

G. Spatarì¹, C. Abbate¹, C. Giorgianni¹, M. Carrieri², D. Sapienza¹, S. Saitta¹, M. Barbaro¹

Indicatori genetici di suscettibilità individuale e stress ossidativo in soggetti esposti a basse dosi di benzene. Dati preliminari

¹ Dipartimento di Medicina Sociale del Territorio - Università degli Studi di Messina - AOU Policlinico "G. Martino", Via C. Valeria - 98125 Messina

² Dipartimento di Medicina Ambientale e Sanità Pubblica - Università degli Studi di Padova - Azienda Ospedaliera di Padova, Via Giustiniani, 2 - 35128 Padova

RIASSUNTO. Il benzene è riconosciuto quale cancerogeno. L'attività enzimatica della glutazione S-transferasi è importante fattore protettivo nei confronti dello stress ossidativo. Obiettivo dello studio, condotto su 25 lavoratori esposti a basse dosi di benzene e 18 controlli, è stato valutare livelli sierici di AOPPs e AGE, marcatori precoci di stress ossidativo, e loro correlazione con il genotipo null (responsabile della mancata espressione enzimatica) dei polimorfismi GSTs. I livelli di AOPPs sono risultati più elevati negli esposti rispetto ai controlli mentre i livelli di AGE non hanno evidenziato differenze statisticamente significative nei due gruppi. Nessuna influenza del genotipo null GSTs è stata riscontrata.

ABSTRACT. GENETIC MARKERS OF INDIVIDUAL SUSCEPTIBILITY AND OXIDATIVE STRESS IN SUBJECTS EXPOSED TO LOW DOSE OF BENZENE. PRELIMINARY DATA. *In the present study we used AOPPs and AGE as early markers of oxidative stress in refinery oil workers. In addition we evaluated whether a genetically determined reduction in the ability to detoxify electrophilic compounds, such as that expected among individuals with glutathione S-transferase (GST) null genotypes might influence the levels of AOPPs thus increasing toxicity. The study was performed on 25 oil refinery workers and in 18 age-matched control subjects. We found a statistically significant increase of AOPPs in exposed workers with respect to controls while AGE levels were not different. Finally serum level of AOPPs and AGE were not correlated with the different GSTs genotypes.*

Key words: Advanced oxidation protein product (AOPPs) - advanced glycation end-product (AGE) - genetic polymorphisms, Glutathione S-Transferase (GSTs).

Introduzione

Quella della Glutazione S-Transferasi è una famiglia di enzimi citosolici espressi fenotipicamente a livello di diversi organi ed apparati. Le classi enzimatiche vengono distinte con le lettere greche alfa (α), mu (μ), pi (π), theta (θ) in base al punto isoelettrico e in base alle affinità tessuto specifiche. Per questi enzimi, responsabili delle reazioni di II fase di coniugazione con il glutathione, sono state individuate quattro sequenze geniche: *GSTA* (*GST* α), localizzata sul cromosoma 6; *GSTM* (*GST* μ), sul cromosoma 1; *GSTP* (*GST* π), sul cromosoma 11; *GSTT* (*GST* θ), sul cromosoma 22. Tali sequenze geniche, secondo quanto previsto dai criteri emanati dal National Research Council nel 1987, assumono il significato di indicatori biologici di suscettibilità in quanto, quando ereditati in omozigosi per il genotipo null, responsabile della mancata espressione enzimatica, predispongono l'individuo a diverse manifestazioni di malattia (neoplastiche, infiammatorie, correlate a esposizioni professionali) (1).

Gli enzimi codificati dai polimorfismi *GSTT1* e *GSTM1* assumono particolare importanza nella detossificazione di diversi agenti xenobiotici come ad esempio, il benzene.

Il benzene subisce una prima biotrasformazione a causa dell'azione degli enzimi di prima fase con produzione di intermedi nucleofili altamente reattivi nei confronti della molecola del DNA; gli intermedi nucleofili delle reazioni di biotrasformazione del benzene (prodotti di I fase/ossidativi) subiscono comunque reazioni di coniugazione con il glutathione (tripeptide composto da glicina, acido glutammico e cisteina), per azione degli enzimi GSTs al fine di essere resi idrofili e facilmente eliminati dagli organi emuntori (2).

Dopo assorbimento, il benzene viene biotrasformato a idrochinone e catecolo, in grado di generare semichinoni e specie reattive dell'ossigeno per meccanismi di *redox cycling* (3).

È stata dimostrata un'associazione positiva tra esposizione ambientale-professionale a benzene e danno ossidativo, in particolare al DNA (4-5) attraverso meccanismi che inducono la formazione di addotti del DNA, mutazioni puntiformi, rottura della molecola, fenomeni di cross linkage.

I processi correlati allo stress ossidativo provocano:

- la modificazione delle proteine coinvolte nei meccanismi di detossificazione a livello di specifici residui aminoacidici per opera di processi chimici reattivi i cui prodotti della cosiddetta "ossidazione avanzata" (AOPPs) assumono il significato di *marker di stress ossidativo* (6);
- la glicosilazione in cui i glucidi reagiscono direttamente con gli aminoacidi proteici specie in presenza di un basso pH plasmatico (reazione di Maillard). Gli AGE (prodotti avanzati di glicosilazione) sono il risultato finale di questo processo ed inducono un legame irreversibile a livello della molecola del DNA (per elevata affinità) con conseguenti alterazioni dell'espressione fenotipica. Per cui il loro accumulo risulta essere responsabile di peculiari alterazioni fisiopatologiche che comportano diminuzione della funzionalità renale e nervosa, aumentando quindi il rischio di mortalità per malattie cardiovascolari ma anche per neoplasie, etc (7).

Esiste una sinergia tra il processo di formazione degli intermedi reattivi - quali prodotti di stress ossidativo - e quello di formazione degli AGE con il risultato che la macromolecola nucleare subisce una cosiddetta "aggressione congiunta" sia a causa dei processi ossidativi sia per i processi di glicosilazione (fenomeni di glicossidazione).

Obiettivo del presente studio è stato valutare i livelli sierici di AOPPs e AGE in soggetti professionalmente esposti a basse dosi di benzene per verificare la presenza di eventuali alterazioni dei processi ossidativi per fenomeni di stress e indagare il genotipo dei polimorfismi GSTT1 e GSTM1 al fine di correlare gli indicatori genetici di suscettibilità individuale a markers precoci di stress ossidativo.

Soggetti e metodi

Lo studio è stato condotto su un campione di dipendenti di uno impianto di raffinazione del greggio della Sicilia Orientale.

Sono stati sottoposti a monitoraggio 25 soggetti di sesso maschile - che hanno manifestato la propria volontà a sottoporsi allo studio attraverso specifico modulo di consenso informato - per i quali l'esposizione ambientale è stata valutata attraverso un campionatore individuale con apposito rilevatore personale ((Radiello®), indossato dagli operatori in prossimità delle vie respiratorie. A tutti è stato somministrato apposito questionario finalizzato a ottenere informazioni su dati anamnestici personali e lavorativi, sulle abitudini voluttuarie e alimentari.

Sono stati esclusi dallo studio i fumatori, gli alcolisti, i soggetti affetti da patologie croniche incluse la dislipidemia, l'obesità e il diabete. Nessuno dei soggetti coinvolti nelle analisi aveva assunto farmaci nella settimana precedente al prelievo dei campioni biologici.

Tutti i soggetti sono stati sottoposti al medesimo protocollo comprendente: prelievo di sangue venoso per il dosaggio di AOPPs e AGE (su sieri congelati a -80°C); prelievo di cellule dell'epitelio buccale mediante tamponamento con buccal swap per le indagini genetiche (su tamponi congelati a meno 20°C).

I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli di un gruppo di controllo costituito da 18 soggetti di sesso maschile (età media 41.64 ± 10.35), non professionalmente esposti e residenti nella medesima area geografica.

L'analisi dell'esposizione ambientale al benzene è stata realizzata presso l'Università di Padova con tecnica GC-FID (gascromatografia con rivelatore a ionizzazione di fiamma) dopo desorbimento chimico del benzene dal carbone attivo con solfuro di carbonio.

Dosaggio di AGEs e AOPPs

La determinazione di AGEs e AOPPs è stata effettuata con metodica spettrofluorimetrica. Per l'analisi degli AGE il siero è stato diluito 1:50 con specifico buffer salino (PBS; pH 7.4) e l'intensità della fluorescenza è stata registrata a una emissione estrema (~440 nm) durante stimolazione a 350 nm ed espressa con arbitraria unità di misura (AU).

Per il dosaggio delle AOPPs, è stato diluito un campione pari a 200 µl di siero nella misura di 1:5 con PBS. Sono stati utilizzati 200 µl di cloroammine T (0-100 mol/l) per la successiva calibrazione e altrettanti 200 µl di PBS come strato sulle piastre di microtitolazione. Inoltre sono stati aggiunti 10 µl di 1.16 MKI e 20 µl di acido acetico. Ogni campione è stato sottoposto ad analisi in triplo sia per il dosaggio delle AGE che per il dosaggio delle AOPPs.

Analisi genotipica dei polimorfismi GSTM1, GSTT1

L'estrazione del DNA è stata condotta secondo la metodica "Chelex®100" a partire dai singoli tamponi buccali. È stata utilizzata la procedura di base che prevede l'ebollizione dei campioni biologici in una soluzione di "Chelex®100" al 5% (8). L'amplificazione via "polymerase chain reaction" (PCR) è stata effettuata utilizzando quali "primers d'innescio" le sequenze oligonucleotidiche riportate in letteratura (9).

La reazione di amplificazione, è quindi avvenuta, utilizzando un termociclatore o thermal-cycler ("PCR sprint", Hybaid) ed allestendo una "multiplex" per la coamplificazione dei loci GSTT1, GSTM1 e β-globina (quest'ultimo quale "controllo positivo" della reazione medesima), in un volume finale di 25 µl comprendente 2.5 µl di estratto (5-250 ng DNA), 0.5 µM of each primer, 2.5 µl Taq buffer (10xPCR Buffer II, Applied Biosystem), 2 µl MgCl₂ 25 mM (Applied Biosystem), 0.5 µl dNTPs mix (10 mM PCR Nucleotide Mix, Promega), 1 U Taq polymerase (DyNAzyme II DNA Polymerase, Finnzymes). Sono stati effettuati un totale di 30 cicli di amplificazione: "denaturazione" a 95°C per 1 minuto, "annealing" a 60°C per 1 minuto ed "estensione" a 72°C, sempre per 1 minuto. L'analisi dei prodotti di amplificazione è stata condotta mediante elettroforesi verticale su gel denaturante di poliacrilamide al 6% in Urea 7 M ultrasottile (0.4 mm) in TBE buffer 1X con le seguenti condizioni di corsa: 2000 V, max mA, max W, per 150 minuti (10). Le bande di migrazione relative ai prodotti di amplificazione (480 bp per GSTT1 e 215 bp per GSTM1), sono state visualizzate con la tecnica del "Silver staining"(11) ed identificate in base

alla valutazione del peso molecolare di ciascuna, definito comparativamente rispetto ai pesi molecolari di specifico marcatore standard (DNA pGEM® marker, Promega).

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata effettuata mediante utilizzo di software SPSS (versione 13.0 per Windows). I dati hanno presentato una deviazione standard \pm significativa.

La differenza tra le serie di dati è stata analizzata attraverso il test di Mann-Whitney. La correlazione delle variabili è stata quindi verificata con indice di Spearman.

In tutti i test è stato considerato un valore statisticamente significativo per $p < 0.05$.

Risultati

I dati ambientali hanno evidenziato che per detti lavoratori l'esposizione al benzene ($62.79 \pm 30.24 \mu\text{g}/\text{m}^3$) è contenuta entro i valori limite della ACGIH ($1600 \mu\text{g}/\text{m}^3$) risultando comunque mediamente superiori a quanto riscontrato nei soggetti di controllo, raggiungendo la significatività statistica ($12.00 \pm 2.29 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $p < 0.0001$).

I livelli sierici di AOPPs nei lavoratori esposti sono risultati essere significativamente più alti rispetto al dosaggio effettuato nel gruppo di controllo (2.70 ± 0.97 vs. 0.169 ± 0.92 nmoli/mg prot, $p = 0.002$) (Fig. 1).

I livelli sierici di AGE nei lavoratori esposti non hanno dimostrato differenze statisticamente significative rispetto ai soggetti del gruppo di controllo (528.83 ± 250.40 vs. 546.17 ± 407.22 AU/g prot, $p = 0.768$).

È stata riscontrata una correlazione comunque positiva tra i livelli sierici di AOPPs e quelli di AGE ($p = 0.271$, $r = 0.229$).

Non si sono evidenziate correlazioni significative tra il genotipo null dei polimorfismi indagati (GSTT1 e GSTM1) e i livelli sierici di AOPPs e AGE.

Discussione

I risultati ottenuti sul campione in studio hanno evidenziato valori medi di benzene ambientale pari a $62.79 \mu\text{g}/\text{m}^3$ tra i soggetti esposti, e pari a $12.00 \mu\text{g}/\text{m}^3$ tra i soggetti di controllo. Tali valori, pur essendo al di sotto dei limiti previsti dall'ACGIH, individuano una chiara condizione espositiva nel primo gruppo ($p < 0.0001$).

I soggetti esposti hanno presentato valori di AOPPs superiori rispetto al gruppo di controllo con rilevante significatività statistica ($p = 0.002$) indicando quindi una correlazione tra esposizione a benzene ed aumento dei prodotti derivanti dall'ossidazione proteica per effetto degli intermedi reattivi conseguenti alla biotrasformazione dello xenobiotico.

L'aumento dei livelli sierici di AOPPs confermerebbe quindi il meccanismo ossidativo secondo cui il benzene viene metabolizzato con produzione di reattivi per fenomeni di redox cycling. Tali prodotti, peraltro altamente nucleofili con affinità elettiva per la molecola nucleare, sarebbero responsabili di danno al DNA per fenomeni di rottura della molecola.

I valori sierici di AGE non hanno mostrato differenti livelli nei due gruppi analizzati; questo dato sembrerebbe confermare che l'esposizione al benzene non aumenta l'attivazione di stress ossidativo per meccanismi di glicosilazione.

Tali proteine invece appaiono di frequente e comune riscontro in diverse patologie croniche anche infiammatorie (diabete, broncopneumopatia cronica ostruttiva, insufficienza renale, aterosclerosi) e assumono sempre il significato di marcatori precoci dello

stress ossidativo che, correlate ai processi di ossidazione, risultano responsabili dei meccanismi di glicosilazione (12-13).

In conclusione, pur con i limiti dell'esiguità del campione, è possibile definire la maggiore sensibilità delle AOPPs nei soggetti professionalmente esposti a basse dosi di benzene quali marcatori precoci di stress ossidativo piuttosto che le AGE.

Appare opportuno ampliare la casistica al fine di confermare il significato predittivo delle AOPPs quale marcatore precoce di stress ossidativo per prevenire l'incidenza di patologie croniche infiammatorie e neoplastiche e, altresì, verificare il ruolo degli indicatori genetici di suscettibilità individuale nella eliminazione per coniugazione dei prodotti di ossidazione.

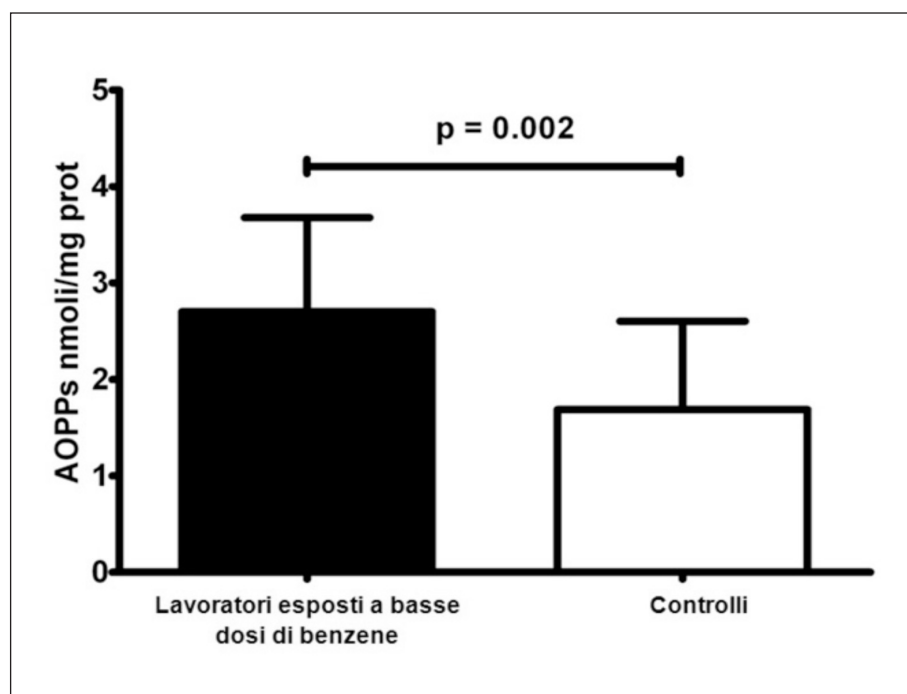


Figura 1. L'istogramma mostra i livelli di AOPPs dosati nei lavoratori esposti e nel gruppo di controllo da cui si evidenzia negli esposti un incremento statisticamente significativo ($p = 0.002$)

Bibliografia

- 1) Strange RC, Fryer AA. The glutathione S-transferase: influence of polymorphism on cancer susceptibility. In: Vineis P, Malats N, Lang M, d'Errico A, Caporaso N, Cuzick J and Boffetta P - Metabolic polymorphisms and susceptibility to cancer (Lyon France), IARC Scientific Publications, 1999. 148: 231-249.
- 2) Pavanello S, Simioli P, Lupi S, Gregorio P, Clonfero E. Exposure levels and cytochrome P450 1A2 activity, but not N-acetyltransferase, Glutathione S-Transferase (GST) M1 and T1, influence urinary mutagen excretion in smokers - Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention 2002; 11: 998-1003.
- 3) Barreto G, Madureira D, Capani F, Aon-Bertolino L, Sraceno E, Alvarez-Giraldez LD. The role of catechols and free radicals in benzene toxicity: an oxidative DNA damage pathway. Environ. Mol. Mutagen. 2009; 50: 771-80.
- 4) Liu L, Zhang Q, Feng J, Deng L, Zeng N, Yang A, Zhang W. The study of DNA oxidative damage in benzene-exposed workers. Mutat. Res. 1996; 370: 145-50.
- 5) Loft S, Poulsen H.E, Vistisen K, Knudsen LE. Increased urinary excretion of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative DNA damage, in urban bus drivers. Mutat. Res. 1999; 441: 11-19.
- 6) Piwowar A. Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property. Pol Merkur Lekarski 2010; 28: 166-169.
- 7) Kalousová M, Zima T, Tesar V, Dusilová-Sulková S, Skrha J. Advanced glycoxidation end products in chronic diseases-clinical chemistry and genetic background. Mutat Res. 2005; 579: 37-46.
- 8) Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques. 1991 Apr; 10(4): 506-13, 1991.
- 9) Pavanello S, Simioli P, Lupi S, Gregorio P, Clonfero E. Exposure levels and Cytochrome P450 1A2 activity, but not N-acetyltransferase, Glutathione S-transferase (GST) M1 and T1, influence urinary mutagen excretion in smokers Cancer Epidemiology, Biomarker & Prevention 2002; 11: 998-1003.
- 10) Robertson JM. Evaluation of native and denaturing polyacrylamide gel electrophoresis for short tandem repeat analysis Adv. Forensic Haemogenet, 1994; 5: 320-322.
- 11) Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels Anal biochem , 1991; 196: 80-83.
- 12) Gillery P. Advanced glycation end products (AGEs), free radicals and diabetes. J Soc Biol. 2001; 195(4): 387-90.
- 13) Wu L, Ma L, Nicholson LF, Black PN. Advanced glycation end products and its receptor (RAGE) are increased in patients with COPD. Respir Med. 2011; 105(3): 329-36.

Richiesta estratti: *Giovanna Spatari via Maddalena, 36 - 98123 Messina, Italy, Tel. +39090221.2060/2052, E-mail: gspatari@unime.it*