

BIOMARCATORI URINARI DI STRESS OSSIDATIVO E IL LORO RUOLO NEL BIOMONITORAGGIO DELL'ESPOSIZIONE AD AGENTI CHIMICI PERICOLOSI

INTRODUZIONE

L'esposizione umana all'inquinamento atmosferico, ad agenti chimici pericolosi, radiazioni, alcuni stili di vita (abitudine al fumo, consumo di alcool e squilibri nutrizionali) e lo stato di salute (invecchiamento, infiam-

mazione cronica, condizione patologica, uso di farmaci e radioterapia) possono dar luogo a modificazioni ossidative delle basi degli acidi nucleici (DNA e RNA) generate da specie reattive dell'ossigeno (reactive oxygen species - ROS), e a modificazioni delle proteine, generate da specie reattive dell'azoto (reactive nitrogen species - RNS).

ROS e RNS sono associate all'invecchiamento cellulare, a malattie degenerative, cardiovascolari, diabete e malattie tumorali, per la loro capacità di danneggiare macromolecole biologiche come DNA e RNA, proteine e lipidi alterando il metabolismo e la vitalità cellulare fino a indurre morte cellulare per necrosi o apoptosi, e causando un danno tissutale di tipo infiammatorio.

STRESS OSSIDATIVO

Lo 'stress ossidativo' è determinato da uno squilibrio tra la produzione di ROS e di RNS e la capacità di difesa antiossidante e di riparazione del danno ossidativo da parte di un sistema biologico, che si traduce in un insieme di alterazioni nelle macromolecole biologiche, nelle cellule e nei tessuti. In ogni individuo è sempre presente un certo livello di danno ossidativo, a causa del metabolismo ossidativo prodotto dalla respirazione mitocondriale, la cui frequenza aumenta con l'esposizione ad agenti che generano specie reattive dell'ossigeno e dell'azoto. Queste specie comprendono il radicale superossido ($O_2\cdot$) e altri derivati, come il perossido d'idrogeno (H_2O_2) e il radicale idrossile ($\cdot OH$) e le specie reattive più importanti derivanti dall'azoto quali il radicale nitrossido ($\cdot NO$) e l'anione perossinitrito ($ONOO^-$): i loro effetti sono contrastati da sistemi di difesa che coinvolgono enzimi specializzati (superossido dismutasi, catalasi, glutazione perossidasi) e antiossidanti (glutazione, ubiquinol, bilirubina, acido urico, α -tocoferolo e acido ascorbico). Un corretto bilanciamento tra ossidanti ed antiossidanti è essenziale per le funzioni fisiologiche coinvolte nelle catene di traduzione intracellulare dei segnali (recettori, chinasi e fosfatasi, fattori di trascrizione). La differenza tra l'intensità nella formazione di ROS e RNS e l'efficacia della difesa antiossidante è la causa della variabilità dello stato di stress ossidativo tra gli individui: essa è legata a molteplici fattori, tra cui fattori genetici, differen-

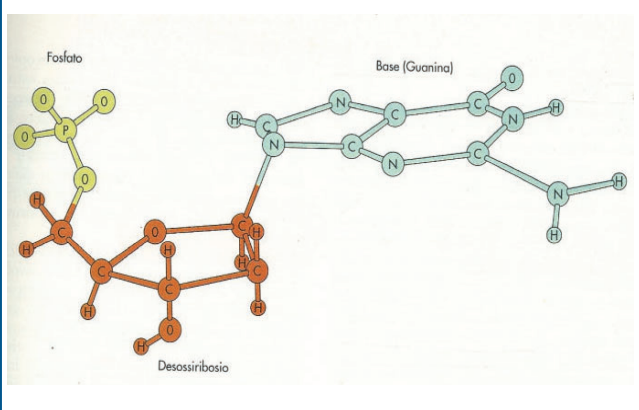
ze epigenetiche, promotori endogeni di ROS (ferro, rame), infiammazione cronica ed altre condizioni. Poiché la misura diretta delle specie reattive e dei radicali liberi è impossibile a causa della loro instabilità e reattività, per valutare i livelli di stress ossidativo, sia per interesse clinico che di ricerca, vengono utilizzati metodi in grado di identificare e misurare le alterazioni indotte su DNA, RNA, lipidi e proteine (biomarcatori di stress ossidativo).

Esistono metodi specifici e sensibili che permettono di analizzare queste alterazioni in un largo numero di campioni e sono essenziali per valutare gli effetti ossidativi precoci capaci di predire valori associati a malattie in sviluppo, legate all'esposizione lavorativa ad agenti chimici.

ALTERAZIONI DEL DNA, RNA E PROTEINE

Il DNA e l'RNA sono due macromolecole polimeriche di struttura simile, costituite da filamenti composti da monomeri detti nucleotidi. Un nucleotide è formato a sua volta da un nucleoside, costituito da una base azotata e uno zucchero, legato ad un gruppo fosfato avente un ruolo strutturale. La base azotata può essere un derivato della purina o della pirimidina. Le purine del DNA sono adenina (A) e guanina (G), le pirimidine sono timina (T) e citosina (C) e lo zucchero è il deossiribosio. Il DNA è composto da due filamenti avvolti fra loro a doppia elica la cui struttura è mantenuta da legami idrogeno fra le basi complementari (G-C e A-T). Nell'RNA lo zucchero è il ribosio, le purine sono adenina (A), guanina (G), e le pirimidine uracile (U) e citosina (C). La guanina è la base che subisce più facilmente l'attacco ossidativo dei radicali e delle specie reattive in quanto ha il potenziale di ossidazione più basso delle quattro. In Figura 1 è riportata l'immagine di un nucleotide del DNA contenente la base guanina.

Figura 1 DNA (costituenti di un nucleotide)



(Watson JD, Gilman M, Whitkowski J et al. DNA ricombinante. Bologna: Zanichelli; 1994)

Nel DNA, l'ossidazione in posizione 8 della guanina porta alla perdita della specificità di accoppiamento fra le basi, aumentando la frequenza di mutazioni GC→TA. Esistono meccanismi di riparazione del DNA, con escissione della base (**Base excision repair, BER**) e con escissione dell'intero nucleotide (**Nucleotide excision repair, NER**), che portano all'escrezione nell'urina umana rispettivamente di 8-oxo-7,8-diidrossiguanina (8-oxoGua, Figura 2A) e di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-oxodGuo, Figura 2B) che è il biomarcatore specifico e più studiato per il danno ossidativo al DNA. Queste molecole possono essere prodotte anche dal turnover del DNA ossidato.

L'RNA è soggetto ad ossidazione più facilmente rispetto al DNA, sia a causa della sua presenza intracellulare sia perché essendo a singolo filamento le sue basi sono più esposte. Anche nell'RNA è la guanina la base che subisce più facilmente l'attacco ossidativo, portando alla formazione sia di 8-oxoGua che del nucleoside

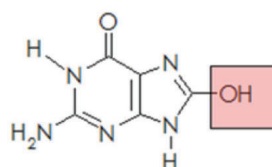
8-oxo-7,8-diidrossiguanosina (8-oxoGuo, Figura 2C), biomarcatore specifico per l'ossidazione dell'RNA.

Per quanto riguarda le proteine, il processo di ossidazione comporta generalmente l'introduzione di nuovi gruppi funzionali. I principali biomarcatori sono i prodotti di nitrossidazione dell'amminoacido tirosina (Tyr), in particolare la 3-nitrotirosina (3-NO₂Tyr, Figura 2D) prodotta dalla reazione dei residui di tirosina con il perossinitrito, anch'essa escreta nelle urine. In Figura 3 sono riportate le reazioni radicaliche che portano alla formazione di 3-NO₂Tyr. Le modificazioni ossidative possono portare alla frammentazione e ad alterazioni della struttura tridimensionale, ad aggregazioni e a perdite funzionali delle proteine. Livelli aumentati di 3-NO₂Tyr si riscontrano in stati patologici correlati a una sovrapproduzione di specie reattive, come malattie cardiovascolari e neurodegenerative, infiammazione e invecchiamento.

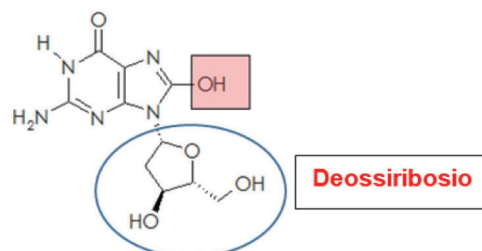
Figura 2 (A,B,C,D)

Prodotti di ossidazione della guanina e tirosina

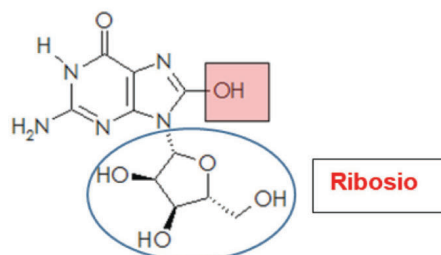
8-idrossi-guanina (8-oxoGua) (A)



8-idrossi-2'-deossi-guanosina (8-oxodGuo) (B)



8-idrossi-guanosina (8-oxoGuo) (C)



3-nitrotirosina (3-NO₂ Tyr) (D)

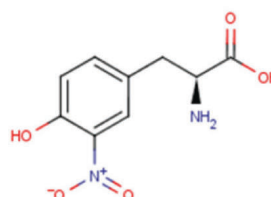
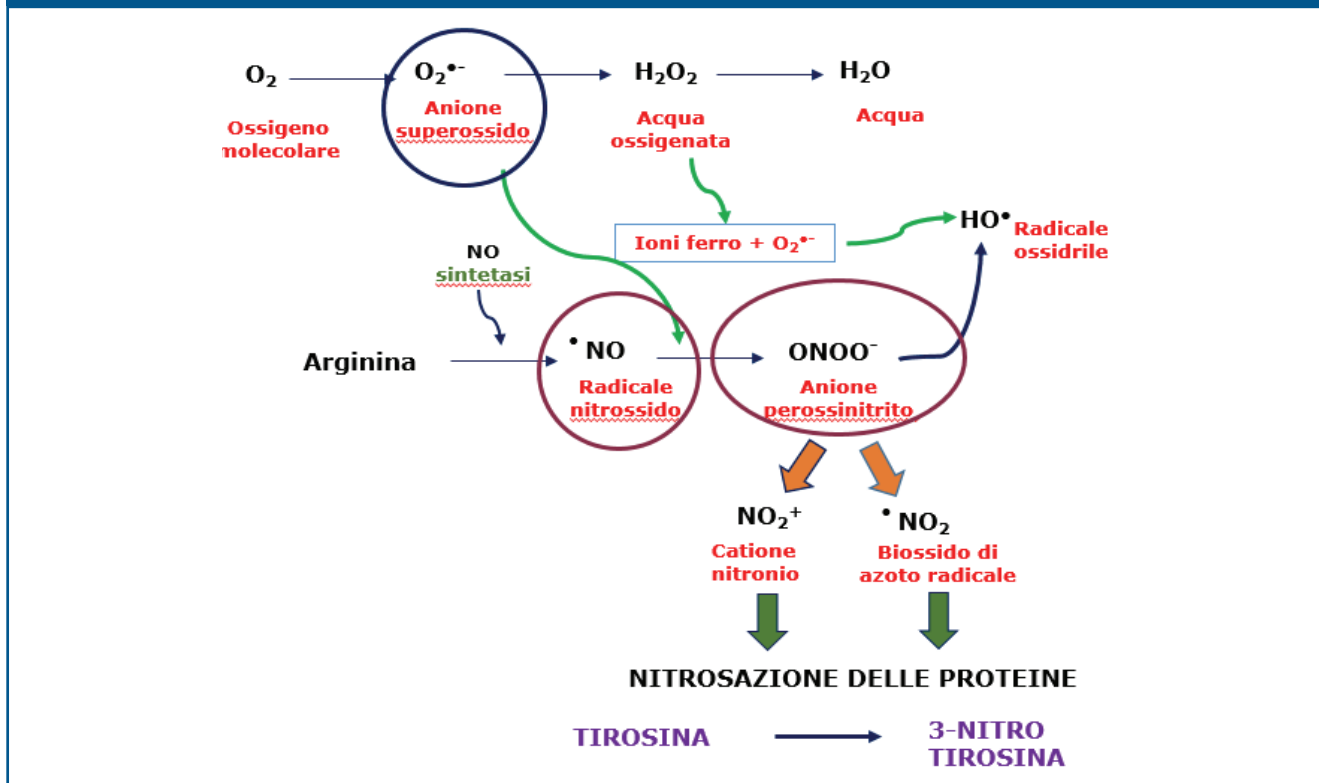


Figura 3



(Inail - Dipartimento di medicina, epidemiologia, igiene del lavoro e ambientale)

TECNICHE ANALITICHE PER LA DETERMINAZIONE DELLE BASI OSSIDATE E DELLA 3-NITROTIROSINA

Esistono diverse metodiche analitiche sufficientemente sensibili e specifiche per determinare le concentrazioni di 8-oxodGuo, 8-oxoGuo, 8-oxoGua e 3-NO₂Tyr in differenti matrici biologiche come plasma, siero, urine, saliva, tessuto e condensato dell'aria espirata (EBC). Si tratta di tecniche quali cromatografia liquida accoppiata a detector elettrochimico (Electrochemical Detection, HPLC/ECD), elettroforesi capillare con detector ultravioletto (Capillary electrophoresis Detection, CE/UV), gas cromatografia accoppiata ad uno spettrometro di massa (Gas chromatography-mass spectrometry, GC/MS), cromatografia liquida accoppiata ad uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo (Liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS/MS), o tests immunoenzimatici (Enzyme-Linked Immuno Assay, ELISA). Tra le diverse tecniche, l'HPLC/ECD ha lo svantaggio di un tempo lungo di analisi e di possibili interferenze, la GC/MS richiede uno step di derivatizzazione, i metodi immunologici portano alla sovrastima dell'analita; l'HPLC-MS/MS mostra di avere una buona selettività e sensibilità per l'analisi quantitativa di queste molecole in diverse matrici biologiche e in tempi rapidi.

MONITORAGGIO BIOLOGICO DEI LAVORATORI

Per monitoraggio biologico si intende la valutazione dell'esposizione a sostanze pericolose attraverso la misura di biomarcatori, cioè la misura della concentrazione di una sostanza o dei suoi prodotti di trasformazione metabolica in compartimenti biologici eticamente raggiungibili o la misura di effetti biologici, precoci e

reversibili, riferibili alla sostanza stessa. Il monitoraggio biologico può aiutare a valutare l'entità dell'esposizione ma anche lo stato di salute in gruppi di popolazione generale o in contesti occupazionali, in modo complementare al monitoraggio ambientale.

I biomarcatori possono quindi essere:

- **biomarcatori di dose**, specificatamente correlati alla dose di sostanza assorbita da un individuo, espressi come concentrazione in una particolare matrice, ad esempio sangue, urina o saliva;
- **biomarcatori di effetto**, i quali identificano una alterazione biochimica o fisiologica precoce e reversibile, secondaria all'esposizione ad una sostanza pericolosa, misurabile in un tessuto o in un fluido corporeo;
- **biomarcatori di suscettibilità**, che esprimono differenze individuali di origine genetica o acquisita della capacità di un organismo a rispondere all'esposizione ad una specifica sostanza.

I biomarcatori di effetto, categoria alla quale appartengono gli indicatori di stress ossidativo, pur non essendo specifici per una determinata sostanza, consentono di misurare l'effetto precoce e reversibile delle esposizioni professionali ad agenti chimici, anche in condizioni ritenute non pericolose, ad esempio quando i valori di esposizione dei lavoratori sono al di sotto dei limiti di esposizione professionale.

La letteratura scientifica riporta numerose conferme dell'associazione fra l'esposizione ad agenti chimici pericolosi e l'escrezione urinaria di biomarcatori di stress ossi-

dativo, confrontando i livelli misurati nei lavoratori professionalmente esposti con quelli riscontrati in individui della popolazione generale considerati come gruppi di controllo. Di seguito sono riportati alcuni esempi.

- L'escrezione di 8-oxoGua (associata al danno ossidativo del DNA e RNA) misurata negli addetti all'erogazione di carburanti per autotrazione, esposti a benzene, che nei lavoratori del comparto vetroresina, esposti a vapori di stirene, risulta all'interno della variabilità della popolazione generale, mentre in altre esposizioni, anche ambientali, risulta aumentata. Ulteriori studi approfondiranno le differenze di significato fra questo biomarcatore e le diverse esposizioni.
- L'escrezione di 8-oxodGuo (associata al danno ossidativo del DNA) risulta significativamente aumentata negli addetti all'erogazione di carburanti per autotrazione, esposti a benzene, e nei lavoratori del comparto vetroresina, esposti a vapori di stirene, anche se i livelli espositivi sono inferiori ai valori limite di esposizione professionale (VLEP).
- L'escrezione di 8-oxoGuo (associata al danno ossidativo del RNA) risulta significativamente aumentata negli addetti all'erogazione di carburanti per autotrazione, esposti a benzene, e nei lavoratori del comparto vetroresina, esposti a vapori di stirene, nei verniciatori, esposti a composti organici volatili (COV), e in lavoratori della carpenteria metallica, esposti a vapori di metalli quali Ba, Be, Bi, Cd, Hg, Fe, Pb, e Sr. Inoltre la determinazione di 8-oxoGuo è in grado di discriminare fra i valori misurati prima e dopo la fine del turno di lavoro, anche per lavoratori esposti a biossido di titanio.
- L'escrezione di 3-NO₂Tyr (associata al danno alle proteine), benché questo indicatore sia meno studiato dei precedenti, risulta significativamente aumentata nei lavoratori esposti a benzene e metalli, e nei pazienti di malattie neurodegenerative quali morbo di Parkinson e Alzheimer.

CONCLUSIONI

L'8-oxodGuo è un biomarcatore di effetto utile per la va-

lutazione di esposizioni professionali croniche a sostanze chimiche pericolose anche a basse dosi; l'8-oxoGuo è un indicatore sensibile nell'esposizione anche a breve termine, come un turno di lavoro; la 3-NO₂Tyr è un buon indicatore di effetto sia in ambito occupazionale che clinico. Questi biomarcatori possono quindi essere utilizzati per valutare gli effetti dell'esposizione lavorativa ad agenti di rischio anche in condizioni di conformità con le norme sulla salute e sicurezza, e risultano particolarmente utili nella valutazione degli effetti dell'esposizione a miscele, per le quali non è possibile stabilire un valore limite di esposizione professionale. La valutazione deve essere effettuata confrontando i valori trovati in lavoratori esposti a sostanze pericolose con quelli di gruppi di controllo per identificare situazioni di rischio che potrebbero evolvere negativamente per la salute.

CONSIDERAZIONI SUL CONTESTO NORMATIVO

La determinazione degli indicatori di stress ossidativo, quali indicatori di effetto, si inserisce nel quadro normativo relativo all'esposizione professionale ad agenti chimici pericolosi delineato dal d.lgs. 81/2008.

In particolare all'articolo 222 – Definizioni – è definito il concetto di valore limite biologico: *'il limite della concentrazione del relativo agente, di un suo metabolita, o di un indicatore di effetto, nell'appropriato mezzo biologico'*. Un primo elenco di tali valori è riportato nell'Allegato XXXIX.

All'articolo 229 - Sorveglianza sanitaria – punto 3, è specificato che il monitoraggio biologico è obbligatorio per i lavoratori esposti agli agenti per i quali è stato fissato un valore limite biologico. Dei risultati di tale monitoraggio viene informato il lavoratore interessato. I risultati di tale monitoraggio, in forma anonima, vengono allegati al documento di valutazione dei rischi e comunicati ai rappresentanti per la sicurezza dei lavoratori.

Per gli indicatori di stress ossidativo non esiste, ad oggi, un valore limite biologico nell'allegato apposito, tuttavia la normativa è in continuo aggiornamento, grazie all'emanazione e al recepimento di nuovi regolamenti e direttive europee, e comunque il medico competente deve fare sempre riferimento all'evoluzione delle conoscenze scientifiche.

PER ULTERIORI INFORMAZIONI

Contatti: d.pigini@inail.it

BIBLIOGRAFIA ESSENZIALE

- Tranfo G, Paci E, Carrieri M et al. Levels of urinary biomarkers of oxidatively generated damage to DNA and RNA in different groups of workers compared to general population. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2019; 16: 2995 doi: 10.3390/ijerph16162995.
- Buonaurio F, Astolfi ML, Canepari S et al. Urinary Oxidative Stress Biomarkers in Workers of a Titanium Dioxide Based Pigment Production Plant. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2020; 17: 9085; doi: 10.3390/ijerph17239085.
- Buonaurio F, Astolfi ML, Pigini D et al. Oxidative Stress Biomarkers in Urine of Metal Carpentry Workers Can Be Diagnostic for Occupational Exposure to Low Level of Welding Fumes from Associated Metals *Cancers* 2021; 13: 3167. doi: 10.3390/cancers13133167.

PAROLE CHIAVE

Radicali liberi; Ossidazione; DNA; RNA; Proteine