori risultano avere una esposizione al farmaco circa 4 volte maggiore rispetto a chi somministra.

L'analisi della ciclofosmamide immodificata nelle urine è stata eseguita dalla nostra UR seguendo il metodo in μ LC-ESI-MS/MS già validato e pubblicato (Barbieri, 2006). Le analisi dei campioni di urina nel gruppo degli esposti sono risultate positive solo in 2 soggetti su 60 esposti, con concentrazioni urinarie di CF pari a 0.08 e 0.12 μ g/L. Tutti gli altri campioni sono risultati negativi presentando concentrazioni urinarie

inferiori al limite di rivelazione del metodo ($0.04 \mu\text{g/l}$). Anche tutti i campioni del gruppo di controllo sono risultati negativi per la ricerca di CF.

E' da notare che uno dei due campioni positivi alla CF urinaria è risultato appartenere alla preparatrice con la maggiore contaminazione rilevata sul pad dell'avambraccio.

Per quanto riguarda gli indicatori di effetto presi in considerazione nello studio, solo le alterazioni di medio periodo, aberrazioni cromosomiche (AC) e micronuclei (MN) sono risultate significativamente maggiori negli esposti a farmaci antineoplastici rispetto ai non esposti. In particolare il modello di regressione multipla applicato suggerisce che la frequenza di MN è significativamente influenzata dalla presenza di polimorfismo nullo sul gene "deossificante" GSTM1 ($p=0.023$). Il livello di 8-OH-dG invece, pur mostrando un valore medio più alto negli esposti rispetto ai controlli, non ha una differenza statisticamente significativa ($p=0.24$) (vedi Figura 9).

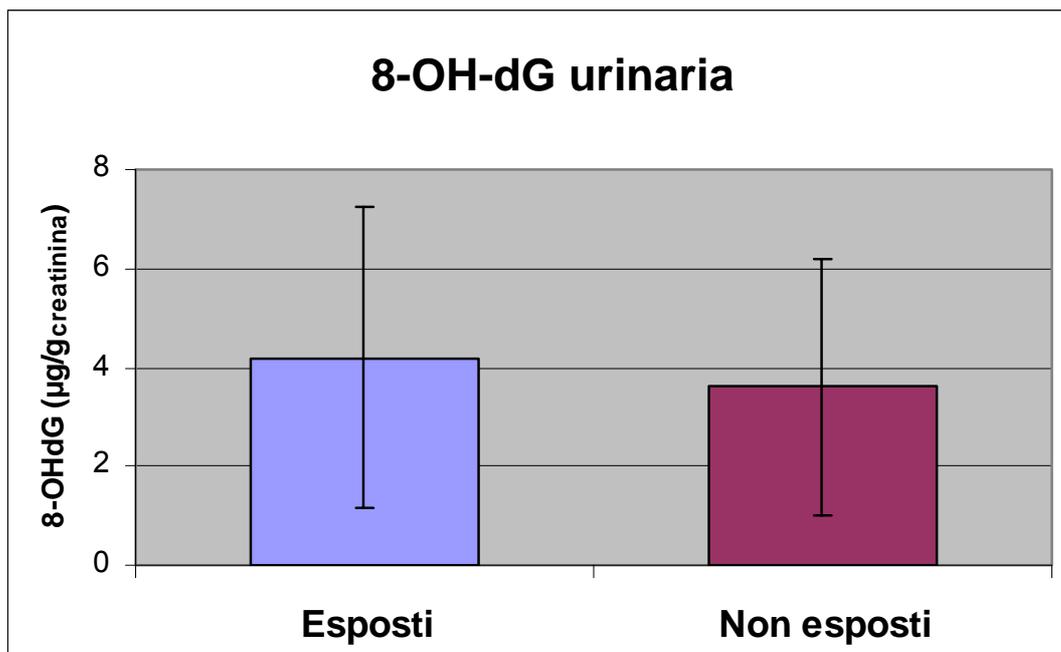


Fig. 9: i valori medi 8-OH-dG urinaria ($\mu\text{g/g creatinina}$) sono risultati maggiori nei soggetti esposti ($n=60$) (4.20 ± 3.20) rispetto ai controlli ($n=75$) (3.61 ± 2.63) ma non statisticamente significativi ($p=0.24$)

Il gruppo dei soggetti esposti è stato successivamente suddiviso in due sottogruppi sulla base dei mesi di anzianità nella mansione specifica, per valutare l'eventuale effetto della durata dell'esposizione sulla escrezione urinaria di 8OHdG. Come cut-off è stata scelta la mediana, corrispondente a 84 mesi di anzianità nella mansione.

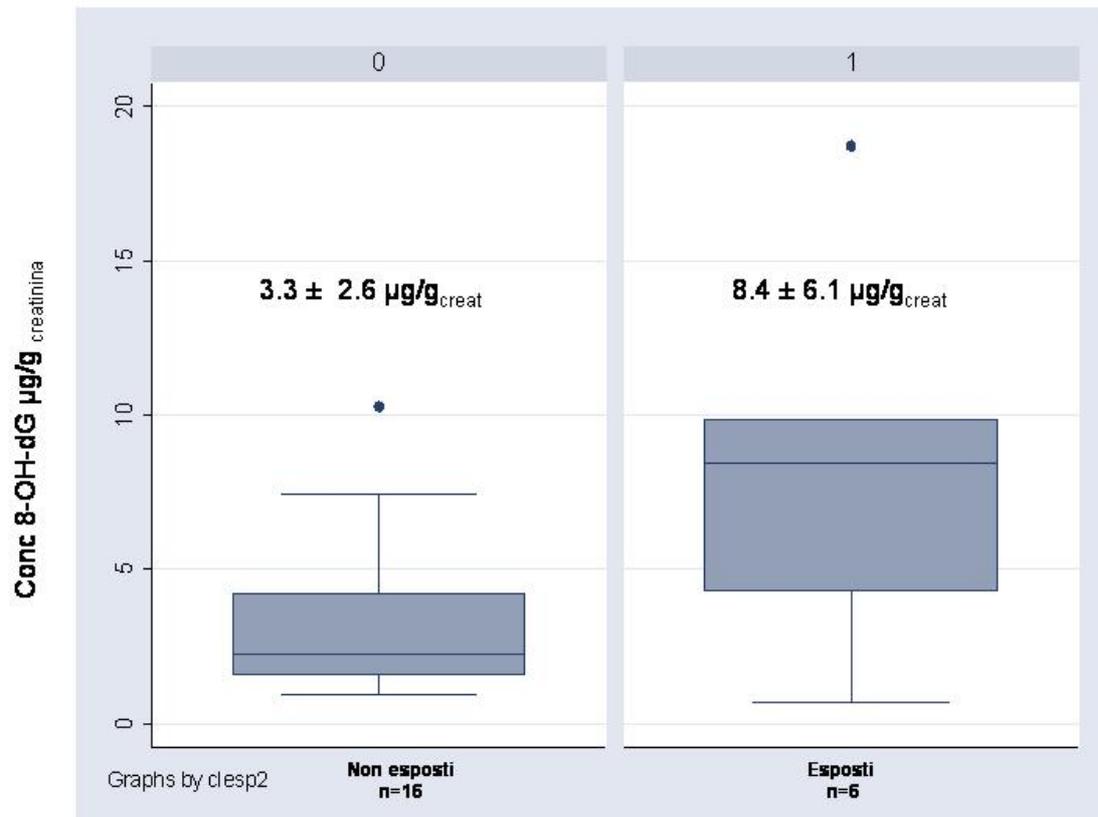
Anche in questo caso la differenza tra il valore medio di 8-OH-dG nei tre gruppi non è risultata statisticamente significativa (Kruskal-Wallis test). I risultati sono riassunti in Tabella 4.

Tab. 4: valori di 8-OH-dG urinaria nei controlli e nei casi divisi per anzianità di mansione

	8-OH-dG urinaria ($\mu\text{g/g}$ creatinina)	
	Media (\pm ds) *	Mediana (iqr)
Controlli (n=75)	3.61 (\pm 2.63)	2.73 (\pm 3.65)
Casi (\leq 84 mesi) (n=30)	4.75 (\pm 3.92)	3.65 (\pm 5.67)
Casi (\geq 84 mesi) (n=30)	3.65 (\pm 2.16)	3.01 (\pm 4.19)

* $P=0.45$

Infine il gruppo dei soggetti è stato suddiviso in sottogruppi di età e in classi di esposizione (in base al numero di preparazioni e/o somministrazioni delle ultime 48 ore). Dall'analisi emerge che una differenza significativa nei valori di 8-OH-dG urinaria si può osservare solo all'interno del gruppo con età inferiore ai 30 anni (non esposte n=16; esposte n=6) (Anova, $p=0.0104$) (vedi Grafico 5).



Graf. 5: concentrazione media (\pm ds) di 8-OH-dG urinaria nel gruppo di soggetti con età inferiore a 30 anni (esposti vs non esposti)

Per il gruppo di soggetti con età superiore a 30 anni, invece (n = 113), non è possibile evidenziare una differenza significativa (Anova, p=0.81) nemmeno creando delle classi di esposizione (cl_exp) basate sul numero di preparazioni e somministrazioni delle ultime 48 ore:

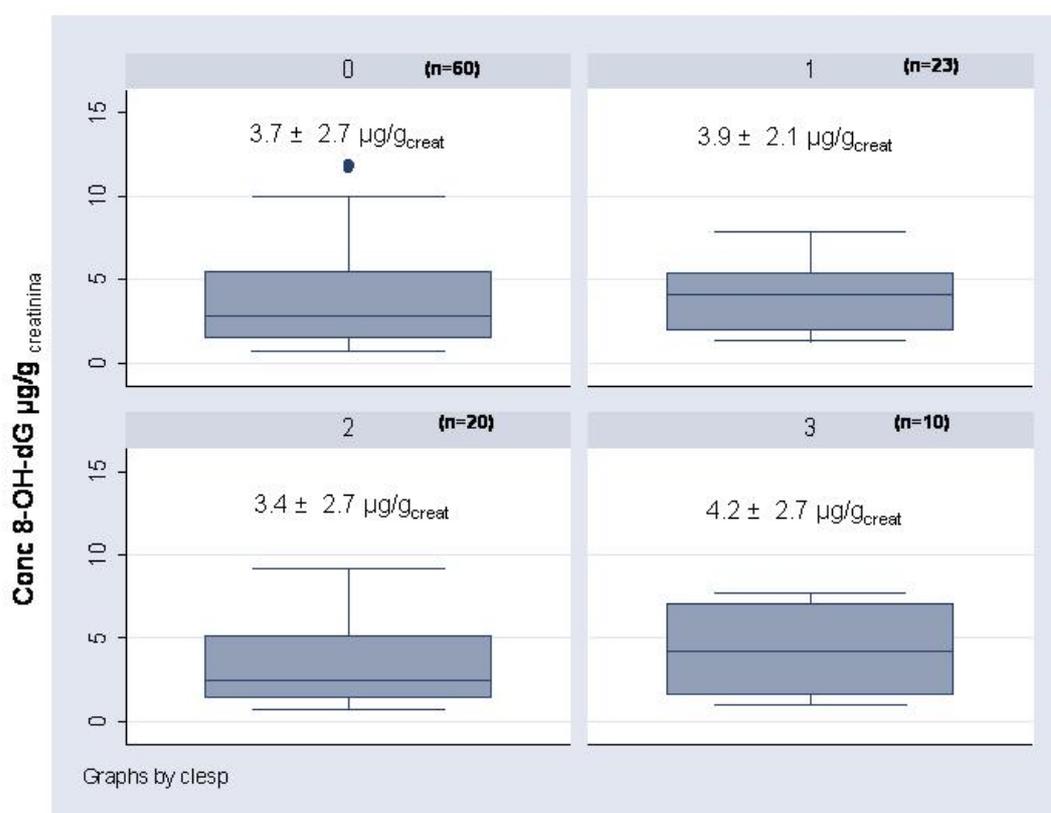
cl_exp 0: non esposte;

cl_exp 1: fino a 10 somministrazioni e/o preparazioni;

cl_exp 2: fino a 50 somministrazioni e/o preparazioni;

cl_exp 3: tra 50 e 190 somministrazioni e/o preparazioni.

Il Grafico 6 mostra i risultati.



Graf. 6: concentrazione media ($\pm ds$) di 8-OH-dG urinaria nel gruppo di soggetti con età superiore a 30 anni divise per classi di esposizione (numero di preparazioni e/o somministrazioni nelle ultime 48 ore)

I risultati globali dello studio mostrano che solo le alterazioni di medio periodo (aberrazioni cromosomiche e micronuclei) sono significativamente maggiori negli esposti a ciclofosfamide rispetto ai non esposti e che esistono nella popolazione soggetti con maggiore suscettibilità agli effetti genotossici dei farmaci chemioterapici antineoplastici (soggetti con polimorfismo nullo per il gene GSTM1, detossificante,

51%). Non ci sono invece differenze evidenti tra esposti e controlli per le alterazioni di breve periodo (Comet e 8-OH-dG). Tale risultato potrebbe essere in parte giustificato dal basso livello di esposizione dei lavoratori addetti alla manipolazione di antiblastici nel periodo immediatamente precedente l'esecuzione dei prelievi, come mostrano i risultati del monitoraggio biologico (la ciclofosfamide è stata rilevata solo in 2 soggetti). Inoltre queste alterazioni possono essere influenzate soprattutto da fattori aspecifici (attività sportiva, dieta, abitudini voluttuarie...).

5. Discussione e conclusioni

Negli ultimi dieci anni molti progressi sono stati fatti sia nella determinazione analitica che nella comprensione del significato della presenza nel DNA e in urina di prodotti di ossidazione e di riparazione, e in particolar modo della 8-OH-dG. Nonostante questo, ancora molti aspetti sono da chiarire ed approfondire.

Per quanto riguarda la determinazione analitica, sia i dati presenti in letteratura sia le prove interlaboratorio da noi presentate, confermano che le metodiche che prevedono una preparazione del campione e che si avvalgono di tecniche cromatografiche accoppiate a detector di massa risultano più accurate e robuste, oltre che più specifiche, rispetto ad altre tecniche e in particolare rispetto a quelle immunoenzimatiche. Nello studio di popolazioni molto ampie che prevedono il coinvolgimento di diversi gruppi di ricerca sarà quindi opportuno selezionare le tecniche analitiche e avviare, comunque, delle prove di calibrazione dei metodi tra i vari laboratori. Questo potrà permettere di ottenere dati attendibili sia rispetto ai valori di baseline della popolazione che di eventuali effetti correlati all'esposizione a xenobiotici.

Un altro importante argomento legato alla misura e all'interpretazione dei dati rimane la valutazione della opportunità di correggere i valori urinari di 8-OH-dG per ottenere una normalizzazione dei valori rispetto alla diluizione o alla concentrazione dei campioni. I campioni da noi analizzati nell'ambito di diversi studi hanno confermato la validità della correzione per la creatinina, avendo osservato un'alta variabilità dei valori rispetto ai singoli individui sia nell'arco di una giornata che nell'arco di 10 giorni di campionamento. La variabilità intra-individuale e inter-day è inoltre da approfondire soprattutto rispetto alle concentrazioni urinarie di 8-OH-dG. I ritmi circadiani e settimanali, rispetto ai valori di background individuale, non sono

ancora infatti stati chiariti e saranno sicuramente oggetto di studi futuri anche da parte nostra.

La problematica maggiore e di più largo interesse rimane invece l'uso e la attendibilità della 8-OH-dG urinaria come marcatore di stress ossidativo. La maggior parte della letteratura scientifica riporta che elevati livelli di danno ossidativo al DNA sono stati misurati in pazienti con diverse patologie, portando a ipotizzare che questo tipo di insulto giochi un ruolo importante nell'eziologia di molte malattie. E' stato inoltre dimostrato che molti meccanismi di riparazione del DNA (come ad esempio la perdita di eterozigosi al gene hOGG1) sono ridotti nei pazienti affetti da tumore (Wikman, 2000). Molte ricerche in corso hanno come obiettivo quello di validare dei biomarcatori utili come indicatori precoci di malattia o alterazione patologica da utilizzare in medicina clinica.

Nel campo della tossicologia occupazionale, invece, i risultati sono spesso più controversi. Studi di monitoraggio biologico hanno mostrato una relazione dose-risposta consistente solo in casi di esposizioni rilevanti a particolari sostanze, anche se le tecniche analitiche utilizzate e i fattori di confondimento hanno portato, in alcuni casi, a risultati non attendibili. Il fumo risulta essere sicuramente il fattore più confondente all'interno delle popolazioni di lavoratori monitorate; non si conosce invece completamente l'effetto di dieta, età e body mass index sui valori urinari di 8-OH-dG misurati. Così come non è ancora chiara la relazione tra la concentrazione di 8-OH-dG nel DNA dei linfociti di sangue periferico rispetto all'urina. Infatti l'interpretazione della presenza di questa base ossidata nell'urina non è univoca: una escrezione immodificata di 8-OH-dG in urina al crescere di un carico ossidativo (come ad esempio un insulto tossico) non può escludere una ridotta capacità riparativa e un eventuale accumulo di danno al DNA non osservabile. Inoltre non è ancora stato chiarito quale sia il contributo del pool dei nucleotidi sulla concentrazione finale della 8-OH-dG in urina.

Rispetto ai risultati ottenuti dal nostro studio sugli esposti a farmaci chemioterapici antineoplastici, il fatto di non aver trovato una correlazione significativa tra esposizione e concentrazione urinaria di 8-OH-dG può trovare sicuramente spiegazione nella bassa esposizione delle lavoratrici (rilevata dal monitoraggio biologico e ambientale) e portare quindi ad escludere l'uso di questo marcatore come indicatore di effetto a bassissime dosi.

Saranno quindi da approfondire in futuro l'influenza dell'esposizione ambientale e professionale sulla formazione di 8-OH-dG urinaria, considerando la variabilità dei

risultati e la possibilità di determinare valori di background della popolazione generale.

Bibliografia

- Alessio L, Berlin A, Dell'Orto A, Toffoletto F, Ghezzi I. Reliability of urinary creatinine as a parameter used to adjust values of urinary biological indicators. *Int Arch Occup Environ Health*. 1985; 55(2):99-106.
- Andreoli R, Manini P, Alinovi R, Goldoni M, De Palma G, Mutti A. Chronobiological evaluation of effects biomarkers and sampling]. *G Ital Med Lav Ergon*. 2005; 27(3):318-21.
- Barzilai A, Yamamoto K. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst)*. 2004; 3(8-9):1109-15.
- Carrieri M, Scapellato ML, Maccà I, Virgili A, Perini M, Saia B, Bartolucci GB. Valutazione dell'esposizione a chemioterapici antitumorali del personale sanitario. *G Ital Med Lav Erg*. 2003; 25:2.
- Carrieri M, Scapellato ML, Maccà I, Zoppellaro E, Salamon F, Cavedon F, Bartolucci GB. Determinazione della ciclofosfamide su superfici e nelle urine mediante gascromatografia - spettrometria di massa. *Folia Med* 2000; 71 (3): 201-204.
- Carrieri M, Trevisan A, Bartolucci GB. Adjustment to concentration-dilution of spot urine samples: correlation between specific gravity and creatinine. *Int Arch Occup Environ Health*. 2001; 74(1):63-7.
- Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. *FASEB J*. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. 2003; 17(10):1195-214.
- Cooke MS, Evans MD, Dove R, Rozalski R, Gackowski D, Siomek A, Lunec J, Olinski R. DNA repair is responsible for the presence of oxidatively damaged DNA lesions in urine. *Mutat Res*. 2005; 574(1-2):58-66.
- Cooke MS, Evans MD, Herbert KE, Lunec J. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine-source, significance and supplements. *Free Radic Res*. 2000; 32(5):381-97.
- Cooke MS, Olinski R, Loft S. Measurement and meaning of oxidatively modified DNA lesions in urine. European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008; 17(1):3-14.
- Cooke MS, Singh R, Hall GK, Mistry V, Duarte TL, Farmer PB, Evans MD. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-tandem mass spectrometry methodology for the analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in saliva and urine. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(12):1829-36.
- Dizdaroglu M, Jaruga P, Rodriguez H. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with measurement by gas chromatography-mass spectrometry. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(3):E12.

- Erhola M, Toyokuni S, Okada K, Tanaka T, Hiai H, Ochi H, Uchida K, Osawa T, Nieminen MM, Alho H, Kellokumpu-Lehtinen P. Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment. *FEBS Lett.* 1997; 409(2):287-91.
- ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage). Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. *Free Radic Res.* 2000; 32(4):333-41.
- Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res.* 2004;567(1):1-61.
- Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radic Res Commun.* 1986;1(3):163-72.
- Fuchs J, Hengstler JG, Jung D, Hiltl G, Konietzko J, Oesch F. DNA damage in nurses handling antineoplastic agents. *Mutat Res.* 1995; 342(1-2):17-23.
- Fucic A, Jazbec A, Mijic A, Seso-Simic D, Tomek R. Cytogenetic consequences after occupational exposure to antineoplastic drugs. *Mutat Res.* 1998; 416(1-2):59-66.
- Gackowski D, Kowalewski J, Siomek A, Olinski R. Oxidative DNA damage and antioxidant vitamin level: comparison among lung cancer patients, healthy smokers and nonsmokers. *Int J Cancer.* 2005;114(1):153-6.
- <http://escula.org>
- Hu CW, Wu MT, Chao MR, Pan CH, Wang CJ, Swenberg JA, Wu KY. Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry and by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004;18(4):505-10.
- IARC (1987) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Suppl. 7.
- IARC (1990) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 50.
- IARC (2000) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 76.
- Lin HS, Jenner AM, Ong CN, Huang SH, Whiteman M, Halliwell B. A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: measurement with gas chromatography-mass spectrometry after single solid-phase extraction. *Biochem J.* 2004; 380(Pt 2):541-8.

- Maluf SW, Erdtmann B. Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res.* 2000; 471(1-2):21-7.
- Mei S, Yao Q, Wu C, Xu G. Determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by two approaches-capillary electrophoresis and GC/MS: an assay for in vivo oxidative DNA damage in cancer patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005; 827(1):83-7.
- Murata M, Suzuki T, Midorikawa K, Oikawa S, Kawanishi S. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. *Free Radic Biol Med.* 2004; 37(6):793-802.
- National Research Council. Biological markers in environmental health research. *Environ Health Perspect* 1987; 74:3-9.
- Pilger A, Rüdiger HW. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health.* 2006; 80(1):1-15.
- Poulsen HE, Loft S, Prieme H, Vistisen K, Lykkesfeldt J, Nyssonen K, Salonen JT. Oxidative DNA damage in vivo: relationship to age, plasma antioxidants, drug metabolism, glutathione-S-transferase activity and urinary creatinine excretion. *Free Radic Res.* 1998; 29(6):565-71.
- Ravanat JL, Duret B, Guiller A, Douki T, Cadet J. Isotope dilution high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry assay for the measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in biological samples. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998; 715(2):349-56.
- Rombaldi F, Cassini C, Salvador M, Saffi J, Erdtmann B. Occupational risk assessment of genotoxicity and oxidative stress in workers handling anti-neoplastic drugs during a working week. *Mutagenesis* 2009; 24(2):143-148.
- Sabatini L, Barbieri A, Tosi M, Roda A, Violante FS. A method for routine quantitation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine based on solid-phase extraction and micro-high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2005; 19:147-152.
- Shigenaga MK, Park JW, Cundy KC, Gimeno CJ, Ames BN. In vivo oxidative DNA damage: measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Methods Enzymol.* 1990; 186:521-30.
- Singh R, McEwan M, Lamb JH, Santella RM, Farmer PB. An improved liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the determination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in DNA samples using immunoaffinity column purification. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2003;17(2):126-34.

- Undeğer U, Başaran N, Kars A, Güç D. Assessment of DNA damage in nurses handling antineoplastic drugs by the alkaline COMET assay. *Mutat Res.* 1999; 439(2):277-85.
- Wikman H, Risch A, Klimek F, Schmezer P, Spiegelhalder B, Dienemann H, Kayser K, Schulz V, Drings P, Bartsch H. hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *Int J Cancer.* 2000; 88(6):932-7.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta.* 2004; 339(1-2):1-9.

Ringraziamenti

Un grazie a Stefano, Stefania, Francesco e Andrea per l'aiuto *statisticamente* significativo.

Grazie di cuore a Laura, che con le sue celluline grigie da Poirot, fa sempre la differenza.

"Una volta un mago inventò una macchina per fare le comete.
Somigliava un tantino alla macchina per tagliare il brodo,
ma non era la stessa....." (G. R.)