

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA
DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE DELLA PREVENZIONE
XX CICLO (2005-2007)**

**STRESS OSSIDATIVO NELLA PATOLOGIA
NEURODEGENERATIVA E TUMORALE DA
INQUINANTI AMBIENTALI: RUOLO DEI
POLIMORFISMI METABOLICI E DELL'ESPRESSIONE
DI ENZIMI ANTIOSSIDANTI.**

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Tutor:

Chiar.mo Prof. Antonio Mutti

Dottoranda

Paola Mozzoni

*A Stefano, Chiara e
Lorenzo*

RIASSUNTO

La dose efficace e gli effetti biologici precoci connessi con l'esposizione occupazionale o ambientale possono essere modulati dai polimorfismi genetici degli enzimi della biotrasformazione e della riparazione degli acidi nucleici. Questi tratti genetici, così come i livelli di espressione di specifici trascritti possono essere sempre più facilmente caratterizzati attraverso l'utilizzo delle nuove biotecnologie. L'implementazione dei tradizionali biomarcatori di esposizione e/o di effetto con nuovi marcatori molecolari può portare ad una migliore conoscenza dei processi coinvolti nell'esposizione a xenobiotici, nonché ad una migliore valutazione del rischio.

In questo lavoro sono presentati diversi studi sviluppati allo scopo di valutare il ruolo svolto dagli enzimi della biotrasformazione e della riparazione del DNA nella modulazione del rischio e degli effetti indotti in risposta ad esposizioni ad agenti chimici sia in ambito occupazionale che ambientale, o nello sviluppo di malattie degenerative, quali il Morbo di Parkinson ed il cancro al polmone.

Parole chiave: polimorfismi, espressione genica, monitoraggio biologico, suscettibilità, Morbo di Parkinson, tumore al polmone.

ABSTRACT

Internal dose and early biological effects following exposure to occupational and environmental pollutants can be modulated by the genetic polymorphisms of biotransformation and DNA repair enzymes. These genetic traits, as well as the expression levels of the respective transcripts can be more and more easily characterized using modern biotechnologies. The implementation of traditional biomarkers of exposure/effect with molecular markers can allow a deeper understanding of processes following xenobiotic exposure as well as a better evaluation of risk.

This work presents several studies designed to evaluate the role of biotransformation and DNA repair enzymes in the modulation of risk following the exposure to occupational/environmental xenobiotics, or in the development of degenerative diseases, such as Parkinson's disease and lung cancer.

Key words: polymorphisms, genetic expression, biological monitoring, susceptibility, Parkinson's disease, lung cancer.

INDICE

1. INTRODUZIONE	1
1.1. VARIABILITA' BIOLOGICA	3
1.2. POLIMORFISMI GENETICI	4
1.2.1. Polimorfismi metabolici	5
1.2.1.1. Marcatori di esposizione	9
1.2.1.2. Marcatori di dose interna	9
1.2.1.3. Marcatori di dose biologicamente efficace	9
1.2.1.4. Marcatori di risposta o di effetto	9
1.2.1.5. Marcatori precoci di malattia	9
1.2.2. Polimorfismi degli enzimi della riparazione	10
1.3. ESPRESSIONE GENICA	12
2. SCOPO DELLA TESI	14
3. RUOLO DEI POLIMORFISMI GENETICI NELL'ESPOSIZIONE	
A XENOBIOTICI	17
3.1. INTRODUZIONE	18
3.2. Benzene	18
3.3. Piombo	20
3.4. IPA, metalli e particolato. L'esempio della fonderia	21
3.5. Stirene	22
3.6. VALUTAZIONE DELL'INTERAZIONE DEI POLIMORFISMI DELLA BIOTRASFORMAZIONE NELL'ESPOSIZIONE A BASSE DOSI DI BENZENE (Allegato 1)	26
3.6.1. Scopo dello studio	26
3.6.2. Materiali e Metodi	26
3.6.2.1. Soggetti	26
3.6.2.2. Monitoraggio ambientale	26
3.6.2.3. Monitoraggio biologico	27
3.6.2.4. Analisi dei genotipi	27
3.6.2.5. Analisi statistica	27
3.6.3. Risultati	27

3.6.3.1. Ruolo interferente del polimorfismo della GSTM1	28
3.6.4. Discussione	28
3.6.5. Conclusioni	29
3.7. VALUTAZIONE DELL'INTERFERENZA DEL POLIMORFISMO METABOLICO DELL' <i>ACIDO</i> <i>δ-AMINOLEVULANICO DEIDRATASI</i> (ALAD) NELLA TOSSICODINAMICA DEL PIOMBO (Allegato 2)	30
3.7.1. Scopo dello studio	30
3.7.2. Materiali e Metodi	30
3.7.2.1. Analisi statistica	30
3.7.3. Risultati	31
3.7.4. Discussione	31
3.7.5. Conclusioni	32
3.8. VALUTAZIONE DEL RUOLO DEI POLIMORFISMI GENETICI DI ALCUNI ENZIMI DELLA BIOTRASFORMAZIONE, PERTINENTI PER L'ESPOSIZIONE A IPA, NELLA MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DELL' <i>EME-OSSIGENASI 1</i> (HO-1) (Allegato 3).	33
3.8.1. Scopo dello studio	33
3.8.2. Materiali e Metodi	33
3.8.2.1. Soggetti	33
3.8.2.2. Estrazione RNA e DNA	33
3.8.2.3. Retrotrascrizione e quantificazione dell'espressione del gene <i>HO-1</i>	33
3.8.2.4. Polimorfismi genetici	34
3.8.2.5. Determinazione urinaria dell'1-OHP	34
3.8.3. Risultati	34
3.8.4. Discussione e Conclusioni	35
3.9. VALUTAZIONE DELL'INTERFERENZA DEL POLIMORFISMO DELL'ENZIMA DELLA RIPARAZIONE hOGG1 SULLA GENERAZIONE DI DANNO OSSIDATIVO AL DNA IN UN GRUPPO DI LAVORATORI ESPOSTI A STIRENE.	36

3.9.1. Scopo dello studio	36
3.9.2. Materiali e Metodi	36
3.9.2.1. Lavoratori esposti	36
3.9.2.2. Impianto A	36
3.9.2.3. Impianto B	36
3.9.2.4. Controlli	36
3.9.2.5. Ex-esposti	37
3.9.2.6. Monitoraggio ambientale e biologico	37
3.9.2.7. Determinazione dello stirene nel sangue	37
3.9.2.8. Determinazione dello stirene nel sangue e dei metaboliti urinari dello stirene mediante cromatografia liquida spettrometria di massa	37
3.9.2.9. Determinazione degli indicatori di stress ossidativo urinari mediante cromatografia liquida spettrometria di massa	37
3.9.2.10. Determinazione di 8-idrossi-2'- deossiguanosina e 2'-deossiguanosina nei globuli bianchi.	38
3.9.2.11. Caratterizzazione genotipica	38
3.9.2.12. Analisi statistica	39
3.9.3. Risultati	39
3.9.3.1 Indicatori di danno ossidativo al DNA e associazione con l'esposizione a stirene	40
3.9.4. Discussione	41
3.9.4.1. Monitoraggio biologico dell'esposizione a stirene	41
3.9.4.2. Danno ossidativo agli acidi nucleici e associazione con l'esposizione a stirene.	41
3.9.4.3. Ruolo dell'enzima hOGG1 nella riparazione del danno ossidativo al DNA	42
3.9.5. Conclusioni	43
4. RUOLO DEI POLIMORFISMI GENETICI NELLA PATOLOGIA MULTIFATTORIALE: L'ESEMPIO DEL MORBO DI PARKINSON	45

4.1. Introduzione	46
4.2. Il Morbo di Parkinson	46
4.3. FATTORI DI RISCHIO NEL MORBO DI PARKINSON	48
4.3.1. Fattori ambientali professionali	48
4.3.2. Fattori genetici	49
4.4. INTERAZIONE GENE-AMBIENTE NEL MORBO DI PARKINSON. RISULTATI DELLO STUDIO GEOPARKINSON (Allegato 4)	53
4.4.1. Scopo dello studio	53
4.4.2. Materiali e Metodi	53
4.4.3. Risultati	55
4.4.4. Discussione e Conclusioni	60
5. ESPRESSIONE GENICA NEL TUMORE POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE (NSCLC)	61
5.1. Introduzione	62
5.2. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI GENI CRITICI NEL TUMORE POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE (NSCLC)	65
5.2.1. Scopo dello studio	65
5.2.2. Materiali e Metodi	65
5.2.2.1. Soggetti	65
5.2.2.2. Elaborazione e somministrazione di un questionario strutturato	65
5.2.2.3. Espressione dei trascritti	65
5.2.2.4. Stima della dose al bersaglio di cancerogeni polmonari	66
5.2.3. Risultati	66
5.2.4. Discussione e Conclusioni	66
5.3. Progetti futuri	69
6. CONCLUSIONI FINALI	71
7. BIBLIOGRAFIA	74
8. TABELLE E FIGURE	93
9. ALLEGATI	111
Allegato 1	112

Allegato 2	113
Allegato 3	114
Allegato 4	115

1. INTRODUZIONE

Uno dei principali interessi relativi al problema della salute pubblica riguarda il grado al quale esposizioni a sostanze chimiche esogene, di origine ambientale, lavorativa o voluttuaria, provocano effetti dannosi sulla salute (1).

La misura dei parametri fisico-chimici è il primo passo per il monitoraggio della qualità degli ambienti di vita e di lavoro. Tuttavia le soglie di attenzione o di allarme di tali parametri riguardano spesso solo gli effetti tossici acuti derivanti dall'inquinante in esame e non tengono in considerazione il problema dell'esposizione cronica, dovuta in genere alla presenza continua di tale agente, anche se a basse dosi. Inoltre possono essere presenti contemporaneamente in uno stesso ambiente più inquinanti sotto forma di miscele complesse nelle quali possono instaurarsi fenomeni di sinergismo/antagonismo dei diversi componenti.

La misura del rischio individuale per l'esposizione a tossici ambientali può essere fatta in differenti sistemi biologici con marcatori che siano indici di anormalità indotte da agenti tossico-nocivi di diversa natura.

Il rischio di effetti dannosi attribuibili ad un particolare agente sotto specifiche condizioni dipende da: a) le sue intrinseche proprietà o tossicità; b) il suo uso e i corrispondenti livelli di esposizione e dose; c) il numero e la suscettibilità dei soggetti esposti. L'importanza relativa di ciascun determinante dipende dal contesto. Nei settori occupazionali, il numero di individui esposti è limitato e perciò il livello di esposizione è il determinante principale. Nella tossicologia ambientale, livelli di esposizione relativamente bassi possono dare origine ad un rischio apprezzabile di effetti dannosi perché un ampio numero di individui suscettibili può assumere dosi biologicamente efficaci (2).

I biomarcatori rendono possibile il monitoraggio dei processi all'interno dell'organismo che iniziano nel momento della penetrazione dell'agente tossico fino ad arrivare allo sviluppo dei sintomi clinici. Essi quindi offrono la possibilità di un rilevamento precoce dei fenomeni che in sequenza portano a cambiamenti patologici.

Da un punto di vista fisiopatologico, la relazione dose-risposta trae origine da una serie di eventi biologici complessi frapposti tra esposizione e manifestazioni cliniche. In tale catena di eventi possono inserirsi variabili esterne ed interazioni tra fattori, che rendono ragione della variabilità intra-ed inter-individuale degli indicatori biologici.

I fattori interferenti possono essere schematicamente distinti in genetici ed acquisiti e per alcuni di essi sono state proposte misure, ad esempio dell'attività metabolica o del genotipo di alcuni enzimi polimorfici, come indicatori di suscettibilità.

1.1.VARIABILITA' BIOLOGICA

L'osservazione biologica che individui diversi esposti agli stessi fattori di rischio possono o meno manifestare effetti indesiderati e che tali effetti presentano differente gravità è in apparente conflitto con il postulato fondamentale per la tossicologia individuato da Paracelso, secondo il quale “tutte le sostanze sono tossiche...è la dose che determina se una sostanza è tossica oppure no”. Va peraltro osservato che nella relazione dose-risposta è implicita l'esistenza di fattori di variabilità inter-individuale che concorrono nel determinare una diversa suscettibilità dei soggetti esposti agli stessi agenti chimici presenti negli ambienti di vita e di lavoro.

Benché concettualmente il termine di suscettibilità implichi la resistenza dei soggetti che non presentano quella particolare caratteristica, va osservato che l'inducibilità di molti enzimi, la complessità delle possibili combinazioni tra le diverse vie metaboliche che concorrono alla biotrasformazione delle sostanze esogene, l'influenza di fattori acquisiti come eventuali patologie d'organo concomitanti, nonché la variabilità dell'esposizione a fattori di rischio pertinenti, ossia dotati di una intrinseca capacità lesiva (come l'esposizione professionale a sostanze chimiche), componente essenziale perché la “suscettibilità” possa manifestarsi, sono tutti elementi di “caratteri complessi”, la cui distribuzione tende ad assumere il carattere gaussiano proprio della relazione dose-risposta.

I geni implicati possono agire come alleli multipli indipendenti (eterogeneità genetica) o in maniera reciprocamente additiva (eredità poligenica) o come fattori epistatici. In ogni caso, essi non sono né necessari né sufficienti per lo sviluppo degli effetti, ma solo fattori predisponenti. La comparsa dell'effetto si manifesta solo quando l'interazione genotipo-ambiente supera un certo valore soglia. Caratteri genetici implicati possono influenzare ciascuna delle tappe fraposte tra l'esposizione ad agenti chimici e comparsa degli effetti e possono dunque coinvolgere i sistemi biochimici che regolano la biotrasformazione delle sostanze chimiche, la riparazione degli acidi nucleici ed il controllo della proliferazione cellulare e della risposta immunitaria.

1.2. POLIMORFISMI GENETICI

La suscettibilità individuale, come complesso di fattori genetici ed acquisiti in grado di modificare il rischio, è un concetto implicito nella nozione stessa di patologia multifattoriale, nonché multistadio, come quella tumorale e neurodegenerativa, in cui le interazioni fra fattori possono svolgere un ruolo patogenetico, in particolare alle basse dosi di esposizione. Un ruolo preminente nella modulazione sia della dose “efficace” connessa con l’esposizione, che degli effetti biologici precoci sarebbe svolto dagli enzimi della biotrasformazione e dagli enzimi della riparazione del DNA, che presentano numerosi polimorfismi genetici con corrispettivo funzionale.

I polimorfismi genetici possono essere definiti come varianti alleliche con frequenza pari ad almeno l’1% della popolazione per il fenotipo più raro.

A differenza delle malattie ereditarie monogeniche, caratterizzate da mutazioni relative a geni responsabili di malattie specifiche, i polimorfismi genetici riguardano geni le cui varianti polimorfiche non sono strettamente associate a condizioni patologiche, ma possono modificare il rischio attraverso interazioni complesse e talora imprevedibili con altri fattori genetici o ambientali. Da un punto di vista molecolare, i polimorfismi genetici possono interessare porzioni esoniche, introniche o regolatorie del gene. Nella maggior parte dei casi riguardano singoli nucleotidi, dando luogo ai cosiddetti *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphisms*), che ricorrono nel genoma umano con una frequenza pari a $1/10^3$ basi. Sono possibili anche riarrangiamenti genici più complessi, come delezioni geniche estese (*GSTM1*, *GSTT1*, *CYP2D6*) o limitate (*GSTM3*: 3 paia di basi), duplicazioni o amplificazioni (*GSTM1* e *CYP2D6*), ripetizioni di dinucleotidi (*EGFR*, *HO-1*) e conversioni geniche (*CYP2A6*).

La localizzazione del polimorfismo ed il numero di nucleotidi coinvolti sono i principali determinanti delle conseguenze sulla cascata di eventi che dalla trascrizione genica conduce ad un prodotto proteico e funzionale. I polimorfismi a carico di sequenze non codificanti (introniche e/o regolatorie) sono generalmente privi di conseguenze, a meno che non riguardino siti critici come le giunzioni introne-esone (allele*4 per il *CYP2D6*) o siti di legame di fattori trascrizionali (*GSTM3*) o siti critici di sequenze regolatorie (*CYP2E1*, *EGFR*). Mentre nel primo caso la conseguenza funzionale del polimorfismo è l’assenza di prodotto proteico per alterazione dei processi di maturazione del trascritto primario, nelle altre due situazioni il polimorfismo interferisce con i meccanismi che

regolano l'espressione genica sia nel senso di un aumento che di una riduzione della sintesi proteica.

Gli SNP esonici, analogamente alle mutazioni puntiformi, possono determinare conseguenze diverse a seconda del tipo di variazione nucleotidica introdotta (inserzioni, delezioni, sostituzioni di basi):

1. l'inserzione o delezione di una singola base azotata causa una sfasatura del modulo di lettura del trascritto ("*frameshift*") in fase trasduzionale, con conseguente sintesi di prodotto diverso da quello originario ed inattivo dal punto di vista funzionale;
2. la sostituzione di una base (transizione o transversione) ha tre possibili conseguenze:
 - a) il polimorfismo non modifica la sequenza aminoacidica della proteina corrispondente a causa della ridondanza del codice genetico (polimorfismo silente);
 - b) il polimorfismo determina una sostituzione aminoacidica ("*missense*"), che, a seconda della localizzazione nella sequenza e delle differenze strutturali e funzionali della proteina (polarità, dimensioni) può determinare variazioni di stabilità o di affinità nei confronti del substrato;
 - c) il polimorfismo introduce un segnale di stop ("*nonsense*"), sicchè la sintesi della proteina è prematuramente interrotta, con conseguente abolizione dell'attività proteica.

Va inoltre considerata l'eventualità di polimorfismi multipli nello stesso gene. Il fenotipo risultante può dipendere o dall'effetto dominante di uno di essi sugli altri, che quindi risulteranno ininfluenti (*CYP2D6*, *NAT-2*) o da una sommatoria di effetti dei singoli polimorfismi (*mEPHX*, *GSTP1*). Va infine considerato il fenomeno della co-segregazione di varianti alleliche di geni adiacenti ("*linkage disequilibrium*"). In epidemiologia molecolare tale fenomeno è da sospettare quando l'associazione evidenziata non ha plausibilità biologica.(3)

1.2.1. Polimorfismi metabolici

I polimorfismi metabolici sono potenzialmente i responsabili delle più vistose differenze inter-individuali nella capacità di bioattivare o detossificare le sostanze esogene. La biotrasformazione di questi composti, orientata alla loro conversione in prodotti a polarità progressivamente crescente al fine di favorirne l'idrosolubilità e la successiva escrezione per via urinaria e biliare, viene schematicamente ricondotta a due fasi. Gli enzimi di fase I sono per lo più monoossigenasi a funzione mista citocromo

P450-dipendenti, che introducendo nella molecola gruppi polari, ne aumentano l'idrofilia. Gli enzimi di fase II catalizzano invece reazioni sintetiche di coniugazione di intermedi prodotti dagli enzimi di fase I, con molecole polari endogene (solfati, metili, acido glucuronico, glutazione etc.) in modo tale che il prodotto finale coniugato risulta assai più polare ed eliminabile con le urine o con la bile.

Le reazioni di fase I possono generare intermedi elettrofili instabili dotati di elevata reattività verso le macromolecole cellulari (DNA, lipidi, proteine). Oltre a generare questi intermedi elettrofili, tali reazioni alimentano la produzione di specie reattive dell'ossigeno ($O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$) che a loro volta, possono interagire con gli stessi bersagli macromolecolari.

In termini generali, i polimorfismi degli enzimi di fase I possono modulare la capacità di bioattivazione (produzione di intermedi elettrofili altamente reattivi) degli xenobiotici, mentre ai polimorfismi degli enzimi di fase II corrispondono differenze nella capacità di detossificare i composti chimici, o gli intermedi reattivi da essi derivati, tramite reazioni di coniugazione con molecole polari endogene, a basso peso molecolare. Tale schematismo trova una limitazione nella complessità delle interazioni enzima-substrato. Il fenotipo metabolico può presentare, nei confronti dello stesso substrato o di substrati differenti, un dualismo d'effetti in rapporto all'end-point considerato. Paradigmatici in tal senso risultano gli esempi di alcuni enzimi polimorfici come la glutazione S-transferasi teta1 (GSTT1), la glutazione S-transferasi pi1 (GSTP1), l'eossido idrolasi microsomiale (mEPHX), la NAD(P)H chinone ossido-reduttasi (NQO1) e l'N-acetil transferasi tipo 1 (NAT-1) e 2 (NAT-2).

La coniugazione con glutazione catalizzata dalla GSTT1 ha un effetto di inattivazione metabolica nei confronti di butadiene ed etilene ossido (5) ma è invece un meccanismo di bioattivazione per aloalcani ed aloalcheni (6). La bioattivazione di tali composti è conseguente alla degradazione del GSH-coniugato ad opera della g-glutamyl-transpeptidasi e cisteinil-glicinasi ed al successivo intervento di una β -liasi che catalizza la metabolizzazione a radicali tioacil fluoruri e tiocheteni. Questa via di attivazione metabolica è condizionata dalla presenza di g-glutamyl-transpeptidasi (fegato, rene, intestino tenue), mentre non sembra pertinente per altri tessuti, in cui prevale il ruolo protettivo e detossificante.

L'enzima GSTP1-1 presenta due varianti polimorfiche, alleli B e C, rispetto alla variante normale A, rispettivamente agli esoni 5 (Iso₁₀₅Val) e 6 (Ala₁₁₄Val), che determinano la possibilità di sei differenti genotipi. I risultati di alcuni studi *in vitro* hanno al momento dimostrato da un lato una minore stabilità delle proteine varianti rispetto a quella normale, con conseguente riduzione dell'attività enzimatica (7), dall'altro una maggiore efficienza catalitica delle varianti polimorfiche rispetto alla normale nei confronti dei diolo epossidi di alcuni Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA), in particolare gli enantiomeri in configurazione R-assoluta. Ciò sarebbe riconducibile ad un'aumentata idrofobicità del sito catalitico per la proteina codificata dall'allele B e ad una maggiore idrofobicità del sito di legame del substrato per la proteina codificata dall'allele C (8, 9,10).

L'mEPHX è un enzima di fase I, che catalizza l'idratazione degli epossidi, intermedi reattivi derivanti dal metabolismo monoossigenasico citocromo P450-dipendente di numerosi solventi organici, a dioli, composti dotati di maggiore stabilità, la reazione ha quindi un effetto di detossificazione. Nel caso degli idrocarburi policiclici aromatici, tuttavia, i dioli sono sequenzialmente ossidati a diolo-epossidi, composti altamente reattivi, dotati di effetti mutageni e cancerogeni (4), tale reazione assume un significato di bioattivazione tossicologica.

La NAD(P)H chinone ossido-reduttasi (NQO1) catalizza la riduzione obbligata a due elettroni di un gran numero di substrati, tra cui i chinoni, utilizzando sia NADH, che NADPH come cofattori. In termini generali tale reazione assume il significato di una detossificazione, in quanto favorisce la rimozione dai sistemi biologici di composti elettrofili come i chinoni (per riduzione a idrochinoni) e ne previene la riduzione parziale (un solo elettrone), ad intermedio radicalico semichinone (SQ•), che, in condizioni aerobiche, induce la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). Le conseguenze funzionali della reazione catalizzata dalla DTD dipendono dalle caratteristiche chimiche del substrato, che condizionano il potenziale redox, nonché dal pH e dall'equilibrio redox intracellulare, in quanto il derivato idrochinonico può a sua volta auto-ossidarsi, innescando un redox-cycling che produce SQ• e ROS. In generale la presenza di sostituenti elettronegativi quali, gruppi alogeni, nitro e carbonilici aumenta il potere ossidante del chinone ed il derivato idrochinonico è meno facilmente ossidabile; all'opposto la presenza dei sostituenti amminici, metossilici, idrossilici

riduce il potere ossidante dei chinoni ed il derivato idrochinone va più facilmente incontro ad auto-ossidazione. Un'ulteriore possibile conseguenza è l'alchilazione bioreduitiva, ossia la tendenza al riarrangiamento intra-molecolare del derivato idrochinonico, con formazione di specie reattive alchilanti, che costituisce il principio di trattamenti antineoplastici a base di diaziquone e mitomicina C. Anche la GSH coniugazione (sia del chinone che dell'idrochinone), con formazione di composti tioeteri, può assumere significato di detossificazione o bioattivazione, a seconda delle proprietà chimiche del composto di partenza. I derivati GSH-coniugati dell'1-4 benzochinone, del 2-bromo-3,5(6)idrochinone e del menadione risultano nefrotossici nel ratto (11).

NAT1 e NAT2 catalizzano reazioni di N- ed O- acetilazione delle amine aromatiche bicicliche ed eterocicliche. La reazione di N-acetilazione, catalizzata da entrambe le NAT, ha un significato di detossificazione (il derivato amidico è meno suscettibile a reazioni che danno luogo a metaboliti reattivi nei confronti del DNA) ed è più efficiente per le amine bicicliche che non per le eterocicliche. La O-acetilazione delle arilidrossilamine o degli acidi arilidrossaminici, conduce alla formazione di N-acetossiarilamine, composti estremamente reattivi, ritenuti i cancerogeni finali, in quanto formano addotti al DNA del tipo C8-deossiguanosina ed ha dunque un significato di attivazione metabolica. Le amine bicicliche sono O-acetilate in egual misura da NAT-1 e NAT-2, mentre le amine eterocicliche sono substrati preferenziali della NAT-2 (12).

In accordo con questi aspetti biochimici, il fenotipo "acetilatore lento" dovuto al polimorfismo del gene NAT-2 è risultato fattore di rischio per il cancro della vescica in soggetti esposti ad amine aromatiche come la 2-naftilamina ed il 4-aminobifenile, che sono detossificate da NAT-2, ma non in lavoratori esposti a benidina, che si ritiene possa essere bioattivata dallo stesso enzima (13, 14, 15). Al contrario il carcinoma del colon è stato ripetutamente associato al fenotipo "acetilatore rapido" per NAT-2 e NAT-1 (NAT1*10) in soggetti esposti ad amine eterocicliche (16, 17).

Da questi pochi esempi è possibile capire come la valutazione dei polimorfismi metabolici come potenziali indicatori di suscettibilità non possa prescindere dalla caratterizzazione dell'esposizione e questo può essere fatto attraverso l'utilizzo di marcatori che siano indici di effetti precoci e reversibili indotti da agenti chimici. Tali

biomarcatori possono essere schematicamente suddivisi in marcatori di esposizione, di dose interna, di dose biologicamente efficace, di effetto e precoci di malattia.

1.2.1.1. Marcatori di esposizione

Un indicatore di esposizione secondo la definizione classica del *National Research Council* (NRC 1987) statunitense è “una sostanza esogena o un suo metabolita o il prodotto dell’interazione tra uno xenobiotico ed una molecola o cellula bersaglio, misurati in un compartimento dell’organismo”.

In pratica sono costituiti dalla misura di elementi o composti chimici esogeni assorbiti, o di loro metaboliti, o di complessi con molecole endogene, presenti nei diversi fluidi o matrici biologiche.

1.2.1.3. Marcatori di dose interna

I marcatori di dose interna permettono di misurare direttamente, o indirettamente attraverso la misura dei metaboliti, la quantità/concentrazione di xenobiotico presente o accumulata in un determinato compartimento o organo.

1.2.1.4. Marcatori di dose biologicamente efficace

Permettono una misura dell’esposizione più vicina al bersaglio, in quanto sono in grado di fornire indicazioni altamente sensibili e specifiche della piccola o minima frazione di xenobiotico che ha legato un determinato bersaglio.

1.2.1.2. Marcatori di risposta o effetto

Un indicatore di risposta o effetto, secondo il NRC è “ un’alterazione biochimica, fisiologica o di altro tipo misurabile in un organismo che, a seguito dell’esposizione ad un determinato fattore di rischio e a seconda dell’entità, indica un danno effettivo o potenziale alla salute o una vera e propria malattia”. Essi rappresentano la categoria più vicina alla clinica nella sequenza che va dall’esposizione alla malattia.

1.2.1.5. Marcatori precoci di malattia

Indicano quelle alterazioni dei parametri biochimici, funzionali o biomolecolari di base di un individuo che, pur non essendo il risultato di un quadro di malattia clinicamente conclamata, dimostrano tuttavia che questo processo è in corso. (18)

1.2.2. Polimorfismi degli enzimi della riparazione

Il danno al DNA si verifica ad un tasso che varia da 1000 ad un milione di lesioni molecolari per cellula al giorno.

Può essere classificato in due tipi principali:

1. danno endogeno causato dall'attacco di radicali reattivi dell'ossigeno derivanti da sottoprodotti del normale metabolismo cellulare (mutazioni spontanee);
2. danno esogeno causato da agenti esterni quali: radiazioni ionizzanti, tossine vegetali, mutageni chimici, chemioterapia o radioterapia.

Il danno coinvolge la struttura primaria del DNA alterando la configurazione spaziale dell'elica e può essere schematicamente suddiviso in quattro classi:

1. *ossidazione* di basi, come ad esempio l'8-oxo-7,8-diidroguanina (8-oxoG) e generazione di interruzioni nei filamenti di DNA ad opera di specie reattive dell'ossigeno;
2. *alchilazione* di basi (generalmente metilazione);
3. *idrolisi* di basi, come la depurinazione e la depirimidazione;
4. *mismatch* (appaiaimento errato) di basi.

Tali alterazioni possono essere rilevate e riparate dalla cellula attraverso il coinvolgimento di un complesso insieme di molecole specifiche che costituiscono gli enzimi della riparazione.

La riparazione del DNA è un processo che opera costantemente all'interno delle cellule, proteggendo il genoma da danni e mutazioni nocive. Può essere schematicamente suddiviso in:

1. **Reversione diretta** attraverso vari meccanismi che non necessitano di un filamento stampo, ad esempio la Metil Guanina Metil Transferasi (MGMT) che rimuove specificamente gruppi metilici dalla guanina, e la fotolisi nei batteri che rompe il legame chimico creato dai raggi ultravioletti tra basi adiacenti di timina.
2. **Base Excision Repair (BER)**: riparazione per escissione di base che ripara il danno che coinvolge un singolo nucleotide (*short patch repair*) o una breve sequenza da 2 a 10 nucleotidi (*long patch repair*), causato da ossidazione, alchilazione idrolisi o deaminazione.

3. **Nucleotide Excision Repair (NER):** riparazione per escissione di nucleotidi che ripara un danno che induce una voluminosa distorsione dell'elica. Una forma specializzata di NER nota come riparazione associata alla trascrizione (*Transcription-Coupled Repair*, TCR) utilizza enzimi del NER ad alta priorità per geni attivamente trascritti.
4. **Mismatch Repair (MMR):** corregge errori di replicazione e di ricombinazione genetica che determinano la formazione di nucleotidi male appaiati in seguito alla replicazione del DNA.
5. **Double Strand Break Repair (DSBR):** corregge la rottura di entrambi i filamenti della doppia elica del DNA. Il meccanismo di riparo per ricombinazione è usato in maniera predominante durante le fasi del ciclo cellulare in cui il DNA si sta replicando o ha completato la duplicazione. Ciò permette ad un cromosoma danneggiato di essere riparato con l'impiego, come stampo, di un cromatide fratello neosintetizzato, come una copia identica che è per di più ordinatamente appaiata alla regione danneggiata. Molti geni del genoma umano sono presenti in copie multiple fornendo diverse possibili fonti di sequenze identiche. Ma il riparo per ricombinazione che si basa su queste copie come stampi reciproci è problematico dal momento che porta a traslocazioni cromosomiche e ad altri tipi di riarrangiamento cromosomico.

Ognuno di questi meccanismi è costituito da numerosi enzimi per i quali sono noti diversi polimorfismi genetici codificanti varianti con un corrispettivo funzionale, per la maggior parte dei quali sono state spesso messe in luce associazioni con varie patologie, in particolare modo con diversi tipi di tumori.

Recenti lavori hanno evidenziato associazioni tra i polimorfismi degli enzimi del *Base Excision Repair* (BER) ed il rischio di sviluppare il tumore al polmone in seguito ad una minore capacità di riparazione delle proteine codificate dall'allele mutato rispetto al "wild type", come nel caso del polimorfismo Ser326Cys del gene *OGG1* o del polimorfismo nel promotore -77 T/C del gene *XRCC1* (19, 20).

Nel *Nucleotide Excision Repair* (NER) sono diversi gli enzimi polimorfici: XPA e XPB (ERCC3), XPC e XPD (ERCC2), XPE e XPF (ERCC4), XPG (ERCC5) e diversi lavori presenti in letteratura hanno messo in evidenza una minore capacità di riparazione delle

proteine codificate dalle varianti mutate rispetto alle proteine codificate dall'allele "wild-type" con conseguente maggiore rischio di sviluppare una patologia tumorale. Per esempio, Duell et al. (21) trovano un aumentato rischio di tumore polmonare tra i soggetti *ERCC2/XPD*, portatori di entrambi gli alleli mutati Gln751Gln, così come Palli et al. (22) dimostrano maggiori livelli di addotti in lavoratori esposti a traffico veicolare con almeno un allele mutato Gln751Gln.

Funzionali associazioni sono state trovate per il polimorfismo del promotore -4 G/A del gene *XPA* il cui prodotto presenta una ridotta capacità di riparazione ed il polimorfismo intronico, AT delezione/inserzione, dell'enzima XPC che mostra anche un aumentato rischio di sviluppare tumori nella popolazione Caucasica (23,24).

Nel *pathway* del *Mismatch Repair* (MMR) mutazioni a carico di alcuni di questi geni sono state messe in relazione con il tumore del colon (25), mentre mutazioni a carico dei geni del *Double Strand Break Repair* (DSBR) sono state spesso associate al tumore alla mammella (26).

1.3. ESPRESSIONE GENICA

La caratterizzazione dell'espressione genica meglio di altri strumenti può riflettere l'ampia variabilità interindividuale della risposta alla esposizione a xenobiotici. La dimostrazione di una associazione tra esposizione ed uno specifico profilo di espressione genica può idealmente aprire la strada per lo sviluppo di marcatori correlati al rischio individuale dei soggetti esposti (27).

A tale scopo vari approcci possono essere utilizzati. Per esempio l'approccio tossicogenomico, si propone di caratterizzare la risposta di un alto numero di geni, non necessariamente noti per essere coinvolti nel meccanismo causale degli effetti tossici, alla esposizione a specifici agenti. Studi condotti con questo approccio hanno rivelato l'enorme complessità delle interazioni gene-ambiente. Per esempio lo studio della risposta cellulare al benzopirene su circa 7000 geni in cellule epiteliali ha mostrato variazioni dell'espressione (> 100% di incremento o diminuzione) in più di 500 specie di RNA.

Variazioni correlate alla dose e al tempo sono state osservate in enzimi metabolici citocromo P450 dipendenti ed in altri geni coinvolti nel metabolismo di sostanze chimiche cancerogene, in enzimi preposti alla riparazione del DNA ed in proteine regolatrici del ciclo cellulare. Per esempio nei soggetti esposti a 2,3,7,8-

Tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD) in seguito all'incidente di Seveso, sono stati recentemente condotti studi di epidemiologia molecolare per valutare l'attivazione dei geni del sistema dell'*Aryl-hydrocarbon Receptor* (AhR) (28, 29). AhR è un recettore nucleare che, in presenza di TCDD, forma un eterodimero attivo con il cofattore ARNT ed induce la trascrizione di enzimi quali il citocromo P4501A1 (*CYP1A1*) e P4501B1 (*CYP1B1*) coinvolti nel metabolismo di xenobiotici. L'espressione prolungata di questi enzimi può provocare un aumento di lesioni del DNA a causa della generazione di metaboliti genotossici e di radicali reattivi dell'ossigeno ed è potenzialmente associata al rischio di neoplasia causato da TCDD.

Approssimativamente 20 anni dopo l'incidente di Seveso, i livelli trascrizionali di *AhR* erano diminuiti nei soggetti esposti ed erano correlati ai livelli di TCDD plasmatica. I risultati sono indicativi di un fenomeno di “*down-regulation*” di AhR in seguito a legame recettoriale della TCDD, analogamente a quel che si verifica in molti altri sistemi recettoriali.

2. SCOPO DELLA TESI

Negli ultimi decenni stiamo assistendo ad un sostanziale cambiamento degli ambienti di lavoro e di vita. Se da un lato, infatti, le esposizioni professionali sono state notevolmente abbattute grazie ad efficaci misure di prevenzione, l'esposizione ambientale, che quindi coinvolge tutta la popolazione, è drammaticamente cambiata con un aumento sia delle concentrazioni di composti gassosi irritanti ed ossidanti, sia del particolato atmosferico, in particolare di quello a granulometria più fine.

I polimorfismi genetici degli enzimi della biotrasformazione, degli enzimi della riparazione del DNA e di altre proteine, quali ad esempio fattori di controllo del ciclo cellulare, recettori, fattori di crescita, sembrano svolgere un ruolo importante nel modulare la risposta, misurabile per esempio con la stima dell'alterazione dell'espressione di geni critici, e quindi nel modificare il rischio d'insorgenza di patologie in soggetti esposti od ex-esposti ad agenti chimici anche a basse dosi.

In questa tesi, saranno illustrati diversi studi svolti allo scopo di valutare:

- nel capitolo 3 il possibile ruolo svolto dai polimorfismi genetici nel modulare la risposta in soggetti professionalmente esposti a xenobiotici. In particolare gli studi sono stati condotti allo scopo di:
 1. Studiare il ruolo dei polimorfismi genetici degli enzimi implicati nella biotrasformazione del benzene, nel modificare la risposta individuale allo xenobiotico presente a basse dosi, in un gruppo di tassisti della città di Parma.
 2. Verificare se il polimorfismo del gene *ALAD*, aumentando l'affinità dell'enzima per il piombo (Pb), sia in grado di modificarne la cinetica e, dunque, gli effetti, in un gruppo di soggetti professionalmente esposti.
 3. Studiare l'interazione dei polimorfismi genetici di alcuni enzimi della biotrasformazione pertinenti per l'esposizione ad Idrocarburi Policiclici Aromatici, sull'indicatore di dose interna 1- idrossipirene (1-OHP) e sull'espressione del gene *Eme-Ossigenasi-1* (HO-1).

4. Valutare il ruolo dei polimorfismi degli enzimi della riparazione, in particolare dell'*hOGGI*, nell'esposizione occupazionale a stirene, attraverso l'utilizzo di indicatori di stress ossidativo.
- Nei capitoli 4 e 5 il ruolo svolto dai polimorfismi genetici e dall'alterazione dell'espressione di geni critici in soggetti con patologie degenerative, quali il Morbo di Parkinson e il tumore al polmone, già conclamate. In particolare gli studi sono stati condotti allo scopo di:
 1. Valutare la possibile associazione tra Morbo di Parkinson con alcuni enzimi della biotrasformazione, pertinenti per le esposizioni prese in esame.
 2. Valutare l'espressione di geni critici implicati nella patogenesi del tumore polmonare, per identificare uno o più biomarcatori da utilizzare per la diagnosi precoce.

3. RUOLO DEI POLIMORFISMI GENETICI NELL'ESPOSIZIONE A XENOBIOTICI

3.1. INTRODUZIONE

Un'ampia variabilità interindividuale nelle capacità di biotrasformare gli xenobiotici è stata dimostrata e le moderne biotecnologie consentono di caratterizzare i tratti genetici responsabili di tali differenze. L'integrazione dei dati derivanti dall'analisi dei polimorfismi genetici con i risultati del monitoraggio biologico e ambientale, dovrebbero agevolare in maniera significativa la comprensione dei meccanismi molecolari indotti in risposta ad esposizioni ad agenti chimici.

3.2. Benzene

L'aria urbana rappresenta un'importante sorgente di esposizione ad una varietà di inquinanti ambientali. Le fonti inquinanti sono rappresentate in primo luogo dai gas di scarico degli autoveicoli, in particolare se alimentati a benzina, ma anche da impianti di combustione, depositi e distributori di carburante. Nel corso degli anni si è osservato, nonostante l'adozione di interventi legislativi tendenti a diminuire l'emissione veicolare di sostanze nocive, un incremento costante del tasso di crescita del numero di automezzi circolanti, con conseguente incremento dell'inquinamento atmosferico. Nell'aria urbana sono stati identificati oltre 60 diversi idrocarburi, che danno luogo a miscele estremamente complesse. Tra questi, il benzene e gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono classificati cancerogeni per l'uomo. I più gravi effetti che si manifestano a lungo termine sono principalmente a carico del sangue. Il benzene danneggia il midollo osseo e provoca un calo del numero di globuli rossi portando ad anemia. Può inoltre ostacolare la coagulazione del sangue e deprimere il sistema immunitario. Tra gli effetti a lungo termine rientra anche la leucemia.

Presente nei petroli e suoi derivati in concentrazioni intorno a 2.5 vol %, il benzene è considerato un inquinante atmosferico ubiquitario. Le quantità giornaliere assorbite possono raggiungere livelli di 2 mg/die nei fumatori, e sono circa 40 volte inferiori (50 µg/die) tra i non fumatori (30, 31). In regioni poco abitate e ben ventilate, sono riportate concentrazioni inferiori o intorno ad 1 µg/m³, mentre in centri urbani ad elevato traffico automobilistico tali valori possono salire fino a 200 µg/m³.

I soggetti che per motivi professionali transitano o sostano lungo arterie urbane ad alta densità di traffico motorizzato risultano maggiormente esposti rispetto alla popolazione

generale. In particolare alcuni studi condotti negli Stati Uniti hanno documentato che i conducenti di autoveicoli, che circolano in aree urbane ad intenso traffico veicolare, sono esposti a livelli di benzene nettamente più elevati (fino a 4 volte) rispetto a quelli dell'ambiente esterno, ed in misura proporzionale al tempo trascorso nell'autoveicolo.

In Italia come nel resto dell'Unione Europea, il traffico veicolare rappresenta la principale fonte di immissione di benzene in atmosfera. Le concentrazioni medie annuali riscontrate in varie città risultano mediamente comprese fra 5 e 30 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, mentre in zone rurali scarsamente abitate sono comprese tra 0,5 e 6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (32, 33, 34).

Nel 1996 l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha calcolato il rischio aggiuntivo o Unità di Rischio (U.R.) per le sostanze cancerogene. E' stato stimato che per il benzene vi possano essere sei casi aggiuntivi di leucemia per ogni milione di individui esposti per tutto l'arco della loro vita (0-75 anni) ad 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ di benzene in aria. Si tratta di un rischio aggiuntivo nel senso che si va ad aggiungere alla probabilità generica per età e sesso di sviluppare un tumore (35). Mentre vi è un generale accordo sul rischio di leucemia associato all'esposizione a dosi medio-elevate di benzene, tipiche di alcune esposizioni lavorative soprattutto del passato, non sono disponibili dati sufficienti per poter confermare od escludere l'esistenza di un rischio anche per l'assorbimento prolungato a basse dosi, quali quelle dell'ambiente urbano.

Nel 1994 la Commissione Consultiva Tossicologica Nazionale ha stimato per i successivi 74 anni, sulla base di dati di concentrazione atmosferica di benzene in aree urbane e aree rurali, il numero di casi di leucemia nella popolazione italiana attribuibili a benzene. Tale numero sarebbe compreso tra 1240 e 18450, quindi tra i 7 e i 246 casi all'anno. Ogni 1000 casi di leucemia in Italia, tra 3 e 50 potrebbero essere attribuibili al benzene derivante da emissioni veicolari. Da questi dati risulta evidente come la presenza di benzene in atmosfera comporti un effettivo rischio per la salute umana e quindi vada sottoposta ad un monitoraggio costante.

Alcuni studi sono stati condotti con lo scopo di valutare il ruolo dei polimorfismi metabolici nella suscettibilità individuale ad esposizioni a basse dosi di benzene, con risultati a volte discordanti. In uno studio italiano condotto su 59 autisti di autobus non fumatori mediamente esposti a $82.2 \pm 25.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ di benzene, è riportata una significativa maggiore escrezione di acido trans,trans-muconico (*t,t*-MA) in soggetti deleti per il gene *GSTT1*, e una significativa minore escrezione di acidi fenil mercapturici (AFM) in soggetti defettivi per l'enzima NQO1 o "*extensive metabolizers*"

per il gene *CYP2D6*. Più recentemente, (36) è stato riportato una possibile influenza del polimorfismo del gene *CYP2E1* in soggetti portatori di almeno un allele mutato, i quali mostrano maggiori livelli di *t,t*-MA e minori concentrazioni di benzene urinario (BU).

3.3. Piombo

Il largo utilizzo del piombo in svariati processi produttivi rende elevata la possibilità, sia in ambito professionale che extraprofessionale, di esposizione a questo metallo o ai suoi composti. Nel 2004 la IARC ha classificato il piombo nel gruppo 2A, ossia come probabile cancerogeno per l'uomo. L'esposizione prolungata può generare una intossicazione cronica, con danni al sistema nervoso periferico, ai reni, al cervello, anemie ed ipertensione arteriosa. E' stato documentato che soggetti che presentano una particolare variante dell'acido δ -aminolevulinico deidratasi (ALAD) hanno, a parità di esposizione, livelli più elevati di piombemia (PbB) e sembrano essere particolarmente suscettibili all'azione nefrotossica del metallo.

L'acido δ -aminolevulinico deidratasi (ALAD), enzima citoplasmatico inducibile che catalizza la seconda tappa biosintetica dell'eme, rappresenta il principale bersaglio molecolare del piombo inorganico (Pb) circolante nel sangue periferico. Si tratta di una metalloproteina di 280kDa, composta da 8 subunità identiche, ciascuna delle quali lega come cofattore, indispensabile per l'attività enzimatica, un atomo di (Zn). E' stato calcolato che circa l'80% del Pb contenuto all'interno dell'eritrocita spiazzava lo Zn dal legame con l'ALAD, inibendone l'attività enzimatica, per alterazione della sua struttura quaternaria.(37)

Sulla base del comportamento in campo elettroforetico, negli anni '80 sono state identificate tre varianti polimorfiche dell'enzima (38), ricondotte successivamente ad un polimorfismo genetico (trasversione G177C) del gene *ALAD*, localizzato sul cromosoma 9q34, che determina la sostituzione aminoacidica Lys59Asn (39, 40). Per effetto del polimorfismo, il peptide variante ALAD-2, codificato dall'allele omologo, risulta più elettronegativo rispetto al peptide codificato dall'allele "wild type" *ALAD-1*. I due alleli sono codominanti, sicchè a livello di popolazione sono distinguibili tre diversi fenotipi proteici (ALAD-1-1, ALAD-1-2, ALAD-2-2), corrispondenti ai diversi genotipi, ad elettronegatività crescente. La prevalenza dell'allele *ALAD-2* varia a seconda del gruppo etnico considerato: in Italia, è stata stimata una frequenza del 10%

(41). Studi sperimentali *in vitro* hanno evidenziato che gli isoenzimi ALAD presentano un'affinità di legame per il Pb proporzionale al contenuto di peptide ALAD-2, probabilmente a causa della maggiore elettronegatività di questo rispetto al peptide ALAD-1. Ciò sembrerebbe influenzare gli aspetti tossicocinetici e quindi gli effetti del metallo in soggetti con diverso genotipo *ALAD*. E' riportato in letteratura, che i soggetti portatori di allele variante (genotipi *ALAD-1-2* e *ALAD-2-2*) possono presentare livelli di piombemia (PbB) più elevati, con livelli di acido δ -aminolevulinico plasmatico (ALAP) ed urinario (ALAU) e di zinco protoporfirina eritrocitaria (ZPP) più bassi, rispetto ai soggetti con genotipo *ALAD-1-1* (42).

3.4. IPA, metalli e particolato. L'esempio della fonderia

I composti di interesse tossicologico presenti nel ciclo produttivo di una fonderia possono essere classificati in particolato atmosferico, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e metalli. A breve termine queste sostanze possono provocare effetti per lo più irritativi delle vie respiratorie, mentre a lungo termine possono agire da cancerogeni, per lo più polmonari. Il particolato aerodisperso inalabile è costituito da una miscela complessa di particelle solide e/o liquide, variabili per massa, dimensione e composizione, in relazione alla diversa origine e alle diverse condizioni meteo climatiche. Numerosi studi *in vivo* e *in vitro* concordano nell'attribuire ad esso la capacità di indurre flogosi per attivazione del sistema immunitario (43), e di indurre la generazione di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS), con conseguente generazione di stress ossidativo cellulare, per azione dei metalli di transizione (reazione di Fenton) (44) e della biotrasformazione dei composti organici, adsorbiti alla superficie delle particelle. Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) a due o più anelli aromatici si formano durante i processi di combustione incompleta di materiale organico. Sono composti ubiquitari, presenti nell'ambiente sotto forma sia di polveri che di vapore, liberi o adsorbiti su particolato atmosferico. La quantità di IPA adsorbita per unità di peso di particolato dipende dalle dimensioni di quest'ultimo ed il maggior adsorbimento si ha con particelle il cui diametro aerodinamico è inferiore a 10 μm (45). Le proprietà tossicologiche degli IPA dipendono dalla produzione di intermedi metabolici reattivi durante la loro biotrasformazione, principalmente per azione delle monoossigenasi a funzione mista citocromo P450 dipendenti (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP3A4*) (46). Tali enzimi di fase I agiscono principalmente sulle regioni ad

elevata densità elettronica portando alla formazione di epossidi reattivi, suscettibili di ulteriore bioattivazione metabolica in diidrodiooli ed infine in diolo epossidi per azione dell'eossido idrolasi microsomiale (EPHX1). La detossificazione di questi composti altamente reattivi, dotati di effetti mutageni e cancerogeni, è legata alle capacità di coniugazione con acido glucuronico, glutatione o acido solforico. Il metabolismo intermedio presenta una variabilità interindividuale, che dipende, almeno in parte dal polimorfismo genetico degli enzimi della biotrasformazione. Dal punto di vista tossicologico risulta rilevante anche una tossicità indiretta legata alla capacità intrinseca delle monoossigenasi citocromo P450 dipendenti di produrre ROS (47).

L'*eme-ossigenasi* (HO-1) è un enzima microsomiale che catalizza la degradazione ossidativa dell'eme a biliverdina, con rilascio di monossido di carbonio (CO) e ferro(II), prodotti con proprietà antiossidanti e antinfiammatorie. Sono note tre isoforme, codificate da altrettanti geni: *HO-1*, *HO-2* e *HO-3*. L'isoforma 1 (HO-1) è inducibile e viene sintetizzata in risposta a diversi stimoli (metabolici, fisici o ambientali) associati a stress ossidativo e infiammazione. Numerosi dati sperimentali suggeriscono che l'attività eme-ossigenasica sia in grado di proteggere cellule e tessuti da risposte infiammatorie eccessive (48).

3.5. Stirene

Lo stirene è un composto liquido a temperatura ambiente, incolore e si ottiene per deidrogenazione catalitica dell'etilbenzene.

I livelli di accettabilità delle concentrazioni aerodisperse, stimate su base scientifica, corrispondono all'attuale limite di soglia (*Threshold Limit Value*, TLV) proposto da diversi organismi internazionali, e già adottato da alcuni paesi europei, ossia 20 ppm (o 85 mg/m³) di stirene nell'aria come media ponderata per le otto ore lavorative (TLV-TWA) per 5 giorni alla settimana, mentre il livello massimo per esposizioni a breve termine è individuato nell'attuale valore TLV-STEL (*TLV-Short Term Exposure Limit*) raccomandato dall'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH, 2004) e corrispondente a 40 ppm per periodi di 15 minuti (49).

In seguito all'assorbimento, lo stirene si distribuisce in tutto il corpo e si ritrova prevalentemente nei tessuti ricchi di lipidi, da cui viene rilasciato lentamente. L'emivita

nel tessuto adiposo è di 2-4 giorni, mentre la completa eliminazione richiede da 12 a 24 giorni.

L'indicatore biologico correntemente utilizzato per il monitoraggio biologico dell'esposizione a stirene è costituito dalla somma delle concentrazioni urinarie dei metaboliti principali dello stirene, gli acidi mandelico e fenilgliossilico (AM+AFG).

Numerosi studi compiuti su gruppi di lavoratori professionalmente esposti hanno documentato manifestazioni irritative a carico degli occhi, della mucosa nasale ed orofaringea come effetti a breve termine. Tra gli effetti a lungo termine si annoverano, invece, alterazioni a carico del sistema nervoso centrale (alterazione della performance psicomotoria, disturbi mnesici) ed effetti sullo sviluppo neurologico, disturbi a carico della sfera neuroendocrina, effetti sul sistema immunitario. Per concentrazioni ambientali attorno a 25 ppm sono state documentate alterazioni nella distribuzione delle sottopopolazioni linfocitarie e dell'immunità cellulo-mediata, compatibili con l'esistenza di un meccanismo d'azione diretto dello stirene sulle cellule immunocompetenti (50), e potenziale cancerogenicità /genotossicità (51, 52).

Studi recenti di citogenetica condotti sui linfociti periferici di lavoratori documentano una frequenza di aberrazioni cromosomiche significativamente maggiori a livelli di esposizione superiori a 20 ppm, che pertanto rappresenterebbe una concentrazione soglia per la comparsa di effetti genotossici. Alle stesse concentrazioni è stata osservata la formazione di addotti al DNA e all'emoglobina da parte del 7,8-stirene-ossido (7,8-SO) e rotture del DNA a singolo filamento (53). Sono state osservate infine mutazioni nel locus dell'*ipoxantina fosforibosil-transferasi* (HPRT) dei linfociti e varianti della glicoforina A in lavoratori esposti (52,54).

Sulla base di alcuni studi condotti sull'animale, che hanno fornito indicazioni di evidenza della cancerogenicità dello stirene, l'Agenzia Internazionale per la Ricerca sul Cancro (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) ha classificato lo stirene nel gruppo 2B, cioè tra i possibili cancerogeni per l'uomo ed il suo metabolita genotossico 7,8-SO nel gruppo 2A, cioè come probabile cancerogeno per l'uomo (55).

Recentemente, è stata formulata una nuova ed interessante ipotesi circa il rischio genotossico derivante dall'esposizione a stirene (56). I risultati di alcuni studi *in vitro* e *in vivo* hanno suggerito che lo stress ossidativo possa essere il meccanismo alla base della genotossicità dello stirene.

E' stato ipotizzato che in seguito alla formazione di addotti alle macromolecole cellulari (DNA, RNA e proteine) da parte del 7,8-SO, si generi un aumento di specie reattive dell'ossigeno, tra cui H_2O_2 .

E' noto che H_2O_2 può generare un radicale idrossile altamente reattivo, in grado di causare perossidazione lipidica e danno ossidativo al DNA. Chakrabarti et al. (57) hanno dimostrato un incremento dose-dipendente nella perossidazione dei lipidi e una deplezione di GSH in colture di linfociti provenienti dal sangue intero in seguito ad incubazione con stirene. Sulla base di questo risultato è stato ipotizzato che la genotossicità dello stirene sia legata non solo alla formazione del metabolita reattivo 7,8-SO, ma anche alla generazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Studi *in vitro* su linee cellulari neuronali umane SK-N-MC (58) hanno dimostrato che il 7,8-SO è in grado di provocare un danno ossidativo sia in termini di perossidazione lipidica che di ossidazione del DNA. Inoltre, in seguito ad esposizione dei neuroni a 7,8-SO è stata osservata una diminuzione delle difese antiossidanti delle cellule, con deplezione di GSH e riduzione dell'attività delle glutatione S-transferasi (GST), ed una induzione dell'espressione e dell'attività dell'eme ossigenasi 1 (HO-1), enzima la cui espressione è indotta da stimoli associati con stress ossidativo ed infiammazione.

Infine, l'esposizione a stirene è stata associata a stress ossidativo anche *in vivo*. Concentrazioni significativamente più elevate di 8-oxo-2'deossiguanosina (8-oxo-dG) sono state riscontrate nei linfociti del sangue periferico di lavoratori esposti a stirene rispetto ad un gruppo di controllo (59). Poiché la concentrazione di 8-oxo-dG è un indicatore di danno ossidativo alla guanina in posizione 8 ad opera del radicale idrossile, questo risultato proverebbe che l'esposizione professionale a stirene si associa alla generazione di radicale idrossile, che è responsabile della formazione di addotti idrossilati e della produzione di rotture del DNA a singolo filamento.

Nel loro insieme, tutte queste evidenze sperimentali sembrano indicare che lo stress ossidativo possa essere il meccanismo responsabile della genotossicità dello stirene e del suo metabolita reattivo 7,8-SO.

Il mezzo principale attraverso il quale i sistemi biologici sono in grado di difendersi dal danno ossidativo al DNA, come precedentemente descritto, è rappresentato dagli enzimi della riparazione ed in questo caso specifico l'enzima maggiormente coinvolto sembra essere l'8-oxoguanina DNA glicosilasi 1 (hOGG1).

Il gene *hOGG1* è espresso in 12 isoforme alternativamente riarrangiate (60) e codifica per 2 isoforme enzimatiche: α -hOGG1 e β -hOGG1. La prima contiene un segnale di localizzazione a livello del nucleo, mentre la seconda sembra essere traslocata ai mitocondri.

Kohno et al. (61) hanno identificato 5 varianti la più significativa delle quali sembra essere il polimorfismo C/G in posizione 1245 del gene *hOGG1*, che determina una sostituzione aminoacidica da serina a cisteina nel codone 326, modificandone la funzionalità.

Negli ultimi anni, la diffusione delle tecniche analitiche basate sulla spettrometria di massa ha reso possibile la caratterizzazione e la determinazione quantitativa dei prodotti di danno ossidativo al DNA (62).

Oltre all'8-oxo-dG, misurabile sia nel sangue periferico come indicatore di danno subito dal DNA ma non riparato, che nelle urine, come indicatore di danno subito dal DNA e riparato dalle nucleotidasi, è possibile oggi determinare le concentrazioni di 8-oxo-G e 8-oxo-Guo mediante cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa. L'8-oxo-G urinaria riflette il danno alla guanina in posizione 8 riparato specificamente dall'azione delle glicosilasi, in particolare dell'*hOGG1*. L'8-oxo-Guo urinaria potrebbe derivare o dalla riparazione degli RNA citoplasmatici o da pool di nucleotidi, con meccanismi non ancora conosciuti.

3.6. VALUTAZIONE DELL'INTERAZIONE DEI POLIMORFISMI DELLA BIOTRASFORMAZIONE NELL'ESPOSIZIONE A BASSE DOSI DI BENZENE. (Allegato1: Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi driver. *Toxicol Lett.* 2006 Dec 1;167(2):142-51.)

3.6.1. Scopo dello studio

Scopo di questo studio era la valutazione dell'interazione dei polimorfismi degli enzimi della biotrasformazione in un gruppo di tassisti della città di Parma esposti a basse dosi di benzene.

3.6.2. Materiali e Metodi

3.6.2.1.Soggetti

Sono stati reclutati 37 autisti di taxi della città di Parma, comprendenti 16 fumatori. Campioni di urine sono stati raccolti all'inizio (7:00 AM) del turno lavorativo ed alla fine (19:00 PM) in quattro giorni consecutivi, caratterizzati dalle stesse condizioni climatiche (20-23 °C di massima, 7-11 °C di minima; 60% di umidità; vento a 3-5 m/s). Le concentrazioni di benzene misurate dalle stazioni municipali fisse erano in media di $3.25 \pm 0.50 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

A tutti i partecipanti allo studio è stato chiesto di compilare un questionario riguardante il proprio turno di lavoro. (per ulteriori dettagli si rimanda all' Allegato 1).

3.6.2.2. Monitoraggio ambientale

Per valutare le concentrazioni di idrocarburi dispersi nell'abitacolo dell'autoveicolo, ciascun tassista è stato dotato di un campionatore radiale a diffusione passiva (Radiello[®], Fondazione Maugeri, Padova, Italia) collocato in zona respiratoria.

Un secondo campionatore, è stato posizionato al colletto della camicia di ogni singolo tassista 12 h prima dell'inizio del turno al fine di ottenere un campionamento personale delle 24 h, ed evidenziare l'influenza dell'inquinamento extra-lavorativo cui il tassista era esposto. Gli idrocarburi, in seguito, sono stati desorbiti ed analizzati in laboratorio mediante gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 1).

3.6.2.3. Monitoraggio biologico

Per l'analisi dei metaboliti del benzene, sono stati raccolti due campioni d'urina uno all'inizio del turno (IT) e l'altro alla fine del turno lavorativo (FT).

Il benzene urinario (BU) e altri non-modificati idrocarburi aromatici sono stati determinati in gas cromatografia-spettrometria di massa su fase solida (SPME GC-MS).

I metaboliti del benzene, *t,t*-acido trans muconico, gli acidi fenilmercapturici (AFM), e la cotinina urinaria (U-cotinina) sono stati determinati in cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC-MS-MS) (63). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 1).

3.6.2.4. Analisi dei genotipi

I genotipi degli enzimi della biotrasformazione *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTA1*, *NQO1* e *EPHX1* sono stati caratterizzati su DNA genomico estratto da 1 ml di sangue intero. I polimorfismi degli enzimi *EPHX1*, *NQO1* e *GSTA1* sono stati caratterizzati in PCR-RFLP utilizzando metodiche già pubblicate (64; 65; 66). Per la caratterizzazione del polimorfismo della *GSTM1* e *GSTT1* è stata utilizzata una Multiplex-PCR secondo Arand et al. 2001 (67). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 1).

3.6.2.5. Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta con l'ausilio del programma statistico SPSS per Windows[®], Versione 10.0 (Statistical Package for Social Sciences, Chicago, IL, USA). Le differenze tra le medie geometriche (MG) dei gruppi sono state valutate usando il test *t* di Student per campioni indipendenti, mentre per il confronto delle stesse all'interno dei gruppi è stato utilizzato il test *t* per dati appaiati. L'analisi della regressione lineare è stata effettuata utilizzando il metodo *least-square* (correlazione di Pearson). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 1).

3.6.3. Risultati

I risultati del monitoraggio ambientale hanno evidenziato come la concentrazione media ponderata di benzene, toluene, etilbenzene e xileni (BTEX) all'interno dell'abitacolo delle auto fosse significativamente più elevata rispetto alla media delle concentrazioni di benzene rilevate nei campionamenti personali effettuati nell'arco delle 24 h. Queste differenze sono state osservate considerando sia l'intera popolazione di tassisti, che i due sottogruppi distinti in base all'abitudine al fumo. Tra gli indicatori biologici, il

benzene urinario (BU) e gli acidi *S*-fenilmercapturici (AFM) presentavano concentrazioni più elevate nei soggetti fumatori rispetto ai non fumatori nei campioni di FT ($p<0.002$). Limitatamente al gruppo dei fumatori le concentrazioni di AFM di fine turno erano significativamente maggiori rispetto ad inizio turno ($p<0.05$). Nessuna differenza significativa è stata riscontrata tra i valori di acido *t,t*-muconico (*t,t*-AM) di inizio e fine turno, né tra fumatori e né tra non fumatori. (**Tabella 1**). Tutti gli indicatori di esposizione a benzene, tranne l'acido *t,t*-muconico di fine turno correlavano con la cotonina-U ($p<0.05$). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 1).

3.6.3.1. Ruolo interferente del polimorfismi della GSTM1

L'escrezione di AFM era significativamente influenzata dal polimorfismo della *GSTM1* in un modello di ANCOVA ($F=3.994$, $p=0.016$) considerando come covariata l'esposizione personale e come fattori il polimorfismi della *GSTM1* e l'abitudine al fumo (si/no) (**Tabella 2**). La variabile dipendente era significativamente influenzata dalla covariata ($F=6.368$, $p=0.020$) e da entrambi i fattori ($F=4.392$, $p=0.049$ per la *GSTM1*; $F=9.214$, $p=0.007$ per l'abitudine al fumo). Sono stati quindi valutati, gli effetti degli altri genotipi e delle altre covariate sull'escrezione dei biomarcatori del benzene. I migliori predittori di escrezione di AFM sono risultati essere la cotonina urinaria, la *GSTAI* e la *GSTM1* (**Tabella 3**). Nei tre soggetti con genotipo *GSTAI***B***B* (tutti non fumatori) si riscontravano minori quantità di AFM a fine turno [1.16 (1.37) $\mu\text{g/g creat.}$] rispetto ai soggetti con almeno un allele *GSTAI***A* considerando sia l'intero gruppo di esposti [2.90 (1.84) $\mu\text{g/g creat.}$, $p<0.02$] o il sottogruppo dei non fumatori [2.28 (1.98) $\mu\text{g/g creat.}$, $p<0.05$]. (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 1).

3.6.4. Discussione

Le concentrazioni ambientali medie di benzene aerodisperso riscontrate in questo studio sono risultate confrontabili con quelle riportate in altri studi su vigili urbani (68; 69; 70) e autisti di autobus (71).

I dati mostrano che le concentrazioni di BTEX all'interno del taxi sono significativamente più alte rispetto all'ambiente esterno, e questi livelli risultano più bassi rispetto al limite minimo fissato dalla legge italiana (direttiva EU97/42/EC) di 3200 $\mu\text{g/m}^3$ o 1ppm. Il monitoraggio ambientale si dimostra utile per stimare l'uptake di

benzene dall'ambiente, ma non quello derivante dall'abitudine voluttuaria al fumo di sigaretta, che pure contribuisce alla dose interna di benzene. Solo due marcatori, il BU e gli AFM risultano significativamente differenti tra tassisti fumatori e non fumatori a fine turno. I risultati ottenuti hanno mostrato che sia il BU che gli AFM distinguono i soggetti in base all'abitudine al fumo e, limitatamente al caso dei soggetti fumatori, gli AFM anche nel distinguere i campioni di inizio turno da quelli di fine turno lavorativo. Ad oggi questo è il primo studio che dimostra una significativa modulazione dei livelli di AFM da parte del polimorfismo della *GSTM1*. Questi dati chiaramente mostrano un effetto del polimorfismo della *GSTM1* sull'escrezione degli AFM alla fine del turno lavorativo, con i soggetti *GSTM1pos* che hanno una significativa maggiore escrezione di questi metaboliti rispetto ai soggetti *GSTM1null*. Questo andamento era visto anche quando i lavoratori erano distinti per l'abitudine al fumo di sigaretta. Inoltre, in via preliminare questi risultati sembrano indicare una possibile influenza anche del polimorfismo della *GSTA1* sull'escrezione dei mercapturati. I tre soggetti *GSTA1*B*B* hanno minori livelli a fine turno di AFM rispetto ai soggetti con almeno un allele *GSTA*A*. Entrambe le *GSTM1-1* e la *GSTA2-2* sono espresse nel fegato e potrebbero essere coinvolte nella detossificazione del benzene anche a basse concentrazioni. (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 1).

3.6.5. Conclusioni

Questo studio mostra come gli autisti di taxi siano esposti a valori di benzene due volte più alti rispetto al resto della popolazione. L'abitudine al fumo è la principale sorgente di benzene extra-professionale. E' evidenziata un'interferenza del polimorfismo della *GSTM1* nell'escrezione di AFM anche a basse dosi di esposizione a benzene. Ulteriori studi su una corte di lavoratori più numerosa sono necessari per confermare questo risultato.

3.7. VALUTAZIONE DELL'INTERAZIONE DEL POLIMORFISMO METABOLICO DELL'ACIDO δ -AMINOLEVULANICO DEIDRATASI (ALAD) NELLA TOSSICODINAMICA DEL PIOMBO.

(Allegato 2: ALAD polymorphism and indicators of dose and effects of occupational exposure to inorganic lead. *G Ital Med Lav Ergon.* 2005 Jan-Mar;27 Suppl 1:39-42.)

3.7.1. Scopo dello studio

Obiettivo del presente lavoro è stato di verificare se il polimorfismo *ALAD*, aumentando l'affinità dell'enzima per il Pb, sia in grado di modificarne la cinetica, e dunque gli effetti. In particolare, l'ipotesi formulata è che, se la frazione tossicologicamente attiva del Pb è quella plasmatica, il polimorfismo *ALAD*, influenzando i livelli di questa, possa modulare le reazioni dose-risposta. (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 2).

3.7.2. Materiali e Metodi

Il polimorfismo genetico *ALAD* è stato caratterizzato in 333 soggetti di sesso maschile professionalmente esposti a livelli di PbB ≥ 100 $\mu\text{g/l}$. Il genotipo metabolico *ALAD* è stato determinato con metodica di PCR-RFLP su DNA genomico, estratto da 2 mL di sangue intero. Gli indicatori di esposizione a Pb [PbB, piombo plasmatico (PbP), piombo urinario (PbU), attività ALAD ematica] e di effetto [acido δ -aminolevulinico plasmatico (ALAP), acido δ -aminolevulinico urinario (ALAU), zincoprotoporfirina ematica (ZPP)] sulla sintesi dell'eme sono stati determinati con i metodi descritti da Neri et al. (72). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato2)

3.7.2.1. Analisi statistica

L'elaborazione statistica è stata eseguita con il programma SPSSTM 12.0 per Windows. La distribuzione delle variabili è stata valutata tramite test di Kolmogorov-Smirnov Le differenze tra gruppi sono state valutate con test *t* di Student e con test *U* di Mann-Whitney Le relazioni tra variabili sono state stimate tramite analisi delle correlazioni con test di Spearman e con modelli di regressione. (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato2).

3.7.3. Risultati

Le frequenze genotipiche si distribuivano secondo l'atteso. I valori di (PbB) erano tendenzialmente più elevati nei soggetti con almeno un allele *ALAD-2*, mentre i soggetti con genotipo *ALAD-1-1* presentavano livelli maggiori di acido δ -aminolevulinico urinario (ALAU) e di zincoprotoporfirina ematica (ZPP). Stratificando i lavoratori in base ai livelli di PbB, nel gruppo a bassa esposizione ($\text{PbB} \leq 300 \mu\text{g/l}$) i soggetti *ALAD-1-1* presentavano livelli di ZPP significativamente più elevati rispetto ai portatori di allele *ALAD-2* (media geometrica $1,84 \mu\text{g/g Hb}$ vs. $1,56 \mu\text{g/g Hb}$, $p < 0,05$, test t di Student). Per livelli più elevati di esposizione ($\text{PbB} > 300 \mu\text{g/l}$), i soggetti con genotipo omozigote *wild type* presentavano valori di PbP/PbB% e di ALAU tendenzialmente più elevati rispetto ai soggetti con allele variante [valori mediani rispettivamente di $0,42\%$ vs. $0,34\%$ ($p = 0,076$, test U di Mann-Whitney) e di $0,94 \text{ mg/g creatinina}$ vs. $0,75 \text{ mg/g creatinina}$ ($p = 0,082$, test U di Mann-Whitney)]. La **Tabella 4** evidenzia che, mentre nei soggetti con genotipo *ALAD-1-1* gli indicatori cinetici e dinamici di esposizione a Pb erano tutti significativamente correlati tra di loro, nei soggetti portatori di allele *ALAD-2* si osservava un numero inferiore di correlazioni significative. L'analisi dei dati con tecniche di regressione multipla evidenziava un'interferenza significativa del polimorfismo *ALAD* nella relazione tra livelli di ZPP ed attività ALAD ($R^2 = 0,49$, $p < 0,0001$) (**Figura 1**). I soggetti con genotipo *ALAD-1-1* presentavano una correlazione inversa e significativa ($R^2 = 0,51$, $p < 0,0001$) tra le variabili, descritta dall'equazione $\text{Log ZPP} = 1,42 - 0,76 \text{ Log ALAD}$, mentre nel gruppo di soggetti portatori di allele *ALAD-2* le due variabili erano tra loro indipendenti.

A parità di PbB e di attività ALAD ematica, i lavoratori con genotipo *ALAD-1-1* presentavano livelli di ZPP significativamente più elevati rispetto ai soggetti con genotipo eterozigote-omozigote variante ($\text{MG } 2,07 \text{ mg/g Hb}$ vs $1,72 \text{ mg/g Hb}$, $p < 0,05$). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato2).

3.7.4. Discussione

Nel nostro campione i soggetti portatori di allele 2 presentavano livelli di piombemia maggiori rispetto ai soggetti con genotipo *ALAD-1-1*. Tra questi ultimi si osservano livelli più elevati di piombo plasmatico (PbP), mentre la frazione del PbP rispetto al PbB è sostanzialmente uguale nei due gruppi. L'interpretazione di tali risultati non può prescindere dalle difficoltà metodologiche insite nel dosaggio di PbP. Per altri indicatori di effetto (ALAU, ZPP) sulla biosintesi dell'eme la cui metodologia di dosaggio non

sembra influenzata da variabili i risultati sono in linea con i dati della letteratura. I valori di entrambi gli indicatori sono più elevati nel sottogruppo di lavoratori con genotipo *ALAD-1-1*. L'interpretazione di questi risultati sarebbe riconducibile alla differente affinità per il Pb degli isoenzimi ALAD, e dunque all'esistenza di diversi equilibri a livello eritrocitario, tra Pb legato ad ALAD e Pb biodisponibile.

Ad ulteriore conferma dell'ipotesi deporrebbe il differente comportamento nei due gruppi di lavoratori della relazione tra attività ALAD e livelli di ZPP, a parità di PbB. Mentre nei lavoratori con genotipo *ALAD-1-1* le due variabili sono inversamente correlate, nei soggetti con allele *ALAD-2*, non si osserva alcuna relazione tra le variabili in quanto in questi soggetti l'aumentata affinità del peptide ALAD-2 per il Pb ne riduce l'interferenza su altri bersagli molecolari.

3.7.5. Conclusioni

I risultati ottenuti sembrano confermare l'esistenza di interferenze sulla cinetica e sulla dinamica del Pb da parte del polimorfismo *ALAD*. L'assenza di chiare differenze statisticamente significative in sottogruppi con diverso genotipo *ALAD* è del tutto compatibile con la natura stessa del fattore studiato, che, in quanto polimorfismo genetico, peraltro infrequente, può solo modulare, concorrendo per via interattiva con altri fattori (di natura genetica e/o acquisita), e la cui frequenza può variare nelle diverse casistiche studiate, alla definizione di tratti complessi quali gli effetti dell'esposizione professionale a Pb.

3.8. VALUTAZIONE DEL RUOLO DEI POLIMORFISMI GENETICI DI ALCUNI ENZIMI DELLA BIOTRASFORMAZIONE, PERTINENTI PER L'ESPOSIZIONE A IPA, NELLA MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA DELL'EME-OSSIGENASI 1 (HO-1).

(Allegato 3: Heme oxygenase 1 expression in foundry workers. *G Ital Med Lav Ergon.* 2005 Jul-Sep;27(3):322-5.)

3.8.1. Scopo dello studio

Scopo di questo lavoro era quello di valutare la possibile interazione dei polimorfismi della biotrasformazione nei confronti di un'esposizione complessa come quella di una fonderia

3.8.2. Materiali e Metodi

3.8.2.1. Soggetti

Lo studio è stato eseguito su una coorte di 37 lavoratori maschi (età media 41 ± 7 anni, di cui 13 fumatori). Il reclutamento dei soggetti è stato effettuato nel Febbraio 2003 (T₁) e nel Giugno 2003 (T₂). Durante ogni reclutamento sono stati raccolti un campione di sangue e un campione di urina all'inizio del turno di lavoro (IT, ore 6) ed alla fine dello stesso (FT, ore 14). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 3).

3.8.2.2. Estrazione RNA e DNA

L'estrazione di RNA totale è stata condotta su 2,5 ml di sangue venoso periferico. L'RNA totale estratto è stato digerito con DNase I, quantificato fluorimetricamente ed infine visualizzato con elettroforesi orizzontale in gel d'agarosio.

L'estrazione del DNA è stata condotta su 3 ml di sangue venoso. (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 3).

3.8.2.3. Retrotrascrizione e quantificazione dell'espressione del gene *HO-1*

500 ng di RNA totale sono stati retrotrascritti con 2,5 μ M di random decamers, 200U di SuperScript II Reverse Transcriptase in un volume finale di 20 μ l. Le reazioni di PCR quantitativa in tempo reale, in duplicato per ciascun campione, sono state eseguite su termociclatore. L'espressione del gene *HO-1* è stata valutata utilizzando l'algoritmo *geNorm* dopo normalizzazione rispetto all'espressione di tre geni di controllo: β 2-

microglobulina ($\beta 2$ -M), *succinato deidrogenasi subunità A* (SDHA) e *ipoxantina fosforibosiltransferasi 1* (HPRT-1). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 3).

3.8.2.4. Polimorfismi genetici

I polimorfismi genetici sono stati caratterizzati utilizzando metodiche di PCR Multiplex (*GSTM1*), PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (*EPHX1* e *CYP1A1m1*), PCR allele-specifica (*CYP1A1m2*) e PCR *RealTime* (*CYP1B1* e *GSTP1*) con metodiche già pubblicate (67, 64, 73, 74, 75). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 3).

3.8.2.5. Determinazione urinaria dell'1-OHP

La determinazione dell'1-idrossipirene (1-OHP), è stata effettuata in cromatografia liquida ad alta pressione. I campioni sono stati analizzati su colonna Supelcosil® LC-18 DB (15 cm x 4,6 mm ID, 3 μ m) e rivelati in fluorimetria (λ_{ecc} 242 nm; λ_{em} 388 nm). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 3).

3.8.3. Risultati

Le medie geometriche delle concentrazioni di 1-OHP misurati a FT erano circa tre volte quelle misurate a IT, mentre le concentrazioni di 1-OHP FT misurate al T2 erano circa il doppio di quelle rilevate al T1. L'1-OHP era significativamente associato con l'abitudine al fumo di sigaretta. L'espressione di *HO-1* a FT, normalizzata rispetto a quella di IT (*HO-1* FT/IT), era aumentata al T2 rispetto al T1. Al T2 e nella valutazione combinata dei due campionamenti, l'espressione di *HO-1* FT/IT era significativamente correlata con l'1-OHP FT ($r=0,47$, $p<0,018$ e $r=0,39$, $p<0,05$, rispettivamente). L'espressione di *HO-1* FT/IT al T2 era significativamente più elevata nei soggetti con almeno un allele *GSTP1* variante rispetto ai soggetti con genotipo *GSTP1AA* (**Figura 2**). In un modello di ANCOVA, l'espressione di *HO-1* FT/IT era, a parità di esposizione, significativamente più elevata nei soggetti con genotipo *GSTP1* variante, rispetto ai soggetti con genotipo *GSTP1AA* (**Tabella 5**). Nei soli soggetti portatori di almeno un allele *GSTP1* variante era evidenziabile una regressione positiva tra l'espressione di *HO-1* FT/IT e livelli di 1-OHP FT ($r^2=0,21$, $p=0,016$). (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 3).

3.8.4. Discussione e Conclusioni

Gli inquinanti aerodispersi negli ambienti di vita e di lavoro assumono notevole rilievo per gli effetti biologici che possono provocare nei lavoratori esposti e nella popolazione generale. Tali effetti dipendono dal tipo di sostanze presenti, dalle loro concentrazioni e dalle possibili loro interazioni. La fonderia rappresenta un interessante “ambiente modello” in cui coesistono particelle inalabili, composti organici e metalli con attività cancerogena, metalli di transizione responsabili della produzione di ROS. A causa della crescente diffusione del traffico autoveicolare e dei motori diesel, queste stesse sostanze sono oggi tra i più importanti e pericolosi inquinanti dell’aria urbana. Lo stress ossidativo, che si genera quando la concentrazione di ROS eccede le capacità antiossidanti della cellula, ha come principale bersaglio le macromolecole cellulari quali DNA, lipidi, e proteine, di cui altera struttura e funzione. Lo stress ossidativo è in grado di alterare l’espressione genica di molti geni coinvolti nelle più svariate vie metaboliche (76). Il presente studio dimostra per la prima volta l’esistenza di una correlazione positiva tra i livelli di un tracciante di esposizione ad IPA (1-OHP) misurato a fine turno e l’induzione dell’espressione genica dell’enzima HO-1 in cellule del sangue periferico. La correlazione sembra limitata ai soggetti portatori di alleli varianti al locus *GSTP1-1*, i quali presentano anche, a parità di esposizione, livelli più elevati di induzione dell’espressione del gene *HO-1* a FT. L’enzima GSTP1-1 è la principale glutatione S-transferasi espressa a livello linfocitario, ed è implicata nella detossificazione degli IPA. L’isoenzima GSTP1-1 presenta due varianti polimorfiche, rispetto alla variante normale, rispettivamente agli esoni 5 (Iso₁₀₅Val) e 6 (Ala₁₁₄Val). Studi *in vitro* hanno dimostrato una minore stabilità delle proteine varianti rispetto alla “selvatica”, con conseguente riduzione dell’attività enzimatica, e variazioni dell’efficienza catalitica delle diverse varianti nei confronti di alcuni IPA. L’espressione dell’enzima in numerosi tessuti e la sua capacità detossificante nei confronti di cancerogeni importanti quali gli IPA diolo epossidi fa ipotizzare che esso sia implicato nella suscettibilità al cancro. La plausibilità biologica dei risultati ottenuti potrebbe quindi risiedere in un più elevato stress ossidativo intracellulare nei soggetti portatori di isoforme *GSTP1-1* varianti, rispetto a quelli che esprimono la proteina “selvatica”, probabilmente a causa di una minore capacità di detossificare gli intermedi metabolici reattivi derivanti dalla fase I della biotrasformazione degli IPA.

3.9. VALUTAZIONE DELL'INTERAZIONE DEL POLIMORFISMO DELL'ENZIMA DELLA RIPARAZIONE hOGG1 SULLA GENERAZIONE DI DANNO OSSIDATIVO AL DNA IN UN GRUPPO DI LAVORATORI ESPOSTI A STIRENE.(dati non pubblicati)

3.9.1. Scopo dello studio

Questo studio si proponeva di valutare l'associazione tra gli indicatori di danno ossidativo alla guanina e l'esposizione a stirene in un gruppo di lavoratori professionalmente esposti (comprendente un sottogruppo di ex-esposti) e in un gruppo di controllo, tenendo in considerazione l'eventuale influenza del polimorfismo dell'enzima della riparazione hOGG1 (Ser326Cys).

3.9.2. Materiali e Metodi

3.9.2.1. Lavoratori professionalmente esposti

E' stato condotto uno studio trasversale su due gruppi di lavoratori reclutati in Repubblica Ceca professionalmente esposti a stirene in due diversi impianti di produzione.

3.9.2.2. Impianto A

Sono stati reclutati 13 soggetti, tutti di sesso maschile, con età media di 35 ± 12 anni, di cui 6 fumatori. I soggetti sono stati esposti ad una concentrazione media di stirene ambientale pari a $16,4 \pm 22,2$ mg/m³.

3.9.2.3. Impianto B

Sono stati reclutati 46 soggetti, 28 maschi e 18 femmine, con età media 38 ± 10 anni, di cui 20 fumatori. I soggetti sono stati esposti ad una concentrazione media di stirene ambientale pari a $135 \pm 48,2$ mg/m³. In questo gruppo, 15 lavoratori (39,5%) presentavano concentrazioni della somma di acido mandelico (AM) + acido fenilgliossilico (AFG) superiori al BEI[®] di 400 mg/g di creatinina raccomandato dalla ACGIH per campioni di fine turno.

3.9.2.4. Controlli

Il gruppo dei controlli è costituito da 38 soggetti, 27 maschi e 11 femmine, non professionalmente esposti a stirene, con età media di 40 ± 12 anni, di cui 16 fumatori.

3.9.2.5. Ex-esposti

Sono stati reclutati 17 soggetti di età media 45 ± 10 anni, tutti di sesso maschile, di cui 9 fumatori, non più esposti a stirene da almeno 3 mesi. Al momento dello studio i soggetti erano impiegati in lavori di manutenzione; precedentemente essi erano stati esposti ad alte concentrazioni di stirene in quanto addetti alla preparazione delle misture per le macchine per la laminazione di grosse superfici per camion.

3.9.2.6. Monitoraggio ambientale e biologico

Ai lavoratori professionalmente esposti a stirene è stato fornito un campionatore personale. E' stata campionata l'aria nella zona respiratoria per la durata di 6 ore. Lo stirene è stato determinato mediante gas cromatografia, come descritto in letteratura (74). Per il monitoraggio biologico dell'esposizione, a ciascun soggetto è stato chiesto di raccogliere un campione di sangue venoso periferico e un campione estemporaneo di urina, alla fine del turno lavorativo. Sono stati quindi valutati i principali metaboliti dello stirene: acido mandelico (AM), acido fenilgliossilico (AFG) e 4-vinilfenolo (4-VF).

3.9.2.7. Determinazione dello stirene nel sangue

Lo stirene nel sangue è stato determinato mediante campionamento dello spazio di testa e analisi gascromatografica come descritto in letteratura (77).

3.9.2.8. Determinazione dei metaboliti urinari dello stirene mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa

La determinazione dei metaboliti principali dello stirene, nonché dei metaboliti minori è stata effettuata mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa *tandem* (LC-MS/MS) utilizzando uno spettrometro di massa PE-Sciex a triplo quadrupolo modello API 365 (Sciex, Concord, Canada).

3.9.2.9. Determinazione degli indicatori di stress ossidativo urinari mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa

Le concentrazioni di 8-oxo-G, 8-oxo-Guo e 8-oxo-dG, escrete nelle urine in forma libera, sono state determinate mediante LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di

massa a triplo quadrupolo dotato di interfaccia TurboIonSpray (78). La separazione dei tre analiti nella stessa corsa cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna Atlantis[®]dC₁₈ (100 x 3,0 mm i.d., 3 µm, Waters) ed una fase mobile costituita da acido formico 10 mM (pH 3,75) e metanolo in gradiente di eluizione.

3.9.2.10. Determinazione di 8-idrossi-2'-deossiguanosina e 2'-deossiguanosina nei globuli bianchi

I campioni sono stati scongelati per 1 ora a temperatura ambiente e diluiti con 35 mL di una soluzione contenente cloruro di ammonio (0,9%) ed EDTA sale sodico (0,1 mM). I globuli bianchi sono stati separati per centrifugazione a 215 g per 20 minuti a 10 °C. Il pellet ottenuto è stato lavato 2 volte con la soluzione di cloruro di ammonio ed EDTA, risospeso in 0,2 ml della stessa soluzione, ed utilizzato per l'isolamento del DNA. Il DNA è stato quindi estratto con cloroformio ed il giorno seguente è stato incubato a 95 °C per 6 minuti e raffreddato in ghiaccio per 10 minuti. E' stato quindi digerito in due passaggi, inizialmente con 20 µg di nucleasi P1 (Sigma) per 30 minuti a 37 °C, e quindi con 20 µl di TRIS-HCl (pH 7,5) e 1,2 U di fosfatasi alcalina (Sigma) per 60 minuti a 37 °C. Il risultante idrolisato è stato centrifugato per 20 minuti utilizzando un filtro Microcon 3 (Amicon) per separare i nucleosidi dagli enzimi. Per evitare l'ossidazione della guanina in posizione 8 durante la preparazione del campione, il DNA ed i nucleosidi sono stati preparati al buio ed in atmosfera di argon per minimizzare il contenuto di ossigeno nelle soluzioni tampone utilizzate per l'estrazione e la digestione del DNA.

La presenza di 8-oxo-dG e dG nei linfociti è stata quantificata mediante HPLC con rivelazione, rispettivamente, elettrochimica e spettrofotometrica UV. Il risultato è stato espresso come rapporto molare 8-oxo-dG/10⁵ dG. Il metodo è stato validato mediante lo studio dell'intervallo di linearità (50-500 fmol per 8-oxo-dG e 5-70 nmol per dG), della determinazione del limite di rivelazione (1,5 residui/10⁵ dG) e della precisione analitica (*intra-day* e *inter-day*, <15%).

3.9.2.11. Caratterizzazione genotipica

Il polimorfismo del gene hOGG1 è stato determinato con metodica di PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) su DNA genomico estratto da circa 3 ml

di sangue intero. Tale polimorfismo porta alla sostituzione di una serina (Ser) con una cisteina (Cys) sul codone 326 (Ser326Cys) (79).

3.9.2.12. Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il software SPSS/PC+ (versione 14.0 per Windows). La normalità della distribuzione è stata verificata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov. Differenze tra esposti e controlli sono state valutate mediante *t*-test per dati indipendenti. L'analisi della correlazione è stata effettuata sia mediante test parametrici (correlazione di Pearson) sia mediante test non parametrici (test di Spearman).

Ai fini della valutazione degli indicatori di stress ossidativo e della loro relazione con l'esposizione a stirene, i soggetti sono stati riclassificati secondo un criterio basato sulla dose interna di stirene, tenendo conto cioè della concentrazione della somma dei metaboliti principali (AM+AFG). Sono stati riclassificati come controlli tutti i soggetti per i quali la somma AM+AFG era inferiore al 95° percentile della distribuzione di frequenza dell'indicatore nella popolazione generale, ovvero 3,5 mg/g creatinina. Il gruppo dei lavoratori con AM+AFG > 3,5 mg/g creatinina è stato quindi suddiviso, sulla base della distribuzione di AM+AFG in terzili, in tre sottogruppi di soggetti, rispettivamente a bassa, media ed alta esposizione. Le differenze fra gruppi sono state valutate mediante l'analisi della varianza a una via (*one-way* ANOVA) seguita dal test di Tukey per confronti multipli.

3.9.3. Risultati

Gli indicatori di esposizione sono risultati significativamente intercorrelati ($p < 0,0001$) con coefficiente di correlazione di Pearson, $r = 0,706$ fra stirene ematico e AM+AFG, $r = 0,609$ fra stirene ematico e 4-VF, ed $r = 0,856$ fra AM+AFG e 4-VF. La correlazione tra AM+AFG e 4-VF si manteneva significativa anche all'interno dei singoli gruppi. Inoltre, le correlazioni sono state confermate applicando test non parametrici, come la correlazione di Spearman.

3.9.3.1. Indicatori di danno ossidativo al DNA e associazione con l'esposizione a stirene

Le concentrazioni urinarie di 8-oxo-G, 8-oxo-Guo e 8-oxodG (esprese come media $\pm$ DS) erano 17.58 ± 7.07 , 5.57 ± 2.06 , 3.78 ± 1.30 $\mu\text{g/g}$ creatinina nei lavoratori e 15.50 ± 5.67 , 4.51 ± 1.47 e 3.87 ± 1.38 $\mu\text{g/g}$ creatinina nei controlli.

I lavoratori presentavano concentrazioni significativamente più basse di 8-oxo-dG nei linfociti ma più elevate di 8-oxo-Guo rispetto ai controlli, mentre non sono state riscontrate differenze significative per 8-oxo-G e 8-oxo-dG.

Applicando il test dell'ANOVA, sono state riscontrate differenze significative tra i gruppi in esame per gli indicatori 8-oxo-G ($p=0,035$) e 8-oxo-Guo ($p=0,008$), ma non per 8-oxo-dG e 8-oxo-dG/ 10^5 dG. In particolare, tali differenze riguardavano soltanto il gruppo dei controlli e quello dei soggetti ad alta esposizione sia per 8-oxo-G ($p=0,049$) che per 8-oxo-Guo ($p=0,008$).

Le distribuzioni degli indicatori di danno ossidativo sono state valutate tenendo conto del polimorfismo genetico dell'hOGG1, enzima specifico del meccanismo di riparo al DNA della guanina ossidata in posizione 8. Il contenuto delle basi ossidate nei linfociti è risultato significativamente inferiore nei soggetti con genotipo omozigote "*wild type*" rispetto ai soggetti con genotipo eterozigote o mutato ($p<0,008$, *t*-test per dati indipendenti) (**Figura 3**). Il polimorfismo dell'enzima hOGG1 non influenzava l'escrezione urinaria delle basi ossidate sulla totalità dei soggetti. Considerando i soli soggetti con genotipo "*wild type*", si è osservata una differenza significativa nelle concentrazioni urinarie di 8-oxo-G dei lavoratori rispetto ai controlli ($18,73 \pm 8,01$ vs $14,4 \pm 4,48$ $\mu\text{g/g}$ creatinina, $p=0,01$, *t*-test per dati indipendenti).

Nel sottogruppo di soggetti "*wild type*" è stato quindi studiato il comportamento degli indicatori di danno ossidativo nei linfociti e nelle urine nei quattro gruppi di soggetti classificati sulla base della dose interna di stirene. Mentre nel sangue il rapporto 8-oxo-dG/ 10^5 dG diminuiva all'aumentare dell'esposizione, anche se non in maniera significativa (ANOVA, $p=0,082$), nelle urine le concentrazioni di 8-oxo-G e 8-oxo-Guo aumentavano in maniera statisticamente significativa (ANOVA, $p=0,029$ e $p=0,001$ rispettivamente). Applicando il test di Tukey per confronti multipli, il gruppo dei controlli è risultato significativamente diverso dal gruppo ad alta esposizione per 8-oxo-G ($p=0,025$), mentre per 8-oxo-Guo il gruppo dei controlli era distinguibile dai gruppi a media ed alta esposizione (rispettivamente $p=0,030$ e $p=0,01$). Non sono state invece riscontrate differenze significative tra i diversi gruppi di soggetti esposti a stirene.

In **Figura 4** sono illustrati gli andamenti di 8-oxo-dG/10⁵ dG nei linfociti e 8-oxo-G nelle urine dei soggetti con genotipo “*wild type*” e classificati in quattro gruppi sulla base della dose interna di stirene.

3.9.4. Discussione

3.9.4.1. Monitoraggio biologico dell'esposizione a stirene

I risultati del monitoraggio ambientale e biologico dei lavoratori esposti a stirene hanno dimostrato che la classificazione effettuata *a priori* tra controlli, ex-esposti, esposti a livelli moderati di stirene (impianto A), ed esposti ad alte concentrazioni di stirene (impianto B) era sostanzialmente corretta.

Differenze significative sono state riscontrate tra i vari gruppi sia per quanto riguarda lo stirene nel sangue che per i metaboliti urinari.

In accordo con numerosi studi della letteratura, gli indicatori di esposizione sono risultati significativamente intercorrelati fra loro sia considerando tutti i soggetti insieme che all'interno dei singoli gruppi (80).

3.9.4.2. Danno ossidativo agli acidi nucleici e associazione con l'esposizione a stirene

Per la corretta interpretazione dei risultati di questo studio è necessario richiamare il significato degli indicatori studiati nelle diverse matrici. Il danno ossidativo al DNA è il risultato della combinazione di due fattori: da un lato, l'azione dell'agente ossidante che lo ha generato e, dall'altro, l'efficacia dei meccanismi predisposti alla riparazione del danno stesso. Il valore di 8-oxo-dG nei linfociti rappresenta il danno ossidativo residuo, subito e non riparato dai vari meccanismi cellulari. Elevati valori di questo indicatore si associano sia ad elevate esposizioni che ad una limitata capacità di riparazione. Mentre nel sangue l'ossidazione della guanina in posizione 8 genera un solo addotto, nelle urine non esiste un unico prodotto di eliminazione. Infatti, essendo numerosi i meccanismi di riparazione del danno al DNA attivati dalle cellule, diversi sono gli indicatori determinabili nelle urine e rappresentativi dell'ossidazione alla guanina. Elevate concentrazioni degli indicatori urinari riflettono un danno a monte elevato, ma efficacemente rimosso.

A tal proposito, un significato particolare deve essere attribuito all'8-oxo-G, che rappresenta il principale prodotto urinario in termini quantitativi, nonché il prodotto

specifico del meccanismo di riparazione per escissione di basi ad opera dell'enzima hOGG1. I livelli del danno residuo nel sangue e di 8-oxo-G nelle urine devono essere letti in modo complementare in quanto questi indicatori sono, rispettivamente, il substrato e il prodotto dell'azione dell'enzima hOGG1.

Per quanto riguarda gli altri due indicatori urinari, l'interpretazione del loro comportamento è più complessa, da un lato perchè l'origine ed il significato dell'indicatore non sono univoci (8-oxo-dG), dall'altro perché i meccanismi di riparazione dell'RNA non sono ancora ben conosciuti (8-oxo-Guo). Tuttavia, sulla base delle elevate correlazioni esistenti tra i tre indicatori urinari, è ragionevole ipotizzare che anche per l'RNA esistano analoghi meccanismi di riparazione che vengono indotti dall'esposizione a stirene.

Alla luce di queste considerazioni, i risultati di questo studio indicherebbero che l'esposizione a concentrazioni ambientali di stirene entro i limiti di accettabilità da un lato genera stress ossidativo, ma dall'altro induce i meccanismi di riparazione del danno agli acidi nucleici, come si evince dai livelli più elevati di danno ossidativo nelle urine dei lavoratori rispetto ai controlli e, viceversa, nel sangue.

Ai fini della valutazione dell'esistenza di una eventuale relazione dose-risposta tra l'esposizione a stirene e gli indicatori di stress ossidativo, i soggetti in studio sono stati riclassificati secondo un criterio basato sulla dose interna di stirene, tenendo conto cioè della concentrazione della somma dei metaboliti principali (AM+AFG). L'andamento del rapporto $8\text{-oxo-dG}/10^5 \text{ dG}$ nei quattro gruppi di soggetti sembra suggerire che ci sia una diminuzione progressiva del danno ossidativo non riparato per medie e basse esposizioni a stirene, mentre nel caso delle alte esposizioni si osserva una tendenza opposta all'aumento del danno linfocitario. Se questo risultato fosse confermato da studi su casistiche più ampie, si potrebbe ipotizzare che, per esposizioni superiori a 20-25 ppm, il danno ossidativo potrebbe prevalere sulla riparazione dello stesso, rendendo ragione dell'insorgere degli effetti genotossici dello stirene al di sopra di questa soglia.

3.9.4.3. Ruolo dell'enzima hOGG1 nella riparazione del danno ossidativo al DNA

In particolare, questo studio ha approfondito il ruolo dell'enzima hOGG1 e l'eventuale influenza del suo polimorfismo funzionale. In questo studio è stato possibile determinare negli stessi soggetti sia la quota di guanina non riparata che quella riparata dall'enzima, ovvero il rapporto $8\text{-oxo-dG}/10^5 \text{ dG}$ nei linfociti e la concentrazione di 8-oxo-G nelle urine, rispettivamente substrato e prodotto dell'enzima hOGG1.

Come atteso, il rapporto 8-oxo-dG/ 10^5 dG nei linfociti è risultato più basso nei soggetti con la variante “*wild type*”, la forma biologicamente più attiva, rispetto ai soggetti aventi le altre varianti (“*het*” e “*mut*”). Nelle urine, invece, considerando la totalità dei soggetti, non sono state riscontrate differenze fra le concentrazioni di questo indicatore in relazione al polimorfismo dell’enzima, probabilmente perché l’hOGG1 sembra essere responsabile solo in parte (25%) della concentrazione urinaria di 8-oxo-G (81).

Prendendo però in considerazione i soli soggetti con genotipo “*wild type*”, si è osservato un andamento complementare del rapporto 8-oxo-dG/ 10^5 dG nei linfociti e di 8-oxo-G nelle urine, rispettivamente substrato e prodotto dell’enzima hOGG1. All’aumentare dell’esposizione a stirene entro livelli di accettabilità, il danno non riparato sembra diminuire mentre aumenta in modo speculare il prodotto di eliminazione specifico dell’enzima hOGG1 nelle urine. In queste condizioni, i meccanismi di riparazione sembrerebbero prevalere sui meccanismi che generano il danno al DNA. Per esposizioni superiori ai limiti di accettabilità, invece, si osserva un aumento sia del danno non riparato che di quello riparato. Questo potrebbe significare che in queste condizioni prevarrebbe lo stress ossidativo, ovvero lo sbilanciamento in favore dell’azione degli agenti ossidanti rispetto alla capacità antiossidante, rendendo possibile l’insorgere di effetti genotossici dello stirene.

3.9.5. Conclusioni

Nel loro insieme, i risultati del presente studio dimostrano:

- (i) che esiste un’associazione tra l’esposizione occupazionale a stirene ed il danno ossidativo al DNA, come dimostrato dalle correlazioni tra gli indicatori di esposizione a stirene e gli indicatori di danno ossidativo al DNA; in particolare, tra gli indicatori urinari 8-oxo-Guo presenta una maggior sensibilità all’esposizione a stirene.
- (ii) che il polimorfismo dell’enzima della riparazione hOGG1 svolge un ruolo funzionale *in vivo*, modulando significativamente le concentrazioni di 8-oxo-dG nei linfociti del sangue periferico;
- (iii) che l’esposizione a stirene induce i meccanismi di riparazione del danno ossidativo al DNA e che, entro certi limiti di esposizione, l’induzione della riparazione prevale nettamente sul danno da stress ossidativo, almeno in termini di formazione di addotti alla guanina. Per esposizioni più elevate, orientativamente superiori a 20-25 ppm,

l'induzione degli enzimi della riparazione risulta insufficiente a compensare l'aumentato danno ossidativo, che pertanto aumenta in modo significativo.

4. RUOLO DEI POLIMORFISMI GENETICI NELLA PATOLOGIA MULTIFATTORIALE: L'ESEMPIO DEL MORBO DI PARKINSON

4.1. Introduzione

Il Morbo di Parkinson si presenta nel 90% dei casi in forma sporadica, come patologia multifattoriale. Lo studio di patologie multifattoriali richiede la valutazione non solo dei singoli fattori considerati, ma anche delle loro interazioni. Il limite principale di questa impostazione, oltre che nella complessità della procedura di stratificazione per i diversi genotipi e/o fenotipi, risiede nella necessità di casistiche sufficientemente numerose (nell'ordine di migliaia di individui) al fine di garantire un'adeguata stabilità statistica ai risultati. Probabilmente a causa soprattutto della scarsa numerosità delle casistiche, le ricerche epidemiologiche sin qui condotte che hanno indagato l'associazione della malattia con fattori di rischio ambientali-professionali o con i polimorfismi genetici degli enzimi della biotrasformazione, hanno prodotto risultati scarsamente riproducibile e talvolta contrastanti.

In questo capitolo sarà preso in considerazione il ruolo delle interazioni gene-ambiente nello sviluppo del Morbo di Parkinson. In tale studio, svolto in collaborazione con: Scozia, Svezia, Romania e Malta, sono stati reclutati per ciascuna nazione 200 soggetti affetti da Morbo di Parkinson e 400 controlli. Lo scopo era quello di valutare la possibile associazione tra Morbo di Parkinson con alcuni enzimi della biotrasformazione pertinenti con le esposizioni prese in esame.

4.2. Il Morbo di Parkinson

E' la seconda patologia neurodegenerativa in ordine di frequenza dopo il M. di Alzheimer (82), con una prevalenza di 1/400 per la popolazione generale e di 1/200 per i soggetti di età superiore ai 40 (83).

Nell'85% circa dei casi l'eziologia delle Sindromi Parkinsoniane è ignota; per questi pazienti si parla quindi di M. di Parkinson (MP) o Parkinsonismo Idiopatico, per differenziarlo dai Parkinsonismi Sintomatici, riconducibili ad eziologia nota.

Da un punto di vista clinico il M. di Parkinson è caratterizzato da tremore ritmico a riposo, ipertonia muscolare, bradicinesia con riduzione dell'iniziativa motoria, rallentamento e rarefazione dei movimenti spontanei.

Tali sintomi sono direttamente riconducibili ad una progressiva degenerazione neuronale a livello della *pars compacta* della Substantia Nigra mesencefalica, con conseguente riduzione dei livelli cerebrali di dopamina, principale neurotrasmettitore sintetizzato a tale livello. Maggiormente coinvolti dal processo degenerativo risultano i neuroni dopaminergici nigro-striatali con proiezioni al Putamen, al Nucleo Caudato e al

Nucleo Accubens (rispettivamente 85% e 75%), rispetto ai neuroni dopaminergici che si proiettano alle strutture corticali e limbiche

Il numero dei neuroni dopaminergici si riduce progressivamente nel corso della malattia con una velocità doppia di circa 1% all'anno, anziché dello 0.5% come nei soggetti normali (84;85). I sintomi iniziano a manifestarsi quando la deplezione dei neuroni dopaminergici supera la soglia del 70-80% a livello delle terminazioni nervose striatali e del 50-60% a livello dei pironofori nella Substantia Nigra (86).

La diagnosi istologica di M. di Parkinson si basa, oltre che sull'evidenza di una rarefazione neuronale a livello della Substantia Nigra e di altri nuclei pigmentati del sistema nervoso, sulla presenza nelle medesime aree di gliosi e dei cosiddetti corpi di Lewy, inclusioni citoplasmatiche eosinofile, in percentuale maggiore rispetto alla norma. Tali inclusi, composti da proteine caratterizzate di recente come ubiquitina ed α -sinucleina (87), acidi grassi liberi, sfingomielina e polisaccaridi, non costituiscono un reperto patognomico di M. di Parkinson, in quanto presenti, seppure in misura minore, anche in età senile ed in numerose altre patologie neurodegenerative (88).

A differenza di quanto osservato nel Parkinsonismo Postencefalico, in cui ad una rapida e massiva distruzione dei neuroni dopaminergici nigro-striatali segue un progressivo depauperamento per effetto dei normali processi dell'invecchiamento, l'accelerata degenerazione neuronale cronica che contraddistingue il M. di Parkinson potrebbe richiedere la persistenza dell'/degli agente/i causali.

Tale ipotesi sarebbe compatibile con un effetto neurotossico da xenobiotici ambientali-professionali. E' altresì possibile che l'accelerata degenerazione neuronale sia riconducibile ad un'alterazione biochimica primaria, verosimilmente su base genetica, che necessita o meno del contributo di tossici esogeni per esplicare i suoi effetti.

Si ipotizza così una patogenesi di tipo multifattoriale, in cui xenobiotici ambientali e/o professionali esplicano i loro effetti soltanto in individui geneticamente suscettibili.

L'aumentata suscettibilità potrebbe essere ricondotta ad un corredo enzimatico sfavorevole del metabolismo intermedio, implicato nella biotrasformazione, nei termini di una attivazione o inattivazione metabolica di sostanze eso-endogene. Tale condizione potrebbe condurre ad un potenziamento degli effetti neurotossici da xenobiotici anche a bassi livelli di esposizione.

4.3. FATTORI DI RISCHIO NEL MORBO DI PARKINSON

4.3.1. Fattori ambientali-professionali

La scoperta che la somministrazione accidentale di 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina (MPTP), sostanza di sintesi utilizzata per il taglio dell'eroina, è in grado di indurre nell'uomo e nei primati un parkinsonismo subacuto (89), ha fornito grande supporto all'ipotesi che il M. di Parkinson possa essere provocato da una neurotossina esogena.

Analogamente sono stati riportati in letteratura casi di parkinsonismo a seguito di esposizioni accidentali a solventi o miscele di solventi (esano, toluene, metanolo, miscele di derivati del petrolio)(90; 91; 92).

L'MPTP è in grado di indurre una degenerazione selettiva delle cellule dopaminergiche della *pars compacta* della Substantia Nigra e dell'Area Segmentale Ventrale, tramite il suo metabolita ione 1-metil-4-fenilpiridinio (MPP⁺), prodotto di ossidazione ad opera delle monoamino ossidasi B (MAO-B) eritrocitarie.

Lo ione piridinio è in grado di diffondere attraverso la membrana astrocitaria ed è accumulato all'interno delle terminazioni presinaptiche dopaminergiche per trasporto attivo ad opera del sistema di ricaptazione della dopamina. L'MPP⁺ assunto è concentrato a livello mitocondriale, ove esplica il suo effetto tossicologico di inibizione dell'enzima NADH-CoQ-1reduttasi (Complesso I) della catena respiratoria mitocondriale, con conseguente inibizione della respirazione cellulare e morte neuronale (93). L'analogia strutturale di molti composti chimici con l'MPTP (sono stati descritti oltre 100 analoghi), associata per alcuni di questi con il comune destino metabolico, con conseguente formazione di ione piridinio (94), avvalorano l'ipotesi che l'esposizione professionale o ambientale a xenobiotici possa essere determinante per l'insorgenza del M. di Parkinson.

Il Paraquat ed erbicidi a struttura simile sono stati associati come fattori di rischio al M. di Parkinson (95), anche se non mancano studi che contraddicono tale ipotesi.

Composti analoghi all'MPTP sono anche le tetraidroisochinoline (TIQ), agenti neurotossici di origine esogena ed endogena, in quanto ritrovate in una varietà di alimenti (96), e/o generate per condensazione spontanea a tipo Pictet-Spengler di amine piogene con composti organici contenenti gruppi carbonilici (metaboliti dell'alcool e di numerosi solventi organici)(97). Le TIQ sono state ritrovate nel cervello umano e sembrano indurre una deplezione di dopamina ed una inibizione dell'attività tirosino-

idrossilasica nei sistemi nigro-striatali dei primati (98). Il metabolita attivo sarebbe il prodotto di ossidazione (ad opera delle MAO-B) ione chinolinio, che è in grado di indurre una deplezione nigro-striatale di dopamina quando infuso direttamente nel cervello (99) ed è in grado di inibire la fosforilazione ossidativa (100) con meccanismo d'azione simile a quello dell'MPP+.

Benché sia generalmente accettata l'ipotesi che l'esposizione, nel corso della vita, a basse dosi di sostanze tossiche giochi un ruolo nella genesi del M. di Parkinson, in letteratura non c'è accordo sul ruolo da attribuire ai singoli fattori di rischio. In particolare è stata ripetutamente dimostrata l'associazione del M. di Parkinson con l'uso di pesticidi/erbicidi in attività agricole (95), consumo di acqua di pozzo (101), esposizione ad agenti chimici d'impiego industriale e metalli pesanti (102). Negativamente associato con la malattia è risultato ripetutamente il fumo di sigaretta, che dunque, sembrerebbe svolgere un ruolo protettivo rispetto all'insorgenza del M. di Parkinson (103).

Lo studio caso-controllo più ampio, fin qui condotto (380 casi vs. 755 controlli), ha evidenziato un'associazione significativa tra M. di Parkinson ed esposizione a pesticidi, in particolare composti organoclorati ed alchilfosfati/carbamati, in assenza di associazione con altri fattori di ambito rurale.

Fattore di rischio risulta anche l'esposizione ai conservanti del legno (blindano, pentaclorofenolo), mentre non è stata confermata l'associazione con altri tossici di origine industriale quali metalli pesanti, solventi, fumi esausti e monossido di carbonio. Tenzialmente ma non significativamente associati al M. di Parkinson sono risultati gli interventi in anestesia generale ed i traumi cranici con sintomatologia post-commotiva.

4.3.2 Fattori genetici

Il ruolo della componente genetica nella eziopatogenesi del M. di Parkinson è tuttora indeterminato. Circa il 15% dei pazienti presenta una anamnesi familiare positiva per la malattia e sono descritti in letteratura ampi "pedigree", per i quali sembra realizzarsi una trasmissione di tipo autosomico dominante a penetranza incompleta. In tre di queste ampie famiglie, una italiana e due greche, è stato identificata una mutazione a carico del gene di una proteina presinaptica - α -sinucleina-, che sembrerebbe responsabile della malattia (104). Tale mutazione non è stata dimostrata in ulteriori famiglie indagate (105), come pure in casi ad insorgenza sporadica (106).

Recentemente è stata inoltre identificata una mutazione a carico del gene della parkina come responsabile di una rara variante, particolarmente diffusa in Giappone, di Parkisonismo Giovanile, che si trasmette con modalità autosomica recessiva .

Nella maggior parte dei casi tuttavia la malattia non sembra seguire un'ereditarietà di tipo monogenico, ed infatti i tassi di concordanza per gemelli omozigoti e dizigoti sono simili (107), anche se recentemente la tomografia ad emissione di positroni (PET) con F-dopa, che consente di valutare *in vivo* la funzione nigro-striatale, ha dimostrato una concordanza del 45% tra gemelli monozigoti e del 29% tra gemelli dizigoti (108).

La possibile identificazione del(i) gene(i) responsabile è resa difficile qualora sussistano condizioni che ostacolano l'analisi di "*random linkage*", quali una penetranza incompleta del(i) gene(i), una modalità di trasmissione sconosciuta, il coinvolgimento di più loci genici, ed il fatto che vi sono poche famiglie con molti ammalati di M. di Parkinson o molte famiglie con pochi ammalati. Una strategia alternativa è quella di studiare l'associazione della malattia con il polimorfismo genetico a più loci, di possibili geni candidati, ossia geni potenzialmente rilevanti dal punto di vista patogenetico .

In tal senso è stata ripetutamente indagata l'associazione del M. di Parkinson con enzimi della biotrasformazione, implicati nella detossificazione di neurotossine esogene (MPTP, TIQ), o nel metabolismo della dopamina e/o nel mantenimento del potenziale redox intracellulare.

Il polimorfismo maggiormente indagato è stato quello del gene *CYP2D6*, che codifica per l'enzima debrisoquina idrossilasi (109). Si tratta di un enzima di fase I non inducibile, espresso a livello dei gangli della base umani ed implicato nella metabolizzazione di un gran numero di farmaci, nonché, pare, nella detossificazione delle neurotossine MPTP e TIQ (110).

E' da tempo noto il polimorfismo per l'attività debrisochino-idrossilasica, per cui il 5-10% della popolazione Caucasica mostra un fenotipo difettivo per la metabolizzazione di detta sostanza, i cosiddetti "*poor metabolisers*" (PM). Tale polimorfismo è su base genetica e dipende dall'esistenza al locus *CYP2D6* di varianti alleliche multiple, che danno luogo ad un prodotto proteico inattivo.

Un altro polimorfismo indagato è quello per il gene *NAT2*, che codifica per l'enzima di fase II N-Acetil-Transferasi di tipo 2. Si tratta di un enzima ad espressione fissa, implicato nella detossificazione delle arilamine, per il quale esiste nella popolazione Caucasica una distribuzione bimodale con un 50% circa di individui in cui l'attività

enzimatica è deficitaria (Acetilatori Lenti). Il polimorfismo riconosce una base genetica, con tre possibili varianti alleliche, tutte codificanti per un prodotto proteico inattivo (111). La condizione di Acetilatore Lento è determinata dalla coesistenza al locus *NAT2* di due alleli varianti. Uno studio condotto in Inghilterra (112) ha identificato come fattore di rischio per lo sviluppo del M. di Parkinson familiare la condizione di Acetilatore Lento definita attraverso l'analisi del polimorfismo genetico. La spiegazione biologica potrebbe risiedere in un difetto di detossificazione di metaboliti neurotossici. Altri studi hanno suggerito l'associazione tra M. di Parkinson ed alleli polimorfici per i geni degli enzimi tiroxina idrossilasi (113), MAO A (114) e MAO B (115). Tali associazioni, peraltro non confermate da indagini successive, hanno tuttavia il difetto di non essere supportate dalla rilevanza biologica del polimorfismo in studio. Detti polimorfismi, infatti, seppure pertinenti in quanto a carico di enzimi implicati nel metabolismo della dopamina, mancano di un corrispettivo funzionale alle varianti alleliche indagate, tutte caratterizzate da variazioni di sequenza nucleotidica a livello intronico, apparentemente prive di conseguenze nel rispettivo prodotto proteico.

Polimorfismi genetici potenzialmente candidati per la patogenesi del M. di Parkinson sono ancora quelli a carico di enzimi implicati nella detossificazione dei radicali liberi dell'ossigeno. La teoria patogenetica dello "stress ossidativo", quale meccanismo principale responsabile della degenerazione dei neuroni dopaminergici nigro-striatali, è basata sull'instaurarsi all'interno delle cellule nervose di uno sbilanciamento tra produzione di radicali liberi dell'ossigeno (ione idrossile $\text{OH}^\cdot$ ed anione superossido $\text{O}_2^{\cdot-}$) e meccanismi antiossidanti di difesa (116). A livello dei neuroni della SNc esisterebbe una condizione di particolare vulnerabilità selettiva allo stress ossidativo come conseguenza del normale metabolismo cellulare. La deaminazione ossidativa della dopamina ad opera delle MAO-B dà origine a perossido d'idrogeno (H_2O_2), nei confronti del quale la substantia nigra *pars compacta* (SNc) possiede ridotte capacità di difesa, sia perché la catalasi è generalmente poco espressa a livello cerebrale, sia per un difetto specifico di attività GSH-perossidasi evidenziato nelle cellule gliali adiacenti ai neuroni nigrali in degenerazione, probabilmente secondaria al deficit di GSH.

L' H_2O_2 in presenza di ione ferroso (Fe^{2+}) dà luogo al radicale $\text{OH}^\cdot$, altamente reattivo e potenzialmente citotossico, e a Fe^{3+} (ione ferrico) (Reazione di Fenton). Tale reazione è alimentata dalla rigenerazione di ione Fe^{2+} , in presenza della specie radicalica $\text{O}_2^{\cdot-}$

(reazione di Haber Weiss). La deplezione di GSH e l'accumulo di ferro già descritti a livello della SNc contribuiscono a facilitare una condizione di stress ossidativo, probabilmente scatenata dall'esposizione a fattori di rischio specifici.

L'autoossidazione spontanea della dopamina, d'altra parte, conduce alla produzione di O_2^- , chinoni e semichinoni, che sono di per sé tossici e possono contribuire alla generazione di specie reattive dell'ossigeno.

Tale condizione di particolare vulnerabilità dei neuroni nigrali allo stress ossidativo è stata dimostrata da un esperimento in topi, cui sono state somministrate basse dosi sistemiche per periodi prolungati di rotenone, un pesticida lipofilo che agisce inibendo in maniera selettiva l'attività del complesso I mitocondriale. Benché tale effetto fosse esplicito a livello sistemico, data la natura lipofila della sostanza, le uniche alterazioni indotte a livello patologico e clinico erano sovrapponibili a quelle osservate nel MP umano (117).

La teoria patogenetica dello "stress ossidativo" è supportata dal rilievo, a livello della SNc dei soggetti con MP, di numerosi prodotti dell'attacco di specie reattive dell'ossigeno alle macromolecole cellulari, come 8-idrossi-2-deossiguanosina (8-OH-2-dG), malondialdeide ed idroperossidi lipidici (118).

Un ulteriore meccanismo patogenetico, compatibile con l'instaurarsi di una condizione di "stress ossidativo" all'interno dei neuroni dopaminergici, riguarda l'alterazione del sistema di degradazione proteosomale delle proteine, che favorirebbe un loro accumulo con conseguente precipitazione a livello citoplasmatico, con effetti favorenti la degenerazione cellulare

4.4. INTERAZIONE GENE-AMBIENTE NEL MORBO DI PARKINSON. RISULTATI DELLO STUDIO EUROPEO GEOPARKINSON.

(Allegato 4: Gene-environmental interactions in parkinsonism and Parkinson's disease: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med.* 2007 Oct;64(10):673-80).

4.4.1 Scopo dello studio

Questo studio si proponeva di valutare, tramite una metodologia caso-controllo, la possibile associazione della malattia con i polimorfismi di alcuni enzimi aventi un chiaro corrispettivo funzionale in senso fenotipico, nonché le interazioni tra geni a loci diversi e tra polimorfismi e xenobiotici ambientali- professionali. (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 4).

4.4.2. Materiali e Metodi

Sono stati reclutati 959 soggetti con diagnosi di M. di Parkinson o parkinsonismo e 1989 controlli in cinque differenti nazioni Europee: Italia, Svezia, Scozia, Romania e Malta. Ad ogni soggetto è stato somministrato un questionario per indagare l'esperienza lavorativa e gli eventuali hobby per i quali ci fosse stata esposizione a solventi, pesticidi o metalli; l'utilizzo di acqua di pozzo; l'abitudine al fumo; il consumo di alcool; l'eventuale perdita di conoscenza.

La valutazione dei questionari e la stima dell'esposizione è stata condotta da un igienista industriale.

Sono stati caratterizzati su DNA genomico estratto da 1 ml di sangue intero i polimorfismi dei seguenti enzimi: CYP2D6, CYP1B1, PON1, GSTM1, GSTT1, GSTM3, GSTP1, NQO1, MAO-A, MAO-B, SOD-2, EPHX, DAT-1, DRD2 e NAT2.

In Scozia sono stati indagati i geni *CYP2D6*, *PON1*, *DAT1*, *NAT2*; in Italia i geni *CYP1B1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1*; in Svezia i geni *MAO-A*, *MAO-B*, *SOD-2*, *EPHX*, *DRD2*.

Per i geni *CYP2D6*, *PON1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTM3*, *GSTP1 ex5*, *NQO1* e *CYP1B1* sono state utilizzate metodiche già pubblicate (119-130).

Nuovi protocolli sono stati messi a punto per:

GSTP1 ex 6 con metodica di Real Time PCR (Italia)

DAT1 con metodica di PCR-RFLP (Scozia)

MAO-B con metodica per Pyrosequencing (Svezia)

SOD-2 con metodica per Pyrosequencing (Svezia)

MAO-A con primers specifici per sequenziamento (Malta)

EPHX ex3 con primers specifici per sequenziamento (Malta)

NAT-2 con primers specifici per DHPLC (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography*) (Malta).

(per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 4)

Dopo avere stilato dei criteri precisi per il trattamento dei dati derivati dai singoli questionari (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 4) sono state prese in considerazione le seguenti interazioni gene-ambiente:

- *CYP2D6*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1*, *SOD-2*, *NAT-2* e esposizione a solventi;
- *CYP2D6*, *PON1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1*, *CYP1B1*, *NAT-2* e esposizione a pesticidi;
- *GSTM1*, *CYP1B1*, *SOD-2*, *NAT-2* e esposizione a ferro;
- *SOD-2* e esposizione a rame;
- *CYP2D6*, *NQO1*, *CYP1B1*, *SOD-2* e esposizione a manganese.

Sono state prese in considerazione le seguenti interazioni gene-gene (aplotipi-metabolici):

CYP2D6 e *GSTM1*; *PON1* e *GSTM1*; *GSTT1* e *GSTM1*; *GSTP1* e *GSTM1*; *NQO1* e *GSTM1*; *NAT-2* e *GSTM1*; *CYP2D6* e *GSTT1*; *GSTP1* e *GSTT1*; *MAO-B* e *NQO1*; *MAO-B* e *DRD2A*, *MAO-B* e *DRD2B*.

Sono state analizzate le seguenti interazioni gene-gene-ambiente:

- *GSTT1* e *GSTP1* e pesticidi;
- *GSTT1* e *GSTP1* e solventi.

Le analisi per i geni *MAO-A* e *MAO-B* sono state condotte separatamente a seconda del sesso.

4.4.3. Risultati

Per una migliore visualizzazione dei risultati sono allegate le tabelle con i risultati delle analisi statistiche.(per ulteriori dettagli vedi allegato 4).

Tabella 1: Analisi dei fattori genetici (tutti i casi vs i controlli) dopo aggiustamento*

Geni	Gruppo di riferimento	Gruppo in studio	OR	95% CI	p-value
CYP2D6	*1*1	*1*4	0.90	(0.75, 1.07)	p=0.16
		*4*4	0.83	(0.55, 1.26)	
PONI L55M	M/M	L/M	0.92	(0.77, 1.09)	p=0.31
		L/L	0.90	(0.69, 1.18)	
PONI Q192R	Q/Q	Q/R	0.99	(0.83, 1.17)	p=0.67
		R/R	1.40	(0.83, 1.57)	
GSTM1	Positive	Null	1.12	(0.95, 1.31)	p=0.18
GSTT1	Positive	Null	0.93	(0.75, 1.56)	p=0.52
GSTM3	AA	AB	1.01	(0.84, 1.20)	p=0.54
		BB	0.71	(0.42, 1.22)	
GSTP1 aplotipo	AA	AB/AC/AD	0.98	(0.82, 1.16)	p=0.74
		BB/BC/CC	1.10	(0.83, 1.47)	
NQO1	*1*1	*1*2	0.95	(0.80, 1.13)	p=0.41
		*2*2	0.86	(0.55, 1.34)	
CYP1B1	*1*1	*1*3	0.95	(0.79, 1.13)	p=0.76
		*3*3	0.98	(0.77, 1.24)	
MAO-A (maschi)	T	G	1.30	(1.02, 1.66)	p=0.04
MAO-A (femmine)	TT	TG	1.06	(0.82, 1.36)	p=0.55
		GG	1.26	(0.72, 1.76)	
MAO-B (maschi)	A	G	1.09	(0.87, 1.36)	p=0.45
MAO-B (femmine)	AA	AG	1.14	(0.86, 1.51)	p=0.49
		GG	1.11	(0.79, 1.56)	
SOD2 Val ₉ Ala	AA	AV	1.00	(0.82, 1.22)	p=0.95
		VV	0.99	(0.79, 1.25)	
EPHX3 Y113H ²	YY	YH	0.89	(0.71, 1.13)	p=0.28
		HH	0.86	(0.61, 1.21)	
EPHX4 H139R	HH	HR	0.95	(0.80, 1.13)	p=0.72
		RR	1.37	(0.89, 2.10)	

Geni	Gruppo di riferimento	Gruppo in studio	OR	95% CI	p-value
<i>DAT1</i>	A/A	A/G	0.94	(0.80, 1.12)	p=0.93
		G/G	1.13	(0.82, 1.55)	
<i>DRD2A</i> ³	CC	CT	0.93	(0.74, 1.16)	p=0.26
		TT	1.42	(1.00, 2.03)	
<i>DRD2B</i> ¹	B2B2	B2B1	0.95	(0.77, 1.67)	p=0.97
		B1B1	1.27	(0.69, 2.34)	
<i>NAT2</i>	Fast/Fast	Fast/Slow	1.04	(0.87, 1.24)	p=0.97
		Slow/Slow	0.95	(0.71, 1.26)	

*regressione logistica aggiustata per età, sesso, paese, prodotti contenenti tabacco, perdita di conoscenza e familiari di primo grado con M. di Parkinson. MAO-A e MAO-B sono state presentate per femmine e maschi separatamente.

¹ Malta era esclusa dall'analisi

² Italia e Svezia erano escluse dall'analisi

³ Svezia e Malta erano escluse dall'analisi

Tabella 2: Analisi delle interazioni gene-ambiente (tutti i casi vs i controlli) dopo aggiustamento*.

Geni	Genotipi candidati	Esposizione† Bassa vs Alta	Interazione Odds Ratio (95%CI)	p value
<i>CYP2D6</i>	*4*4	Solventi	1.65 (0.37, 7.36)	0.51
<i>CYP1B1</i>	*3*3	Solventi	1.15 (0.49, 2.69)	0.75
<i>GSTM1</i>	Null	Solventi	1.76 (0.91, 3.41)	0.09
<i>GSTT1</i>	Null	Solventi	0.81 (0.35, 1.89)	0.63
<i>GSTM3</i>	AB/BB	Solventi	0.93 (0.45, 1.91)	0.84
<i>GSTP1</i> aplotipo	AB, AC, AD, BB, BC, CC	Solventi	1.53 (0.79, 2.96)	0.21
<i>NQO1</i>	*1*2/*2*2	Solventi	0.54 (0.27, 1.11)	0.09
<i>SOD2</i> Val ⁹ Ala	AV	Solventi	1.74 (0.72, 4.23)	0.46
	VV	Solventi	1.60 (0.60, 4.24)	
<i>NAT2</i>	FS/SS	Solventi	2.31 (0.61, 8.77)	0.22
<i>CYP2D6</i>	*4*4	Pesticidi	1.61 (0.40, 6.46)	0.50
<i>PONI L55M</i>	LM/LL	Pesticidi	4.43 (0.88, 22.31)	0.07

Geni	Genotipi candidati	Esposizione† Bassa vs Alta	Interazione Odds Ratio (95%CI)	p value
<i>PON1 Q192R</i>	QR/RR	Pesticidi	1.56 (0.70, 3.44)	0.27
<i>GSTM1</i>	Null	Pesticidi	0.65 (0.29, 1.43)	0.28
<i>GSTT1</i>	Null	Pesticidi	1.29 (0.42, 3.94)	0.65
<i>GSTM3</i>	AB/BB	Pesticidi	1.41 (0.60, 3.30)	0.43
<i>GSTP1 aplotipo</i>	AC/AD/BC/CC	Pesticidi	2.47 (0.63, 9.73)	0.20
<i>NQO1</i>	*1*2/*2*2	Pesticidi	1.20 (0.54, 2.66)	0.66
<i>CYP1B1</i>	*3*3	Pesticidi	0.57 (0.18, 1.91)	0.37
NAT2	FS/SS	Pesticidi	1.70 (0.48, 6.07)	0.42
<i>GSTM1</i>	Null	Ferro	0.94 (0.48, 1.83)	0.85
<i>CYP1B1</i>	*3*3	Ferro	1.53 (0.61, 3.83)	0.37
<i>SOD2 Val₉Ala</i>	AV	Ferro	0.67 (0.29, 1.55)	0.64
	VV	Ferro	0.75 (0.31, 1.84)	
<i>NAT2</i>	FS/SS	Ferro	1.45 (0.39, 5.40)	0.58
<i>SOD2 Val₉Ala</i>	AV	Rame	0.78 (0.30, 2.04)	0.66
	VV	Rame	1.20 (0.40, 3.55)	
<i>CYP2D6</i>	*4*4	Manganese	1.27 (0.28, 5.80)	0.76
<i>NQO1</i>	*1*2/*2*2	Manganese	1.09 (0.53, 2.22)	0.82
<i>CYP1B1</i>	*3*3	Manganese	1.75 (0.68, 4.52)	0.25
<i>SOD2 Val₉Ala</i>	AV	Manganese	0.75 (0.31, 1.82)	0.60
	VV	Manganese	1.13 (0.44, 2.92).	

*regressione logistica aggiustata per età, sesso, paese, prodotti contenenti tabacco, perdita di conoscenza e familiari di primo grado con M. di Parkinson. MAO-A e MAO-B sono state presentate per femmine e maschi separatamente.

† cut-offs per bassa/alta esposizione:

solventi/ferro/manganese: 20% del OEL (AAI)

pesticidi/rame: 2% del OEL (AAI)

Tabella 3: Analisi delle interazioni gene-gene (tutti i casi vs i controlli) dopo aggiustamento*

Interazioni gene-gene		Interazione Odds Ratio (95%CI)	p value
CYP2D6	GSTM1	0.68 (0.30, 1.56)	0.37
PON55	GSTM1	0.80 (0.48, 1.34)	0.40
PON192	GSTM1	0.88 (0.64, 1.22)	0.45
GSTT1	GSTM1	1.17 (0.76, 1.80)	0.47
GSTM3	GSTM1	0.75 (0.52, 1.09)	0.13
GSTP1 aplotipo	GSTM1		
AB/AC/AD vs. AA	Null vs. Pos	0.88 (0.62, 1.24)	0.48
BB/BC/CC vs. AA	Null vs. Pos	1.23 (0.69, 2.19)	
NQO1	GSTM1	0.96 (0.70, 1.35)	0.82
NAT2	GSTM1	1.17 (0.67, 2.04)	0.58
CYP2D6	GSTT1	1.21 (0.36, 4.10)	0.76
GSTP1 aplotipo	GSTT1		
AB/AC/AD vs. AA	Null vs. Pos	1.11 (0.70, 1.74)	0.70
BB/BC/CC vs. AA	Null vs. Pos	1.38 (0.63, 3.01)	
MAO-B (solo maschi)	NQO1	0.98 (0.62, 1.57)	0.95
MAO-B (solo femmine)	NQO1		
AG vs. AA		0.93 (0.52, 1.67)	0.87
GG vs. AA		0.83 (0.40, 1.69)	
MAO-B (solo maschi)	DRD2A ²	1.51 (0.55, 4.15)	0.43
MAO-B (solo femmine)	DRD2A ²		
AG vs. AA		0.71 (0.23, 2.21)	0.79
GG vs. AA		0.99 (0.26, 3.74)	
MAO-B (solo maschi)	DRD2B ¹	0.65 (0.37, 1.15)	0.14
MAO-B (solo femmine)	DRD2B ¹		
AG vs. AA		1.01 (0.50, 1.99)	0.37
GG vs. AA		0.58 (0.24, 1.39)	

* regressione logistica aggiustata per età, sesso, paese, prodotti contenenti tabacco, perdita di conoscenza e famigliari di primo grado con M. di Parkinson.

1 Malta esclusa

2 Malta e Svezia escluse.

Dopo analisi statistica alcuni dei polimorfismi studiati per alcune nazioni risultavano non essere in equilibrio di Hardy-Weinberg: EPHX per Svezia e Italia; DRD2A per

Svezia e Malta; DRD2B per Malta. Per tali motivi questi polimorfismi non sono stati analizzati sul totale dei soggetti in studio ma, indagati singolarmente per ciascuna nazione.

Per la maggior parte dei polimorfismi genetici indagati sulla totalità dei casi (parkinsonismi e M. di Parkinson), non c'era evidenza di alcuna associazione con il rischio di sviluppare Morbo di Parkinson, con l'unica eccezione del gene MAO-A nei maschi, la cui mutazione correlava significativamente con il rischio di sviluppare la malattia [OR 1.30, 95% CI 1.02-1.66, $p=0.04$; (dati corretti per: età, fumo, stati di incoscienza e casi familiari di M. di Parkinson)]. Questa associazione perdeva di significatività quando venivano considerati solo i casi di M. di Parkinson [OR 1.25, 95% CI 0.97-1.61, $p=0.09$] (**Tabella 6**)

Nessuna delle interazioni gene-ambiente indagate sulla totalità dei casi (parkinsonismi e M. di Parkinson), raggiungeva la significatività, anche se alcune di queste interazioni potrebbero essere maggiormente indagate in ulteriori studi: GSTM1 e esposizione a solventi [OR 1,76,(95% CI 0.91-3.41, $p=0.09$]; NQO1 ed esposizione a solventi [OR 0.54, 95% CI 0.27-1.11, $p=0.09$]; PON55 ed esposizione a pesticidi [OR 4.43, 95% CI 0.88-22.31, $p=0.07$];(dati corretti per: sesso, età, fumo, stati di incoscienza e casi familiari di M. di Parkinson).

Quando nell'analisi statistica per le stesse interazioni gene-ambiente, venivano presi in considerazione solo i casi di M. di Parkinson solo l'interazione GSTM1 e solventi acquistava significatività statistica [OR 2.34, 95% CI 1.08-4.62, $p=0.03$; (dati corretti per: sesso, età, fumo, stati di incoscienza e casi familiari di M. di Parkinson)].(**Tabella 7**)

Nessuna delle interazioni gene-gene, indagate sulla totalità dei casi, così come solo nei casi di M. di Parkinson, presentava risultati significativi.(**Tabella 8**)

Nessuna delle associazioni gene-gene-ambiente (GSTT1/GSTP1 aplotipo e solventi; GSTT1/GSTP1 aplotipo e pesticidi) indagate sulla totalità dei casi e nei soli casi di M. di Parkinson, mostrava alcun evidente effetto. (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 4).

Per la completezza dei risultati sottolineo che è stato pubblicato dallo stesso gruppo, sulla stessa coorte di soggetti, un altro studio in cui sono stati presi in considerazione solo i fattori di rischio ambientale e non gli aspetti genetici. Per il contesto di questa tesi, inerente soprattutto al ruolo dei polimorfismi genetici, ne tralascio la discussione e

rimando l'eventuale interesse all'articolo stesso: **Environmental risk factors for Parkinson's disease and parkinsonism: the Geoparkinson study.** *Occup Environ Med.* 2007 Oct;64(10):666-72.

4.4.4. Discussione e Conclusioni

Rispetto a quelle che erano le aspettative, soprattutto per la numerosità della popolazione presa in esame, i risultati attesi da questo studio non sono stati confermati. Infatti, nessuno dei geni considerati, con l'unica eccezione della MAO-A, risultava modificare il rischio di sviluppare il Morbo di Parkinson. Inoltre, sulla totalità dei casi, nessuna delle interazioni gene-ambiente prese in considerazione risultava significativamente associata allo sviluppo del M. di Parkinson. Solo limitatamente al gruppo di soggetti con M. di Parkinson, gli individui con genotipo GSTM1 *null* presentavano un rischio maggiore, rispetto agli individui GSTM1 *positive*, di sviluppare la malattia in seguito ad alta esposizione a solventi (131).

Molti di questi geni risultavano non essere in equilibrio di Hardy-Weinberg. Le possibili spiegazioni a tale risultato possono essere diverse, dall'errore di laboratorio ad una selezione naturale all'interno della popolazione stessa e riuscire a dare una spiegazione è alquanto difficile.

In letteratura è possibile trovare un elevato numero di studi in cui è messo in evidenza il ruolo dei polimorfismi genetici nel modificare il rischio di sviluppare tale patologia. Studi che in realtà riguardano spesso piccole casistiche. E' possibile quindi che tali associazioni siano in realtà casuali.

Questo risulta al momento uno dei maggiori studi, in termini di numerosità di casistica sul Morbo di Parkinson, ed una delle possibili spiegazioni a questa mancanza di associazioni potrebbe risiedere nella parzialità della ricostruzione dell'esposizione, fatta utilizzando il questionario e quindi per forza di cose retrospettiva, ed anche nei bassi livelli di esposizione a cui i soggetti in studio sono stati esposti, sia per motivi professionali che per hobby. Un'altra possibile spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che le cause genetiche siano comunque più importanti ed influenti nel modificare il rischio di Morbo di Parkinson rispetto ai soli polimorfismi i quali, molto probabilmente, possono contribuire allo sviluppo della patologia, ma solo quando l'esposizione ai tossici in esame risulta più elevata. (per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 4).

5. ESPRESSIONE GENICA NEL TUMORE POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE (NSCLC)

5.1.Introduzione

Il tumore polmonare rappresenta la principale causa di morte per tumore nei paesi occidentali a causa della sua elevata frequenza e scarsa curabilità, che è rimasta invariata (6-15%) negli ultimi 40 anni. Solo nel 15% dei casi la diagnosi posta in stadio precoce consente un miglioramento della prognosi. Il carcinoma non a piccole cellule (Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) rappresenta circa il 75-80% di tutti i casi di carcinoma polmonare, ed è riconducibile a tre istotipi principali:

1- il Carcinoma Epidermoidale o squamoso costituito da cellule tumorali che ricordano quelle di rivestimento della parte più esterna della pelle. Si tratta di un tumore centrale, legato al fumo, che risponde meno di tutti alla chemio-radioterapia, ma è quello che meglio guarisce dopo intervento chirurgico.

2- l' Adenocarcinoma che si sviluppa dalle cellule specializzate nella secrezione del muco bronchiale. E' una forma spesso periferica (cioè parte dai bronchi piccoli e a volte dagli alveoli), ed è meno legata al fumo. E' più frequente nelle donne ed è un po' più responsiva alla chemio-radioterapia del carcinoma epidermoidale, ma è più difficile da curare chirurgicamente.

3- il Carcinoma Indifferenziato a Grandi Cellule comprende quei carcinomi non a piccole cellule che non possono essere classificati come epidermoidali o adenocarcinomi. Presenta caratteristiche cliniche intermedie ai due istotipi precedenti.

La prognosi dello NSCLC è fra le più infauste (in media solo il 10-15% dei pazienti sopravvive a 5 anni dalla diagnosi) e sfortunatamente, alla diagnosi, la maggior parte dei pazienti si presenta in stadio localmente avanzato o metastatico.

Le anomalie molecolari presenti nel tumore polmonare avanzato sono ben caratterizzate ed alcune di queste si riscontrano già nelle fasi precoci della cancerogenesi polmonare. Tra queste una varietà di alterazioni genetiche, comprendenti mutazioni a carico di protooncogeni (p53, k-ras), inattivazione del gene FHIT ed aberrazioni cromosomiche, risultano frequentemente associate al tumore polmonare. E' frequente anche il riscontro di alterazioni dell'espressione genica di molti geni legati a diversi "pathway" metabolici e cellulari.

Frequenti sono gli studi che attestano un'alterata espressione di proto oncogeni quali per esempio l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR) o l'*v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2* (HER-2). Tali recettori rivestono un ruolo chiave nella determinazione del comportamento della cellula maligna in varie neoplasie umane attraverso fenomeni di induzione della proliferazione cellulare, diminuzione dell'apoptosi, aumento della motilità cellulare e angiogenesi.(132, 133, 134).

Recenti lavori hanno messo in relazione l' aumento dello stress ossidativo intracellulare con l'instaurarsi del processo cancerogeno, in seguito a repressione genica di enzimi deputati all'eliminazione di specie ossigeno reattive (ROS).(135, 136, 137). Tra gli enzimi maggiormente studiati particolare importanza è rivestita dall'*eme ossigenasi 1* (HO-1), enzima inducibile sintetizzato in risposta a diversi stimoli di natura metabolica, fisica o ambientale, associati a stress ossidativo ed infiammazione, come precedentemente descritto e dagli enzimi *superossido dismutasi 1* (SOD-1) e *superossido dismutasi* (SOD-2), che si trovano nella cellula rispettivamente a livello citoplasmatico e all'interno dei mitocondri. La loro attività è rivolta alla trasformazione dello ione superossido, prodotto in seguito a stress ossidativo, in acqua ossigenata ed ossigeno, impedendone in tal modo la capacità di attaccare le macromolecole cellulari, danneggiandole (138, 139).

Particolare interesse nello sviluppo del processo cancerogeno è ultimamente rivolto all'*aryl hydrocarbon receptor* (AhR). E' una proteina citoplasmatica legata ad una "heat shock protein" 90, la cui espressione è indotta in risposta ad esposizioni ad idrocarburi policiclici aromatici (IPA). In presenza di IPA il recettore si libera dal complesso, viene attivato per fosforilazione ad opera di una tirosino-chinasi e trasloca nel nucleo legato all'IPA dove si lega ad una seconda proteina l' *aryl receptor hydrocarbon nuclear translocator* (ARNT). Tale eterodimero si lega a sua volta a sequenze regolatorie XRE (*Xenobiotic Responsive Elements*) di alcuni geni implicati nella biotrasformazione, delle sostanze tossiche, quali *CYP1A1*, *CYP1B1*, *CYP1A2*, inducendone l'espressione. Oltre a tale funzione è stata ultimamente evidenziata anche un'attività regolatoria dell'AhR sul ciclo cellulare.(140, 141).

Nello sviluppo del tumore polmonare rivestono particolare importanza gli inquinanti dell'aria presenti sia negli ambienti di lavoro che di vita per i numerosi effetti biologici nocivi che possono provocare. Tali effetti possono essere condizionati dal tipo di inquinanti presenti, dalle loro concentrazioni e dalle possibili loro interazioni.

Un ruolo particolarmente rilevante nello sviluppo di tale patologia sembra possa essere rivestito da numerosi elementi metallici presenti nell'atmosfera, immessi nell'ambiente dalle lavorazioni industriali, dai gas di scarico degli autoveicoli, dagli impianti di riscaldamento etc. Molti di questi sono classificati dalla IARC (*International Agency for Research on Cancer*) come cancerogeni umani certi. Il meccanismo d'azione può essere genotossico diretto (DNA cross-link), epigenetico (modificazioni post-traduzionali di proteine) o indiretto attraverso la generazione di radicali liberi dell'ossigeno, in grado di indurre stress ossidativo con conseguente danno ai sistemi biologici. (136, 142, 143).

5.2. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI GENI CRITICI IMPLICATI NELLA PATOGENESI DEL TUMORE POLMONARE NON A PICCOLE CELLULE (NSCLC). (dati non pubblicati).

5.2.1.Scopo dello studio

Individuare marcatori precoci di tumore polmonare, su una coorte di soggetti affetti da NSCLC al I o II stadio operabile. A tale scopo sono state valutate le espressioni di geni implicati in diversi “pathway” metabolici e cellulari. Oltre, alla quantificazione dei trascritti sono stati valutati anche diversi metalli, quali indicatori di dose al bersaglio

5.2.2. Materiali e Metodi

5.2.2.1. Soggetti

Sono stati reclutati 49 soggetti (37 maschi) afferenti all'UO di Chirurgia Toracica dell'Azienda Ospedaliera di Parma con sospetto tumore polmonare, con le seguenti diagnosi istopatologiche: (i) tumore polmonare non a piccole cellule (NSCLC): 38 soggetti (78%), di cui 17 (45 %) carcinomi squamocellulari, 20 (53 %) adenocarcinomi (ADK), 1 (2%) carcinoma indifferenziato; (ii) tumore polmonare a piccole cellule (SCLC): 2 soggetti (4%); (iii) metastasi polmonari di tumori in altre sedi: 3 soggetti; (iv) noduli polmonari benigni: 6 soggetti.

5.2.2.2. Elaborazione e somministrazione di un questionario strutturato

E' stato elaborato un questionario strutturato per la raccolta di informazioni socio-demografiche, sulle abitudini voluttuarie e sull'esposizione a fattori di rischio ambientali-professionali specifici per il tumore polmonare.

5.2.2.3. Espressione di trascritti

L'RNA totale è stato estratto dalle biopsie polmonari (tessuto neoplastico e peritumorale apparentemente indenne) risospeso in acqua, digerito con DNasi I, quantificato con sonda RiboGreen e valutato tramite elettroforesi su gel d'agarosio. L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA con random decamers (2.5 µM) e Superscript II, in un volume di 20 µl. Le reazioni di PCR quantitativa in tempo reale, in duplicato per ciascun campione, sono state eseguite su termociclatore con chimica SybrGreen per i geni *HO-1*, *EGFR*, *HER-2* e con sonde specifiche marcate all'estremità 5' con fluoresceina per i geni *SOD-1*, *SOD-2* e *AhR*. La stima dell'espressione per i geni

HO-1, *EGFR*, *HER-2* è stata ottenuta dopo normalizzazione rispetto ai geni di controllo $\beta 2$ - microglobulina ($\beta 2M$), succinato deidrogenasi, subunit A (SDHA), ipoxantina fosforibosil transferasi 1 (HPRT), proteina ribosomiale L13 (RPL13) con algoritmo *geNorm* per Microsoft ExcelTM. La stima dell'espressione per i geni *SOD-1*, *SOD-2* e *AHR* è stata ottenuta dopo normalizzazione rispetto ai geni di controllo succinato deidrogenasi, subunità A (SDHA), ipoxantina fosforibosiltransferasi 1 (HPRT), proteina ribosomiale L13 (RPL13), fosfoglicerato chinasi 1 (PGK1) con algoritmo *geNorm* per Microsoft ExcelTM.

5.2.2.4. Stima della dose al bersaglio di cancerogeni polmonari

In tale studio le concentrazioni tissutali di cromo (Cr), rame (Cu), manganese (Mn), piombo (Pb), e ferro (Fe) sono state valutate in 30 soggetti (28 affetti da tumore polmonare, 2 con lesioni non tumorali), tramite spettroscopia in assorbimento atomico in accoppiamento elettrotermico (ETAAS) con effetto Zeeman con SpectrAA 220Z (Varian, Palo Alto, USA). L'analisi è stata eseguita con metodo di calibrazione esterna usando il materiale di riferimento del National Institute of Standard and Technology (Gaithersburg; USA). Le concentrazioni tissutali dei metalli sono state espresse, dopo opportune diluizioni, in $\mu\text{g/g}$ di tessuto secco.

5.2.3. Risultati

Sul totale dei tessuti tumorali analizzati i valori dell'espressione dei geni *AhR*, *EGFR*, *HER-2*, *SOD-1*, *SOD-2* ed i valori delle concentrazioni tissutali dei metalli Cr, Cu, Mn, Pb e Fe risultavano distribuiti normalmente, e dunque sono stati analizzati, per il confronto tra tessuto tumorale e tessuto sano tramite test *t* di Student per dati appaiati. L'unica eccezione era rappresentata dal gene *HO-1* i cui valori, distribuiti non normalmente, hanno richiesto l'utilizzo del test di Wilcoxon.

Sul totale dei tessuti analizzati, l'espressione del gene *AhR* era significativamente più elevata nel tessuto sano rispetto al tessuto malato (media 0.350 ± 0.11 vs 0.194 ± 0.11 , $p=0.000$), così come l'espressione del gene *SOD-1* (media 0.17 ± 0.030 vs 0.13 ± 0.055 , $p=0.003$) e del gene *SOD-2* (media 0.28 ± 0.137 vs 0.18 ± 0.11 , $p=0.002$) (**Tabella 9**).

L'espressione del gene *HO-1* risultava significativamente maggiore nel tessuto sano rispetto al malato (mediana 0.164 (0.13 - 0.21) vs 0.103 (0.06 - 0.14)) (**Tabella 9**).

Sempre sul totale dei tessuti analizzati solo i metalli Cu e Mn presentavano una maggiore concentrazione nel tessuto malato rispetto a quello sano ai limiti della significatività (media 5.68 ± 3.003 vs 4.47 ± 2.04 , $p=0.32$; media 1.29 ± 0.63 vs 1.01 ± 0.81 , $p=0.63$) (**Tabella 10**).

Valutando gli stessi campioni suddivisi per i due istotipi, squamocellulare e adenocarcinoma, si evidenziava un aumento significativo dell'espressione dell'*EGFR* nel tessuto malato normalizzato per l'espressione dello stesso gene nel tessuto sano nell'istotipo squamocellulare rispetto all'istotipo adenocarcinoma (mediana 1.59 [$0.99-2.93$] vs 0.71 [$0.53-1.08$], $p=0.019$).

In modo ancora più evidente si evidenziava un aumento significativo dell'espressione dell'*HER-2* nel tessuto malato dell'istotipo adenocarcinoma rispetto al tessuto malato dell'istotipo squamocellulare (mediana 0.377 [$0.24-0.51$] vs 0.10 [$0.069-0.13$], $p=0.000$) ed ancora un aumento dell'espressione dell'*HER-2* nel tessuto malato normalizzato per il tessuto sano nell'istotipo adenocarcinoma rispetto al tessuto malato normalizzato per il tessuto sano nell'istotipo squamocellulare (mediana 1.06 [$0.61-2.81$] vs 0.46 [$0.32-1.13$], $p=0.019$). Inoltre, ma non in modo significativo, l'espressione dell'*HER-2* aumentava nel tessuto sano dell'istotipo adenocarcinoma rispetto al tessuto sano dell'istotipo squamocellulare (mediana 0.291 [$0.21-0.5$] vs 0.192 [$0.09-0.28$], $p=0.073$), (**Tabella 11**).

Per quanto riguarda le concentrazioni tissutali dei metalli nei due distinti istotipi, vi era un aumento significativo del Cu nel tessuto malato normalizzato per il tessuto sano nell'istotipo squamocellulare rispetto all'istotipo adenocarcinoma (mediana 1.61 [$1.18-2.34$] vs 1.09 [$0.75-1.32$], $p=0.007$) ed una tendenza alla significatività per l'aumento del Cu nel tessuto malato dell'istotipo squamocellulare rispetto al tessuto malato dell'istotipo adenocarcinoma (mediana 5.40 [$4.4-8.15$] vs 4.60 [$3.10-5.70$], $p=0.095$). (**Tabella 12**).

5.2.4. Discussione e Conclusioni

I radicali liberi e le specie ossigeno reattive (ROS) sono noti per essere in grado di indurre danno alle macromolecole cellulari (DNA, proteine) contribuendo in tal modo alla trasformazione cellulare ed allo sviluppo di patologie maligne, quali il cancro. Le principali difese della cellula nei confronti delle specie ossigeno reattive, derivano

dall'attività di diversi enzimi antiossidanti. Tra questi le superossido dismutasi rivestono senza dubbio un ruolo fondamentale, catalizzando la dismutazione dell' $O_2^{\cdot-}$ in O_2 e H_2O_2 . Nell'uomo si conoscono tre isoforme: la citosolica Cu,Zn SOD (SOD-1), la mitocondriale Mn SOD (SOD-2) e la extracellulare EC-SOD. Negli ultimi anni il ruolo degli enzimi antiossidanti, ed in particolar modo quello delle SODs, nella patologia tumorale ha ricevuto particolare attenzione. Diversi lavori hanno evidenziato differenze nella attività enzimatica delle SODs tra tessuto sano e tessuto malato, il più delle volte con risultati contrastanti. Bostwick et al. (144) trovano un decremento nell'attività delle SODs del tessuto malato rispetto a quello sano nel tumore alla prostata. Bakan et al. (145) mostrano livelli più bassi di SODs in soggetti con leucemia linfoide acuta rispetto a soggetti sani. Kaynar et al. (146) trovano una aumentata attività delle SODs in soggetti con NSCLC rispetto ai controlli mentre, al contrario, Ho et al. (147) riscontrano una diminuzione nell'attività delle SODs in soggetti con cancro al polmone, rispetto a soggetti sani.

In questo studio è stata messa in evidenza la significativa depressione dell'espressione genica della Cu, Zn SOD, e della Mn SOD nel tessuto tumorale rispetto al sano, con conseguente riduzione dell'attività enzimatica e probabile aumento delle specie ossigeno reattive all'interno della cellula. Tale meccanismo porterebbe danni a carico delle macromolecole cellulari, quali DNA e proteine, responsabili di molte proprietà della cellula tumorale. In aggiunta la riduzione dell'attività delle SODs può promuovere la crescita del tessuto tumorale e la sua infiltrazione nel tessuto circostante, promuovendo fenomeni di invasione e metastasi.

Anche l'*eme-ossigenasi* (HO-1) è un enzima antiossidante microsomiale di fondamentale importanza nella difesa cellulare nei confronti delle ROS. Catalizza la degradazione ossidativa dell'eme a biliverdina, con rilascio di monossido di carbonio (CO) e ferro (Fe^{2+}), prodotti con proprietà antiossidanti e antinfiammatorie. Di esso, sono note tre isoforme, codificate da altrettanti geni: *HO-1*, *HO-2* e *HO-3*. L'isoforma HO-1 è inducibile e viene sintetizzata in risposta a diversi stimoli associati a stress ossidativo ed infiammazione. Numerosi dati sperimentali suggeriscono che l'attività eme-ossigenasica sia in grado di proteggere cellule e tessuti da risposte infiammatorie eccessive.

Anche per tale enzima, in questo studio, è stata evidenziata una repressione della trascrizione genica nel tessuto tumorale rispetto a quello sano con probabile

conseguente aumento di stress ossidativo intracellulare e successivi danni a carico della cellula.

Inizialmente l'AhR era considerato un enzima sintetizzato in risposta ad esposizioni a xenobiotici, in particolare ad IPA. Negli ultimi anni tuttavia molti lavori hanno dimostrato un ruolo fondamentale dell'AhR nella regolazione di diverse funzioni cellulari, in modo particolare nella regolazione del ciclo cellulare. Topi "*knockout*" per AhR evidenziano un'iperplasia dell'epidermide, un'iperproliferazione dell'angiogenesi epatica e una maggiore incidenza, età dipendente, di adenocarcinoma del fegato e del polmone. La repressione dell'espressione del gene *AhR* evidenziata, nel nostro studio, nel tessuto tumorale rispetto al tessuto sano metterebbe in evidenza un'alterazione del controllo del ciclo cellulare, caratteristica preponderante della cellula tumorale.

Inoltre la presenza di una maggior concentrazione di due metalli di transizione come Cu e Mn nel tessuto malato rispetto a quello sano, in grado di generare specie ossigeno reattive, associata ad una depressione dell'espressione di geni ad attività antiossidante, quali *SOD-1*, *SOD-2* e *HO-1* potrebbe ulteriormente aumentare lo stress ossidativo intracellulare, favorendo in tal modo il processo cancerogeno.

L'*EGFR* e l'*HER-2* sono proteine recettoriali costituite da un dominio extracellulare glicosilato, da un dominio idrofobico transmembrana ed da un dominio intracitoplasmatico contenente una tirosin chinasi. Il legame con il ligando causa autofosforilazione del dominio intracitoplasmatico e conseguente avvio dell'attività tirosin chinasi con innesco di una cascata di reazioni, che portano a fenomeni quali induzione della proliferazione cellulare, diminuzione dell'apoptosi, aumento della motilità cellulare e angiogenesi.

Numerosi studi hanno messo in evidenza l'aumentata espressione sia dell'*EGFR* che dell'*HER-2* nel tumore polmonare. Nel nostro studio troviamo un aumento dell'espressione dell'*EGFR* nel tessuto malato rispetto al tessuto sano nell'istotipo squamocellulare ed un aumento dell'*HER-2* nell'istotipo adenocarcinoma rispetto allo squamocellulare. Tali risultati sembrano compensarsi l'un l'altro e giustificerebbero gli sforzi volti alla ricerca di chemioterapici in grado di bloccare l'attività tirosin-chinasi di tali proteine (Cetuximab, Erlotinib, Gefitinib etc.).

5.3. Progetti futuri

Questi primi e interessanti risultati rappresentano la base di partenza per i prossimi approfondimenti ed obiettivi futuri, i quali prevederanno:

- Valutazione del ruolo di polimorfismi genetici pertinenti, sia in relazione all'accumulo dei metalli evidenziato nei tessuti in oggetto, che in relazione alle variazioni di espressione dei geni analizzati.
- Valutazione dell'espressione dei geni analizzati a livello tissutale anche nel sangue periferico degli stessi soggetti, per confermare l'utilizzo di una matrice molto più accessibile, quale il sangue, come surrogato dell'organo bersaglio.
- Caratterizzazione dei meccanismi alla base della depressione dell'espressione dei geni analizzati. Uno dei possibili meccanismi imputabili di tale fenomeno potrebbe essere rappresentato dalla metilazione del promotore. In vari tipi di tumori è stato infatti ampiamente dimostrato che la trascrizione di molti geni è alterata in seguito al legame di un gruppo metile $-CH_3$ in posizione C5 delle citosine presenti nelle cosiddette "CpG islands", regioni presenti nelle zone regolatrici della maggior parte dei geni.
- Valutazione e quantificazione dell'espressione dell'RNA circolante nel plasma, presumibilmente di origine tumorale, per confermare le medesime alterazioni genetiche evidenziate nella neoplasia.
- Quantificazione del DNA circolante presumibilmente di origine tumorale da poter utilizzare come indicatore precoce di diagnosi di cancro al polmone.

6. CONCLUSIONI FINALI

In conclusione, le esperienze accumulate nel corso del dottorato di ricerca mi inducono a trarre le seguenti conclusioni sull'applicazione delle tecniche di biologia molecolare per lo studio delle interazioni gene-ambiente a fini preventivi:

1. Lo studio del ruolo dei polimorfismi genetici nella modulazione del rischio di malattia tramite indagini di tipo retrospettivo caso-controllo, benchè utile per la generazione di ipotesi da validare successivamente, è limitato dai seguenti fattori:
 - 1.1 Bassa penetranza dei polimorfismi genetici, ossia delle relazioni tra gli stessi ed i fenotipi ad essi associati.
 - 1.2 Parzialità della ricostruzione dell'esposizione che, sia nel caso dei polimorfismi metabolici, che in quelli degli enzimi della riparazione è critica per la specificità delle interazioni enzima-substrato e per la specificità del danno genotossico e del relativo sistema di riparazione di volta in volta implicato;
 - 1.3 Difficoltà analoghe esistono nella caratterizzazione di altre esposizioni di tipo ambientale-professionale che possono avere effetti interferenti (inibizione-potenziamento) sull'attività enzimatica di cui si studia il polimorfismo;
 - 1.4 Molteplicità dei passaggi fisiopatologici intermedi tra l'interazione enzima-substrato nel caso dei polimorfismi metabolici e l'interazione enzima-danno genotossico nel caso dei polimorfismi degli enzimi della riparazione che possono confondere i risultati delle associazioni trovate tra polimorfismo e malattia.
2. In conseguenza delle difficoltà di cui ai punti 1.2 e 1.3 potrebbe essere lecito lo studio della pura associazione tra malattia e polimorfismi, che potrebbero essere utilizzati come marcatori indiretti di esposizioni pertinenti.
3. Tutte le limitazioni riportate al punto 1, con l'eccezione della penetranza, che è una caratteristica intrinseca del polimorfismo, possono essere attenuate in situazioni sperimentali *in vitro* (studi su colture cellulari) ed *in vivo* (studi sperimentali, semi-sperimentali, studi trasversali), in cui vengano testate ipotesi specifiche di interazione enzima-substrato con adeguato controllo dei fattori interferenti/confondenti.

4. Lo studio dell'espressione genica nell'uomo richiede un attento controllo delle variabili interferenti-confondenti, soprattutto per geni la cui attività è regolata da più fattori. I profili di espressione genica specifici di tessuti patologici rispetto a tessuti di controllo possono essere utili a scopo diagnostico. Per l'utilizzazione degli stessi a scopo preventivo è necessario verificare che essi siano espressi anche in tessuti/fluidi surrogati dell'organo bersaglio e nelle prime fasi della malattia o, meglio, in soggetti ad alto rischio, ossia esposti a fattori eziologici per la patologia in esame.

7. BIBLIOGRAFIA

- 1 Henderson RF. Strategies for use of biological markers of exposure. *Toxicol Lett* 82-83:379-83, 1995.
- 2 Mutti A. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. *Toxicol Lett* 108(2-3):77-89, 1999.
- 3 De Palma G., Mutti A. I polimorfismi metabolici come caratteri complessi: implicazioni per il monitoraggio biologico e la valutazione del rischio. *Folia Med* 71 (S2) 7-21, 2000.
- 4 Puga A., Nebert DW., Mckinnon RA., Menon AG. Genetic polymorphisms in human drug metabolising enzymes: potential uses of reverse genetics to identify genes of toxicological relevance. *Crit. Rev. Toxicol.* 27: 199-222, 1997.
- 5 Wiencke JK., Pemble SE., Ketterer B., Kelsey KT. Gene deletion of glutathione S-transferase: correlation with induced genetic damage and potential role in endogenous mutagenesis. *Canc. Epidemiol. Biom. Prev.* 4: 253-259, 1995.
- 6 Anders MW., Decant W. Glutathione dependent bioactivation of haloalkenes. *Ann.Rev.Pharmacol. Toxicol.* 38:501-537, 1998.
- 7 Ali-Osman F., Akande N., Mao J. Molecular cloning, characterization, and expression in Escherichia coli of full length cDNAs of 3 human glutathione S-transferase Pi gene variants. Evidence for differential catalytic activity of the encoded proteins. *J Biol Chem* 272:10004-10012, 1997.
- 8 Hu X., Ji X., Srivastava SK. et al. Mechanism of differential catalytic efficiency of the two polymorphic forms of the human glutathione S-transferase P1-1 in the glutathione conjugation of carcinogenic diol epoxide of chrysene. *Arch.Biochem. Biophys.* 345:32-38, 1997.
- 9 Hu X., O'donnell R., Srivastava SK et al. Active site architecture of polymorphic forms of human glutathione S-transferase P1-1 accounts for their enantioselectivity and disparate activity in the glutathione conjugation on 7,8-

- dihydroxy-9,10-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyrene. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 235: 424-428, 1997.
- 10 Sundberg K., Johansson AS. Stenberg G. et al. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenetic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 19: 433-436, 1998.
 - 11 Monks TJ., Hanzlik RP., Cohen GM. Ross D., Graham DG. Quinone Chemistry and toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 112: 2-16, 1992.
 - 12 Grant DM., Hughes NC., Janezic SA. et al. Human acetyltransferase polymorphisms. *Mut. Res.* 376: 61-70, 1997.
 - 13 Vineis P., Sculte P. Scientific and ethical aspects of genetic screening of workers to cancer risk: the case of the N- acetyltransferase phenotype. *J. Cancer Epidemiol.* 48: 189-197, 1995.
 - 14 Hayes RB., Bi W., Rothmann N. et al. N-acetylation phenotype and genotype and risk of bladder cancer in benzidine-exposed workers. *Carcinogenesis* 14: 675-678, 1993.
 - 15 Rothman N., Bhatnagar VK., Hayes RB. et al. The impact of interindividual variation in NAT2 activity on benzidine urinary metabolites and urothelial DNA adducts in exposed workers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 5084-5089, 1996.
 - 16 Lang NP., Butler MA., Massengill J. et al. Rapid metabolic phenotypes for acetyl transferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 3: 675-682, 1994.
 - 17 Bell DA., Stephens E., Castranio T. et al. Polyadenylation polymorphism in the N- acetyl transferase gene 1 (NAT1) increases risk of colorectal cancer. *Cancer Res.* 55: 3537-3542, 1995.

- 18 Manno M., Sannolo N. Significato tossicologico degli indicatori biologici. *G Ital Med Lav Erg* 26(4): 270-77, 2004.
- 19 Chikako K., Koichi T., Yoichi N. Association of genetic polymorphisms in the base excision repair pathway with lung cancer risk: A meta-analysis. *Lung Cancer* 54: 267-283, 2006.
- 20 Hung RJ., Hall J., Brennan P., Boffetta P. Genetic Polymorphisms in the Base Excision Repair Pathway and Cancer Risk: A HuGE Review. *Am. J. Epidemiol.* 162 (10): 925-942, 2005.
- 21 Duell EJ, Wiencke JK, Chen TJ. et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 21: 965-71, 2000
- 22 Palli D., Russo A., Masala G. et al. DNA adduct levels and DNA repair polymorphisms in traffic-exposed workers and a general population sample. *Int J Cancer* 94: 121-7, 2001.
- 23 Chikako K., Kouichi Y. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: A meta-analysis *Int. J. Med. Sci.* 4(2):59-71, 2007.
- 24 Hung RJ., Brennan P., Canzian F., Szeszenia-Dabrowska N., Zaridze D., Lissowska J., Rudnai P., Fabianova E., Mates D., Foretova L., Janout K., Bencko H., Chabrier A., Borel S., Hall J., Boffetta P. Large-scale investigation of base excision repair genetic polymorphisms and lung cancer risk in a multicenter study. *J. Natl. Cancer. Inst.* 97 567–576, 2005.
- 25 Calvert PM., and Frucht H. The Genetics of Colorectal Cancer. *Ann Intern Med.* 37:603-612, 2002.
- 26 Huan-Ming Hsu, Hui-Chun Wang, Sou-Tong Chen, Giu-Cheng Hsu, Chen-Yang Shen, and Jyh-Cherng Yu. Breast Cancer Risk Is Associated with the Genes

- Encoding the DNA Double-Strand Break Repair Mre11/Rad50/Nbs1 Complex.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16(10): 2024-32, 2007.
- 27 De Palma G., Corradi M., Mutti A., Baccarelli A., Pesatori A., Bertazzi P.A.
Nuovi indicatori di effetto. *G Ital Med Lav Erg* 26: 4, 302-310, 2004.
- 28 Baccarelli A., Pesatori AC., Masten SA. et al. Aryl-hydrocarbon receptor-dependent pathway and toxic effects of TCDD in humans: a population based study in Severo Italy. *Toxicol Lett* 149: 287-293, 2004.
- 29 Landi MT., Bertazzi PA., Baccarelli A et al. TCDD-mediated alterations in the AhR dependent pathway in Seveso Italy: 20 years after the accident. *Carcinogenesis* 24: 673-680, 2003.
- 30 Ghittori S., Imbriani M., Maestri L., Capodoglio E., Cavalleri A. Determination of S-phenylmercapturic acid in urine a san indicator of exposure to benzene. *Toxicol Lett* 108, 329-334, 1999.
- 31 Melikian AA., O'Connor R., Prahalad AK., Hu P., Li H., Kagan M., Thompson S. Determination of the urinary benzene metabolites S-phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis* 20: 719-726, 1999.
- 32 Rossi AM., Guarnieri C., Rovesti S., Gobba F., Ghittori S., Vivoli G., Barale R. Genetic polymorphisms influence variabilità in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics* 9, 445-451, 1999.
- 33 Maffei F., Hrelia P., Angelici S., Carbone F., Forti GC., Barbieri A., Sanguinetti G., Mattioli S., Violante FS. Effects of environmental benzene: micronucleus frequencies and hematological values in traffic police working in an urban area. *Mutat Res* 583, 1-11, 2005.
- 34 Farmer PB., Kaur B., Roach J., Levy L., Consonni D., Bertazzi PA., Pesatori A., Fustinoni S., Buratti M., Ronzini M., Colombi A., Popov T., Cavallo D.,

- Desideri A., Valerio F., Pala M., Bolognesi C., Merlo F. The use of S-phenylmercapturic acid as biomarker in molecular epidemiology studies of benzene. *Chem. Biol. Interact.*, 153-154, 97-102, 2005.
- 35 Who Working Group. Updating and Revision of the Air Quality Guidelines for Europe; Report on the WHO Working Group on Volatile Organic compounds. *EUR/ICP/EHAZ 94 05/MT12*.
- 36 Fustinoni S., Consonni D., Campo L. et al. Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 14, 2237-2244, 2005.
- 37 Bergdahl IA., Grubb A., Schutz A., Desnick RJ., Wetmur JG., Sassa S., Skerfving S. Lead binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) in human erythrocytes. *Pharmacol Toxicol* 81(4): 153-8, 1997.
- 38 Petrucci R., Leonardi A., Battistuzzi G. The genetic polymorphism of delta-aminolevulinate dehydrase in Italy. *Hum Genet* 60(3): 289-90, 1982.
- 39 Wetmur JG., Kaya AH., Plewinska M., Desnick RJ. Molecular characterization of the human delta-aminolevulinate dehydratase 2 (ALAD2) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *Am J Hum Genet* 49(4): 757-63, 1991.
- 40 Potluri VR., Astrin KH., Wetmur JG., Bishop DF., Desnick RJ. Human delta-aminolevulinate dehydratase: chromosomal localization to 9q34 by in situ hybridization. *Hum Genet* 76(3): 236-9, 1987.
- 41 Battistuzzi G., Petrucci R., Silvagni L., Urbani FR., Caiola S. Delta-Aminolevulinate dehydrase: a new genetic polymorphism in man. *Ann Hum Genet* 45(Pt 3): 223-9, 1981.

- 42 Kelada SN., Shelton E., Kaufmann RB., Khoury MJ. Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 154(1): 1-13, 2001.
- 43 Becker S., Soukup JM., Gilmour MI., Devlin RB. Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol* 141: 637-648, 1996.
- 44 Han JY., Takeshita K., Utsumi H. Noninvasive detection of hydroxyl radical generation in lung by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med* 30:516-525, 2001.
- 45 Valerio F. Formazione e destino degli IPA immessi in atmosfera. In: Apostoli P, Minoia C, Alessio L. Idrocarburi policicliciaromatici negli ambienti di vita e di lavoro: esposizione ed effetti. *Gargnano, 27-29 Marzo 1996*.
- 46 Sorensen M., Autrup H., Moller P., Hertel O., Jensen SS., Vinzents P., Knudsen LE., Loft S. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mut Res* 544: 255-271, 2003.
- 47 Li N., Sioutas C., Cho A., Schmitz D., Misra C., Sempf J., Wang M., Oberley T., Froines J., Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 111: 455-460, 2003.
- 48 Ryster SW., Choi AM. Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid Redox signal* 7: 80-91, 2005.
- 49 ACGIH. American Conference of Governmental Industrial Hygienists, 2004. Threshold Limit Values (TLVs) for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices (BEIs). Cincinnati, OH.

- 50 Bergamaschi E., Smargiassi A., Mutti A., Lucchini R., Franchini I. Immunological changes among workers occupationally exposed to styrene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 67: 165-171, 1995.
- 51 Barale R. The genetic toxicology of styrene and styrene oxide. *Mutat. Res.*, 257: 107-126, 1991.
- 52 Bigbee W., Grant SG., Langlois RG., *et al.* Glicophorin A somatic mutation frequencies in Finnish reinforced plastics workers exposed to styrene. *Cancer Epid. Biom. Prev.*, 5: 801-810, 1996.
- 53 Phillips DH., Farmer PB. Evidence for DNA and protein binding by styrene and styrene oxide, *C.R.C. Crit. Rev. Toxicol., Suppl.* 24, 35, 1994
- 54 Vodicka P., Bastlová T., Vodicková L. *et al.* Biomarkers of styrene exposure in lamination workers: levels of O⁶–guanine DNA adducts, DNA strand breaks and mutant frequencies in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene in T-lymphocytes. *Carcinogenesis*, 16: 1473-1481, 1995.
- 55 IARC. International Agency for Research on Cancer. Iarc Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Human. Styrene. In: IARC, vol. 60, *WHO, Geneva*, pp. 233-320, 1993.
- 56 Marczynski B., Peel M., Baur X. New aspects in genotoxic risk assessment of styrene exposure – a working hypothesis. *Medical Hypotheses*, 54: 619-623, 2000.
- 57 Chakrabarti S., Duhr M.A., Senecal-Quevillon M., Richer CL. Dose-dependent genotoxic effects of styrene on human blood lymphocytes and the relationship to its oxidative and metabolic effects. *Environ. Mol. Mutagen.*, 22: 85-92, 1993.
- 58 Vettori MV., Caglieri A., Goldoni M., Castaldi AF., Darè E., Alinovi R., Beccatelli S., Mutti A. Analysis of oxidative stress in SK-N-MC neurons exposed to styrene-7,8-oxide. *Toxicol. In Vitro*, 19: 11-20, 2005.

- 59 Marczynski B., Rozynek P., Elliehausen H-J., Korn M., Baur X. Detection of 8-hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in white blood cells of workers occupationally exposed to styrene. *Arch. Toxicol.*, 71: 496-500, 1997.
- 60 Nishioka K., Ohtsubo T., Oda H., Fujiwara T., Kang D., Sugimachi K., Nakabeppu Y. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol. Bio. Cell.*, 10: 1637-1652, 1999.
- 61 Kohno T., Shinmura K., Tosaka M., et al. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene*, 16: 3219-3225, 1998.
- 62 Weinmann A., Belling D., Poulsen H.E. Quantification of 8-oxo-guanine and guanine as the nucleobase, nucleoside and deoxynucleoside forms in human urine by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Nucl. Acids Res.*, 30: E7, 2002.
- 63 Andreoli R., Manini P., Bergamaschi E., Brustolin A., Mutti A. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of monoaromatic hydrocarbons in blood and urine: application to people exposed to air pollutants. *Chromatographia*, 50: 167-72, 1999.
- 64 Smith CAD., Harrison, D. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 350, 630-633, 1997.
- 65 Schulz WA., Krummeck A., Rosinger I., Eickelmann P., Neuhaus C., Ebert T., Schmitz-Drager BJ., Sies H. Increased frequency of a null-allele for NAD(P)H: quinone oxidoreductase in patients with urological malignancies. *Pharmacogenetics* 7, 235-239, 1997.

- 66 Coles BF., Morel F., Rauch C., Huber WW., Yang M., Teitel CH., Green B., Lang NP., Kadlubar FF. Effect of polymorphism in the human glutathione S-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2. *Pharmacogenetics* 11, 663-669, 2001.
- 67 Arand M., Muhlbauer R., Hengstler J., Jager E., Fuchs J., Winkler R., Oesch F. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of glutathione S-transferase *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms. *Anal. Biochem.* 236, 184-186, 1996.
- 68 Crebelli R., Tomei F., Zijno A., Ghittori S., Imbriani M., Gamberale D., Martini, A., Carere, A. Exposure to benzene in urban workers: environmental and biological monitoring of traffic police in Rome. *Occup. Environ. Med.* 58, 165-171, 2001.
- 69 Maffei F., Hrelia P., Angelini S., Carbone F., Cantelli Forti G., Barbieri A., Sanguinetti G., Mattioli S., Violante F.S. Effects of environmental benzene: Micronucleus frequencies and hematological values in traffic police working in an urban area. *Mutat. Res.* 583, 1-11, 2005.
- 70 Bono R., Traversi D., Maestri L., Schilirò T., Ghittori S., Baiocchi C., Gilli G. Urban air and tobacco smoke in benzene exposure in a cohort of traffic policemen. *Chem. Biol. Interact.* 153-154, 239-242, 2005.
- 71 Farmer P.B., Kaur B., Roach J., Levy L., Consonni D., Bertazzi P.A., Pesatori A., Fustinoni S., Buratti M., Bonzini M., Colombi A., Popov T., Cavallo D., Desideri A., Valerio F., Pala M., Bolognesi C., Merlo F. The use of S-phenylmercapturic acid as biomarker in molecular epidemiology studies of benzene. *Chem. Biol. Interact.* 153-154, 97-102, 2005.
- 72 Neri G., Apostoli P., Catalani S., Carta P., Flore C., Mutti A., Murgia N., Muzi G., Soleo L. Piombo: indicatori di dose e di effetto sull'eme. *Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia*, Vol. XXVII – Suppl.1: 15-21, Gennaio/Marzo 2005.

- 73 Bruning T, Abel J, Koch B, Lorenzen K, Harth V, Donat S, Sachinidis A, Vetter H, Bolt HM, Ko Y. Real-time PCR-analysis of the cytochrome P450 1B1 codon 432-polymorphism. *Arch Toxicol* 73: 427-30, 1999.
- 74 Ko Y., Koch B., Harth V., Sachinidis A., Their R., Vetter H., Bolt HM., Bruning T. Rapid analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms using real-time polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics* 10: 271-4, 2000.
- 75 Drakoulis N., Cascorbi J., Brockmoller., Gross CR., Roots I. Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region. *Clin Investig* 72: 240-248, 1994.
- 76 Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. *Genome Biol* 2002; 3, RESEARCH0034.
- 77 Vodicka P., Bastlová T., Vodicková L., *et al.* Biomarkers of styrene exposure in lamination workers: levels of O⁶-guanine DNA adducts, DNA strand breaks and mutant frequencies in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene in T-lymphocytes. *Carcinogenesis*, 16: 1473-1481, 1995.
- 78 Andreoli R., Manini P., Alinovi R., *et al.* Importanza della valutazione cronobiologica degli indicatori di effetto per una corretta strategia di campionamento. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.*, 27: 318-321, 2005.
- 79 Wikman H., Risch A., Klimek F., Schmezer P., Spiegelhalder B., Dienemann H., Kaiser H., 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* 88(6):932-7, 2000.
- 80 Manini P., Buzio L., Andreoli R., Goldoni M., Bergamaschi E., Jakubowski M., Vodicka P., Hirvonen A., Mutti A. Assessment of the biotransformation of the arene moiety of styrene in volunteers and occupationally exposed workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 189: 160-169, 2003.

- 81 Rozalski R., Siomek A., Gackowski D. et al. Substantial decrease of urinary 8-oxo-7,8-dihydroguanine, a product of the base excision repair pathway, in DNA glycosylase defective mice. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.*, 37: 1331-1336, 2005.
- 82 Tanner CM., Goldman S.M. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin.* 14: 317-335, 1996.
- 83 Pinelli P., Poloni M. *Neurologia Principi di diagnostica e terapia*, pag 387, 1993.
- 84 Rieder P., Wuketich S. et al. Time course of nigrostriatal degeneration in Parkinson's Disease. *J Neurol. Transm* 38:277-301, 1976.
- 85 Scherman D., Desnos C., et al. Striatal dopamine deficiency in Parkinson's disease: role of aging. *Ann Neurol.* 26: 551-557, 1989.
- 86 Agid Y. Parkinson's disease: pathophysiology. *The Lancet* 337 (8753) pag 1321-1324, 1991.
- 87 Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M.Y. et al. alpha-synuclein in Lewy Bodies. *Nature* 388: 839-840, 1997.
- 88 Forno L.S. Pathology of Parkinson's disease : the importance of the substantia nigra and Lewy bodies. In: *Parkinson's Disease, a cura, Stern GM eds Baltimore, Johns Hopkin Press pp 185-238, 1990.*
- 89 Langston G.W., Ballard P, Tetrad J.W. et al. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219: 979-980, 1983.
- 90 Tetrad J.W, Langston J., Irwin I. et al. Parkinsonism caused by petroleum waste ingestion. *Neurol* 44: 1051-1054, 1994.
- 91 Uitti R.J., Snow B.J., Shinotoh H. et al. Parkinsonism induced by solvent abuse. *Ann Neurol* 35: 616-619, 1994.

- 92 Pezzoli G., Barbieri S., Ferrante S. et al. Parkinsonism due to n-hexane exposure. *Lancet* 2: 874, 1989.
- 93 Di Monte A.D. Royland J.E. Irwin I. et al. Astrocytes as the site for bioactivation of neurotoxins. *Neurotoxicol* 17 (3-4): 697-704, 1996.
- 94 Ramsay R.R., Youngster S.K. et al Structural dependence of the inhibition of mitochondrial respiration and of NADH oxidase by MPP⁺ analogs and their energised accumulation by mitochondria. *Proc Natl acad sci USA*, 86: 9168-9172, 1989.
- 95 Hertzman C., Wiens M. et al A case-control study of Parkinson's disease in a horticultural region of British Columbia. *Mov Disord* 9: 69-75, 1994.
- 96 Makino Y., Otha S., Tachikawa O. et al., Presence of tetrahydroisoquinoline and 1-methyl-tetrahydroisoquinoline in foods: Compounds related to Parkinson's disease. *Life Sci* 43: 373-378, 1988.
- 97 Mutti A., Franchini I. Toxicity of metabolites to dopaminergic systems and the behavioural effects of organic solvents. *Br J Ind Med* 44: 721-723, 1987.
- 98 Nagatsu T., Yoshida M. An endogenous substance of the brain, tetrahydroisoquinoline, produces Parkinsonism in primate with decreased dopamine, tyrosine hydroxylase and bipterin in the nigrostriatal regions. *Neurosci Lett* 87: 178-182, 1988.
- 99 Sayre L.M. Wang F., Arora P.K. et al. Dopaminergic neurotoxicity in vivo and inhibition of mitochondrial respiration in vitro by possible endogenous pyridinium-like substance. *J Neurochem* 57: 2106-2115, 1991.
- 100 Suzuki K., Mizuno Y., Yamauchi Y et al. Selective inhibition of complex I by N-methyl-isoquinolinium ion and N-methyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline in isolated mitochondria prepared from mouse brain. *J Neurol Sci* 109: 219-223, 1992.

- 101 Koller W., Vetere Overfield B. et al. Environmental risk factors in Parkinson's disease. *Neurology* 40: 1218-1221, 1990.
- 102 Zayed J., Ducic S., Campanella g. et al Facteurs environnementaux dans la maladie de Parkinson. *Can J Neurol Sci* 17 : 286-291, 1990
- 103 Ben Shlomo Y. How far are we in understanding the cause of Parkinson's disease? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61: 614-616, 1996.
- 104 Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E. et al. Mutation in the alfa-synuclein gene identified in family with Parkinson's disease. *Science* 276: 2045-2047, 1997.
- 105 Zarepari S., Kay J., Camicioli R et al. Analisis of the alfa-synuclein G209A mutation in familial Parkinson's disease. *Lancet* 351: 1998.
- 106 Chan P., Jiang X., Forno L.S., et al. Absence of mutation in the coding region of the a-synuclein gene in pathologically proven Parkinson's disease. *Neurol* 50. 1136-1137, 1998.
- 107 Johnson W.G., Hodge S.E., et al. Twin studies and the genetics of parkinson's disease: a reappraisal. *Mov Disord* 5: 187-194, 1990.
- 108 Marangore D.M., Harding A.E. et al A clinical and genetic study of familial Parkinson's disease. *Mov Disord* 6: 205-211, 1991.
- 109 Barbeau A., Cloutier T. et al. Ecogenetics of Parkinson's Disease: 4-hydroxylation of debrisoquine. *Lancet* 1213-1216, 1985.
- 110 Coleman T., Ellis S.W., et al. MPTP is N-demethylated by cytochromes P450D6 1A2 and 3A4. Implications for susceptibility to Parkinson's disease. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 685-690, 1996.

- 111 Bell D., Taylor J., Butler M. et al genotype/phenotype discordance for human arylamine N-acetyltransferase (NAT2) reveals a new slow-acetylator allele common in African-Americans. *Carcinogenesis* 14: 1689-1692, 1993.
- 112 Bandmann O., Vaughan J., Holmans P. et al Association of slow acetylator genotype for N-acetyltransferase 2 with familial Parkinson's disease. *Lancet* 350: 1136-1139, 1997.
- 113 Kurt J.K., Kurt M.,C. Allele frequencies of tyrosine hydroxylase in Parkinson's disease patients. *Mov Disord* 7: 290, 1992.
- 114 Hotamisligil G.S., Girmen A.S. et al. Hereditary variations in monoamine oxydase as a risk factor for Parkinson's disease. *Mov Disord* 9: 305-310, 1994.
- 115 Ho S., Kapadi A.L. et al. An allelic association study of monoamine oxydase B in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 37: 403-405, 1995.
- 116 Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *The Lancet* 344: 796-798, 1994.
- 117 Betabert R, Sherer TB et al. Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience* 3(12): 1301-1306, 2000.
- 118 Dexter DT, Holley AE, et al. Increased levels of lipid hydroperoxides in the parkinsonian substantia nigra: an HPLC and ESR study. *Mov Disord* 9: 92-9, 1994.
- 119 Cascorbi I., Laule M., Mrozikiewicz P.M. et al. Mutations in the human paraoxonase 1 gene:frequencies, alleli linkagrs, and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 9: 755-761,1999.
- 120 Harth V., Donat S., Ko Y. et al. NADPH quinine oxidoreductase 1 codon 609 polymorphisms using real-time polymerase chain reaction. *Arch Toxicol* 73: 528-531, 2000.

- 121 Mozzoni P., De Palma G., Scotti E. et al., Characterization of GSTM3 polymorphism by real-time polymerase chain reaction with LightCycler. *Anal Biochem* 330: 175-177, 2004.
- 122 Zheng W., Xie DW., Jin F., et al. Genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:147-150, 2000.
- 123 Hotamisligil GS., Breakefield XO. Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *Am J Hum Genet* 49:383-392, 1991.
- 124 Ronaghi M., Uhlen M., Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281:363-365, 1998.
- 125 Lancaster JM., Brownlee HA., Bell DA., et al. Microsomal epoxide hydrolase polymorphism as a risk factor for ovarian cancer. *Mol Carcinog* 17:160- 162, 1996.
- 126 Smith CA., Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 350:630-633, 1997.
- 127 Keicho N., Emi M., Kajita M., et al. Overestimated frequency of a possible emphysema-susceptibility allele when microsomal epoxide hydrolase is genotyped by the conventional polymerase chain reaction-based method. *J Hum Genet* 46:96-98, 2001.
- 128 Castiglione CM., Deinard AS., Speed WC., et al. Evolution of haplotypes at the DRD2 locus. *Am J Hum Genet* 57:1445-1456, 1995.
- 129 Grandy DK., Zhang Y., Civelli O. PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. *Hum Mol Genet* 2:2197,1993.

- 130 Osborne A., Bell C., Grant F., *et al.* A rapid method of screening for Nacetyltransferase (NAT2) phenotype by use of the WAVE DNA fragment analysis system. *Biochem Genet* 41:405-411, 2003.
- 131 Tan EK., Khajavi M., Thornby JL., Nagamitsu S., Jankovic J., Ashizawa T. Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease. *Neurology* 55:533-538, 2000.
- 132 Kalemi TG., Papazisis KT., Lambropoulos AF., Voyatzi S., Kotsis A., Kortsaris AH. Expression of the HER family mRNA in breast cancer tissue and association with cell cycle inhibitors p21 (waf1) and (kip1). *Anticancer Res* 27(2): 913-20, 2007.
- 133 Chan SK., Hill ME., Gullick WJ. The role of the epidermal growth factor receptor in breast cancer. *J Mammary Gand Biol Neoplasia* 11(1): 3-11, 2006.
- 134 Lassus H., Sihto H., Leminen A., Joensuu H., Isola J., Nupponen NN., Butzow R. Gene amplification, mutation, and protein expression of EGFR and mutations of ERBB2 in serous ovarian carcinoma. *J Mol Med* 84(8): 671-81.
- 135 Boschetto P., Zeni E., Mazzetti L., Miotto D., Cascio NL., Maestrelli P., Marian E., Querzoli P., Pedriali M., Murer B., De Rosa E., Fabbri LM., Mapp CE. Decreased Heme-oxygenase (HO-1) in the macropages of non small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007.
- 136 Valko M., Rhodes CJ., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160(1): 1-40, 2006.
- 137 Toyokuni S. Novel aspects of oxidative stress- associated carcinogenesis. *Antioxid Redox Signal* 8(7-8): 1373-7. 2006.
- 138 Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Ann Rev Biochem* 64: 97-112, 1995.

- 139 Warner HR. Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Radic Biol Med* 17(3): 249-58, 1994.
- 140 Marlowe JL., Puga A. Aryl hydrocarbon receptor, cell cycle regulation, toxicity and tumorigenesis. *J Cell Biochem* 96(6): 1174-84, 2005.
- 141 Puga A., Xia Y., Elferink C. Role of the aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation. *Chem Biol Interact* 141(1-2): 117-30, 2002.
- 142 Stavrides JC. Lung carcinogenesis: pivotal role of metals in tobacco smoke. *Free Radic Biol Med* 41(7): 1017-30, 2006.
- 143 Wolf FI., Maier JA., Nasulewicz A., Feillet-Coudray C., Simonacci M., Mazur A., Cittadini A. magnesium and neoplasia: from carcinogenesis to tumor growth and progression or treatment. *Arch Biochem Biophys* 458(1): 24-32, 2007.
- 144 Bostwick DG., Alexander EE., Singh R., Shan R., Qian J., Santella RM., Oberley LW., Yan T., Zhong W., Jiang X., Oberley TD. Antioxidant enzyme expression and reactive oxygen species damage in prostatic intraepithelial neoplasia and cancer. *Cancer* 89(1): 123-34, 2000.
- 145 Bakan N., Taysi s., Yilmaz O., Bakan E., Kuskay S., Uzun N., Gundogdu M. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde concentrations in swerum of patients with chronic lymphocitic leukaemia. *Clin Chim Acta* 338(1-2): 143-9, 2003.
- 146 Kaynar H., Meral M., Turhan H., Keles M., Celik G., Akcay F. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalane, xanthine oxidase, Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 227(2): 133-9, 2005.

- 147 Ho JC., Chan-Yeung M., Ho SP., Mak JC., Ip MS., Ooi GC., Wong MP., Tsang KW., Lam WK. Disturbance of systemic antioxidant profile in non-small cell lung cancer. *Eur Respir J* 29(2): 273-8, 2007.

8. TABELLE E FIGURE

Tabella 1

Marcatori di esposizione a benzene e cotinina urinaria nei campioni di inizio (IT) e fine turno (FT) dei tassisti distinti per abitudine al fumo

I valori di *t,t*-AM and cotinina urinaria (U-cotinina) sono espressi come media $\pm$ DS, *AFM* and B-U come media geometrica (MG) [deviazione standard geometrica (GSD)].

	Non fumatori	Fumatori
Biomarker	(n = 21)	(n = 16)
IT <i>t,t</i> -AM ($\mu\text{g/g creat.}$)	105.4 $\pm$ 67.0	130.9 $\pm$ 62.0
FT <i>t,t</i> -AM ($\mu\text{g/g creat.}$)	122.0 $\pm$ 70.3	154.4 $\pm$ 70.0
IT <i>AFM</i> ($\mu\text{g/g creat.}$)	2.23 [1.72]	2.81 [1.93]
FT <i>AFM</i> ($\mu\text{g/g creat.}$)	2.14 [1.87]	3.79 [1.50] ^{*,#}
FT B-U ($\mu\text{g/l}$)	0.44 [1.79]	2.58 [4.23] [*]
IT U-Cotinina ($\mu\text{g/g creat.}$)	1.41 $\pm$ 1.22	789 $\pm$ 673 [*]
FT U-Cotinina ($\mu\text{g/g creat.}$)	1.45 $\pm$ 1.28	1100 $\pm$ 879 ^{*,#}

^{*} $p < 0.002$, *t*-test a due code per campioni indipendenti (fumatori vs non fumatori)

[#] $p < 0.05$, *t*-test a due code per campioni appaiati (FT vs IT)

Tabella 2

Escrezione degli AFM ($\mu\text{g/g creat.}$) di fine turno nei soggetti distinti per il genotipo GSTM1. Le medie marginali erano calcolate per una esposizione a $5.88 \mu\text{g/m}^3$ di benzene (campionamento personale di 24 h). I valori sono espressi come medie geometriche (MG) [deviazione standard geometrica (GSD)].

Genotipo	<i>AFM fine turno ($\mu\text{g/g creat.}$)</i>					
	Gruppo intero		Non-fumatori		Fumatori	
	n	GM [GSD]	n	GM [GSD]	n	GM [GSD]
GSTM1 null	17	2.19 [1.18]	8	1.53 [1.25]	9	3.63 [1.27]
GSTM1 pos	20	3.61 [#] [1.15]	13	2.93 [1.20]	7	4.85 [1.27]

[#] $p < 0.05$, ANCOVA a due vie utilizzando la GSTM1 e l'abitudine al fumo (si/no) come fattori fissi e l'esposizione personale a benzene come covariate.

Tabella 3

Predittori di escrizione a fine turno di AFM secondo un modello di regressione multipla lineare: $\log \text{AFM fine turno} = \text{costante} + (\text{FT U-cotina}) \times \beta_1 + \text{GSTA1} \times \beta_2 + \text{GSTM1} \times \beta_3 + (\text{Benzene Personale}) \times \beta_4$. Sono mostrati in tabella i parametri del modello, così come il coefficiente di regressione ed la significatività statistica (p). Il livello di significatività era di 0.05 per l'inclusione e di 0.10 per l'esclusione dal modello.

Predittori	B	SE B	β	P
Constant	-0.368	0.163	-2.252	0.036
U-Cotina FT	0.000	0.000	4.728	0.000
<i>GSTA1</i>	0.277	0.076	3.640	0.002
<i>GSTM1</i>	0.119	0.041	2.890	0.009
Benzene personale	0.034	0.012	2.745	0.013
$R^2=0.769, p<0.000$				

Tabella 4

Correlazioni tra valori degli indicatori di dose e di effetto sul sistema emopoietico in lavoratori professionalmente esposti a Pb e classificati in base al polimorfismo *ALAD*.

<i>ALAD-1-1</i>	PbB	PbP	PbU	ALAD	ALAP	ALAU
PbP	,62***					
PbU	,74***	,64***				
ALAD	-,53***	-,53***	-,51***			
ALAP	,39***	,20**	,28***	-,48***		
ALAU	,37***	,41***	,54***	-,37***	,16*	
ZPP	,38***	,34***	,41***	-,54***	,38***	,33***
<i>ALAD-1-2/2-2</i>						
PbP	,57***					
PbU	,70***	,47***				
ALAD	-,65***	-,43*	-,67***			
ALAP	,31*	,09	,24	-,33		
ALAU	,24	,22	,35*	-,20	,42*	
ZPP	,53***	,24	,50***	-,05	,40**	,36*

* $p \leq 0,05$ (2-code); ** $p \leq 0,005$ (2-code); *** $p \leq 0,001$ (2-code)

Figura 1

Relazione tra livelli di attività ALAD ematica e livelli di ZPP eritrocitaria in lavoratori professionalmente esposti a piombo e classificati in base al polimorfismo ALAD. Nei soggetti omozigoti “*wild type*” è evidente una relazione inversa tra le variabili, mentre nei soggetti portatori di allele *ALAD-2* non c'è alcuna relazione tra le variabili.

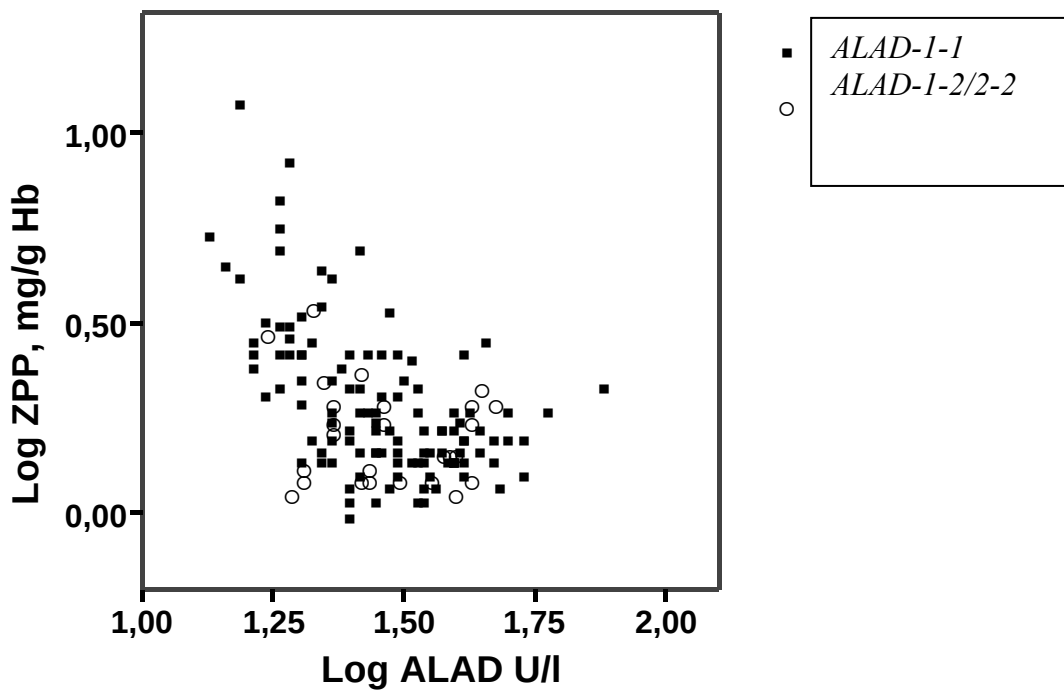


Tabella 5

Espressione di *HO-1* FT/IT nei soggetti distinti per il genotipo *GSTP1* ai singoli tempi di campionamento T₁ e T₂ e nella valutazione combinata degli stessi (T₁+T₂).

Genotipo	<i>HO-1 mRNA FT / IT</i>					
	T ₁		T ₂		T ₁ +T ₂	
	N	M [GSD]	N	M [GSD]	N	M [GSD]
<i>GSTP1</i> *A*A	15	0,78 [1,16]	11	1,00 [1,12]	27	0,88 [1,10]
<i>GSTP1</i> else	10	1,03 [1,20]	14	1,50* [1,10]	24	1,23* [1.11]

Medie marginali calcolate per valori di 1-OHP FT di 1,31 µg/g creat (T₁), 1,89 µg/g creat (T₂) e 1,10 µg/g creat (T₁+T₂), rispettivamente.

**p*< 0,05

Figura 2

Confronto tra l'espressione di *HO-1* FT/IT ai tempi di campionamento T₁ (□) e T₂ (■) nei soggetti con almeno un allele *GSTP1* variante (else) e nei soggetti con genotipo *GSTP1AA*.(*p<0.05)

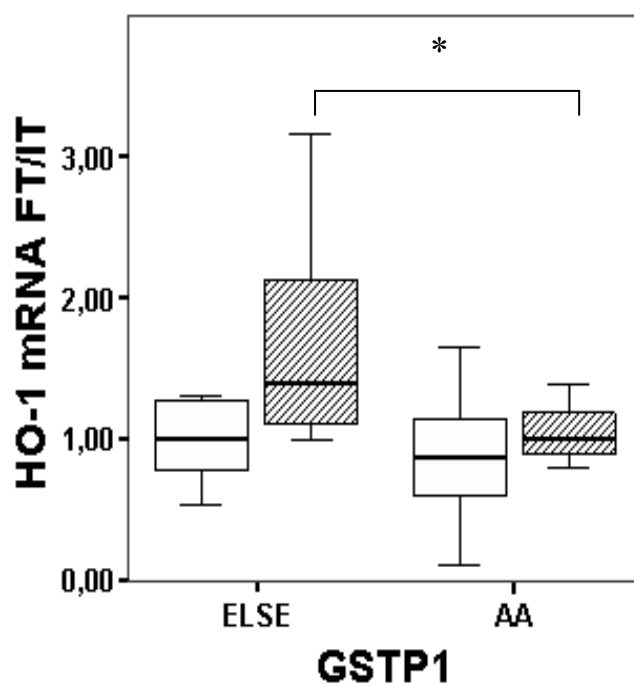


Figura 3.

Valore medio ($\pm$ SD) del rapporto 8-oxo-dG/ 10^5 dG nei linfociti dei soggetti classificati sulla base del polimorfismo genetico dell'enzima hOGG1 (*wild type*, ww, n = 70; *eterozigoti e mutati*, het&mut, n = 43) (*t*-test per dati indipendenti).

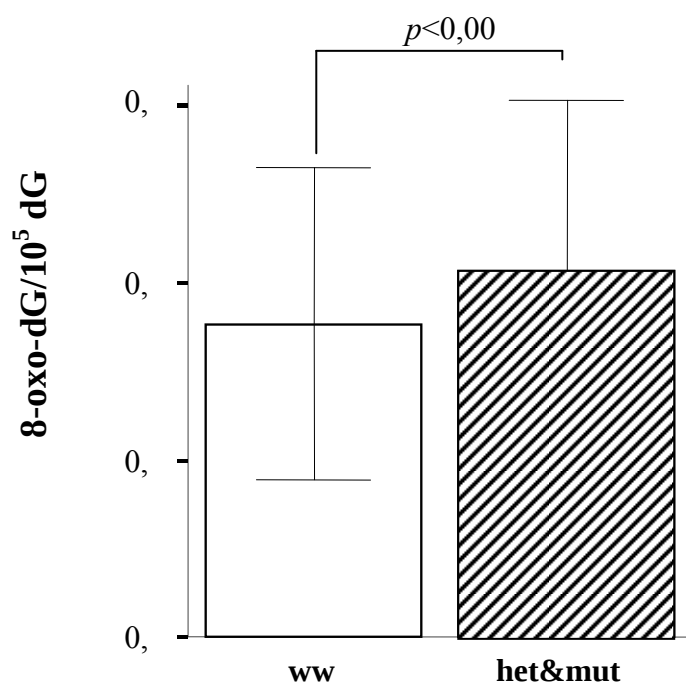


Figura 4

(A) Andamento del rapporto 8-oxo-dG/ 10^5 dG nei linfociti e **(B)** della concentrazione di 8-oxo-G nelle urine nei soggetti con genotipo “*wild type*” e classificati in quattro gruppi sulla base della dose interna di stirene (*one-way* ANOVA, seguita da test di Tukey per confronti multipli).

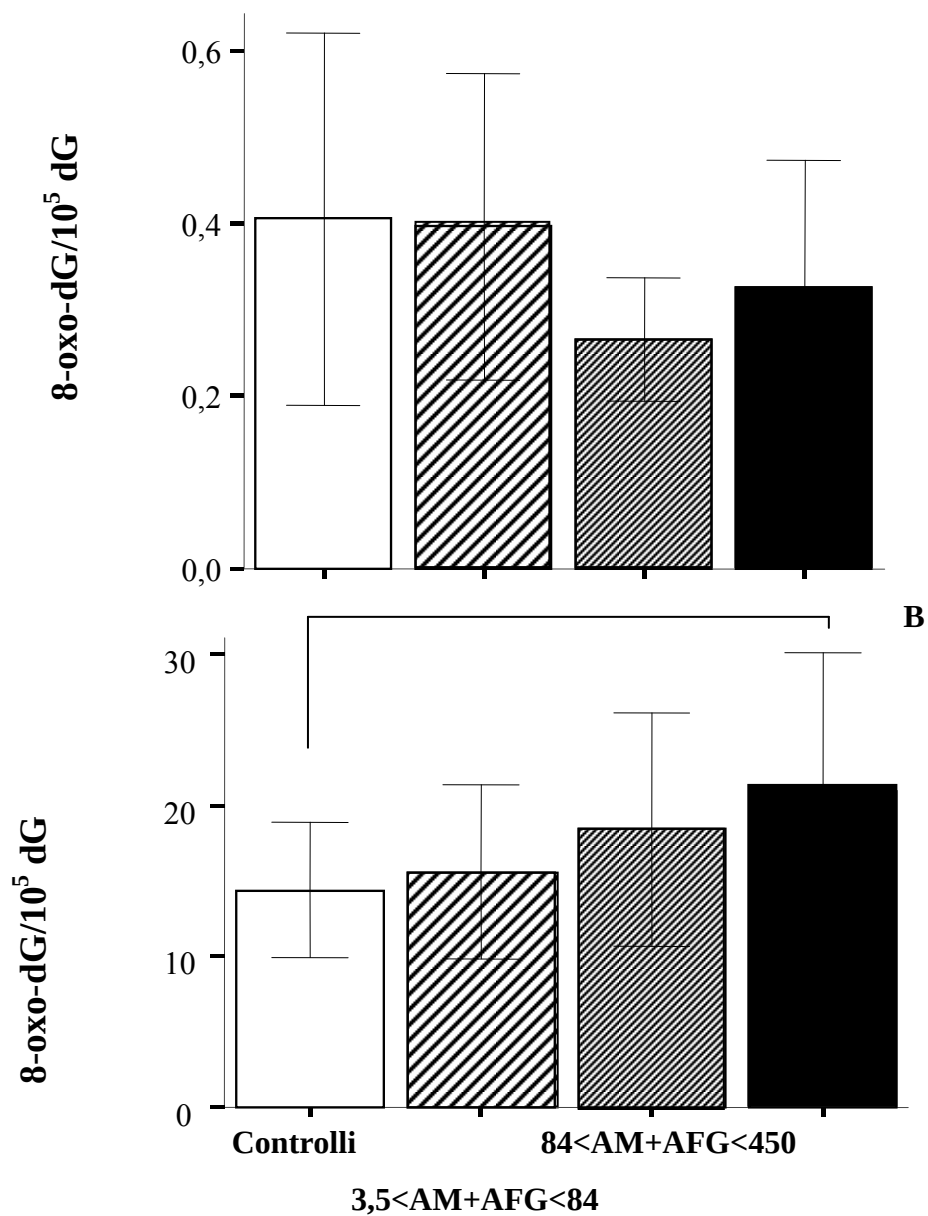


Tabella 6: Analisi dei fattori genetici (solo i casi di M. di Parkinson vs i controlli) dopo aggiustamento

Geni	Gruppo Referente	Gruppo in studio	OR	95% CI	p-value
CYP2D6	*1*1	*1*4 *4*4	0.93	(0.77, 1.13)	p=0.34
			0.85	(0.54, 1.32)	
PON1 L55M	M/M	L/M L/L	0.92	(0.76, 1.10)	p=0.25
			0.86	(0.64, 1.16)	
PON1 Q192R	Q/Q	Q/R R/R	0.94	(0.78, 1.34)	p=0.98
			1.12	(0.79, 1.58)	
GSTM1	Positive	Null	1.16	(0.98, 1.39)	p=0.09
GSTT1	Positive	Null	0.91	(0.72, 1.16)	p=0.45
GSTM3	AA	AB BB	0.97	(0.80, 1.18)	p=0.20
			0.53	(0.27, 1.01)	
GSTP1 aplotipo	AA	AB/AC/AD BB/BC/CC	0.92	(0.76, 1.11)	p=0.95
			1.12	(0.82, 1.52)	
NQO1	*1*1	*1*2 *2*2	0.96	(0.79, 1.16)	p=0.25
			0.68	(0.40, 1.15)	
CYP1B1	*1*1	*1*3 *3*3	0.98	(0.80, 1.19)	p=0.98
			1.01	(0.78, 1.31)	
MAO-A (males)	T	G	1.22	(0.93, 1.58)	p=0.15
MAO-A (females)	TT	TG GG	1.04	(0.79, 1.37)	p=0.66
			1.11	(0.67, 1.79)	
MAO-B (males)	A	G	1.16	(0.91, 1.48)	p=0.23
MAO-B (females)	AA	AG GG	1.11	(0.82, 1.50)	p=0.67
			1.07	(0.74, 1.55)	
SOD2 A16V	AA	AV VV	0.98	(0.79, 1.22)	p=0.72
			0.96	(0.75, 1.22)	
EPHX3 Y113H ²	YY	YH HH	0.85	(0.66, 1.01)	p=0.20
			0.84	(0.58, 1.21)	
EPHX4 H139R	HH	HR RR	0.99	(0.82, 1.20)	p=0.51
			1.36	(0.86, 2.16)	
DAT1	A/A	A/G G/G	0.94	(0.78, 1.12)	p=0.86
			1.07	(0.76, 1.52)	
DRD2A ³	CC	CT TT	0.98	(0.77, 1.25)	p=0.11
			1.53	(1.06, 2.22)	
DRD2B ¹	B2B2	B2B1 B1B1	0.96	(0.77, 1.20)	p=0.88
			1.32	(0.69, 2.50)	
NAT2	Fast/Fast	Fast/Slow Slow/Slow	1.03	(0.86, 1.25)	p=0.87
			0.93	(0.68, 1.27)	

*regressione logistica aggiustata per età, sesso, paese, prodotti contenenti tabacco, perdita di conoscenza e famigliari di primo grado con M. di Parkinson. MAO-A e MAO-B sono state presentate per femmine e maschi separatamente.

¹ Malta era esclusa dall'analisi

² Italia e Svezia erano escluse dall'analisi

³ Svezia e Malta erano escluse dall'analisi

Tabella 7: Analisi delle interazioni gene-ambiente (solo i casi di M. di Parkinson vs i controlli) dopo aggiustamento*.

Polimorfismi genetici	Genotipo candidato	Esposizione [†] Bassa vs Alta	Interazione Odds Ratio (95%CI)	p-value
CYP2D6	*4*4	Solventi	1.95 (0.43-8.88)	0.39
CYP1B1	*3*3	Solventi	1.29 (0.53-3.15)	0.57
GSTM1	Null	Solventi	2.34 (1.08-4.62)	0.03
GSTT1	Null	Solventi	0.81 (0.32-2.00)	0.63
GSTM3	AB/BB	Solventi	0.95 (0.43-2.07)	0.88
GSTP1 aplotipo	AB, AC, AD, BB, BC, CC	Solventi	1.32 (0.65-2.66)	0.44
NQO1	*1*2/*2*2	Solventi	0.68 (0.32-1.44)	0.31
SOD2 A ₁₆ V	AV	Solventi	1.44 (0.56-3.73)	0.44
	VV	Solventi	1.94 (0.70-5.34)	
NAT2	FS/SS	Solventi	1.14 (0.56-2.29)	0.72
CYP2D6	*4*4	Pesticidi	1.33 (0.31-5.80)	0.70
PON1 L55M	LL/LM	Pesticidi	0.55 (0.24-1.30)	0.18
PON1 Q192R	QR/RR	Pesticidi	1.49 (0.64-3.45)	0.36
GSTM1	Null	Pesticidi	0.71 (0.31-1.65)	0.43
GSTT1	Null	Pesticidi	1.81 (0.58-5.63)	0.31
GSTM3	AB/BB	Pesticidi	1.08 (0.43-2.71)	0.87
GSTP1 aplotipo	AC/AD/BC/CC	Pesticidi	3.01 (0.75-12.02)	0.12
NQO1	*1*2/*2*2	Pesticidi	1.09 (0.47-2.54)	0.84
CYP1B1	*3*3	Pesticidi	0.69 (0.21-2.32)	0.55
NAT2	FS/SS	Pesticidi	0.67 (0.29-1.56)	0.35
GSTM1	Null	Ferro	1.13 (0.54-2.33)	0.75
CYP1B1	*3*3	Ferro	1.64 (0.63-4.27)	0.31
SOD2 A ₁₆ V	AV	Ferro	0.69 (0.28-1.70)	0.71
	VV	Ferro	0.72 (0.27-1.94)	
NAT2	FS/SS	Ferro	0.77 (0.37-1.63)	0.51
SOD2 A ₁₆ V	AV	Rame	0.89 (0.31-2.58)	0.46
	VV	Rame	1.65 (0.51-5.34)	

Polimorfismi genetici	Genotipo candidato	Esposizione [†] Bassa vs Alta	Interazione Odds Ratio (95% CI)	p-value
CYP2D6	*4*4	Manganese	1.63 (0.35-7.62)	0.54
<i>NQO1</i>	*1*2/*2*2	Manganese	1.06 (0.49-2.33)	0.88
CYP1B1	*3*3	Manganese	1.93 (0.71-5.21)	0.20
SOD2	AV	Manganese	0.73 (0.27-1.93)	0.67
	VV	Manganese	1.07 (0.38-3.01)	

*regressione logistica aggiustata per età, sesso, paese, prodotti contenenti tabacco, perdita di conoscenza e familiari di primo grado con M. di Parkinson. MAO-A e MAO-B sono state presentate per femmine e maschi separatamente.

† cut-offs per bassa/alta esposizione:

solventi/ferro/manganese: 20% del OEL (AAI)

pesticidi/rame: 2% del OEL (AAI)

Tabella 8: Analisi delle interazioni gene-gene (solo i casi di M. di Parkinson vs i controlli) dopo aggiustamento*

Interazioni gene-gene		Interazione Odds Ratio (95%CI)	p value
<i>CYP2D6</i>	<i>GSTM1</i>	0.86 (0.36-2.09)	0.86
<i>PON55</i>	<i>GSTM1</i>	1.18 (0.82-1.68)	0.38
<i>PON192</i>	<i>GSTM1</i>	0.88 (0.62-1.26)	0.50
<i>GSTT1</i>	<i>GSTM1</i>	1.35 (0.84-2.16)	0.22
<i>GSTM3</i>	<i>GSTM1</i>	0.73 (0.49-1.10)	0.13
<i>GSTP1</i> aplotipo AB/AC/AD vs. AA BB/BC/CC vs. AA	<i>GSTM1</i> Null vs. Pos Null vs. Pos	0.73 (0.50-1.07) 1.02 (0.55-1.87)	0.23
<i>NQO1</i>	<i>GSTM1</i>	0.95 (0.66-1.37)	0.78
<i>NAT2</i>	<i>GSTM1</i>	1.02 (0.72-1.46)	0.90
<i>CYP2D6</i>	<i>GSTT1</i>	1.62 (0.47-5.58)	0.44
<i>GSTP1</i> aplotipo AB/AC/AD vs. AA BB/BC/CC vs. AA	<i>GSTT1</i> Null vs. Pos Null vs. Pos	0.99 (0.59-1.63) 1.72 (0.77-3.83)	0.38
<i>MAO-B</i> (solo maschi)	<i>NQO1</i>	0.95 (0.58-1.57)	0.85
<i>MAO-B</i> (solo femmine) AG vs. AA GG vs. AA	<i>NQO1</i>	0.97 (0.52-1.84) 0.85 (0.39-1.84)	0.91
<i>MAO-B</i> (solo maschi)	<i>DRD2A</i> ²	1.57 (0.55-4.51)	0.40
<i>MAO-B</i> (solo femmine) AG vs. AA GG vs. AA	<i>DRD2A</i> ²	0.62 (0.18-1.97) 0.67 (0.16-2.81)	0.71
<i>MAO-B</i> (solo maschi)	<i>DRD2B</i> ¹	0.59 (0.33-1.09)	0.09
<i>MAO-B</i> (solo femmine) AG vs. AA GG vs. AA	<i>DRD2B</i> ¹	0.97 (0.46-2.02) 0.64 (0.25-1.61)	0.58

* regressione logistica aggiustata per età, sesso, paese, prodotti contenenti tabacco, perdita di conoscenza e familiari di primo grado con M. di Parkinson.

1 Malta esclusa

2 Malta e Svezia escluse.

Tabella 9

Distribuzione dei valori medi di espressione dei diversi trascritti indagati nel tessuto tumorale ed in quello sano peritumorale. Sono riportati i valori medi $\pm$ DS, con l'eccezione del gene *HO-1*, per il quale sono riportati i valori mediani e l'intervallo interquartile.

Geni	N	Espressione genica, u.a.*		P
		Tessuto sano	Tumore	
<i>AHR</i>	27	0.350 $\pm$ 0.11	0.194 $\pm$ 0.11	<0,0001 [†]
<i>EGFR</i>	26	0.054 $\pm$ 0.026	0.068 $\pm$ 0.047	0.134
<i>HER-2</i>	26	0.289 $\pm$ 0.20	0.238 $\pm$ 0.17	0.288
<i>SOD-1</i>	26	0.170 $\pm$ 0.03	0.130 $\pm$ 0.05	<0,005
<i>SOD-2</i>	27	0.281 $\pm$ 0.13	0.181 $\pm$ 0.11	<0,005
<i>HO-1</i>	28	0.164 (0.13-0.21)	0.103(0.068-0.147)	0,031 [¶]

*u.a.= unità arbitrarie; [¶] test di Wilcoxon; [†] test t di Student per dati appaiati

Tabella 10

Disribuzione dei valori medi delle concentrazioni tessutali dei metalli indagati nel tessuto tumorale ed in quello sano peritumorale. Sono riportati i valori medi $\pm$ DS.

Metallo	N	Concentrazione Tessutale $\mu\text{g/g}$ tessuto		$\text{P}^\dagger$
		secco		
		Tessuto sano	Tumore	
Cu	27	4.47 ± 2.04	5.68 ± 3.03	0.079
Cr	28	0.26 ± 0.35	0.25 ± 0.25	0.832
Fe	28	514 ± 380	549 ± 663	0.798
Mn	28	1.01 ± 0.81	1.29 ± 0.63	0.063
Pb	27	1.90 ± 5.04	0.40 ± 0.65	0.115

[†] test *t* di Student per dati appaiati

Tabella 11

Espressione dei diversi trascritti indagati nel tessuto tumorale distinto per istotipo. Sono riportati i valori mediani e l'intervallo interquartile.

Geni	mRNA tumore, u.a.¶		mRNA tumore/tessuto sano	
	Squamocell.(N=13)	ADK (N=13)	Squamocell.(N=13)	ADK (N=13)
AHR	0,20 (0,07-0,25)	0,19 (0,13-0,34)	0,55 (0,21-0,71)	0,70 (0,35-1,06)
EGFR	0,06 (0,05-0,09)	0,06 (0,01-0,07)	1,59 (0,99-2,93) *	0,71 (0,53-1,08)
HER-2	0,10 (0,06-0,13)	0,38 (0,24-0,51) ***	0,46 (0,32-1,13)	1,06 (0,61-2,81) *
HO-1	0,09 (0,05-0,15)	0,11 (0,07-0,16)	0,55 (0,31-1,57)	0,59 (0,31-1,57)
SOD-1	0,14 (0,09-0,19)	0,12 (0,09-0,13)	0,72 (0,52-1,05)	0,60 (0,48-0,98)
SOD-2	0,2 (0,08-0,32)	0,14 (0,11-0,23)	0,51 (0,35-1,13)	0,67 (0,32-0,88)

***p=0.000, *p=0.019 test di Mann-Whitney

¶ u.a.= unità arbitrarie ***p<0,0001, *p<0,05 test di Mann-Whitney

Tabella 12

Concentrazione tissutale dei metalli indagati nel tessuto tumorale distinto per istotipo.

Sono riportati i valori mediani e l'intervallo interquartile.

Metalli	Concentrazione ($\mu\text{g/g}$ tessuto secco)		Concentrazione ($\mu\text{g/g}$ tessuto secco) tumore/tessuto sano	
	SQUAM	ADK	SQUAM	ADK
Cr	0,136 (0,05-0,27)	0,30 (0,12-0,39)	1,36 (0,28-2,73)	2,42 (1,13-4,21)
Cu	5,40 (4,70-8,15)	4,60 (3,10-5,70)	1,61 (1,18-2,34) *	1,08 (0,75-1,32)
Fe	300 (144-747)	392 (150-564)	1,04 (0,64-1,52)	0,75 (0,41-2,09)
Mn	1,17 (0,72-1,57)	1,02 (0,76-1,66)	1,80 (1,11-2,29)	1,29 (0,73-1,84)
Pb	1,70 (0,14-0,29)	0,17 (0,07-0,34)	1,68 (0,96-4,38)	0,73 (0,23-1,83)

*p=0.007 test di Mann-Whitney

9. ALLEGATI

Allegato 1: Manini P., De Palma G., Andreoli R., Poli D.,
Mozzoni P., Folesani G., Mutti A., Apostoli P.
**Environmental and biological monitoring of
benzene exposure in a cohort of Italian taxi
driver. *Toxicol Lett.* 2006 Dec 1;167(2):142-
51.**

Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi drivers

Paola Manini^{a,b,*}, Giuseppe De Palma^a, Roberta Andreoli^{a,b}, Diana Poli^b,
Paola Mozzoni^{a,b}, Giuseppina Folesani^{a,b}, Antonio Mutti^a, Pietro Apostoli^c

^a Laboratory of Industrial Toxicology, Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences,
University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy

^b ISPESL (Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro) Research Center at the University of Parma,
Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy

^c Department of Experimental and Applied Medicine, Occupational Medicine and Industrial Hygiene, University of Brescia,
Piazzale Spedali Civili 1, 25123 Brescia, Italy

Received 29 June 2006; received in revised form 29 August 2006; accepted 31 August 2006

Available online 9 September 2006

Abstract

An integrated approach based on ambient and biological monitoring, the latter including both biomarkers of exposure and susceptibility, was applied to characterize benzene exposure in a group of 37 taxi drivers of the city of Parma (Italy). Airborne benzene concentrations were assessed by 24 h personal sampling and work-shift sampling inside the taxicab using passive samplers (Radiello®). Benzene metabolites, *trans,trans*-muconic acid (*t,t*-MA) and *S*-phenylmercapturic acid (*S*-PMA), and urinary cotinine as biomarker of smoking habits were measured by isotopic dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry in both pre-shift (PS) and end-of-shift (EOS) samples. Urinary benzene (U-B) levels were determined by solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry in EOS samples. Relevant polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, glutathione *S*-transferases M1-1 (*GSTM1*), T1-1, and A1 were characterized by PCR-based methods.

Mean airborne benzene concentration was $5.85 \pm 1.65 \mu\text{g}/\text{m}^3$, as assessed by 24 h personal sampling integrating for work-shift, indoor or general environment activities. Significantly, higher benzene concentrations were detected in the taxicab during the work-shift ($7.71 \pm 1.95 \mu\text{g}/\text{m}^3$, $p < 0.005$). Smokers eliminated significantly higher concentrations of U-B and *S*-PMA than non-smokers in EOS samples [geometric mean (geometric S.D.): 2.58 (4.23) versus 0.44 (1.79) $\mu\text{g}/\text{l}$ for U-B; 3.79 (1.50) versus 2.14 (1.87) $\mu\text{g}/\text{g creat.}$ for *S*-PMA, $p < 0.002$]. Within smokers, *S*-PMA concentrations significantly increased at the end of the work-shift compared to pre-shift values ($p < 0.05$). *t,t*-MA showed a similar behaviour, although differences were not significant. In the narrow range examined, no correlation was observed between air benzene concentration and urinary biomarkers. All benzene biomarkers but EOS *t,t*-MA were correlated with U-cotinine ($p < 0.05$). *GSTM1* polymorphism significantly modulated *S*-PMA excretion, as subjects bearing the *GSTM1pos* genotype [3.61 (1.15) $\mu\text{g}/\text{g creat.}$] excreted significantly higher *S*-PMA concentrations than *GSTM1null* subjects [2.19 (1.18) $\mu\text{g}/\text{g creat.}$, $p < 0.05$].

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Benzene; Taxi drivers; *GSTM1* polymorphism; *S*-Phenylmercapturic acid; *t,t*-Muconic acid; Urinary benzene

* Corresponding author at: Laboratory of Industrial Toxicology, Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences, University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy. Tel.: +39 0521 033060; fax: +39 0521 033076.

E-mail address: paola.manini@unipr.it (P. Manini).

1. Introduction

Due to its toxicity properties, benzene has become one of the most intensely regulated substances in the world. It has been recognized as a class I carcinogenic agent from the International Agency for Research on Cancer (IARC), as long-term exposure to high benzene concentrations is known to cause bone marrow damage, leukemia and aplastic anemia (IARC, 1982; WHO, 1993). After an early uncontrolled use as a solvent, exposure to benzene in developed countries mainly occurs in the chemical and petroleum industry, and in urban environments, where benzene is a ubiquitous pollutant arising from motor vehicle emissions. In addition, tobacco smoke represents a relevant source of personal benzene intake (Brugnone et al., 1992; Melikian et al., 1999; Ghittori et al., 1999). Since it has been estimated that the risk of developing leukemia is about six cases per million among people who experience lifetime exposure to benzene concentrations of $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in air (WHO Working Group, 1996), it is clear that benzene abatement represents a public health concern. In the past decade, after the reduction of benzene content in unleaded fuel (from 5% to 1%, European Directive 98/70/EC), airborne concentrations have been significantly decreased in Italy (Tomei et al., 2001; Verdina et al., 2001; Bono et al., 2005) and are now close or even below the recommended threshold level of $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$, which will be progressively decreased up to $5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ within 2010. However, higher values ($>20 \mu\text{g}/\text{m}^3$) have been reported for some Italian cities characterized by high traffic density and unfavorable geographical and climatic conditions (Rossi et al., 1999; Maffei et al., 2005; Farmer et al., 2005). Due to the current low exposure levels, biological monitoring of groups of workers exposed to benzene from automobile exhaust emissions in urban environments (traffic policemen, bus drivers) represents a complex issue. Recent studies have indicated that the most sensitive and reliable biomarkers of benzene exposure are *S*-phenylmercapturic acid (*S*-PMA), *trans,trans*-muconic acid (*t,t*-MA) (Melikian et al., 2002), and urinary benzene (U-B) (Waidyanatha et al., 2001; Fustinoni et al., 2005). Comparative investigations among these biomarkers have shown that *S*-PMA is superior to *t,t*-MA in terms of both sensitivity and specificity and is suitable for benzene exposures down to 0.3 ppm (or $960 \mu\text{g}/\text{m}^3$, Boogard and van Sittert, 1995) or 0.1 ppm (or $320 \mu\text{g}/\text{m}^3$, Qu et al., 2003), whereas U-B seems to be able to detect even lower (<0.15 ppm or $480 \mu\text{g}/\text{m}^3$) exposures (Fustinoni et al., 2005). In addition, a number of studies have been conducted with the aim to evaluate whether genetic polymorphisms of biotransformation enzymes may play a role in determin-

ing individual susceptibility to low-dose benzene exposure. In an Italian study conducted on 59 non-smoking bus drivers meanly exposed to $82.2 \pm 25.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ of benzene, Rossi et al. (1999) reported a significantly higher *t,t*-MA excretion in subjects bearing the *GSTT1* null genotype, and a significantly lower *S*-PMA excretion in subjects bearing a defective NQO1 genotype or CYP2D6 extensive-metabolizers. A similar investigation conducted on 169 policemen exposed to benzene concentrations below $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ showed that the *t,t*-MA/blood benzene ratio was partially modulated by GSTs, as significantly higher values were found in subjects lacking both *GSTM1* and *GSTT1* activities. The variance in *S*-PMA/blood benzene ratio was not associated with metabolic polymorphisms, but only with smoking and occupation (Verdina et al., 2001). More recently, Fustinoni et al. (2005) reported a possible influence of *CYP2E1* polymorphisms (*RsaI* and/or *DraI*) in subjects bearing at least one variant allele, who showed increased levels of *t,t*-MA and decreased concentrations of U-B, as compared to homozygous wild type subjects.

Since it has been recognized that benzene and other volatile organic compounds are increased in the passenger compartment of automobiles as compared to outdoor (Jo and Yu, 2001; Schupp et al., 2006), taxi drivers are probably the professional category, which is most exposed to environmental pollutants. In addition, their job organization contemplates very long work-shifts, e.g. up to 12–14 consecutive hours spent in the urban traffic.

This study was planned to pursue the following aims: (i) to characterize benzene exposure in a group of taxi drivers of the city of Parma (Italy) by an integrated approach, based on both environmental and biological monitoring and (ii) to investigate the modifying effect of genetic polymorphisms of the enzymes involved in benzene biotransformation. The genotypes of microsomal epoxide hydrolase (*EPHX1*), NAD(P)H:quinone oxidoreductase (*NQO1*), glutathione *S*-transferases M1-1 (*GSTM1*), T1-1 (*GSTT1*), and A1 (*GSTA1*) were included in the study. We chose not to characterize the *CYP2E1* polymorphisms (allele *CYP2E1**5A), whose frequency is very low among Caucasians (only approximately 5% of Europeans are heterozygous) and whose *in vivo* significance remains far from clear.

2. Subjects and methods

2.1. Subjects

Thirty-seven volunteers (35 males, 16 smokers, aged 42.7 ± 11.7 years) were recruited among the 60 taxi drivers (62% of participation) doing their job in Parma, Italy. The study

Table 1

Demographic characteristics of the study group and summary of information collected by questionnaire

Number of subjects	37
Age (years)	42.7 ± 11.7
Gender (male/female)	35/2
Number of current/ex-/never-smokers	16/0/21
Cigarettes/day (mean ± S.E.M.)	12.8 ± 8.7
Years of smoke (mean ± S.E.M.)	20.0 ± 11.8
Duration of shift (h, mean ± S.E.M.)	11.1 ± 1.7
Time spent outside car (h, mean ± S.E.M.)	2.4 ± 1.4
Time with the engine on (h, mean ± S.E.M.)	7.5 ± 2.0
Time with window open (h, mean ± S.E.M.)	2.2 ± 1.5
Use of air conditioning (yes/no)	22/15
Time with air conditioning on (h, mean ± S.E.M.)	7.9 ± 4.3

was conducted in March 2004. All subjects were monitored once, during the same work-shift (7:00–19:00), in 4 consecutive days characterized by similar climatic conditions (temperatures: maximum 20–23 °C, minimum 7–11 °C, air humidity about 60%, wind 3–5 m/s, no rain). In these days, benzene ambient concentration measured by municipal air monitoring stations was $3.25 \pm 0.50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ on average, and was in line with the mean benzene concentration of year 2004 (mean 3.2, median $3.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$, range 0.5–11 $\mu\text{g}/\text{m}^3$; source; ARPA, 2004). All the taxicabs were equipped with Diesel engine. Subjects were asked not to modify their working habits and to fill a questionnaire to collect information concerning the work-shift (time spent inside/outside the car, with the engine on/off, with the window open/closed, with the air conditioning on/off), and the smoking habits. All this information is reported in Table 1. The study protocol was approved by the local Ethical Committee and the subjects participated after giving written, informed consent.

2.2. Chemicals

Benzene, toluene, ethylbenzene, *o*-, *m*-, *p*-xylenes (BTEX, purity 99%), the corresponding deuterated standards (BTEX- d_6) and $^{13}\text{C}_6$ -benzene used as internal standards (ISs), *trans,trans*-muconic acid (*t,t*-MA, 98%), cotinine (98%), cotinine- d_3 (99%), carbon disulphide (99.9+%), analytical grade formic acid and ammonium hydroxide were purchased by Sigma–Aldrich (Milan, Italy). DL-Phenylmercapturic acid (S-PMA, purity 98%) was supplied by TCI America (Portland, OR, USA). All standards were used without further purification. S-PMA- d_5 and *t,t*-MA- d_4 were obtained biosynthetically from rat urine and purified by solid-phase extraction (SPE) and HPLC (Melikian et al., 1999). HPLC-grade water and methanol were from Carlo Erba (Milan, Italy). Stock solutions containing about 1 g/l of BTEX and S-PMA were prepared in methanol; cotinine was dissolved in water. The solubilization of *t,t*-MA (about 0.5 mg/l) in 0.1N aqueous sodium hydroxide was achieved by heating and stirring.

2.3. Exposure assessment

Personal exposure to ambient concentrations of BTEX was assessed by using Radiello® passive-diffusive samplers (Fondazione S. Maugeri, Padova, Italy). Two samplers were used for each subject: one sampler was located inside the taxicab, in the breathing zone in correspondence of the headrest of the right front seat for the whole work-shift (11.1 ± 1.7 h); the second sampler was worn by the taxi driver starting from 12 h before the beginning of the shift, in order to obtain a 24 h personal sampling accounting for the daily BTEX dose uptaken during the work-shift, indoor or in general environment activities (23.9 ± 1.2 h). BTEX were desorbed according to the instructions given by the manufacturer, using low-benzene carbon disulfide. Analytical determinations were performed on a Hewlett-Packard 5890 GC equipped with a HP 7673 autosampler, a split/splitless injector, and a flame ionization detector, using the NIOSH method 1501. For all BTEX, the limit of detection (LOD) of the whole procedure was 0.5–1 μg (as absolute amount) or 0.5–1.5 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (as airborne concentration for a 12 h sampling), and the reproducibility, expressed as %CV, was 4–6% and 5–8% within and between series, respectively. In the case of benzene, the LOD was 1 μg or 1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, and the %CV was 6% (within series) and 8% (between series).

2.4. Biological monitoring

Spot urine samples were collected at the beginning (pre-shift, PS) and at the end of the shift (EOS). Urine samples were divided into three aliquots and frozen at -20°C until analyses of unchanged BTEX, benzene metabolites, and cotinine, respectively.

Urinary benzene (U-B) and other unmodified aromatic hydrocarbons were determined in EOS samples by solid phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry (SPME GC–MS), as previously described (Andreoli et al., 1999). Briefly, 2 ml of urine were immediately transferred into 4.0 ml SPME glass vials containing 1.0 g of NaCl. Then, 2 μl of a IS mixture [$^{13}\text{C}_6$ -benzene (0.5 $\mu\text{g}/\text{l}$), ethylbenzene- d_6 (1 $\mu\text{g}/\text{l}$), toluene- d_6 and *p*-xylene- d_6 (2 $\mu\text{g}/\text{l}$)] was added and samples were shaken and stored at -20°C . Headspace SPME sampling was performed at 45°C for 30 min under stirring conditions using a 75 μm Carboxen PDMS fiber (Supelco, Bellefonte, PA, USA) mounted on a Combi/Pal System autosampler (CTC Analytics, Zwingen, Switzerland). Analyses were carried out on Hewlett-Packard HP 6890 gas chromatograph coupled with a HP 5973 mass selective detector, controlled by a HP Chem Station (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

Benzene metabolites, *t,t*-MA and S-PMA, were determined by isotopic dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS–MS) using a PE-Sciex API 365 triple–quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Thornhill, Canada) equipped with a ionspray interface for pneumatically assisted electrospray (ESI). Before analyses, urine samples were centrifuged at $5000 \times g$ for 10 min,

added with a IS mixture containing *t,t*-MA-*d*₄ and *S*-PMA-*d*₅, and acidified with formic acid (0.1 M). A volume of 20 µl was then injected onto the LC column. Separation of benzene metabolites was obtained using a Supelcosil LC-18-DB (75 mm × 3.0 mm i.d., 3 µm; Supelco). Elution was achieved at a flow-rate of 0.50 ml/min by running a linear gradient starting from 2% (hold 1.5 min) to 80% methanol (in 6.5 min, and then hold 1 min) in 20 mM aqueous formic acid. Analytes were ionized by negative-ion (NI) ESI and detection was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode following the transitions characteristic of the analytes and ISs, *m/z* 141 → 97 for *t,t*-MA, *m/z* 145 → 101 for *t,t*-MA-*d*₄, *m/z* 238 → 109 for *S*-PMA, and *m/z* 243 → 114 for *S*-PMA-*d*₅. Concentrations of urinary metabolites were expressed as a function of creatinine concentration (µg/g creat.), measured by the method of Jaffe (Henry, 1974). For quantitative analyses, calibrations were performed in the matrix, by spiking pooled urine samples from non-exposed subjects with appropriate standard mixtures. The LOD, calculated as the ratio *S/N* > 3, was 0.1 µg/l for *S*-PMA and 2.5 µg/l for *t,t*-MA. The coefficient of variation of the method (%CV) was within 1.3% and 2.6% for all intra- and inter-day determinations.

Urinary free cotinine (U-cotinine) was determined by isotopic dilution LC–MS–MS. Before analyses, urine samples were added with the IS (cotinine-*d*₃) and centrifuged at 5000 × *g* for 10 min. Chromatography was performed on an Atlantis® dC₁₈ column (100 mm × 2.0 mm i.d., 3 µm; Waters, Milford, MA, USA) using variable proportions of 10 mM aqueous formic acid (pH 3.75) and methanol. Elution program: 12% methanol, hold for 12 min; from 12% to 70% methanol in 2.5 min (linear gradient); 70% methanol, hold for 1 min. The flow-rate was 0.3 ml/min and the injection volume 30 µl. Analytes were ionized in positive-ion (PI) mode and the transitions chosen for SRM detection of cotinine and its IS were *m/z* 177 → 80 and *m/z* 180 → 101, respectively. The LOD was 0.2 µg/l (20 µl injected), the %CV below 2% for all intra- and inter-day determinations.

2.5. Genotype analysis

The genotypes of polymorphic enzymes relevant to benzene metabolism, namely *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTA1*, *NQO1*, and *EPHX1*, were characterized on DNA extracted from 1 ml of peripheral whole blood using a PureGene DNA purification system (Gentra Systems, Minneapolis, MN). Genetic polymorphisms of *EPHX1* (Smith and Harrison, 1997), *NQO1* (Schulz et al., 1997), and *GSTA1* (Coles et al., 2001) were determined with minimal changes by using the mentioned polymerase chain reaction-restriction fragments length polymorphism (PCR-RFLP) protocols. To determine the presence or absence of *GSTM1* and *GSTT1*, a multiplex PCR protocol with albumin as internal control (Arand et al., 1996) was used. Observed genotype frequencies did not differ significantly from the expected (Garte et al., 2001) and the study cohort was in Hardy-Weinberg equilibrium. The following genotype frequencies were found: *GSTA1***A***A* 33%, *GSTA1***A***B* 58%,

*GSTA1***B***B* 9%; *GSTM1* positive 53%; *GSTT1* positive 85%; *EPHX1*13 Tyr/Tyr 54%, *EPHX1*13 Tyr/His 27%, *EPHX1*13 His/His 19%; *EPHX1*39 His/His 62%; *EPHX1*39 His/Arg 27%; *EPHX1*39 Arg/Arg 11%; *NQO1***1***1* 56%, *NQO1***1***2* 38%, *NQO1***2***2* 6%.

2.6. Statistics

Statistical analyses were carried out by using SPSS software (version 14.0 for Windows, Chicago, IL). All analytical determinations were above the corresponding limit of detections. Parametric statistical tests were applied to log-transformed values, when necessary to obtain a normal distribution, which was assessed by the one-sample Kolmogorov–Smirnov test. Differences between groups were assessed using the *t*-test for independent samples, whereas the *t*-test for paired samples was applied to compare metabolite concentrations in different samples from the same individual. Pearson's *r* was used to assess the correlation between variables. Non-parametric tests were also applied with confirmative purpose (Mann–Whitney *U*-test, Wilcoxon matched-paired test, and Spearman ρ). Analysis of covariance (ANCOVA) and multiple linear regression analysis models were used to assess the contribution of genetic polymorphisms and other covariates (smoking habits as urinary cotinine, and personal benzene) to the variability of metabolites. *GSTA1* and *NQO1* genotypes were collapsed into two groups referring to wild type homozygous subjects and people carrying at least one variant allele, respectively. For *EPHX1* polymorphism, subjects were classified as carrying either normal-high or slow activity genotypes, according to Sarmanova et al. (2000). The significance level for all test was $p \leq 0.05$ (two-tailed). Stepwise regression analyses were run using a significance level of 0.05 for entry and 0.10 for removal from the model.

3. Results

3.1. Ambient monitoring

Table 2 summarizes the results of BTEX ambient monitoring. All variables were normally distributed. The time-weighted average concentrations of BTEX inside the car were significantly higher than those assessed by the 24 h personal sampling ($p < 0.05$, *t*-test for paired samples). Such differences were observed considering both the whole group and the subgroups of taxi drivers distinguished for their smoking habits. Only in the case of toluene in non-smokers, the concentration detected inside the taxicab was similar to that assessed by the 24 h personal sampling. No differences were detected between smokers and non-smokers, either in the 24 h personal sampling or in the taxicab, thus excluding a contribution of side stream tobacco smoke inside the car. BTEX concentrations inside the taxicab were not

Table 2

Average personal air concentrations (24 h personal) and taxicab concentrations ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in the whole group of taxi drivers ($n = 37$) and in subgroups based on the current smoking status

Compound	Sampling	Whole group ($n = 37$)	Non-smokers ($n = 21$)	Smokers ($n = 16$)
Benzene	24 h Personal	5.9 ± 1.7	6.0 ± 1.7	5.6 ± 1.7
	Taxicab	$7.7 \pm 2.0^*$	$7.5 \pm 1.9^\#$	$8.1 \pm 2.2^*$
Toluene	24 h Personal	29.6 ± 18.5	34.7 ± 21.1	24.5 ± 9.1
	Taxicab	$35.2 \pm 25.7^\#$	36.5 ± 30.6	$34.2 \pm 18.0^*$
Ethylbenzene	24 h Personal	4.4 ± 1.4	4.6 ± 1.6	4.0 ± 0.9
	Taxicab	$6.2 \pm 1.9^*$	$6.3 \pm 1.9^*$	$6.1 \pm 2.0^*$
Xylenes	24 h Personal	20.3 ± 6.1	21.1 ± 6.7	19.1 ± 5.0
	Taxicab	$27.7 \pm 11.5^*$	$27.9 \pm 13.5^*$	$27.6 \pm 8.6^*$

* $p < 0.005$, # $p \leq 0.05$, two-tailed t -test for paired samples (taxicab vs. 24 h personal sampling).

significantly influenced by the car model and other self-reported factors, like use of air conditioning, window opening, time with engine on. The ambient concentrations of aromatic hydrocarbons were correlated each other for both the sampling conditions (data not shown). Assuming that a healthy subject employed in a sedentary job inhales about 500 ml of air 16 times/min (that is about $0.48 \text{ m}^3/\text{h}$), the mean benzene daily dose uptaken by inhalation [obtained by multiplying personal benzene concentration ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) $\times$ the sampling time (h) $\times 0.48 (\text{m}^3/\text{h})$] was about $67.0 \pm 19.7 \mu\text{g}$ benzene/day, $40.3 \pm 11.5 \mu\text{g}$ of which during the work-shift [benzene concentration in the taxicab ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) $\times$ time inside the taxicab (h) $\times 0.48 (\text{m}^3/\text{h})$]. By difference between day and work-shift uptake, it was estimated a mean benzene contribution of $25.1 \pm 20.2 \mu\text{g}$ uptaken during extra-professional activities, corresponding to a median airborne benzene concentration of $3.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

3.2. Biological monitoring

The results of biomonitoring in taxi drivers classified according to smoking habits are summarized in Table 3. t,t -MA and U-cotinine distributed normally (the latter only after stratification for smoking habits), whereas S -PMA and U-B followed a log-normal distribution. Therefore, parametric statistical tests were primarily applied and results were then confirmed by non-parametric tests. Smokers eliminated significantly higher concentrations of EOS U-B and EOS S -PMA than non-smokers ($p < 0.002$ for both). Moreover, within smokers S -PMA concentrations were significantly increased at the end of the work-shift (EOS versus PS, $p < 0.05$). A similar trend was observed in the case of t,t -MA, although the differences between smokers and non-smokers and between PS and EOS samples were not statistically significant.

Table 4 shows Pearson's correlation matrix among environmental and biological markers in EOS samples in subjects distinguished according to smoking habits. In the narrow range examined, no correlation was observed between air benzene concentration and urinary biomarkers. Among non-smokers, only PS and EOS concentrations of t,t -MA were positively correlated each other ($r = 0.54$, $p < 0.05$), whereas a negative correlation was observed between S -PMA and U-B in EOS samples ($r = -0.49$, $p < 0.05$, not confirmed by Spearman's rank test). In the subgroup of smokers, PS and EOS S -PMA concentrations were highly correlated each other ($r = 0.78$, $p < 0.01$). Benzene biomarkers were correlated with each other in EOS samples ($p < 0.05$), with the only exception of S -PMA and U-B. All exposure biomarkers but EOS t,t -MA were correlated with U-cotinine ($p < 0.05$). Fig. 1 shows the correlations between U-cotinine and urinary biomarkers in EOS samples. The self-reported number of cigarettes/day was

Table 3

Biomarkers of benzene exposure and urinary cotinine in pre-shift (PS) and end-of shift (EOS) samples from taxi drivers distinguished according to their smoking habits

Biomarker	Non-smokers ($n = 21$)	Smokers ($n = 16$)
PS t,t -MA ($\mu\text{g}/\text{g creat.}$)	105.4 ± 67.0	130.9 ± 62.0
EOS t,t -MA ($\mu\text{g}/\text{g creat.}$)	122.0 ± 70.3	154.4 ± 70.0
PS S -PMA ($\mu\text{g}/\text{g creat.}$)	2.23 [1.72]	2.81 [1.93]
EOS S -PMA ($\mu\text{g}/\text{g creat.}$)	2.14 [1.87]	3.79 [1.50]*, #
EOS U-B ($\mu\text{g}/\text{l}$)	0.44 [1.79]	2.58 [4.23]*
PS U-cotinine ($\mu\text{g}/\text{g creat.}$)	1.41 ± 1.22	$789 \pm 673^*$
EOS U-cotinine ($\mu\text{g}/\text{g creat.}$)	1.45 ± 1.28	$1100 \pm 879^*, \#$

t,t -MA and U-cotinine values are expressed as mean $\pm$ S.D., S -PMA and U-B as geometric mean (GM) [geometric S.D. (GSD)].

* $p < 0.002$, two-tailed t -test for independent samples (smokers vs. non-smokers).

$p < 0.05$, two-tailed t -test for paired samples (EOS vs. PS).

Table 4

Pearson's correlation matrix including environmental [benzene in the taxicab (B taxicab) and personal benzene 24 h (B 24 h)] and biological markers in the subgroups of non-smoking ($n = 21$) and smoking ($n = 16$) taxi drivers

	B 24 h	EOS <i>t,t</i> -MA	EOS <i>S</i> -PMA	EOS U-B	EOS U-Cot
Non-smokers ($n = 21$)					
B taxicab	0.05	−0.18	−0.56	0.20	−0.11
B 24 h		0.33	0.38	−0.32	−0.92
EOS <i>t,t</i> -MA			0.15	−0.22	0.18
EOS <i>S</i> -PMA				−0.49 [#]	0.21
EOS U-B					0.22
Smokers ($n = 16$)					
B taxicab	0.21	−0.24	0.28	0.30	0.30
B 24 h		0.15	0.26	0.12	0.12
EOS <i>t,t</i> -MA			0.51 [#]	0.57 [#]	0.42
EOS <i>S</i> -PMA				0.43	0.67 [*]
EOS U-B					0.63 [#]

The concentrations of EOS *S*-PMA and EOS U-B were log-transformed. Metabolites were expressed as a function of creatinine concentration ($\mu\text{g/g creat.}$) for correlations with environmental parameters, U-B, and when PS concentrations were correlated with EOS concentrations (not shown). Correlations between different metabolites in the same sample were performed on concentrations expressed in $\mu\text{g/l}$.

* $p < 0.01$, [#] $p < 0.05$, Pearson's correlation, two-tailed.

highly correlated with U-cotinine in both samplings ($\rho > 0.84$, $p < 0.01$), confirming the reliability of questionnaire to collect information on the smoking habits. Significant correlations were observed between the number of cigarettes/day and the concentrations of both EOS *S*-PMA ($r = 0.72$, $p < 0.01$) and EOS *t,t*-MA ($r = 0.51$, $p < 0.05$).

3.3. Modifying role of *GSTM1* genotype

S-PMA excretion was found to be significantly influenced by *GSTM1* status in an ANCOVA model ($F = 3.994$, $p = 0.016$) considering personal exposure as covariate, and *GSTM1* and the smoking status (yes/no) as factors. The dependent variable was significantly influenced by the covariate ($F = 6.368$, $p = 0.020$) and both

the factors ($F = 4.392$, $p = 0.049$ for *GSTM1*; $F = 9.214$, $p = 0.007$ for smoking habit). Table 5 reports the estimated marginal means of EOS *S*-PMA in subjects classified by *GSTM1* genotype and smoking habits.

Stepwise multiple linear regression models were then evaluated, in order to investigate the modifying effect of metabolic genotypes and other covariates (personal benzene, U-cotinine, and U-creatinine) on benzene exposure biomarkers, set as dependent variables. The best predictors for *S*-PMA concentrations in EOS samples were U-cotinine, *GSTA1* and *GSTM1* status, and personal benzene sampling, as shown in Table 6. The three subjects bearing a *GSTA1***B***B* genotype (all non-smokers) were found to excrete significantly lower EOS *S*-PMA levels [1.16 (1.37) $\mu\text{g/g creat.}$] than subjects bearing at least a *GSTA1***A* allele, considering either the whole group

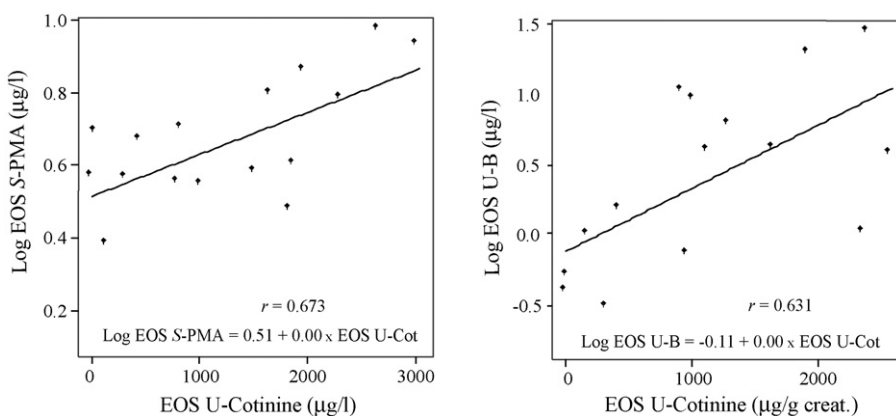


Fig. 1. Relationships between U-cotinine and *S*-PMA and between U-cotinine and U-B at the end of shift in samples from smoking taxi drivers ($n = 16$).

Table 5

S-PMA excretion ($\mu\text{g/g creat.}$) in end-of-shift samples from subjects bearing different GSTM1 genotype

Genotype	EOS S-PMA ($\mu\text{g/g creat.}$)					
	Whole group		Non-smokers		Smokers	
	<i>n</i>	GM [GSD]	<i>n</i>	GM [GSD]	<i>n</i>	GM [GSD]
<i>GSTM1 null</i>	17	2.19 [1.18]	8	1.53 [1.25]	9	3.63 [1.27]
<i>GSTM1 pos</i>	20	3.61 [#] [1.15]	13	2.93 [1.20]	7	4.85 [1.27]

Estimated marginal means were calculated for an exposure to $5.88 \mu\text{g/m}^3$ of airborne benzene (24 h personal sampling). Values are expressed as geometric mean (GM) [geometric S.D. (GSD)].

[#] $p < 0.05$, two-way ANCOVA using GSTM1 and smoking habit (yes/no) as fixed factors and personal benzene exposure as covariate.

Table 6

Predictors of the urinary excretion of EOS S-PMA according to a stepwise multiple linear regression model: $\log \text{EOS S-PMA} = \text{constant} + (\text{EOS U-cotinine}) \times \beta_1 + \text{GSTA1} \times \beta_2 + \text{GSTM1} \times \beta_3 + (\text{personal benzene}) \times \beta_4$

Predictors	B	S.E. B	β	<i>p</i>
Constant	−0.368	0.163	−2.252	0.036
EOS U-cotinine	0.000	0.000	4.728	0.000
<i>GSTA1</i>	0.277	0.076	3.640	0.002
<i>GSTM1</i>	0.119	0.041	2.890	0.009
Personal benzene	0.034	0.012	2.745	0.013

Parameters of the model, as well as regression coefficients and statistical significance (*p*) are shown. The significance level was 0.05 for entry and 0.10 for removal from the model. $R^2 = 0.769$, $p < 0.0001$.

[2.90 (1.84) $\mu\text{g/g creat.}$, $p < 0.02$] or the subgroup of non-smokers [2.28 (1.98) $\mu\text{g/g creat.}$, $p < 0.05$].

4. Discussion

Airborne benzene concentrations detected in this study are comparable to those reported in last years in other field studies, where Italian traffic policemen (Crebelli et al., 2001; Maffei et al., 2005; Bono et al., 2005) and bus drivers (Farmer et al., 2005) were monitored. In general, the concentrations measured in the more recent studies manifested a trend towards lower levels as compared to the past (Rossi et al., 1999). Taxi drivers are a professional category of independent workers; therefore, they have been poorly investigated so far. The vehicle cabin has been recognized as an important microenvironment that can create personal exposure to many volatile organic compounds. A pilot study conducted in Korea comparing personal exposure to BTEX in public bus and taxicab drivers demonstrated that the latter ones are exposed to significantly higher concentrations during the work-shift (Jo and Yu, 2001). Despite our data showed that BTEX concentrations inside the taxicab are significantly increased as compared to the urban

environment, these levels are considerably lower than the limit fixed by the Italian law (EU directive 97/42/EC) for the work environment ($3200 \mu\text{g/m}^3$ or 1 ppm) and close to the recommended air quality parameter of $10 \mu\text{g/m}^3$ (or 3.12 ppb).

Ambient monitoring was useful to estimate the uptake of benzene from the air, but not that arising from tobacco smoke, as already reported by other authors (Crebelli et al., 2001; Sørensen et al., 2003). Conversely, biological parameters are thought to reflect the whole absorbed dose. This is why we did not observe any significant correlation between environmental and biological parameters in the narrow range of concentration explored ($3\text{--}12 \mu\text{g/m}^3$), contrary to other studies where exposure spanned over a broader range. In our study group, the mean dose uptaken from the environment by inhalation was about $67 \mu\text{g}$ benzene/day, the 60% of which during the work-shift. Considering that the mean content of benzene in one cigarette is about $50 \mu\text{g}$ (Darrall et al., 1998), it is clear that benzene uptake from cigarette smoke is much higher than that arising from occupational exposure. Nevertheless, only two of three biomarkers (U-B and S-PMA) distinguished between smoking and non-smoking subjects at the end of the work-shift (Table 3), whereas in the case of *t,t*-MA this difference was no longer significant. It is known that the interference by sorbic acid, a common food additive partly metabolized into *t,t*-MA, could affect the specificity of this biomarker especially at low benzene exposure (Negri et al., 2005). The consumption of candies and chewing gums, quite common particularly among smokers, could account, at least in part, for the lack of correlation between EOS *t,t*-MA levels and U-cotinine. S-PMA concentrations increased at the end of the work-shift as compared to pre-shift values in smokers but not in non-smokers. This means that benzene exposure to $3\text{--}12 \mu\text{g/m}^3$, as detected in the taxicab, is not sufficient to modify the concentrations of urinary metabolites, as occurs in the case of tobacco smoke instead. Consistently, S-PMA concentra-

tions were correlated with both urinary cotinine and the self-reported number of cigarettes, in agreement with a previous study (Ghittori et al., 1999), but not with environmental parameters. A similar behavior was observed for U-B. U-B seemed to be more sensitive than S-PMA in distinguishing smokers from non-smokers (with about a six-fold increase in U-B levels compared to a 1.8-fold increase in S-PMA concentrations), but it was affected by a larger inter-individual variability, as shown by the different distributions of biomarkers. Whereas S-PMA displayed a log-normal distribution with an acceptable GSD, the distribution of U-B in the subgroup of smokers was largely asymmetric with a GSD of 4.23. This behavior could be ascribed to kinetic reasons related to the short half-life of U-B and its sampling time. In fact, the measurement of the urinary levels of a solvent can be adequately interpreted only if the collection of samples is carried out at relatively short times. Imbriani and Ghittori (2005) proposed to collect urine at the end of each half-shift and to compare the resulting concentrations with the exposure of the 4 previous hours. These kinetic issues together with pre-analytical factors (e.g. particular care needed in sample collection, handling, and storage) limit the practical use of U-B in the biomonitoring of benzene exposure. Taken together, our data confirm that S-PMA is the more reliable biomarker for benzene biomonitoring. The above mentioned kinetic considerations could explain the apparent disagreement with the conclusions drawn by Fustinoni et al. (2005) in the comparison among the same biomarkers, from which U-B resulted the best one starting from airborne concentrations as low as $6 \mu\text{g}/\text{m}^3$. On the other hand, the use of a different method in the determination of S-PMA, e.g. immunoassay technique instead of LC-MS-MS, may reasonably explain the unexpected poor performance of the biomarker. The use of chromatographic techniques coupled with mass spectrometry seems to be a necessary requirement to achieve reliable results for any of these biomarkers when low exposures are monitored.

To our knowledge, this is the first study demonstrating a significant modulation of S-PMA levels by the *GSTM1* genotype. A key role of *GSTM1* has already been demonstrated in the case of styrene metabolism and excretion of mercapturic acids (De Palma et al., 2001; Haufroid et al., 2001). A recent biomarker study on 130 Chinese workers with benzene exposure ranging from 0.06 to 122 ppm (or 0.19–390 mg/m^3 ; median exposure 3.2 ppm or 10.2 mg/m^3) demonstrated that *GSTT1* is probably a key enzyme in benzene metabolism, as subjects carrying the *GSTT1* wild-type genotype excreted two-fold higher concentrations of S-PMA than subjects carrying the null

genotype ($59.84 \pm 47.66 \mu\text{g}/\text{g creat.}/\text{ppm benzene}$ versus $24.72 \pm 32.48 \mu\text{g}/\text{g creat.}/\text{ppm benzene}$, $p < 0.0001$) (Qu et al., 2005). A similar conclusion concerning the role of *GSTT1* was drawn by Sørensen et al. (2004) in a field study conducted on Estonian oil shale mineworkers (mean benzene exposure $114 \pm 35 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and $190 \pm 50 \mu\text{g}/\text{m}^3$ for surface and underground workers, respectively), whereas no association was found between the *GSTM1* or *GSTP1* genotypes and S-PMA and *t,t*-MA concentrations. During the working week, S-PMA excretion was significantly increased only for the *GSTT1* wild-type subjects and was relatively constant in the *GSTT1null* subjects. Therefore, it was hypothesized that these differences in S-PMA excretion between subjects bearing opposite *GSTT1* genotypes could only be distinguished at relatively high benzene exposure. In fact, when the same authors investigated the effect of *GSTT1* genotype in 40 Danish volunteers (four of them were smokers) exposed to median urban benzene concentrations of $2.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (0.78 ppb), the difference in urinary levels of S-PMA between subjects with *GSTT1null* ($3.79 \pm 3.23 \mu\text{g}/24 \text{ h}$, $n = 8$) and *GSTT1pos* alleles ($6.71 \pm 5.24 \mu\text{g}/24 \text{ h}$, $n = 32$) was no longer significant ($p = 0.27$, Sørensen et al., 2003). Conversely, both *t,t*-MA and S-PMA were influenced by the *NQO1* genotype, as subjects bearing the heterozygote genotype (+/–) excreted more metabolites than subjects with the wild-type genotype. Other studies performed on workers exposed to environmental benzene gave inconclusive results (Rossi et al., 1999; Verdina et al., 2001; Fustinoni et al., 2005). As already stated by other authors, the limited sample size together with the low level of external benzene exposure might be an explanation to the scarce influence of genetic polymorphisms in comparison to other lifestyle factors, particularly the smoking habits. Due to the low frequency of *GSTT1null* genotype in Caucasian (20%), the subjects bearing the *GSTT1null* genotype were only five in our cohort and we did not observe any influence of this polymorphism. Nevertheless, our data clearly show a significant effect of *GSTM1* polymorphism on the excretion of S-PMA at the end of the work-shift, with *GSTM1pos* subjects excreting significantly higher concentrations of the metabolite than *GSTM1null* subjects. This trend was also observed when workers were distinguished for their smoking habits (Table 5). Very preliminarily, the results of the present study seems to indicate a possible influence of *GSTA1* polymorphism on benzene metabolism and excretion of mercapturates. The three *GSTA1**B*B subjects, expected to express a low *GSTA1*-1/*GSTA2*-2 ratio in the liver (Coles et al., 2001), excreted the lowest EOS S-PMA levels as compared to subjects bearing at least one *GSTA**A

allele. Both GSTM1-1 and GSTA2-2 are expressed in the liver and might be involved in the detoxification of benzene oxide formed there via cytochrome P450 2E1, even at low benzene concentrations. A working hypothesis that needs to be verified on larger samples is that different glutathione *S*-transferases, e.g. GSTT1-1, GSTM1-1, and GSTA2-2, might be involved at different benzene levels.

5. Conclusions

This study showed that during the work shift, taxi drivers are exposed to a two-fold higher benzene concentration as compared to the value provided by the municipal air-quality monitoring stations (about $3 \mu\text{g}/\text{m}^3$), to which the general population is supposed to be exposed. Nevertheless, these levels are considerably lower than the limit fixed by the law (DLgs 25/2) for the work environment ($3200 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and close to the recommended air quality parameter of $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Cigarette smoking represents the main extra-professional source of benzene uptake, as well as the most important confounding factor for the biomonitoring of occupational benzene exposure. After having excluded the contribution of tobacco smoke, none of benzene biomarkers was significantly modified at the end of the work-shift. In fact, the concentration ranges of biomarkers observed for both smoking and non-smoking taxi drivers fell into the reference value intervals proposed for the unexposed population (BIOLIND.NET, 2005), thus excluding any relevant occupational exposure to benzene. Whereas in workers exposed to high benzene concentrations a key role of *GSTT1* in the inter-individual variations of *S*-PMA was demonstrated, we observed a modifying effect of *GSTM1* on the same biomarker at low exposure levels. Further investigations on larger cohorts of workers are needed to confirm this result and to support the hypothesis that different GSTs might be involved in benzene metabolism at different concentration levels.

Acknowledgements

The kind collaboration of the taxi drivers of the city of Parma and the precious activity of Dr. Giovanni Casillo in subject enrolment and biological specimen collection are gratefully acknowledged.

References

Andreoli, R., Manini, P., Bergamaschi, E., Brustolin, A., Mutti, A., 1999. Solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of monoaromatic hydrocarbons

in blood and urine: application to people exposed to air pollutants. *Chromatographia* 50, 167–172.

Arand, M., Muhlbauer, R., Hengstler, J., Jager, E., Fuchs, J., Winkler, R., Oesch, F., 1996. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of glutathione *S*-transferase *GSTM1* and *GSTT1* polymorphisms. *Anal. Biochem.* 236, 184–186.

ARPA (Agenzia Regionale Protezione Ambiente, Emilia Romagna), 2004. Available at: <http://www.arpa.emr.it/>.

BIOLIND.NET, 2005. Available at: <http://www.biolind.net>.

Bono, R., Traversi, D., Maestri, L., Schilirò, T., Ghittori, S., Baiocchi, C., Gilli, G., 2005. Urban air and tobacco smoke in benzene exposure in a cohort of traffic policemen. *Chem. Biol. Interact.*, 153–154, 239–242.

Boogard, P.J., van Sittert, N.J., 1995. Biological monitoring of exposure to benzene: a comparison between *S*-phenylmercapturic acid, *trans,trans*-muconic acid, and phenol. *Occup. Environ. Med.* 52, 611–620.

Brugnone, F., Perbellini, L., Maranelli, G., Romeo, L., Lombardini, F., 1992. Reference values for blood benzene in occupationally unexposed general population. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 61, 513–518.

Coles, B.F., Morel, F., Rauch, C., Huber, W.W., Yang, M., Teitel, C.H., Green, B., Lang, N.P., Kadlubar, F.F., 2001. Effect of polymorphism in the human glutathione *S*-transferase A1 promoter on hepatic GSTA1 and GSTA2. *Pharmacogenetics* 11, 663–669.

Crebelli, R., Tomei, F., Zijno, A., Ghittori, S., Imbriani, M., Gambale, D., Martini, A., Carere, A., 2001. Exposure to benzene in urban workers: environmental and biological monitoring of traffic police in Rome. *Occup. Environ. Med.* 58, 165–171.

Darrall, K.G., Figgings, J.A., Brown, R.D., Phillips, G.F., 1998. Determination of benzene and associated volatile compounds in mainstream cigarette smoke. *Analyst* 123, 1095–1101.

De Palma, G., Manini, P., Mozzoni, P., Andreoli, R., Bergamaschi, E., Cavazzini, S., Franchini, I., Mutti, A., 2001. Polymorphism of xenobiotic-metabolizing enzymes and excretion of styrene-specific mercapturic acids. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1393–1400.

Farmer, P.B., Kaur, B., Roach, J., Levy, L., Consonni, D., Bertazzi, P.A., Pesatori, A., Fustinoni, S., Buratti, M., Bonzini, M., Colombi, A., Popov, T., Cavallo, D., Desideri, A., Valerio, F., Pala, M., Bolognesi, C., Merlo, F., 2005. The use of *S*-phenylmercapturic acid as biomarker in molecular epidemiology studies of benzene. *Chem. Biol. Interact.*, 153–154, 97–102.

Fustinoni, S., Consonni, D., Campo, L., Buratti, M., Colombi, A., Pesatori, A.C., Bonzini, M., Bertazzi, P.A., Foà, V., Garte, S., Farmer, P.B., Levy, L.S., Pala, M., Valerio, F., Fontana, V., Desideri, A., Merlo, D., 2005. Monitoring low benzene exposure: comparative evaluation of urinary biomarkers, influence of cigarette smoking, and genetic polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 2237–2244.

Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A.K., Ambrosone, C., Autrup, H., Autrup, J.L., Baranova, H., Bathum, L., Benhamou, S., Moffetta, P., Bouchardy, C., Breskvar, K., Brockmoller, J., Cascorbi, I., Clipper, M.L., Coutelle, C., Daly, A., Dell’Omo, M., Dolzan, V., Dresler, C.M., Fryer, A., Haugen, A., Hein, D.W., Hildesheim, A., Hirvonen, A., Hsieh, L.L., Ingelman-Sundberg, M., Kalina, I., Kang, D., Kihara, M., Kiyohara, C., Kremers, P., Lazarus, P., Le Marchand, L., Lechner, M.C., van Lieshout, E.M., London, S., Manni, J.J., Maugard, C.M., Morita, S., Nazar-Stewart, V., Noda, K., Oda, Y., Parl, F.F., Pastorelli, R., Persson, I., Peters, W.H., Rannug, A., Rebbeck, T., Risch, A., Roelandt, L., Romkes, M., Ryberg, D., Salagovic, J., Schoket, B., Seidegard, J., Shields, P.G., Sim, E.,

- Sinnet, D., Strange, R.C., Stucker, I., Sugimura, H., To-Figueras, J., Vineis, P., Yu, M.C., Taioli, E., 2001. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 10, 1239–1248.
- Ghittori, S., Imbriani, M., Maestri, L., Capodaglio, E., Cavalleri, A., 1999. Determination of *S*-phenylmercapturic acid in urine as an indicator of exposure to benzene. *Toxicol. Lett.* 108, 329–334.
- Haufrond, V., Buchet, J.P., Gardinal, G., Ghittori, S., Imbriani, M., Lison, D., 2001. Importance of genetic polymorphisms for enzymes involved in the biotransformation of styrene in humans and interest for interpretation of biomarkers of exposure. *Biomarkers* 6, 236–249.
- Henry, R.J., 1974. *Clinical Chemistry Principle and Techniques*, 2nd ed. Harper & Row, New York.
- IARC, 1982. Benzene. In: *Some Industrial Chemicals and Dyestuffs IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*, vol. 29, 93–148.
- Imbriani, M., Ghittori, S., 2005. Gases and organic solvents in urine as biomarkers of occupational exposure: a review. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 78, 1–19.
- Jo, W.-K., Yu, C.-H., 2001. Public bus and taxicab drivers' exposure to aromatic work-time volatile organic compounds. *Environ. Res.* 86, 66–72.
- Maffei, F., Hrelia, P., Angelini, S., Carbone, F., Forti, G.C., Barbieri, A., Sanguinetti, G., Mattioli, S., Violante, F.S., 2005. Effects of environmental benzene: micronucleus frequencies and hematological values in traffic police working in an urban area. *Mutat. Res.* 583, 1–11.
- Melikian, A.A., O'Connor, R., Prahalad, A.K., Hu, P., Li, H., Kagan, M., Thompson, S., 1999. Determination of the urinary benzene metabolites *S*-phenylmercapturic acid and *trans,trans*-muconic acid by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis* 20, 719–726.
- Melikian, A.A., Qu, Q., Shore, R., Li, G., Li, H., Jin, X., Cohen, B., Chen, L., Li, Y., Yin, S., Mu, R., Zhang, X., Wang, Y., 2002. Personal exposure to different levels of benzene and its relationships to the urinary metabolites *S*-phenylmercapturic acid and *trans,trans*-muconic acid. *J. Chromatogr. A* 778, 211–221.
- Negri, S., Bono, R., Maestri, L., Ghittori, S., Imbriani, M., 2005. High pressure liquid chromatographic–mass spectrometric determination of sorbic acid in urine: verification of formation of *trans,trans*-muconic acid. *Chem. Biol. Interact.*, 153–154, 243–246.
- Qu, Q., Shore, R., Li, G., Jin, X., Chen, L.C., Cohen, B., Melikian, A.A., Eastmond, D., Rappaport, S., Rupa, D., Waidyanatha, S., Yin, S., Yan, H., Meng, M., Winnik, W., Kwok, E.S., Li, Y., Mu, R., Xu, B., Zhang, X., Li, K., 2003. Validation and evaluation of biomarkers in workers exposed to benzene in China. *Res. Resp. Health Eff. Inst.* 115, 1–87.
- Qu, Q., Shore, R., Li, G., Su, L., Jin, X., Melikian, A.A., Roy, N., Chen, L.C., Wirgin, I., Cohen, B., Yin, S., Li, Y., Mu, R., 2005. Biomarkers of benzene: urinary metabolites in relation to individual genotype and personal exposure. *Chem. Biol. Interact.*, 153–154, 85–95.
- Rossi, A.M., Guarnieri, C., Rovesti, S., Gobba, F., Ghittori, S., Vivoli, G., Barale, R., 1999. Genetic polymorphisms influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics* 9, 445–451.
- Sarmanova, J., Tynkova, L., Susova, S., Gut, I., Soucek, P., 2000. Genetic polymorphisms of biotransformation enzymes: allele frequencies in the population of the Czech Republic. *Pharmacogenetics* 10, 781–788.
- Schulz, W.A., Krummeck, A., Rosinger, I., Eickelmann, P., Neuhaus, C., Ebert, T., Schmitz-Drager, B.J., Sies, H., 1997. Increased frequency of a null-allele for NAD(P)H:quinone oxidoreductase in patients with urological malignancies. *Pharmacogenetics* 7, 235–239.
- Schupp, T., Bolt, H.M., Jaech, R., Hengstler, J.G., 2006. Benzene and its methyl-derivatives: derivation of maximum exposure levels in automobiles. *Toxicol. Lett.* 160, 93–104.
- Smith, C.A.D., Harrison, D., 1997. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 350, 630–633.
- Sørensen, M., Skov, H., Autrup, H., Hertel, O., Loft, S., 2003. Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes. *Sci. Total Environ.* 309, 69–80.
- Sørensen, M., Poole, J., Autrup, H., Muzyka, V., Jensen, A., Loft, S., Knudsen, L.E., 2004. Benzene exposure assessed by metabolite excretion in Estonian oil shale mineworkers: influence of glutathione *S*-transferase polymorphisms. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 1729–1735.
- Tomei, F., Ghittori, S., Imbriani, M., Pavanella, S., Carere, A., Marcon, F., Martini, A., Baccolo, T.P., Tomao, E., Zijno, A., Crebelli, R., 2001. Environmental and biological monitoring of traffic wardens from the city of Rome. *Occup. Med.* 51, 198–203.
- Verdina, A., Galati, R., Falasca, G., Ghittori, S., Imbriani, M., Tomei, F., Marcellini, L., Zijno, A., Vecchio, V.D., 2001. Metabolic polymorphisms and urinary biomarkers in subjects with low benzene exposure. *J. Toxicol. Environ. Health A* 64, 607–618.
- Waidyanatha, S., Rothman, N., Fustinoni, S., Smith, M.T., Hayes, R.B., Bechtold, W., Dosemeci, M., Guilan, L., Yin, S., Rappaport, S.M., 2001. Urinary benzene as a biomarker of exposure among occupationally exposed and unexposed subjects. *Carcinogenesis* 22, 279–286.
- WHO, 1993. *WHO Environmental Health Criteria* 155. Biomarkers and risk assessment, concepts and principles. ICPS, Geneva.
- WHO Working Group, 1996. *Updating and Revision of the Air Quality Guidelines for Europe; Report on the WHO Working Group on Volatile Organic Compounds*. EUR/ICP/EHAZ 94 05/MT12.

Allegato 2: De Palma G., Scotti E., **Mozzoni P.**, Alinovi R., Apostoli P., Neri G., Soleo L., Cassano F., Carta P., Murgia N., Muzi G., Mutti A.

ALAD polymorphism and indicators of dose and effects of occupational exposure to inorganic lead. *G Ital Med Lav Ergon.* 2005 Jan-Mar;27 Suppl 1:39-42.

G. De Palma^{1,2}, E. Scotti^{1,2}, P. Mozzoni^{1,2}, R. Alinovi¹, P. Apostoli³, G. Neri³, L. Soleo⁴, F. Cassano⁴, P. Carta⁵, N. Murgia⁶, G. Muzi⁶, A. Mutti¹

Polimorfismo ALAD ed indicatori di dose e di effetto dell'esposizione professionale a piombo inorganico

¹ Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Università degli Studi di Parma

² Centro Ricerche ISPESL presso Università di Parma

³ Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata - Sezione di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale, Università degli Studi di Brescia

⁴ Dipartimento di Medicina Interna e Medicina Pubblica - Sezione di Medicina del Lavoro - Università di Bari

⁵ Università degli Studi di Cagliari - Dipartimento di Sanità Pubblica - Sezione di Medicina del Lavoro Università degli Studi di Cagliari

⁶ Sezione di Medicina del Lavoro e Tossicologia Professionale e Ambientale - Università di Perugia

RIASSUNTO. Il polimorfismo genetico dell'enzima delta-aminolevulinico deidratasi (ALAD) e gli indicatori di esposizione a piombo metallico (Pb) e di effetto sulla biosintesi dell'eme sono stati valutati in 333 soggetti maschi, professionalmente esposti a Pb, con livelli di piombemia (PbB) maggiori di 100 µg/l. Le frequenze genotipiche si distribuivano secondo l'atteso. I valori di PbB erano tendenzialmente più elevati nei soggetti con almeno un allele ALAD-2, mentre i soggetti con genotipo ALAD-1-1 presentavano livelli maggiori di acido δ-aminolevulinico urinario (ALAU) e di zinco protoporfirina ematica (ZPP). La frazione del piombo plasmatico (PbP) era simile nei due gruppi. Nei lavoratori con genotipo ALAD-1-1, gli indicatori di dose e di effetto erano tra loro significativamente correlati. A parità di PbB, negli stessi soggetti era evidente una relazione inversa negativa e significativa tra attività enzimatica ALAD e livelli di ZPP. Il presente studio conferma i risultati di studi precedenti e l'ipotesi che il polimorfismo ALAD possa interferire con i parametri cinetici e dinamici di esposizione professionale a Pb.

Parole chiave: piombo, polimorfismo ALAD, monitoraggio biologico, suscettibilità.

ABSTRACT. www.gimle.fsm.it

The delta-aminolevulinic dehydratase (ALAD) genetic polymorphism was investigated along with biomarkers of lead exposure and effect on 333 male workers, occupationally exposed to lead, with blood lead levels (PbB) higher than 100 µg/l. ALAD genotype frequencies were distributed as expected among Caucasians. Workers bearing at least one ALAD-2 allele showed PbB values slightly higher than those from ALAD-1-1 subjects, who also exhibited higher urinary delta-aminolevulinic acid (ALAU) and blood zinc protoporphyrin (ZPP) levels. The plasmatic lead (PbP)/PbB ratio was similar in both groups. Exposure and effect biomarkers were significantly each other correlated among ALAD-1-1 subjects only, who showed also a significant inverse relationship between ALAD activity and ZPP values. Results confirm previous studies, supporting the hypothesis that ALAD polymorphism may interfere with toxicokinetic and toxicodynamic parameters of occupational exposure to Pb.

Key words: lead, ALAD polymorphism, biological monitoring, susceptibility.

Introduzione

L'acido δ-aminolevulinico deidratasi (ALAD), enzima citoplasmatico inducibile che catalizza la seconda tappa biosintetica dell'eme, rappresenta il principale bersaglio molecolare del piombo inorganico (Pb) circolante nel sangue periferico. Si tratta di una metalloproteina di 280 kD, composta da 8 subunità identiche, ciascuna delle quali lega come cofattore, indispensabile per l'attività enzimatica, un atomo di zinco (Zn). È stato calcolato che circa l'80% del Pb contenuto all'interno dell'eritrocita spiazzalo Zn dal legame con ALAD, inibendone l'attività enzimatica, per alterazione della sua struttura quaternaria (1).

Sulla base del comportamento in campo elettroforetico, negli anni '80 sono state identificate tre varianti polimorfiche dell'enzima (2), ricondotte successivamente ad un polimorfismo genetico (trasversione G₁₇₇C) del gene ALAD, localizzato sul cromosoma 9q34, che determina la sostituzione aminoacidica Lys₅₉Asn (3, 4). Per effetto del polimorfismo, il peptide variante ALAD-2, codificato dall'allele omologo, risulta più elettronegativo rispetto al peptide codificato dall'allele *wild type* ALAD-1. I due alleli sono codominanti, sicché a livello di popolazione sono distinguibili tre diversi fenotipi proteici (ALAD-1-1, ALAD-1-2, ALAD-2-2), corrispondenti ai diversi genotipi, ad elettronegatività crescente. La prevalenza dell'allele ALAD-2 varia a seconda del gruppo etnico considerato: in Italia, è stata stimata una frequenza del 10% (2, 5). Studi sperimentali *in vitro* hanno evidenziato che gli isoenzimi ALAD presentano un'affinità di legame per il Pb proporzionale al contenuto di peptide ALAD-2, probabilmente a causa della maggiore elettronegatività di questo, rispetto al peptide ALAD-1 (1). Ciò sembrerebbe influenzare gli aspetti tossicocinetici e la tossicodinamica del metallo in soggetti con diverso genotipo ALAD. È riportato in letteratura, sebbene non sempre in maniera del tutto concorde, probabilmente a causa dell'eterogeneità delle casistiche e per la bassa frequenza dell'allele variante, che limita la potenza statistica delle singole osservazioni e rende instabili le stime, che i soggetti portatori di allele variante (genotipi

ALAD-1-2 e *ALAD-2-2*) possano presentare livelli di piombemia (PbB) più elevati, con livelli di acido δ -aminolevulinico plasmatico (ALAP) ed urinario (ALAU) e di zinco protoporfirina eritrocitaria (ZPP) più bassi, rispetto ai soggetti con genotipo *ALAD-1-1* (6, review sull'argomento).

Obiettivo del presente studio è stato di verificare se il polimorfismo *ALAD*, aumentando l'affinità dell'enzima per il Pb, sia in grado di modificarne la cinetica e, dunque, la tossicodinamica. In particolare, l'ipotesi formulata è che, se la frazione tossicologicamente attiva del Pb è quella plasmatica, il polimorfismo *ALAD*, influenzando i livelli di questa, possa modulare le relazioni dose-risposta.

Materiali e metodi

Il polimorfismo genetico *ALAD* è stato caratterizzato in 333 soggetti di sesso maschile, età media $40,9 \pm 8,7$ anni (estremi 20-65), professionalmente esposti a livelli di PbB ≥ 100 $\mu\text{g/l}$, ed occupati in produzione e demolizione di accumulatori (n.=122), industria ceramica (n.=70), fonderia (n.=141). Il genotipo metabolico *ALAD* è stato determinato con metodica di reazione polimerasica a catena seguita da analisi dei frammenti di restrizione dopo digestione enzimatica (*PCR-RFLP*) su DNA genomico, estratto da un campione di 2 mL di sangue intero in EDTA con kit commerciale PUREGENE® (Gentra Systems, USA). Le reazioni di *PCR* erano preparate in volume di 40 μL , contenenti 50-100 ng di DNA, Tris-HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, dNTPs 200 μM , 100 nM di ciascun primer, MgCl_2 2 mM, Taq polimerasi 1 U, e sottoposte ai seguenti cicli di amplificazione su termociclatore iCycler (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA): denaturazione iniziale di 2' a 96°C , seguita da 35 cicli di 30s a 95°C , 30s a 60°C , 40s a 72°C , con un ciclo finale di 5' a 72°C . Come primers delle reazioni di *PCR* erano utilizzati i seguenti oligonucleotidi: primer forward 5'-AGA CAG ACA TTA GCT CAG TA-3' e primer reverse 5'-GGC AAA GAC CAC GTC CAT TC-3'. Il prodotto di amplificazione, di 916 paia di basi (bp), era digerito con *MspI*, e sottoposto a separazione elettroforetica su gel di

agarosio NuSieve 3:1 (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) al 3% in TBE. La digestione dell'allele *ALAD-1* dava luogo a quattro frammenti di restrizione, di 583, 158, 139 e 36 bp, mentre nei soggetti con allele *ALAD-2* era presente una banda aggiuntiva, legata alla digestione del frammento di 583 bp in due bande, di 512 e 71 bp. I gel, colorati con bromuro di etidio, erano visualizzati su transilluminatore GEL DOC 1000 (BioRad Laboratoires, CA, USA) e le immagini acquisite su PC tramite telecamera CCD. Le frequenze genotipiche ottenute si distribuivano secondo l'atteso: 272 (81,7%) soggetti erano omozigoti per l'allele *ALAD-1*, 56 (16,8%) eterozigoti *ALAD-1-2* e 5 (1,5%) omozigoti per il gene *ALAD-2*, con frequenze alleliche rispettivamente del 90% e del 10% per gli alleli *ALAD-1* e *ALAD-2*. Gli indicatori di esposizione a Pb [PbB, piombo plasmatico (PbP), piombo urinario (PbU)] e di effetto (attività *ALAD* ematica, ALAP, ALAU, ZPP) sulla sintesi dell'eme erano determinati con i metodi descritti da Neri et al, in questo stesso volume. L'elaborazione statistica è stata eseguita con il programma SPSS™ 12.0 per Windows. La distribuzione delle variabili è stata valutata tramite test di Kolmogorov-Smirnov e, ove necessario e sufficiente per ottenere una normalizzazione della distribuzione, è stata eseguita la trasformazione logaritmica dei valori. Le differenze tra gruppi sono state valutate con test *t* di Student e con test *U* di Mann-Whitney (in caso di variabili distribuite o meno normalmente, rispettivamente). Le relazioni tra variabili sono state stimate tramite analisi delle correlazioni con test di Spearman e con modelli di regressione multipla includendo tra le variabili indipendenti il polimorfismo *ALAD*, i valori di PbB ed altre variabili potenzialmente interferenti come età e abitudini voluttuarie. I soggetti omozigoti *ALAD 2-2* sono stati trattati insieme agli eterozigoti, a causa della loro scarsa numerosità.

Risultati

La distribuzione degli indicatori di dose (PbB, PbP, PbU) e di effetto sulla biosintesi dell'eme (attività *ALAD*,

Tabella 1. Distribuzione dei valori degli indicatori di dose (PbB, PbP, PbU) e di effetto sul sistema emopoietico (ALAD, ALAP, ALAU, ZPP) in lavoratori professionalmente esposti a Pb e classificati in base al polimorfismo ALAD

Indicatori	ALAD 1-1			ALAD 1-2/2-2		
	25° percentile	50° percentile	75° percentile	25° percentile	50° percentile	75° percentile
PbB, $\mu\text{g/l}$	201,5	272	398	224,2	282	396
PbP, $\mu\text{g/l}$	0,47	0,92	1,95	0,66	0,99	1,62
PbP/PbB %	0,22	0,36	0,55	0,23	0,35	0,47
PbU, $\mu\text{g/g Creat.}$	5,95	10,80	19,11	6,45	12,31	20,49
ALAP, ng/l	4,40	5,70	7,25	4,40	5,90	7,30
ALAU, mg/g Creat.	0,65	0,81	1,08	0,57	0,72	1,09
ALAD, U/l	23	29	39	23,75	29	41
ZPP, $\mu\text{g/g Hb}$	1,50	2,20	3,08	1,40	1,90	2,60

AlaP, AlaU, ZPP) nei lavoratori classificati in base al genotipo *ALAD* non presentava differenze statisticamente significative (Tabella I). Rispetto ai soggetti con genotipo *ALAD-1-1*, i lavoratori portatori di allele 2 (*ALAD-1-2* e *ALAD-2-2*) presentavano livelli mediani tendenzialmente più elevati di PbB, PbP, PbU ed ALAP e minori di ALAU e ZPP. La frazione del PbP rispetto alla PbB (PbP/PbB%) era solo lievemente più elevata nei soggetti *ALAD-1-1*, rispetto al resto dei soggetti. Stratificando i lavoratori in base ai livelli di PbB, nel gruppo a bassa esposizione (PbB ≤ 300 µg/l) i soggetti *ALAD1-1* presentavano livelli di ZPP significativamente più elevati rispetto ai portatori di allele *ALAD-2* (media geometrica 1,84 µg/g Hb vs. 1,56 µg/g Hb, $p<0,05$, test t di Student). Per livelli più elevati di esposizione (PbB>300 µg/l), i soggetti con genotipo omozigote *wild type* presentavano valori di PbP/PbB% e di ALAU tendenzialmente più elevati rispetto ai soggetti con allele variante [valori mediani rispettivamente di 0,42% vs. 0,34% ($p=0,076$, test U di Mann-Whitney) e di 0,94 mg/g creatinina vs. 0,75 mg/g creatinina ($p=0,082$, test U di Mann-Whitney)]. La distribuzione dei genotipi *ALAD* per quartili di PbB risultava sostanzialmente omogenea. La Tabella II evidenzia che, mentre nei soggetti con genotipo *ALAD1-1* gli indicatori cinetici e dinamici di esposizione a Pb erano tutti significativamente correlati tra di loro, nei soggetti portatori di allele *ALAD-2* si osservava un numero inferiore di correlazioni significative. In particolare, né la frazione libera del PbP (PbP/PbB%) né l'attività *ALAD* ematica risultavano correlate con gli indicatori di effetto (ALAP, ALAU e ZPP). L'analisi dei dati con tecniche di regressione multipla evidenziava un'interferenza significativa del polimorfismo *ALAD* nella relazione tra livelli di ZPP ed attività *ALAD* ($R^2=0,49$, $p<0,0001$) (Figura 1). I soggetti con genotipo *ALAD-1-1* presentavano una correlazione inversa e significativa ($R^2=0,51$, $p<0,0001$) tra le variabili, descritta dall'equazio-

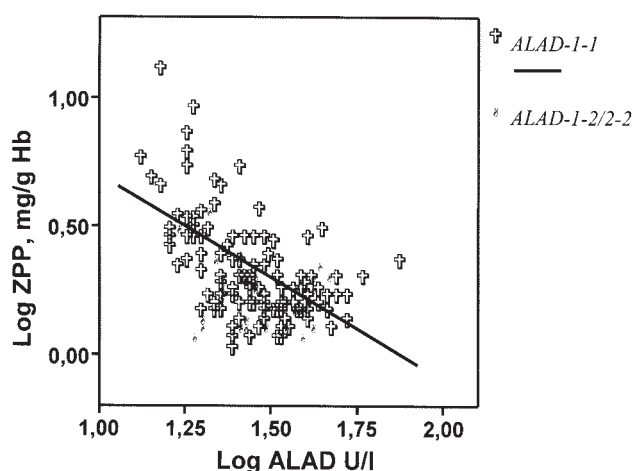


Figura 1. Relazione tra livelli di attività *ALAD* ematica e livelli di ZPP eritrocitaria in lavoratori professionalmente esposti a piombo e classificati in base al polimorfismo *ALAD*. Nei soggetti omozigoti *ALAD-1-1* è evidente una relazione inversa tra le variabili, mentre nei soggetti portatori di allele *ALAD-2* le variabili sono tra loro indipendenti

ne $\text{Log ZPP} = 1,42 - 0,76 \text{ Log ALAD}$, mentre nel gruppo di soggetti portatori di allele *ALAD-2* le due variabili erano tra loro indipendenti. L'analisi della covarianza dimostrava che, a parità di PbB e di attività *ALAD* ematica, i lavoratori con genotipo *ALAD-1-1* presentavano livelli di ZPP significativamente più elevati rispetto ai soggetti con genotipo eterozigote-omozigote variante (MG 2,07 mg/g Hb vs. 1,72 mg/g Hb, $p<0,05$). Altri modelli di regressione multipla, in cui PbP, ALAP, ALAU erano considerati variabili dipendenti e PbB, polimorfismo *ALAD* ed altri fattori potenzialmente interferenti (età, abitudini voluttuarie) come variabili indipendenti, non evidenziavano interferenze significative del polimorfismo *ALAD* nelle relazioni tra variabili.

Tabella II. Correlazioni tra valori degli indicatori di dose (PbB, PbP, PbU) e di effetto sul sistema emopoietico (ALAD, ALAP, ALAU, ZPP) in lavoratori professionalmente esposti a Pb e classificati in base al polimorfismo *ALAD*

<i>ALAD-1-1</i>	PbB	PbP	PbU	ALAD	ALAP	ALAU
PbP	,62***					
PbU	,74***	,64***				
ALAD	-,53***	-,53***	-,51***			
ALAP	,39***	,20**	,28***	-,48***		
ALAU	,37***	,41***	,54***	-,37***	,16*	
ZPP	,38***	,34***	,41***	-,54***	,38***	,33***
<i>ALAD-1-2/2-2</i>	PbB	PbP	PbU	ALAD	ALAP	ALAU
PbP	,57***					
PbU	,70***	,47***				
ALAD	-,65***	-,43*	-,67***			
ALAP	,31*	,09	,24	-,33		
ALAU	,24	,22	,35*	-,20	,42*	
ZPP	,53***	,24	,50***	-,05	,40**	,36*

* $p \leq 0,05$ (2-code); ** $p \leq 0,005$ (2-code); *** $p \leq 0,001$

Discussione

Il presente studio conferma le frequenze genotipiche del polimorfismo *ALAD* già rilevate in indagini precedentemente eseguite sulla popolazione italiana, utilizzando come criterio di identificazione delle varianti polimorfiche il comportamento in campo elettroforetico degli isoenzimi *ALAD* (2, 5). La distribuzione di frequenza dei genotipi *ALAD* è risultata sostanzialmente omogenea ai diversi quartili di PbB. Per le concentrazioni più elevate di PbB non si è osservato né un eccesso di soggetti portatori di allele variante, né l'eccesso di soggetti con genotipo *ALAD 1-1*, situazioni già descritte in precedenza (7, 8) ed interpretate entrambe con l'aumentata affinità per il Pb della proteina contenente il peptide *ALAD-2*. Nel secondo caso l'interpretazione era legata all'effetto "lavoratore sano", ossia alla tendenza dei lavoratori portatori di allele *ALAD-2* a presentare livelli di PbB più elevati e quindi ad allontanarsi volontariamente o ad essere allontanati da cicli produttivi che implicano l'esposizione a questo metallo, soprattutto in paesi in cui i limiti di esposizione sono più restrittivi. Nel nostro campione, i soggetti portatori di allele 2 presentano, coerentemente con l'atteso, sebbene in maniera statisticamente non significativa, livelli di PbB maggiori rispetto ai soggetti con genotipo *ALAD-1-1*. Contrariamente all'ipotesi formulata in partenza, tra questi ultimi si osservano livelli più elevati di PbP, mentre la frazione del PbP rispetto al PbB è sostanzialmente uguale nei due gruppi. L'interpretazione di tali risultati non può prescindere dalla considerazione delle difficoltà metodologiche insite nel dosaggio del PbP, per le quali non è possibile escludere *a priori* la contaminazione accidentale della frazione plasmatica con il Pb eritrocitario. La stessa problematica si pone per il dosaggio dell'*ALAP*, i cui valori, anche in questo caso, si distribuiscono nei sottogruppi di lavoratori classificati per polimorfismo *ALAD* in maniera contraria all'atteso. L'effetto dei fattori di variabilità analitica e pre-analitica potrebbe essere stato amplificato dalle caratteristiche stesse dello studio multicentrico. Per altri indicatori di effetto sulla biosintesi dell'eme, la cui metodologia di dosaggio appare influenzata da minore variabilità analitica (*ALAU*, *ZPP*), i nostri risultati sono sostanzialmente in linea con i dati di letteratura. I valori di entrambi gli indicatori sono più elevati nel sottogruppo di lavoratori con genotipo *ALAD-1-1*, anche se la piena significatività statistica viene raggiunta solo per la *ZPP*, a bassi livelli di esposizione ($PbB \leq 300 \mu g/l$). L'interpretazione di questi risultati sarebbe riconducibile alla differente affinità per il Pb degli isoenzimi *ALAD*, e dunque all'esistenza, in soggetti con diverso genotipo *ALAD*, di diversi equilibri, a livello eritrocitario, tra Pb legato ad *ALAD* e Pb biodisponibile. Nei soggetti con genotipo *ALAD-1-1*, rispetto a quelli con allele variante, la quota di Pb eritrocitario disponibile a diffondere verso altri bersagli molecolari sarebbe maggiore. In particolare, l'inibizione della ferro-chelatasi, ultimo enzima della via biosintetica dell'eme, avrebbe come conseguenza da un

lato un eccesso di protoporfirina IX, convertita a *ZPP* in presenza dello Zn spiazzato da *ALAD*, e dall'altro la rimozione del *feedback* negativo da prodotto finale (eme) sul primo enzima della via metabolica (*ALA-sintetasi*), con conseguente aumento delle concentrazioni di *ALA* (e dunque *ALAU*). Le correlazioni significative tra indicatori di dose e di effetto osservate nei lavoratori con genotipo *ALAD-1-1* sembrano confermare l'esistenza di un sostanziale equilibrio tra le due frazioni di Pb eritrocitario. Nei soggetti portatori di allele *ALAD-2*, invece, l'assenza di correlazioni significative tra indicatori di dose e di effetto deporrebbe per uno spostamento dell'equilibrio a favore del Pb legato ad *ALAD*. Ad ulteriore conferma dell'ipotesi deporrebbe il differente comportamento nei due gruppi di lavoratori della relazione tra attività *ALAD* e livelli di *ZPP*, a parità di PbB. Mentre nei lavoratori con genotipo *ALAD-1-1* le due variabili sono inversamente correlate, nei soggetti con allele *ALAD-2*, non si osserva alcuna relazione tra le variabili, in quanto in questi soggetti l'aumentata affinità del peptide *ALAD-2* per il Pb ne riduce l'interferenza su altri bersagli molecolari come la ferro-chelatasi.

In conclusione, i risultati ottenuti sembrano confermare l'esistenza di interferenze sulla cinetica e sulla dinamica del Pb da parte del polimorfismo *ALAD*. L'entità delle differenze osservate è del tutto compatibile con la natura stessa del fattore studiato: il polimorfismo genetico, peraltro infrequente come in questo caso, può solo concorrere per via interattiva con altri fattori (di natura genetica e/o acquisita), la cui frequenza può variare nelle diverse casistiche studiate, alla definizione di tratti complessi quali la cinetica del Pb inorganico, controllata da fattori di varia natura e variabili nel tempo anche nello stesso soggetto.

Bibliografia

- 1) Bergdahl IA, Grubb A, Schutz A, Desnick RJ, Wetmur JG, Sassa S, Skerfving S. Lead binding to delta-aminolevulinic acid dehydratase (*ALAD*) in human erythrocytes. *Pharmacol Toxicol* 1997; 81(4): 153-8.
- 2) Petrucci R, Leonardi A, Battistuzzi G. The genetic polymorphism of delta-aminolevulinic acid dehydratase in Italy. *Hum Genet* 1982; 60(3): 289-90.
- 3) Wetmur JG, Kaya AH, Plewinska M, Desnick RJ. Molecular characterization of the human delta-aminolevulinic acid dehydratase 2 (*ALAD2*) allele: implications for molecular screening of individuals for genetic susceptibility to lead poisoning. *Am J Hum Genet* 1991; 49(4): 757-63.
- 4) Potluri VR, Astrin KH, Wetmur JG, Bishop DF, Desnick RJ. Human delta-aminolevulinic acid dehydratase: chromosomal localization to 9q34 by in situ hybridization. *Hum Genet* 1987; 76(3): 236-9.
- 5) Battistuzzi G, Petrucci R, Silvagni L, Urbani FR, Caiola S. delta-Aminolevulinic acid dehydratase: a new genetic polymorphism in man. *Ann Hum Genet* 1981; 45(Pt 3): 223-9.
- 6) Kelada SN, Shelton E, Kaufmann RB, Khoury MJ. Delta-aminolevulinic acid dehydratase genotype and lead toxicity: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 2001; 154(1): 1-13.
- 7) Bergdahl IA, Gerhardsson L, Schutz A, et al. Delta-aminolevulinic acid dehydratase polymorphism: influence on lead levels and kidney function in humans. *Arch Environ Health* 1997; 52(2): 91-96.
- 8) Astrin KH, Bishop DF, Wetmur JG, Kaul B, Davidow B, Desnick RJ. delta-Aminolevulinic acid dehydratase isozymes and lead toxicity. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 514: 23-9.

Allegato 3: **Mozzoni P.**, De Palma G., Scotti E., Andreoli R., Folesani G., Manini P., Apostoli P., Mutti A.
Heme oxygenase 1 expression in foundry workers. *G Ital Med Lav Ergon.* 2005 Jul-Sep;27(3):322-5.)

P. Mozzoni^{1,2}, G. De Palma^{1,2}, E. Scotti², R. Andreoli^{1,2}, G. Folesani^{1,2}, P. Manini^{1,2}, P. Apostoli³, A. Mutti¹

Espressione dell'eme ossigenasi-1 in un gruppo di lavoratori di un'acciaieria

¹ Università di Parma, Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Parma

² Centro Studi e Ricerche ISPEL di Parma, Parma

³ Università di Brescia, Dipartimento di Medicina Sperimentale ed Applicata, Medicina del Lavoro e Igiene Industriale, Brescia

RIASSUNTO

L'esposizione a idrocarburi policiclici aromatici (IPA), metalli e particolato aerodisperso è associata alla generazione di stress ossidativo intracellulare. L'eme ossigenasi 1 (HO-1) è un enzima inducibile, ubiquitariamente espresso, che catalizza l'ossidazione dell'eme a biliverdina, con rilascio di ferro(II) e monossido di carbonio, prodotti con proprietà antiossidanti ed antinfiammatorie. L'espressione genica è indotta da stimoli associati con stress ossidativo ed infiammazione. Sono stati reclutati 37 lavoratori di un'acciaieria con lo scopo di valutare il ruolo dei polimorfismi genetici di alcuni enzimi della biotrasformazione, pertinenti per l'esposizione ad IPA (*GSTM1*, *GSTP1*, *EPHX1*, *CYP1A1*, *CYP1B1*), nella modulazione dell'espressione genica dell'HO-1. I lavoratori sono stati esaminati in due diversi periodi dell'anno [Febbraio 2003 (T_1) e Giugno 2003 (T_2)] all'inizio (IT) ed al termine (FT) del turno lavorativo. L'esposizione è stata caratterizzata determinando l'escrezione urinaria di 1-idrossipirene (1-OHP). L'espressione di HO-1 a FT, normalizzata rispetto a quella di IT, era significativamente più elevata al T_2 rispetto al T_1 ($1,37 \pm 0,63$ vs $0,97 \pm 0,51$, $p < 0,05$). Al T_2 e nella valutazione combinata dei due campionamenti, l'espressione di HO-1 FT/IT era significativamente correlata con l'1-OHP FT ($r = 0,47$, $p < 0,018$ e $r = 0,39$, $p < 0,05$). L'induzione dell'espressione genica HO-1, a parità di esposizione, era significativamente più elevata nei soggetti con almeno un allele *GSTP1* variante rispetto ai soggetti con genotipo *GSTP1AA* ($1,23 \pm 0,002$ vs $0,88 \pm 0,002$, $p < 0,05$). Nei soli soggetti portatori di almeno un allele *GSTP1* variante si evidenziava una correlazione positiva tra espressione HO-1 FT/IT e livelli di 1-OHP FT ($r^2 = 0,21$, $p < 0,016$). Il presente studio dimostra per la prima volta l'esistenza di una correlazione tra i livelli di 1-OHP e l'induzione dell'espressione del gene HO-1. La correlazione sembra limitata ai soggetti portatori di alleli *GSTP1* varianti, i quali presentano anche, a parità di esposizione, livelli più elevati di induzione dell'espressione di HO-1 a FT. I risultati sembrerebbero indicare un più elevato stress ossidativo intracellulare nei soggetti che esprimono isoforme *GSTP1*-1 varianti, probabilmente per una minore capacità di detossificare i metaboliti reattivi prodotti dalla biotrasformazione degli IPA.

Parole chiave: eme ossigenasi 1, IPA, fonderia, polimorfismi, *GSTP1*.

ABSTRACT

[Heme oxygenase 1 expression in foundry workers]
Heme oxygenase 1 (HO-1) catalyses the oxidation of heme to biliverdin, and its expression is induced by oxidative stress. This study was aimed at assessing the role of metabolic polymorphisms (*CYP1A1*, *CYP1B1*, *GSTM1*, *GSTP1*, *EPHX*) in the modulation of HO-1 gene expression in 37 foundry workers. Blood and urine samples were obtained at the beginning (BS) and at the end (ES) of work shift, in February (T_1) and June (T_2). Urinary 1-hydroxypyrene (1-OHP) was measured as a tracer of PAH exposure.

*HO-1 gene expression in ES samples normalized to BS values (HO-1 ES/BS) was higher at T_2 respect to T_1 . HO-1 gene induction was related to ES 1-OHP when considering either T_2 samples or the combination of the two samplings. HO-1 ES/BS was significantly increased in subjects with at least a mutant allele for *GSTP1* as compared to subjects with *GSTP1AA* genotype ($1,23 \pm 0,002$ vs $0,88 \pm 0,002$, $p < 0,05$). Only in subjects with at least one variant allele for *GSTP1*, a positive correlation between HO-1 ET/IT expression and 1-OHP FT levels was observed ($r^2 = 0,21$, $p = 0,016$). The present study demonstrates a correlation between PAH exposure, as assessed by urinary 1-OHP, and the induction of HO-1 expression. Such a correlation seems to be limited to subjects bearing variant alleles for *GSTP1*. At the same exposure levels, these subjects showed a greater expression of HO-1 FT as compared to subjects with *GSTP1* wild type genotype, possibly due to a higher oxidative stress in the subjects expressing the mutant *GSTP1*-1 isoform, which could imply a limited scavenging capacity.*

Key words: heme oxygenase 1, polymorphisms, polycyclic aromatic hydrocarbons, workers, foundry.

Introduzione

I composti di interesse tossicologico prodotti nel ciclo produttivo di un'acciaieria possono essere classificati in particolato atmosferico, idrocarburi policiclici aromatici (IPA) e metalli. A breve termine queste sostanze possono provocare effetti per lo più irritativi delle vie respiratorie, mentre a lungo termine possono agire da cancerogeni, per lo più polmonari.

Il particolato aerodisperso inalabile è costituito da una miscela complessa di particelle solide e/o liquide, variabili per massa, dimensione e composizione, in relazione alla diversa origine e alle diverse condizioni meteo-climatiche. Numerosi studi *in vivo* e *in vitro* concordano nell'attribuire ad esso la capacità di indurre flogosi per attivazione del sistema immunitario (1), e di indurre la generazione di specie reattive dell'ossigeno (*reactive oxygen species*, ROS), con conseguente generazione di stress ossidativo cellulare, per azione dei metalli di transizione (reazione di Fenton) (2) e della biotrasformazione dei composti organici, adsorbiti alla superficie delle particelle.

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) a due o più anelli aromatici si formano durante i processi di combustione incompleta di materiale organico. Sono composti ubiquitari, presenti nell'ambiente sotto forma sia di polve-

ri che di vapore, liberi o adsorbiti su particolato atmosferico. La quantità di IPA adsorbita per unità di peso di particolato dipende dalle dimensioni di quest'ultimo ed il maggior adsorbimento si ha con particelle il cui diametro aerodinamico è inferiore a 10 µm (3). Le proprietà tossicologiche degli IPA dipendono dalla produzione di intermedi metabolici reattivi durante la loro biotrasformazione, principalmente per azione delle monoossigenasi a funzione mista citocromo P450 dipendenti (*CYP1A1*, *CYP1A2*, *CYP1B1*, *CYP3A4*) (4). Tali enzimi di fase I agiscono principalmente sulle regioni ad elevata densità elettronica portando alla formazione di epossidi reattivi, suscettibili di ulteriore bioattivazione metabolica in diidrodioli ed infine in diolo epossidi per azione dell'eossido idrolasi microsomiale (*EPHX1*). La detossificazione di questi composti altamente reattivi, dotati di effetti mutageni e cancerogeni, è legata alle capacità di coniugazione con acido glucuronico, glutazione o acido solforico. Il metabolismo intermedio presenta una variabilità interindividuale, che dipende, almeno in parte dal polimorfismo genetico degli enzimi della biotrasformazione. Dal punto di vista tossicologico risulta rilevante anche una tossicità indiretta legata alla capacità intrinseca delle monoossigenasi citocromo P450 dipendenti di produrre ROS (5).

L'eme-ossigenasi (HO-1) è un enzima microsomiale che catalizza la degradazione ossidativa dell'eme a biliverdina, con rilascio di monossido di carbonio (CO) e ferro(II), prodotti con proprietà antiossidanti e antinfiammatorie (Figura 1). Sono note tre isoforme, codificate da altrettanti geni: HO-1, HO-2 e HO-3. L'isoforma 1 (HO-1) è inducibile e viene sintetizzata in risposta a diversi stimoli (metabolici, fisici o ambientali) associati a stress ossidativo e infiammazione. Numerosi dati sperimentali suggeriscono che l'attività eme-ossigenasica sia in grado di proteggere cellule e tessuti da risposte infiammatorie eccessive (6).

Scopo del presente lavoro è la valutazione del ruolo dei polimorfismi genetici di alcuni enzimi della biotrasformazione, pertinenti per l'esposizione a IPA (*GSTM1*, *GSTP1*, *EPHX1*, *CYP1A1*, *CYP1B1*), nella modulazione dell'espressione genica dell'HO-1 nel sangue periferico di un

gruppo di lavoratori impiegati in un'acciaieria elettrica. In particolare, in questo studio sono stati valutati i seguenti polimorfismi: *CYP1A1* m1 ($T_{6235}C$) 3'flanking region, *CYP1A1* m2 ($A_{4889}G$) esone 7, *CYP1B1* (Leu432Val), *GSTM1* delezione genica, *GSTP1* esone 5 (Ile105Val) ed esone 6 (Ala114Val), *EPHX1* esone 3 (Tyr113His) ed esone 4 (His139Arg).

Materiali e metodi

Soggetti

Lo studio è stato eseguito su una coorte di 37 lavoratori maschi (età media 41 ± 7 anni, di cui 13 fumatori) impiegati in una fonderia della provincia di Brescia che produce acciaio per l'edilizia. Il gruppo esaminato comprendeva lavoratori impiegati nelle mansioni a maggior rischio di esposizione (fuori forno, colata, siviere). Il reclutamento dei soggetti è stato effettuato una prima volta nel Febbraio 2003 (T_1) e una seconda volta nel Giugno 2003 (T_2). Durante ogni reclutamento sono stati raccolti un campione di sangue e un campione estemporaneo di urina all'inizio del turno di lavoro (IT, ore 6) ed alla fine dello stesso (FT, ore 14). Il giorno dell'indagine ogni lavoratore ha compilato un questionario indicando abitudini alimentari (consumo di carne alla griglia) e voluttuarie (consumo di sigarette).

Estrazione RNA e DNA

L'estrazione di RNA totale è stata condotta con kit PAXgene Blood RNA (PreAnalytix, Qiagen) su 2,5 ml di sangue venoso periferico raccolto in provette PAXgene. L'RNA totale estratto è stato digerito con Dnase I (DNA-free kit; Ambion), quantificato fluorimetricamente con sonda RiboGreen (Molecular Probes) ed infine visualizzato con elettroforesi orizzontale in gel d'agarosio con buffer denaturante (RNA Ladder; New England Biolabs).

L'estrazione del DNA è stata condotta con kit Puregene (Gentra Systems) su 3 ml di sangue venoso periferico raccolto in provette con EDTA, valutato e quantificato con metodica spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 260 nm.

Retrotrascrizione e quantificazione dell'espressione del gene HO-1

500 ng di RNA totale sono stati retrotrascritti con 2,5 µM di random decamers (Ambion), 200U di SuperScript II reverse Transcriptase (Invitrogen) in un volume finale di 20 µl. Le reazioni di PCR quantitativa in tempo reale, in duplicato per ciascun campione, sono state eseguite su termociclatore iCycler iQ Real-Time Detection System (BioRad). Il protocollo di amplificazione comprendeva un ciclo di 3 min a 95°C seguito da

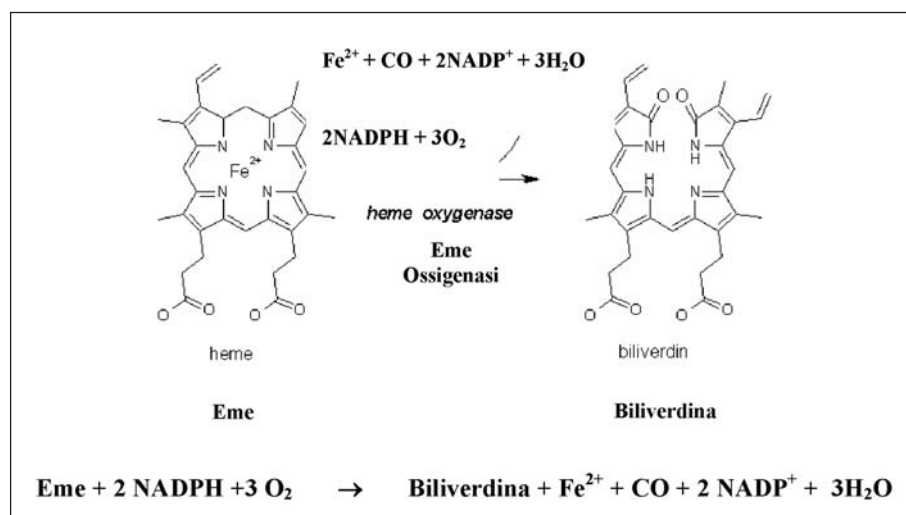


Figura 1. Degradazione ossidativa dell'eme a biliverdina, monossido di carbonio (CO) e ferro (Fe^{2+}) da parte dell'eme ossigenasi 1

40 cicli, ciascuno dei quali costituito da 3 step di 30 sec a 95°C, 30 sec a 61°C e 30 sec a 72°C. Al termine di tale protocollo è stata eseguita un'analisi delle curve di *melting* allo scopo di accertare l'assenza di prodotti di reazione aspecifici. Ogni esperimento, oltre ai campioni analizzati in duplicato, includeva una curva standard ed un controllo negativo.

L'espressione del gene *HO-1* è stata valutata utilizzando l'algoritmo *geNorm* (12) dopo normalizzazione rispetto all'espressione di tre geni di controllo: β 2-microglobulina (β 2-M), succinato deidrogenasi subunità A (SDHA) e ipoxantina fosforibosiltransferasi 1 (HPRT-1).

I primers utilizzati per il gene *HO-1* sono stati disegnati con programma Primer3 su sequenza *Genebank* NM002133, mentre per i geni di controllo sono state utilizzate sequenze oligonucleotidiche già pubblicate (7).

Polimorfismi genetici

I polimorfismi genetici sono stati caratterizzati utilizzando metodiche di *PCR Multiplex* (*GSTM1*), *PCR-RFLP* (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (*EPHX1* e *CYP1A1m1*), *PCR allele-specifica* (*CYP1A1m2*) e *PCR-Real Time* (*CYP1B1* e *GSTP1*) utilizzando metodiche già pubblicate (8-12).

Determinazione urinaria dell'1-OHP

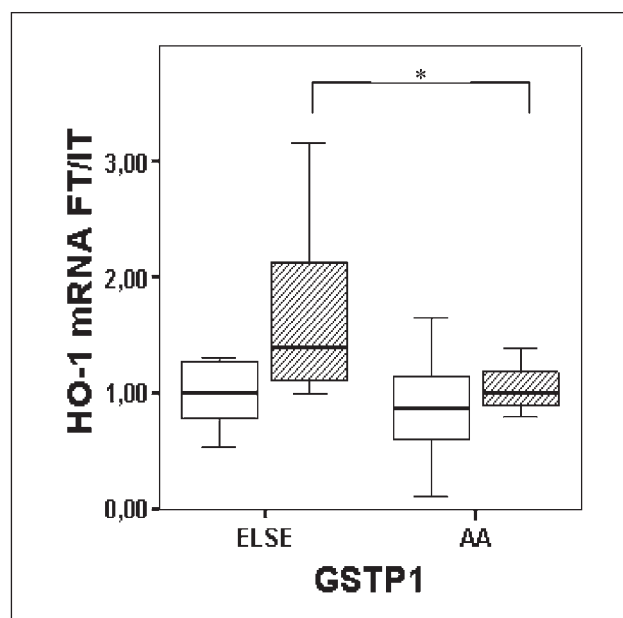
La determinazione dell'1-idrossipirene (1-OHP), metabolita del pirene utilizzato come tracciante di esposizione a miscele di IPA in diverse realtà lavorative (13-14), è stata effettuata in cromatografia liquida ad alta pressione. I campioni sono stati sottoposti ad idrolisi enzimatica con β -glucuronidasi-arilsulfatasi a 37°C per una notte e poi concentrati su colonnine SPE C18 da 3 ml (14). Gli eluati (20 μ l) sono stati analizzati su colonna Supelcosil® LC-18 DB (15 cm x 4,6 mm ID, 3 μ m) e rivelati in fluorimetria (λ_{ecc} 242 nm; λ_{em} 388 nm). La fase mobile impiegata prevede un gradiente metanolo/H₂O con flusso di 0,8 ml/min.

Analisi Statistica

L'elaborazione statistica dei dati è stata eseguita con software SPSS13 per Widows™, applicando test parametrici (correlazione di Pearson, ANOVA, ANCOVA) o non parametrici (Correlazione di Spearman) a seconda della distribuzione delle variabili.

Risultati

Le medie geometriche (DSG) delle concentrazioni di 1-OHP misurati a FT erano circa tre volte quelle misurate a IT [1,75 (2,90) μ g/g creat. vs 0,52 (2,59) μ g/g creat., $p < 0,001$], mentre le concentrazioni di 1-OHP FT misurate al T₂ erano circa il doppio di quelle rilevate al T₁ [2,31 (3,17) vs 1,28 (2,61) μ g/g creat., $p < 0,05$]. Le concentrazioni di polveri ambientali non erano significativamente differenti nei due campionamenti, con un valore mediano di 0,79 (range 0,74-1,98) mg/m³. L'1-OHP era significativamente associato con l'abitudine al fumo di sigaretta (ρ di Spearman 0,32,



* $p < 0,05$

Figura 2. Confronto tra l'espressione di HO-1 FT/IT ai tempi di campionamento T₁ (□) e T₂ (■) nei soggetti con almeno un allele GSTP1 variante (else) e nei soggetti con genotipo GSTP1AA

$p < 0,001$). Le frequenze genotipiche osservate si distribuivano secondo l'atteso. L'espressione di HO-1 a FT, normalizzata rispetto a quella di IT (HO-1 FT/IT), era aumentata al T₂ rispetto al T₁ ($1,37 \pm 0,63$ vs. $0,97 \pm 0,51$, $p < 0,05$). Al T₂ e nella valutazione combinata dei due campionamenti, l'espressione di HO-1 FT/IT era significativamente correlata con l'1-OHP FT ($r = 0,47$, $p < 0,018$ e $r = 0,39$, $p < 0,05$, rispettivamente), ma non con le polveri aerodisperse. L'espressione di HO-1 FT/IT al T₂ era significativamente più elevata nei soggetti con almeno un allele GSTP1 variante rispetto ai soggetti con genotipo GSTP1AA (Figura 2). In un modello di ANCOVA, l'espressione di HO-1 FT/IT era, a parità di esposizione, significativamente più elevata nei soggetti con genotipo GSTP1 variante, rispetto ai soggetti con genotipo GSTP1AA (Tabella I). Nei soli soggetti portatori di almeno un allele GSTP1 variante era evidenziabile una regressione positiva tra l'espressione di HO-1 FT/IT e livelli di 1-OHP FT ($r^2 = 0,21$, $p = 0,016$).

Tabella I. Espressione di HO-1 FT/IT nei soggetti distinti per il genotipo GSTP1 ai singoli tempi di campionamento T₁ e T₂ e nella valutazione combinata degli stessi (T₁+T₂)

Genotipo	HO-1 mRNA FT / IT					
	T ₁		T ₂		T ₁ +T ₂	
	N	M [GSD]	N	M [GSD]	N	M [GSD]
GSTP1 *A*A	15	0,78 [1,16]	11	1,00 [1,12]	27	0,88 [1,10]
GSTP1 else	10	1,03 [1,20]	14	1,50* [1,10]	24	1,23* [1,11]

Medie marginali calcolate per valori di 1-OHP FT di 1,31 μ g/g creat (T₁), 1,89 μ g/g creat (T₂) e 1,10 μ g/g creat (T₁+T₂), rispettivamente.

* $p < 0,05$

Discussione

Gli inquinanti aerodispersi negli ambienti di lavoro e di vita assumono notevole rilievo per gli effetti biologici che possono provocare nei lavoratori esposti e nella popolazione generale. Tali effetti dipendono dal tipo di sostanze presenti, dalle loro concentrazioni e dalle possibili loro interazioni. La fonderia rappresenta un interessante “ambiente modello” in cui coesistono particelle inalabili, composti organici e metalli con attività cancerogena, metalli di transizione responsabili della produzione di ROS. A causa della crescente diffusione del traffico autoveicolare e dei motori diesel, queste stesse sostanze sono oggi tra i più importanti e pericolosi inquinanti dell'aria urbana.

Lo stress ossidativo, che si genera quando la concentrazione di ROS eccede le capacità antiossidanti della cellula, ha come principale bersaglio le macromolecole cellulari quali DNA, lipidi, e proteine, di cui altera struttura e funzione. Lo stress ossidativo è in grado di alterare l'espressione genica di molti geni coinvolti nelle più svariate vie metaboliche (15).

Il presente studio dimostra per la prima volta l'esistenza di una correlazione positiva tra i livelli di un tracciante di esposizione ad IPA (1-OHP) misurato a fine turno e l'induzione dell'espressione genica dell'enzima HO-1 in cellule del sangue periferico. La correlazione sembra limitata ai soggetti portatori di alleli varianti al locus *GSTP1-1*, i quali presentano anche, a parità di esposizione, livelli più elevati di induzione dell'espressione del gene HO-1 a FT. L'enzima GSTP1-1 è la principale glutathione S-transferasi espressa a livello linfocitario, ed è implicata nella detossificazione degli IPA. L'isoenzima GSTP1-1 presenta due varianti polimorfiche, rispetto alla variante normale, rispettivamente agli esoni 5 (Iso105Val) e 6 (Ala114Val). Studi *in vitro* hanno dimostrato una minore stabilità delle proteine varianti rispetto alla “selvatica”, con conseguente riduzione dell'attività enzimatica, e variazioni dell'efficienza catalitica delle diverse varianti nei confronti di alcuni IPA. L'espressione dell'enzima in numerosi tessuti e la sua capacità detossificante nei confronti di cancerogeni importanti quali gli IPA diolo epossidi fa ipotizzare che esso sia implicato nella suscettibilità al cancro (16).

La plausibilità biologica dei risultati ottenuti potrebbe quindi risiedere in un più elevato stress ossidativo intracellulare nei soggetti portatori di isoforme GSTP1-1 varianti, rispetto a quelli che esprimono la proteina “selvatica”, probabilmente a causa di una minore capacità di detossificare gli intermedi metabolici reattivi derivanti dalla fase I della biotrasformazione degli IPA.

Bibliografia

- 1) Becker S, Soukup JM, Gilmour MI, Devlin RB. Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996; 141: 637-648.
- 2) Han JY, Takeshita K, Utsumi H. Noninvasive detection of hydroxyl radical generation in lung by diesel exhaust particles. *Free Radic Biol Med* 2001; 30:516-525.
- 3) Valerio F. Formazione e destino degli IPA immessi in atmosfera. In: Apostoli P, Minoia C, Alessio L. Idrocarburi policiclici aromatici negli ambienti di vita e di lavoro: esposizione ed effetti. Gargnano, 27-29 Marzo 1996.
- 4) Sorensen M, Autrup H, Moller P, Hertel O, Jensen SS, Vinzents P, Knudsen LE, Loft S. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mut Res* 2003; 544: 255-271.
- 5) Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang M, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 2003; 111: 455-460.
- 6) Ryster SW, Choi AM. Heme oxygenase-1: redox regulation of a stress protein in lung and cell culture models. *Antioxid Redox signal* 2005; 7: 80-91.
- 7) Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. *Genome Biol* 2002; 3, RESEARCH0034.
- 8) Arand M, Muhlbauer R, Hengstler J et al. A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem* 1996; 236: 184-186.
- 9) Smith C, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997; 350: 630-33.
- 10) Bruning T, Abel J, Koch B, Lorenzen K, Harth V, Donat S, Sachinidis A, Vetter H, Bolt HM, Ko Y. Real-time PCR-analysis of the cytochrome P450 1B1 codon 432-polymorphism. *Arch Toxicol* 1999; 73: 427-30.
- 11) Ko Y, Koch B, Harth V, Sachinidis A, Their R, Vetter H, Bolt HM, Bruning T. Rapid analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms using real-time polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 271-4.
- 12) Drakoulis N, Cascorbi J, Brockmoller J, Gross CR, Roots I. Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region. *Clin Invest* 1994; 72: 240-248.
- 13) Jongeneelen FJ, Anzion RB, Scheepers PT, Bos RP, Henderson PT, Nijenhuis EH, Veenstra SJ, Brouns RM, Winkes A. 1-hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments. *Ann Occup Hyg* 1988; 32: 35-43.
- 14) Bergamaschi E, Apostoli P, Catalani S, Festa D, Folesani G, Andreoli R, Manini P, Schenato S, De Palma G, Franchini I, Bernard A, Mutti A. Indicatori di danno epiteliale polmonare in lavoratori di una acciaieria elettrica esposti ad inquinanti aerodispersi. *G Ital Med Lav Erg* 2003; 25, 104-6.
- 15) Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, Oxford, 1999.
- 16) Sundberg K, Johansson AS, Stenberg G, Widersten M, Seidel A, Mannervik B, Jernstrom B. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* 1998; 19: 433-6.

Allegato 4: Dick F., De Palma G., Ahmadi A., Osborne A., Scott NW., Prescott GJ., Bennett JJ., Semple S., Dick S., **Mozzoni P.**, Haites N., Bezzina Wettinger S., Mutti A., Otelea M., Seaton A., Soderkvist P., Felice A.

Gene-environmental interactions in parkinsonism and Parkinson's disease: the Geoparkinson study. *Occup Environ Med.* 2007 Oct;64(10):673-80



Gene-environment interactions in parkinsonism and Parkinson's disease: the Geoparkinson study

Finlay Dick, Giuseppe De Palma, Ahmad Ahmadi, Aileen Osborne, Neil W Scott, Gordon J Prescott, Jane Bennett, Sean Semple, Smita Dick, P Mozzoni, Neva Haites, Stephanie Bezzina Wettinger, Antonio Mutti, Marina Otelea, Anthony Seaton, Peter Soderkvist and Alex Felice

Occup. Environ. Med. published online 20 Apr 2007;
doi:10.1136/oem.2006.032078

Updated information and services can be found at:
<http://oem.bmj.com/cgi/content/abstract/oem.2006.032078v1>

These include:

Rapid responses

You can respond to this article at:
<http://oem.bmj.com/cgi/eletter-submit/oem.2006.032078v1>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article - sign up in the box at the top right corner of the article

Notes

Online First contains unedited articles in manuscript form that have been peer reviewed and accepted for publication but have not yet appeared in the paper journal (edited, typeset versions may be posted when available prior to final publication). Online First articles are citable and establish publication priority; they are indexed by PubMed from initial publication. Citations to Online First articles must include the digital object identifier (DOIs) and date of initial publication.

To order reprints of this article go to:
<http://www.bmjjournals.com/cgi/reprintform>

To subscribe to *Occupational and Environmental Medicine* go to:
<http://www.bmjjournals.com/subscriptions/>

"The Corresponding Author has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, an exclusive licence (or non exclusive for government employees) on a worldwide basis to the BMJ Publishing Group Ltd and its Licensees to permit this article (if accepted) to be published in Occupational and Environmental Medicine editions and any other BMJ PGL products to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence (<http://oem.bmjjournals.com/misc/ifora/licenceform.shtml>).

Gene-environment interactions in parkinsonism and Parkinson's disease: the Geoparkinson study

Dick FD¹, De Palma G⁴, Ahmadi A⁶, Osborne A², Scott NW³, Prescott GJ³, Bennett J³, Semple S¹, Dick S¹, Mozzoni P⁵, Haites N², Bezzina Wettinger S⁸, Mutti A⁴, Otelea M⁷, Seaton A¹, Soderkvist P⁶, Felice A⁸ on behalf of the Geoparkinson study group.

1. Department of Environmental & Occupational Medicine, University of Aberdeen, UK
2. Department of Medical Genetics, University of Aberdeen, UK
3. Department of Public Health, University of Aberdeen, UK
4. Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Science, Laboratory of Industrial Toxicology, University of Parma, Parma, Italy
5. ISPEL Research Centre, University of Parma, Parma, Italy
6. Division of Cell Biology, Department of Biomedicine and Surgery, Faculty of Health Sciences, Linköping University, Linköping, Sweden
7. Department of Occupational Medicine, University Hospital 'Colentina, Bucharest, Romania
8. Laboratory of Molecular Genetics, Department of Physiology and Biochemistry, University of Malta, Msida, Malta.

Supplemental data E table 1, E table 2, E table 3, E text.

Corresponding author: Finlay D. Dick, Department of Environmental & Occupational Medicine, University of Aberdeen, Foresterhill, Aberdeen, UK.

e-mail: f.dick@abdn.ac.uk

Telephone +44 (0) 1224 558191 Fax +44(0) 1224 551826

Word count: Abstract 225, 3452 words

Key words: Parkinson's disease, parkinsonism, genetics

Objectives To investigate associations of Parkinson's disease (PD) and parkinsonian syndromes with polymorphic genes that influence metabolism of either foreign chemical substances or dopamine and seek evidence of gene-environment interaction effects that modify risk.

Methods A case-control study of 959 prevalent cases of parkinsonism (767 with PD) and 1989 controls across five European centres. Occupational hygienists estimated the average annual intensity of exposure to solvents, pesticides and metals, (iron, copper, manganese), blind to disease status. *CYP2D6*, *PON1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1*, *CYP1B1*, *MAO-A*, *MAO-B*, *SOD 2*, *EPHX*, *DAT1*, *DRD2*, and *NAT2* were genotyped. Results were analysed using multiple logistic regression adjusting for key confounders.

Results There was a modest but significant association between *MAO-A* polymorphism in males and disease risk (G versus T, OR 1.30, 95%CI 1.02-1.66, adjusted). The majority of gene-environment analyses did not show significant interaction effects. There were possible interaction effects between *GSTM1 null* genotype and solvent exposure, (which were stronger when limited to PD cases only).

Conclusions Many small studies have reported associations between genetic polymorphisms and PD. Fewer have examined gene-environment interactions. This large study was sufficiently powered to examine these aspects. *GSTM1 null* subjects heavily exposed to solvents appear to be at increased risk of PD. There was insufficient evidence that the other gene-environment combinations investigated modified disease risk, suggesting they contribute little to the burden of PD.

The causes of Parkinson's disease (PD) are unclear although both genetic and environmental factors are believed to be important. Several occupational exposures have been studied as possible risk factors for PD including pesticides, organic solvents and metals including iron, copper and manganese. A positive family history is a risk factor [1] but whether this reflects shared heredity or environment is uncertain. Polymorphic genes coding for enzymes involved in the metabolism of foreign chemicals (xenobiotics) may modify disease risk in exposed individuals. Similarly, polymorphic genes coding for enzymes involved in the transport or metabolism of dopamine may alter disease risk. The interested reader is referred to the additional electronic text regarding candidate genes examined as risk factors in this study. Briefly, we selected genes coding for enzymes that metabolise foreign chemicals, transport dopamine or metabolise dopamine and have polymorphisms that occur relatively frequently in the European population. The following genes were studied: *CYP2D6*, *CYP1B1*, *PON1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1*, *MAO-A*, *MAO-B*, *SOD 2*, *EPHX*, *DAT1*, *DRD2*, and *NAT2*.

Many association studies investigating candidate genetic polymorphisms and occupational exposures have been relatively small and have not used high quality exposure estimates. The interaction between occupational exposures and genetic factors may be important in leading to disease in susceptible individuals. Therefore this large multi-centre study of environmental exposures, genes and gene-environment interactions as risk modifiers for Parkinson's disease was undertaken.

Methods

The overall study aim was to (i) explore environmental risk factors (organic solvents, pesticides, iron, copper or manganese) for Parkinson's disease and parkinsonism, (ii) to determine if polymorphisms in a number of genes that influence metabolism of chemicals can modify the risk of PD and parkinsonism and (iii) to establish whether there was any evidence of gene-environment interactions between these polymorphic genes and occupational exposure to solvents, pesticides, iron, copper or manganese.

The research was a multi-centre case-control study, prevalent cases of parkinsonism and controls being recruited in the five participating countries (Scotland, Italy, Sweden, Romania and Malta). In an accompanying paper the study design is more fully described and the exposure assessment methods have previously been reported.[21] The findings regarding gene-tobacco smoke interactions as risk modifiers for PD will be reported separately.

Each centre aimed to recruit 200 cases and 400 age- and gender-balanced controls. Cases were classified as having Parkinson's disease or parkinsonism using the United Kingdom Parkinson's Disease Society Brain Bank (UK PDS Brain Bank) clinical diagnostic criteria. Individuals with vascular or drug-induced parkinsonism were excluded from the study, as were those with dementia. No information on race or ethnicity was collected from study participants. However, individuals with non-Maltese parents were excluded from the Maltese arm of the study. The relevant ethics committees approved the study and all subjects gave written informed consent.

Power calculations

The power to detect a significant association with a disease is dependent on the proportion of subjects with a potential risk factor (or combination of risk factors). For a single risk factor (exposed/unexposed or polymorphism present/absent), it was calculated that a two group continuity corrected chi-squared test with a 0.05 two-sided significance level would have 89% power to detect the difference between a case group proportion of 0.57 and a control group proportion of 0.50 with sample sizes of 800 cases and 1600 controls, respectively. If a risk factor were much more or less common then it would be possible to detect much smaller differences in proportions between the case and control groups as statistically significant. For example if a polymorphism were present in 15% of controls then a difference of +/- 5% in the percentage within the cases would be detected with more than 80% power. If the polymorphism, or combination of polymorphisms, were present in 5% of the controls then a difference of +/- 3% within the cases would be detectable with 80% power. Provided the number of the subjects with a particular combination of characteristics is not extremely small then the sample size would have sufficient power to detect interactions between exposure and genetic factors at the 5% significance level. With this sample size, the width of the 95% CI for the log odds ratios presented by De Palma *et al.* for an interaction between solvent exposure, CYP2D6 status and Parkinson's disease would be reduced by a factor of 0.35.[8] Then the odds ratios would be 1.15 (0.94, 1.40) for solvent exposure, 0.69 (0.48, 1.00) for the presence of two variant alleles at the CYP2D6 locus and 14.47 (5.94, 35.09) for their interaction. Then the odds ratio for solvent exposure would be very close to indicating statistical significance and the interaction result would be much more significant than reported

in that paper.

Questionnaire

A questionnaire in English was developed, piloted and subsequently translated into Italian, Swedish, Romanian and Maltese. Trained interviewers administered the questionnaire. Occupational history was obtained together with information as to the duration and likely intensity of occupational and hobby exposure to solvents, pesticides, iron, copper, and manganese. Private water supply use such as a well, river or spring was recorded by location and duration. Smoking ('ever consumed a tobacco product', defined as smoking one cigarette per day or two cigars or two pipes per week or use of snuff/chewable tobacco for a period greater than 6 months) and alcohol histories were obtained. History of having been knocked unconscious (defined as any loss of consciousness) and of Parkinson's disease in first and second-degree relatives was recorded. Interviewers administered a core questionnaire to all subjects with a series of questions that triggered exposure-specific questionnaires where relevant.

Exposure estimation

An occupational hygienist produced a job exposure matrix (JEM) for commonly reported occupations, categorising exposures as zero, low, medium or high with reference to the then UK occupational exposure limit (OEL) for mixed solvents, a typical pesticide employed in the task or for iron, copper or manganese in air. The resulting exposure estimate was then modified using subjective exposure estimation techniques.[21] The hygienist employed judgment as to the most likely agents for the described task where the specific agent was not recalled. Exposure intensity for each job was combined with data on exposure duration (number of hours per day, days per year and years exposed) to calculate a job cumulative exposure. This was expressed in OEL.years where 1 OEL.year was equivalent to working at the then UK OEL for 8 hours per day for 240 days per year. Job cumulative exposure values were summed to provide a lifetime cumulative exposure (CE) to that chemical group. A second measure produced was the average annual intensity (AAI) of exposure derived from dividing the lifetime CE by the number of years of exposure to that material. An indirect validation of this exposure assessment methodology has been reported for solvent exposures.[21]

Genetic methods

DNA was extracted from whole blood samples or from buccal samples taken from each subject enrolled in the five participating countries. Most of the genes were selected for analysis, on the basis that they have polymorphisms that occur relatively frequently in the European population and are involved in the metabolism of foreign chemicals. The following genes were studied: *CYP2D6*, *CYP1B1*, *PON1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1*, *MAO-A*, *MAO-B*, *SOD 2*, *EPHX*, *DAT1*, *DRD2*, and *NAT2*. All Maltese samples were analysed in Malta whereas the other three laboratories in Scotland, Italy and Sweden analysed specific genes for the remaining countries. In Scotland *CYP2D6*, *PON1*, *DAT1*, *NAT2* were analysed, in Italy *CYP1B1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1* were analysed and in Sweden *MAO-A*, *MAO-B*, *SOD 2*, *EPHX* and *DRD2* were analysed. 1% of all samples were sent to the laboratories a second time as blind duplicates for quality assurance purposes.

CYP2D6 genotyping was carried out using published methodology to identify

*CYP2D6**4, the major "Poor Metaboliser" allele in Caucasians.[22] Single nucleotide polymorphisms in codons 55 (Leu⁵⁵Met) and 192 (Gly¹⁹²Arg) of the *PON1* gene were genotyped by polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis.[23][24]

GSTM1 and *GSTT1* polymorphisms (homozygous large gene deletions) were characterised by a multiplex PCR method.[25] We characterised *GSTM3*, *GSTP1*, *NQO1* and *CYP1B1* polymorphisms using real-time fluorescence PCR methods on a LightCycler Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). *GSTP1* exon 5 (Ile¹⁰⁵Val), *NQO1* (Pro¹⁸⁷Ser), and *CYP1B1* (Leu⁴³²Val) polymorphisms were identified applying previously described protocols.[26][27][28] New methods were developed to characterise the genetic polymorphisms of *GSTM3* [29] and *GSTP1* exon 6. The primer and hybridisation probe's sequences used to characterise the *GSTP1* exon 6 polymorphism are shown in Table 1. The *GSTP1* exon 6 fluorescein-labelled probe hybridises to a 20 bp sequence of exon 6 of the *GSTP1* gene (nt. 487-468 of the X08095 GeneBank sequence), which contains the base transition and is specific for the variant allele. Therefore, the wild type allele (Ala 114) will display a lower melting temperature, compared to that of the variant allele (Val 114). For the Maltese samples the same PCR products from the *GSTM3* and the *NQO1* genes were analysed by dideoxy sequencing and by restriction enzyme digestion using Hinf I respectively. The *GSTP1* polymorphisms [30] and *CYP1B1* [31] were analysed using previously published methods.

Table 1: Oligonucleotide primers, probes and restriction endonuclease employed in genotyping (unless otherwise listed in the text).

Genes	Molecular biology methods	
	PCR-RFLP	
	Oligonucleotide primers	Restriction endonuclease
DAT1	D9RU 5'-CATCATCTACCCGGAAGCCA-3'	DdeI
	D9RL 5'-CAGGGTGAGCAGCATGATGA-3'	
	Real-time PCR	
	Oligonucleotide primers	Hybridisation probes
GSTP1 exon 6	Forward primer 5'- AAGCAGAGGAGAATCTGGGACTC- 3'	5'-LC Red 640 ^a - CCAGACACCACCATGTATCATCCTACTCTCp- 3'
	(Reverse Primer) 5'-GGCCAGATGCTCACCTGGTC-3'	5'-GTCATCCTTGCCACCTCCT-FL ^b 3'
	Pyrosequencing	
	Pyrosequencing primers	Sequencing primers

MAO-B	5'-GTCCTTTAGGGAGCAGATTAG-3'	5'-GATTAGAAGAAAGATGGT-3'
	5'-biotin-CAGACTCTGGTTCTGACTGC-3'	
SOD2	5'-biotin-CAGCCCAGCCTGCGTAGACG-3'	5'-CCCAGATACCCCAAA-3'
	5'-CTGGAGCCCAGATACCCCAA-3'	
	PCR and dideoxy sequencing primers	
MAO-A exon 8	5'-TTGCTTGTGTGTGTTTTAGTGC-3'	
	5'-GACAGACCAAGATTTCTAATCC-3'	
EPHX3	5'-GGAAACTGCCTTGCCACTCC-3'	
	5'-CTAGCTCTAAAGATGGACAGA-3'	
	DHPLC (WAVE)	
NAT2	5'-GGATTCATGCAGTAGAAATAC-3'	
	5'ATAACGTGAGGGTAGAGAGG-3'	

^aLightCycler Red 640; ^bfluorescein

Primers were developed (Table 1) for sequencing the C/T polymorphism (Val₁₆Ala) in the *SOD2* gene using pyrosequencing.[33] For the Maltese samples these polymorphisms were analysed by dideoxy sequencing. Two amino acid polymorphisms in the *EPHX1* gene (*EPHX1* exon 3 and *EPHX1* exon 4) were determined by a PCR-RFLP assay [34][35] taking care to test for a synonymous SNP in the primer site.[36] The *EPHX1* Tyr₁₁₃His substitution in exon 3 was characterised in the Maltese samples by dideoxy sequencing (Table 1).

A PCR-RFLP approach identified the A₁₂₁₅>G polymorphism in exon 9 of the *DAT1* gene using the primers shown in Table 1. The resulting 83 base pair (bp) PCR product was digested with DdeI, producing fragments of 40bp and 43bp for the wild type allele. Two polymorphisms in the *DRD2* gene, *DRD2* TaqI-A and *DRD2* TaqI-B, were detected by PCR-RFLP, using TaqI as restriction enzyme.[37][38]

The *NAT2* status was determined using the WAVE DNA fragment analysis system. Using this method, two polymorphisms (C₂₈₂T and T₃₄₁C) were identified allowing identification of the most common slow acetylators alleles found in Caucasians.[39] The same polymorphisms were characterised in the Maltese samples by sequencing of the whole *NAT2* gene.

Statistical methods

Statistical analyses were undertaken relating genetic factors to disease state: cases of parkinsonism versus controls. None of the analyses assumed cases were matched

with specific controls. Gene distributions in controls in the five countries overall were tested to confirm they fitted Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). If the overall p value was less than $p=0.001$ then each country was tested individually and any country where $p<0.001$ was excluded from analyses for that polymorphism. *GSTM1* and *GSTT1* were not tested for Hardy Weinberg equilibrium, as the test used does not distinguish between heterozygotes and homozygotes.

For each polymorphism odds ratios (OR) were calculated for each category compared to a pre-specified reference category. Where there were fewer than 5% of subjects in one category then categories were combined and the factor was treated as binary. One genetic factor with seven categories (*GSTP1* haplotype) was collapsed into three categories before statistical analysis. Since *MAO-A* and *MAO-B* are X-linked only females could belong to the heterozygous category; therefore these factors were considered separately for males and females. Depending on the number of categories a χ^2 test or X^2 test for trend was conducted to assess the relationship between the genetic factor and disease state.

Multiple logistic regression was then used to obtain estimates of odds ratios for genetic factors adjusting for the following pre-specified covariates: age, sex, country, ever used tobacco, ever been knocked unconscious and first degree family history of Parkinson's disease. Subjects with missing information for any of these covariates were excluded from the adjusted analyses. Genetic factors with two categories were tested to establish whether the coefficient of the factor representing the log odds ratio was significantly different from zero. For risk factors with three ordered categories a trend test was conducted using logistic regression assuming equidistance between the three categories.

All of the above analyses were then repeated restricting cases to those with a diagnosis of PD. No adjustment was made for multiple significance testing. Occupational exposures were arbitrarily split into low and high exposure categories taking high exposure as being an average annual intensity of exposure (AAI) of $>20\%$ of the current UK occupational exposure limit value (OEL) for mixed solvents, iron or manganese. For pesticides and copper, where exposures were generally lower, the cut-off for high exposure was taken as an average annual intensity of 2% of the relevant OEL.[21]

Pre-specified gene-environment interactions were evaluated by first calculating a 2x4 table showing the numbers of cases and controls in each combination of genetic and occupational exposure with respect to the reference category, i.e. the combination of the reference genotype and no exposure. From the 2x4 table various odds ratios may be presented including those for having one or both of the two factors with respect to this reference.[40] In each case an odds ratio representing the deviation from the multiplicative model of interaction was calculated.

When factors with three or more levels were involved, appropriate extensions to the 2x4 table were produced. In addition to the gene-environment interactions some gene-gene interactions were assessed using identical methods. Two three-way gene-gene-

environment interactions were also assessed in a similar way. Multiple logistic regression was again undertaken to adjust the analysis of interactions for confounding factors. For interactions between two binary factors, a multiplicative interaction term was included in the model described above and a test carried out to determine whether the coefficient of the interaction term was significantly different from zero.

For factors with three categories, two dummy variables were created and interactions between all combinations of these variables were included in the model. It was then tested simultaneously whether any of these interactions were significantly different from zero using a single likelihood ratio test.

Gene-environment interaction analyses were undertaken for *CYP2D6*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTM3*, *GSTP1* haplotype, *NQO1*, *CYP1B1*, *SOD2*, *NAT2* and solvents. Similar analyses were undertaken for pesticide exposures and the following genes, *CYP2D6*, *PON1*, *GSTM1*, *GSTT1*, *GSTM3*, *GSTP1* haplotype, *NQO1*, *CYP1B1*, and *NAT2*. For iron exposure the genes studied were *GSTM1*, *CYP1B1*, *SOD2* and *NAT2*. Analyses for gene-copper interactions were carried out for *SOD2* whereas gene-manganese interactions were carried out for *CYP2D6*, *NQO1*, *CYP1B1* and *SOD2*.

Gene-gene interaction analyses were undertaken for *CYP2D6* and *GSTM1*, *PON1* and *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTM1*, *GSTM3* and *GSTM1*, *GSTP1* haplotype and *GSTM1*, *NQO1* and *GSTM1*, *NAT2* and *GSTM1*, *CYP2D6* and *GSTT1*, *GSTP1* haplotype and *GSTT1*, *MAO-B* and *NQO1*, *MAO-B* and *DRD2A*, and *MAO-B* and *DRD2B*. All the *MAO-A* and *MAO-B* analyses were carried out for males and female separately. Gene-gene-environment interactions were examined for *GSTT1* and *GSTP1* haplotype and pesticides and also for *GSTT1* and *GSTP1* haplotype and solvents.

Results

959 cases of parkinsonism (of whom 767 met the UK PDS Brain Bank criteria for PD) and 1989 age and gender balanced controls were recruited. For brevity, only the results of the analysis of genetic factors including all cases (after adjustment) are presented in Table 2 and the all cases gene-environment interaction analysis (after adjustment) in Table 3. The full results of all the genetic and gene-environment interaction analyses are available on-line at: (*Tables E-2 and E-3.*)

Table 2: Analysis of genetic factors by case-control status (all cases versus controls) after adjustment*

Genetic polymorphisms	Reference group	Studied groups	OR	95% CI	p-value **
<i>CYP2D6</i>	*1 *1	*1 *4	0.90	(0.75, 1.07)	p=0.16**
		*4 *4	0.83	(0.55, 1.26)	
<i>PON1 L55M</i>	M/M	L/M	0.92	(0.77, 1.09)	p=0.31**
		L/L	0.90	(0.69, 1.18)	
<i>PON1 Q192R</i>	Q/Q	Q/R	0.99	(0.83, 1.17)	p=0.67**
		R/R	1.40	(0.83, 1.57)	

<i>GSTM1</i>	Positive	Null	1.12	(0.95, 1.31)	p=0.18
<i>GSTT1</i>	Positive	Null	0.93	(0.75, 1.56)	p=0.52
<i>GSTM3</i>	AA	AB	1.01	(0.84, 1.20)	p=0.54**
		BB	0.71	(0.42, 1.22)	
<i>GSTP1 haplotype</i>	AA	AB/AC/AD	0.98	(0.82, 1.16)	p=0.74
		BB/BC/CC	1.10	(0.83, 1.47)	
<i>NQO1</i>	*1*1	*1*2	0.95	(0.80, 1.13)	p=0.41**
		*2*2	0.86	(0.55, 1.34)	
<i>CYP1B1</i>	*1*1	*1*3	0.95	(0.79, 1.13)	p=0.76**
		*3*3	0.98	(0.77, 1.24)	
<i>MAO-A</i> (males)	T	G	1.30	(1.02, 1.66)	p=0.04
<i>MAO-A</i> (females)	TT	TG	1.06	(0.82, 1.36)	p=0.55**
		GG	1.26	(0.72, 1.76)	
<i>MAO-B</i> (males)	A	G	1.09	(0.87, 1.36)	p=0.45
<i>MAO-B</i> (females)	AA	AG	1.14	(0.86, 1.51)	p=0.49**
		GG	1.11	(0.79, 1.56)	
<i>SOD2 Val₉Ala</i>	AA	AV	1.00	(0.82, 1.22)	p=0.95**
		VV	0.99	(0.79, 1.25)	
<i>EPHX3 Y113H</i> ²	YY	YH	0.89	(0.71, 1.13)	p=0.28**
		HH	0.86	(0.61, 1.21)	
<i>EPHX4 H139R</i>	HH	HR	0.95	(0.80, 1.13)	p=0.72**
		RR	1.37	(0.89, 2.10)	
<i>DAT1</i>	A/A	A/G	0.94	(0.80, 1.12)	p=0.93**
		G/G	1.13	(0.82, 1.55)	
<i>DRD2A</i> ³	CC	CT	0.93	(0.74, 1.16)	p=0.26**
		TT	1.42	(1.00, 2.03)	
<i>DRD2B</i> ¹	B2B2	B2B1	0.95	(0.77, 1.67)	p=0.97**
		B1B1	1.27	(0.69, 2.34)	
<i>NAT2</i>	Fast/Fast	Fast/Slow	1.04	(0.87, 1.24)	p=0.97**
		Slow/Slow	0.95	(0.71, 1.26)	

*logistic regression adjusting for age, sex, country, ever used tobacco containing product, ever knocked unconscious and first degree family history of Parkinson's disease. *MAO-A* and *MAO-B* are not adjusted for sex but are presented for males and females separately.

** For three category factors p-value for trend derived from logistic regression coding genetic factors as 0, 1 and 2 variable.

¹ Malta excluded from analysis involving *DRD2B*

² Sweden and Italy excluded from analysis involving *EPHX3*

³ Sweden and Malta excluded from analysis involving *DRD2A*

Table 3: Analysis of gene-environment interactions (all cases versus controls) after adjustment*.

Genetic polymorphisms	Candidate genotype	Exposure† Low vs High	Multiplicative interaction Odds Ratio (95%CI)	p value
CYP2D6	*4*4	Solvents	1.65 (0.37, 7.36)	0.51
CYP1B1	*3*3	Solvents	1.15 (0.49, 2.69)	0.75
GSTM1	Null	Solvents	1.76 (0.91, 3.41)	0.09
GSTT1	Null	Solvents	0.81 (0.35, 1.89)	0.63
GSTM3	AB/BB	Solvents	0.93 (0.45, 1.91)	0.84
GSTP1 haplotype	AB, AC, AD, BB, BC, CC	Solvents	1.53 (0.79, 2.96)	0.21
NQO1	*1*2/*2*2	Solvents	0.54 (0.27, 1.11)	0.09
SOD2 Val ₉ Ala	AV	Solvents	1.74 (0.72, 4.23)	0.46**
	VV	Solvents	1.60 (0.60, 4.24)	
NAT2	FS/SS	Solvents	2.31 (0.61, 8.77)	0.22
CYP2D6	*4*4	Pesticides	1.61 (0.40, 6.46)	0.50
PON1 L55M	LM/LL	Pesticides	4.43 (0.88, 22.31)	0.07
PON1 Q192R	QR/RR	Pesticides	1.56 (0.70, 3.44)	0.27
GSTM1	Null	Pesticides	0.65 (0.29, 1.43)	0.28
GSTT1	Null	Pesticides	1.29 (0.42, 3.94)	0.65
GSTM3	AB/BB	Pesticides	1.41 (0.60, 3.30)	0.43
GSTP1 haplotype	AC/AD/BC/CC	Pesticides	2.47 (0.63, 9.73)	0.20
NQO1	*1*2/*2*2	Pesticides	1.20 (0.54, 2.66)	0.66
CYP1B1	*3*3	Pesticides	0.57 (0.18, 1.91)	0.37
NAT2	FS/SS	Pesticides	1.70 (0.48, 6.07)	0.42
GSTM1	Null	Iron	0.94 (0.48, 1.83)	0.85
CYP1B1	*3*3	Iron	1.53 (0.61, 3.83)	0.37
SOD2 Val ₉ Ala	AV	Iron	0.67 (0.29, 1.55)	0.64**
	VV	Iron	0.75 (0.31, 1.84)	
NAT2	FS/SS	Iron	1.45 (0.39, 5.40)	0.58
SOD2 Val ₉ Ala	AV	Copper	0.78 (0.30, 2.04)	0.66**
	VV	Copper	1.20 (0.40, 3.55)	

<i>CYP2D6</i>	*4*4	Manganese	1.27 (0.28, 5.80)	0.76
<i>NQO1</i>	*1*2/*2*2	Manganese	1.09 (0.53, 2.22)	0.82
<i>CYP1B1</i>	*3*3	Manganese	1.75 (0.68, 4.52)	0.25
<i>SOD2</i> Val ₉ Ala	AV	Manganese	0.75 (0.31, 1.82)	0.60**
	VV	Manganese	1.13 (0.44, 2.92).	

* logistic regression adjusting for age, sex, country, ever used tobacco containing product, ever knocked unconscious and first degree family history of Parkinson's disease. *MAO-A* and *MAO-B* are not adjusted for sex but are presented for males and females separately.

** For three category factors p-value for trend derived from logistic regression coding genetic factors as 0, 1 and 2 variable.

+cut-offs for low /high exposure:

solvents/iron/manganese: 20% of an OEL (AAI)

pesticides/copper: 2% of an OEL (AAI)

The following polymorphisms did not fit HWE: *EPHX3* (Sweden, Italy), *DRD2A* (Sweden, Malta) and *DRD2B* (Malta) and analyses of these polymorphisms were restricted to those countries in HWE.

For the majority of genetic polymorphisms there was no evidence of any association with the odds of being a case. For the unadjusted all cases analyses (data not shown) there was an increased odds ratio for disease for the *MAO-A 8 G* genotype among males only, OR 1.30, 95%CI 1.03-1.64, $p=0.03$ unadjusted. This was not statistically significant when considering only PD cases: *MAO-A 8 G*, OR 1.25, 95%CI 0.97-1.61, $p=0.09$ unadjusted. There were no significant results when restricting analyses to PD cases unadjusted.

These analyses were repeated after adjustment for age, sex, country, ever used a tobacco containing product, ever been knocked unconscious and first degree family history of Parkinson's disease. The adjusted (all cases) analyses (Table 2) were broadly similar to the unadjusted results. Only the *MAO A 8* (males) analysis was significant at the 5% level (OR 1.30, 95%CI 1.02-1.66, $p=0.04$ adjusted). For the Parkinson's disease only (adjusted) analysis, (data not shown), there were no statistically significant results.

The gene-environment interactions analysis for all cases, (parkinsonism and PD), yielded little evidence of interaction effects between environmental and genetic factors; none of the analyses conducted being significant at the 5% level. However, a number of interactions may be worthy of further study. There were possible interaction effects between: *GSTM1* genotype and solvent exposure, the multiplicative interaction (Table 3) giving an OR 1.76, (95%CI 0.91-3.41, $p=0.09$ adjusted); *NQO1* and solvent exposure, (OR 0.54, 95%CI 0.27-1.11, $p=0.09$ adjusted); and *PON55* and pesticides (OR 4.43, 95%CI 0.88-22.31, $p=0.07$ adjusted). None of the gene-gene interactions (Table 4) gave a significant result. Neither of the three-way interactions studied (*GSTT1/GSTP1* haplotype/solvents and *GSTT1/GSTP1* haplotype/pesticides) showed any evidence of an effect.

Table 4: Analysis of gene-gene interactions (all cases versus controls) after adjustment*

Gene-gene interactions		Multiplicative interaction Odds Ratio (95%CI)	p value
CYP2D6	GSTM1	0.68 (0.30, 1.56)	0.37
PON55	GSTM1	0.80 (0.48, 1.34)	0.40
PON192	GSTM1	0.88 (0.64, 1.22)	0.45
GSTT1	GSTM1	1.17 (0.76, 1.80)	0.47
GSTM3	GSTM1	0.75 (0.52, 1.09)	0.13
GSTP1 haplotype AB/AC/AD vs. AA BB/BC/CC vs. AA	GSTM1 Null vs. Pos Null vs. Pos	0.88 (0.62, 1.24) 1.23 (0.69, 2.19)	0.48**
NQO1	GSTM1	0.96 (0.70, 1.35)	0.82
NAT2	GSTM1	1.17 (0.67, 2.04)	0.58
CYP2D6	GSTT1	1.21 (0.36, 4.10)	0.76
GSTP1 haplotype AB/AC/AD vs. AA BB/BC/CC vs. AA	GSTT1 Null vs. Pos Null vs. Pos	1.11 (0.70, 1.74) 1.38 (0.63, 3.01)	0.70**
MAO-B (males only)	NQO1	0.98 (0.62, 1.57)	0.95
MAO-B (females only) AG vs. AA GG vs. AA	NQO1	0.93 (0.52, 1.67) 0.83 (0.40, 1.69)	0.87**
MAO-B (males only)	DRD2A ²	1.51 (0.55, 4.15)	0.43
MAO-B (females only) AG vs. AA GG vs. AA	DRD2A ²	0.71 (0.23, 2.21) 0.99 (0.26, 3.74)	0.79**
MAO-B (males only)	DRD2B ¹	0.65 (0.37, 1.15)	0.14
MAO-B (females only) AG vs. AA GG vs. AA	DRD2B ¹	1.01 (0.50, 1.99) 0.58 (0.24, 1.39)	0.37**

* logistic regression adjusting for age, sex, country, ever used tobacco containing product, ever knocked unconscious and first degree family history of Parkinson's disease.

** For three category factors p-value for trend derived from logistic regression assuming equidistance between genetic categories.

¹ Excludes Malta

² Excludes Sweden and Malta.

The adjusted analyses excluding those cases without a diagnosis of PD provided a similar pattern of results: see website (Table E-3). The previously noted multiplicative interaction between *GSTM1* genotype and solvent exposure was now statistically

significant with an increased odds ratio, (OR 2.34, 95%CI 1.08-4.62, $p=0.03$ adjusted). For *NQO1* the previously noted marginally non-significant association between *NQO1* *1*2/*2*2 and solvent exposure was no longer evident (OR 0.68, 95%CI 0.32-1.44, $p=0.31$ adjusted). For *PON55* and pesticides there was no evidence of an interaction, (OR 0.55, 95%CI 0.24-1.30, $p=0.18$ adjusted). *GSTP1* haplotype and pesticides gave a non-significant multiplicative interaction (OR 3.01, 0.75-12.02, $p=0.12$). No statistically significant gene-gene interaction was identified.

Discussion

There was no convincing evidence that any of the genes studied modified risk and only limited evidence that gene-environment interactions (*GSTM1* genotype and solvents) may alter the risk of Parkinson's disease. None of the significant p -values were less than $p=0.01$. The genetic analyses identified only one statistically significant association with Parkinson's disease. The association between *MAO-A* 8 *G* or *GG* genotype (reference rs6323 on NCBI SNP database) and parkinsonism that was observed was of modest size.

The gene-environment interactions also gave few significant results. Allowing for the number of analyses carried out these may simply be chance associations; even if no interaction effects exist 5% of the tests performed should still be statistically significant by chance. Nonetheless there is limited evidence to support the previously observed association of *GSTM1 null* genotype, solvent exposure and neurological disease.[41] The multiplicative interaction is greater than one, suggesting that a *GSTM1 null* individual having high solvent exposure would have greater risk of disease than would be expected with only one of these factors. This interaction effect is only statistically significant for the PD only sub-group. *NQO1* homozygous mutants show poorer benzene metabolism than the wild type [42] and the reduced odds ratios for *NQO1* heterozygotes or homozygous mutants, with high solvent exposure, is therefore unexpected. The non-significantly reduced odds ratio for *PON55 MM* genotype subjects with high pesticide exposure should be interpreted with caution as this is based on a very small number of exposed subjects.

Polymorphism in the *GSTP1* gene has previously been linked to an increased risk of Parkinson's disease in pesticide exposed individuals.[10] There was a non-significantly elevated odds ratio that would support this association in this (larger) study where detailed exposure estimates were generated. In particular, the risk was associated with the less common *GSTP1* polymorphism, affecting exon 6, which modifies the substrate-binding site of the enzyme.

A number of polymorphisms were not in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for some countries. There are a number of possible explanations for a gene not being in HWE including recent mutation, mating preference linked to a polymorphism, natural selection or sampling error. It is not possible to identify a specific reason why a polymorphism is not in Hardy-Weinberg equilibrium in a specific population. It is possible that one of the conditions for HWE was not met in that population but equally it may be due to chance, as a substantial number of polymorphisms were evaluated.

The Geoparkinson study is one of the largest case-control studies to have examined

genetic, environmental and occupational risk factors for Parkinson's disease. A number of enzymes were examined (on a candidate gene basis) as potential modifiers of chemical toxicity. Published diagnostic criteria for PD were employed and subjects were recruited using a common protocol across five countries. Detailed estimates for a range of occupational exposures were produced using an indirectly validated methodology.

The literature includes many small studies describing positive associations between a range of genetic polymorphisms and Parkinson's disease.[43] Several studies report associations between a number of these polymorphisms, chemical exposures and PD. It seems likely that some of these are false positive associations, occurring by chance. Publication bias ensures more of these false positive studies are published than negative studies. This large multi-centre study was sufficiently powered to test these associations. One possible explanation for these largely negative findings is that the occupational and hobby exposures identified were generally of low-level. An alternative explanation is that other genetic factors are more important in modifying disease risk. Some gene-environment interactions may only be revealed with substantial exposure. These results suggest that even if the polymorphisms studied interact with heavy exposures to modify disease status they do not make a major contribution to the prevalence of Parkinson's disease.

Acknowledgements

This study was funded by the European Union as part of the Fifth Framework programme, project number QLK4-CT-1999-01133. We gratefully acknowledge the support of the European Union for this project.

Reference List

1. Taylor CA, Saint-Hilaire MH, Cupples LA, *et al.* Environmental, medical, and family history risk factors for Parkinson's disease: a New England-based case control study. *Am J Med Genet* 1999;88:742-749.
2. McCann SJ, Pond SM, James KM, *et al.* The association between polymorphisms in the cytochrome P-450 2D6 gene and Parkinson's disease: a case-control study and meta-analysis. *J Neurol Sci* 1997;153:50-53.
3. Rieder CR, Ramsden DB, Williams AC. Cytochrome P450 1B1 mRNA in the human central nervous system. *Mol Pathol* 1998;51:138-142.
4. Lewis DF, Gillam EM, Everett SA, *et al.* Molecular modelling of human CYP1B1 substrate interactions and investigation of allelic variant effects on metabolism. *Chem Biol Interact* 2003;145:281-295.
5. Shimada T, Watanabe J, Inoue K, *et al.* Specificity of 17beta-oestradiol and benzo[a]pyrene oxidation by polymorphic human cytochrome P4501B1 variants substituted at residues 48, 119 and 432. *Xenobiotica* 2001;31:163-176.
6. Mackness B, Mackness MI, Arrol S, *et al.* Effect of the molecular polymorphisms of human paraoxonase (PON1) on the rate of hydrolysis of paraoxon. *Br J Pharmacol* 1997;122:265-268.
7. Ahmadi A, Fredrikson M, Jerregard H, *et al.* GSTM1 and mEPHX polymorphisms in Parkinson's disease and age of onset. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;269:676-680.
8. De Palma G, Mozzoni P, Mutti A, *et al.* Case-control study of interactions between genetic and environmental factors in Parkinson's disease. *Lancet* 1998;352:1986-

1987.

9. Inskip A, Elexperu-Camiruaga J, Buxton N, *et al.* Identification of polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: evidence for linkage with GSTM1*A. *Biochem J* 1995;312:713-716.
10. Menegon A, Board PG, Blackburn AC, *et al.* Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet* 1998;352:1344-1346.
11. Kuehl BL, Paterson JW, Peacock JW, *et al.* Presence of a heterozygous substitution and its relationship to DT-diaphorase activity. *Br J Cancer* 1995;72:555-561.
12. Chan TS, Teng S, Wilson JX, *et al.* Coenzyme Q cytoprotective mechanisms for mitochondrial complex I cytopathies involves NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1(NQO1). *Free Radic Res* 2002;36:421-427.
13. Orelan L. Monoamine oxidase, dopamine and Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand Suppl* 1991;136:60-65.
14. Hotamisligil GS, Girmen AS, Fink JS, *et al.* Hereditary variations in monoamine oxidase as a risk factor for Parkinson's disease. *Mov Disord* 1994;9:305-310.
15. Shimoda-Matsubayashi S, Matsumine H, Kobayashi T, *et al.* Structural dimorphism in the mitochondrial targeting sequence in the human manganese superoxide dismutase gene. A predictive evidence for conformational change to influence mitochondrial transport and a study of allelic association in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;226:561-565.
16. Pifl C, Giros B, Caron MG. Dopamine transporter expression confers cytotoxicity to low doses of the parkinsonism-inducing neurotoxin 1-methyl-4-phenylpyridinium. *J Neurosci* 1993;13:4246-4253.
17. Morino H, Kawarai T, Izumi Y, *et al.* A single nucleotide polymorphism of dopamine transporter gene is associated with Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2000;47:528-531.
18. Grandinetti A, Morens DM, Reed D, *et al.* Prospective study of cigarette smoking and the risk of developing idiopathic Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 1994;139:1129-1138.
19. Spitz MR, Shi H, Yang F, *et al.* Case-control study of the D2 dopamine receptor gene and smoking status in lung cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:358-363.
20. Bandmann O, Vaughan J, Holmans P, *et al.* Association of slow acetylator genotype for N-acetyltransferase 2 with familial Parkinson's disease. *Lancet* 1997;350:1136-1139.
21. Semple SE, Dick F, Cherrie JW. Exposure assessment for a population-based case-control study combining a job-exposure matrix with interview data. *Scand J Work Environ Health* 2004;30:241-248.
22. Smith CA, Gough AC, Leigh PN, *et al.* Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Lancet* 1992;339:1375-1377.
23. Cascorbi I, Laule M, Mrozikiewicz PM, *et al.* Mutations in the human paraoxonase 1 gene: frequencies, allelic linkages, and association with coronary artery disease. *Pharmacogenetics* 1999;9:755-761.
24. Humbert R, Adler DA, Distech CM, *et al.* The molecular basis of the human serum paraoxonase activity polymorphism. *Nat Genet* 1993;3:73-76.
25. Arand M, Muhlbauer R, Hengstler J, *et al.* A multiplex polymerase chain reaction protocol for the simultaneous analysis of the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *Anal Biochem* 1996;236:184-186.
26. Bruning T, Abel J, Koch B, *et al.* Real-time PCR-analysis of the cytochrome P450

- 1B1 codon 432-polymorphism. *Arch Toxicol* 1999;73:427-430.
27. Ko Y, Koch B, Harth V, *et al.* Rapid analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms using real-time polymerase chain reaction. *Pharmacogenetics* 2000;10:271-274.
28. Harth V, Donat S, Ko Y, *et al.* NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 codon 609 polymorphism and its association to colorectal cancer. *Arch Toxicol* 2000;73:528-531.
29. Mozzoni P, De Palma G, Scotti E, *et al.* Characterization of GSTM3 polymorphism by real-time polymerase chain reaction with LightCycler. *Anal Biochem* 2004;330:175-177.
30. Saarikoski ST, Voho A, Reinikainen M, *et al.* Combined effect of polymorphic GST genes on individual susceptibility to lung cancer. *Int J Cancer* 1998;77:516-521.
31. Zheng W, Xie DW, Jin F, *et al.* Genetic polymorphism of cytochrome P450-1B1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:147-150.
32. Hotamisligil GS, Breakefield XO. Human monoamine oxidase A gene determines levels of enzyme activity. *Am J Hum Genet* 1991;49:383-392.
33. Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 1998;281:363-365.
34. Lancaster JM, Brownlee HA, Bell DA, *et al.* Microsomal epoxide hydrolase polymorphism as a risk factor for ovarian cancer. *Mol Carcinog* 1996;17:160-162.
35. Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997;350:630-633.
36. Keicho N, Emi M, Kajita M, *et al.* Overestimated frequency of a possible emphysema-susceptibility allele when microsomal epoxide hydrolase is genotyped by the conventional polymerase chain reaction-based method. *J Hum Genet* 2001;46:96-98.
37. Castiglione CM, Deinard AS, Speed WC, *et al.* Evolution of haplotypes at the DRD2 locus. *Am J Hum Genet* 1995;57:1445-1456.
38. Grandy DK, Zhang Y, Civelli O. PCR detection of the TaqA RFLP at the DRD2 locus. *Hum Mol Genet* 1993;2:2197.
39. Osborne A, Bell C, Grant F, *et al.* A rapid method of screening for Nacetyltransferase (NAT2) phenotype by use of the WAVE DNA fragment analysis system. *Biochem Genet* 2003;41:405-411.
40. Botto LD, Khoury MJ. Commentary: facing the challenge of gene-environment interaction: the two-by-four table and beyond. *Am J Epidemiol* 2001;153:1016-1020.
41. Soderkvist P, Ahmadi A, Akerback A, *et al.* Glutathione S-transferase M1 null genotype as a risk modifier for solvent-induced chronic toxic encephalopathy. *Scand J Work Environ Health* 1996;22:360-363.
42. Nebert DW, Roe AL, Vandale SE, *et al.* NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) polymorphism, exposure to benzene, and predisposition to disease: a HuGE review. *Genet Med* 2002;4:62-70.
43. Tan EK, Khajavi M, Thornby JI, Nagamitsu S, Jankovic J, Ashizawa T. Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease. *Neurology* 2000;55:533-538.

Appendix 1: the Geoparkinson study group

Dick F D. MD (Study co-ordinator, Scotland); Seaton A. MD (Principal Investigator); Haites N. PhD (Molecular biology); Osborne A. MSc (Molecular biology); Grant F BSc (Molecular biology); Semple S E. PhD (Exposure estimation); Cherrie J W. PhD (Exposure estimation); Dick S. PhD (Questionnaire administration); Adiakpan N. MSc (Questionnaire administration); Sutherland S. RGN (Questionnaire administration); Prescott G J. PhD (Statistics); Scott N W. MSc (Statistics); Bennett J E. MSc (Statistics); Counsell C E. MD (Case enrolment); Coleman R. MD (Case enrolment); Primrose W. FRCP (Subject enrolment); Srivastava P. FRCP (Subject enrolment); Mutti A MD (Principal Investigator - Italy), De Palma G. MD (Study coordinator, Italy), Mozzoni P. BSc (Molecular biology), Scotti E PhD (Molecular biology), Buzio L MD (Questionnaire administration), Calzetti S MD (Neurological evaluation), Montanari E MD (Neurological evaluation), Negrotti A MD (Case enrolment), Scaglioni A MD (Case enrolment), Manotti C. MD (Control enrolment), Söderkvist P. PhD (Principal Investigator - Sweden), Ahmadi A PhD (Molecular Biology), Hällsten A-L (Questionnaire administration), Molbaek A (Molecular biology), Schippert Å (Molecular biology), Dizdar N. MD (Case enrolment), Tondel M. MD (Case enrolment), Fall P-A MD (Case enrolment), Otelea M MD (Principal Investigator - Romania), Tinischi M. (Molecular biology), Bezzina Wettinger S. M.Phil. (Study co-ordinator, Malta), Scerri C Ph.D. (Subject recruitment, questionnaire administration), Borg J BSc (Molecular Biology, questionnaire administration), Cassar K MD (Subject recruitment, questionnaire administration), Cassar W B.Pharm. (Molecular Biology), Galdies R B.Pharm. (Molecular Biology), Vella N R. MD (Subject recruitment), Mifsud V A. MD (Subject recruitment), Aquilina J MD (Subject recruitment), Galea Debono A MD (Subject recruitment), Felice A MD, PhD (Principal Investigator- Malta).

From the Departments of Environmental & Occupational Medicine (Drs Dick, Seaton, Semple, Cherrie, Dick, Adiakpan and S Sutherland), Medicine & Therapeutics (Dr Counsell), Medical Genetics (A Osborne, F Brown and Dr Haites), Public Health (G Prescott, N Scott and J Bennett), University of Aberdeen, UK; Department of Neurology, (Dr Coleman) Aberdeen Royal Infirmary, Aberdeen, UK; Department of Medicine for the Elderly, (Dr Primrose), Woodend Hospital, Aberdeen, UK; Department of Medicine for the Elderly, (Dr Srivastava), Raigmore Hospital, Inverness, UK; the Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Science, Laboratory of Industrial Toxicology (Drs Mutti, De Palma, Mozzoni, Scotti, Buzio), ISPEL Research Center (Drs De Palma, Mozzoni, Scotti), Neuroscience Department, Neurology Section (Drs Negrotti and Calzetti) University of Parma; Neurological Division (Drs Montanari and Scaglioni) Hospital of Fidenza, Parma; Haemostasis Center (Dr Manotti) University Hospital of Parma, Parma, Italy; Division of Cell Biology, Department of Biomedicine and Surgery, (A Molbaek, Å Schippert, Drs Söderkvist and Ahmadi), Division of Occupational and Environmental Medicine, Department of Molecular and Clinical Medicine, (A-L Hällsten, Dr Tondel), Division of Geriatrics, Department of Neuroscience and Locomotion, (Dr Fall), Division of Neurology, Department of Neuroscience and Locomotion (Dr Dizdar), Faculty of Health Sciences, Linköping University, Linköping, Sweden; Department of Occupational Medicine (M. Tinischi, Dr Otelea) University Hospital 'Colentina', Bucharest, Romania; Department of Medicine, (Drs Mifsud, Aquilina, Galea

Debono, and Vella) St Luke's Hospital, G'Mangia, Malta, Laboratory of Molecular Genetics, Department of Physiology and Biochemistry, (S Bezzina Wettinger, R Galdies, W Cassar, J Borg, and Drs K Cassar, Scerri and Felice) University of Malta, Msida, Malta.

Competing interest statement: all authors declare that there are no competing interests.

Main messages

1. There was a modest but significant association between *MAO-A* polymorphism in males and risk of Parkinson's disease
2. Only one of the 31 gene-environment analyses showed a significant interaction effect.
3. There were possible interaction effects between *GSTM1 null* genotype and solvent exposure

Policy implications

1. There was little evidence that the genetic polymorphisms studied modified risk of Parkinson's disease.

Ringraziamenti

Un sentito ringraziamento al *Prof. Antonio Mutti* per la disponibilità, i preziosi suggerimenti e la fiducia dimostratami in questi anni.

Un sentito ringraziamento al *Prof. Innocente Franchini*, Direttore del Dipartimento, e a tutti i colleghi e gli amici del Laboratorio di Tossicologia Industriale e della Sezione di Medicina del Lavoro per la stima e il sostegno che mi hanno dimostrato.

Tanta stima e riconoscenza vanno al *Dott. Giuseppe De Palma* che mi ha pazientemente guidato durante questi anni.

Infine un doveroso GRAZIE a *Stefano*, a *Chiara* e a *Lorenzo* per essermi stati vicini ed essere i pilastri fondamentali della mia vita.