

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

---

MONITORAGGIO BIOLOGICO DELL'ESPOSIZIONE  
AD INQUINANTI AERODISPERSI NEI LUOGHI DI  
VITA E DI LAVORO: SVILUPPO DI NUOVI  
INDICATORI IN CROMATOGRAFIA LIQUIDA  
ACCOPIATA ALLA SPETTROMETRIA DI MASSA

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. ANTONIO MUTTI

Tutor:

Dott. PAOLA MANINI

Dottoranda:

ROBERTA ANDREOLI

## **RIASSUNTO**

La diminuzione dei livelli di esposizione negli ambienti di lavoro e l'aumento degli inquinanti urbani hanno reso sempre più complessa la caratterizzazione dell'esposizione, evidenziando la necessità di sviluppare nuovi indicatori di esposizione e di effetto sufficientemente sensibili per distinguere le due condizioni.

La cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa ha permesso di: (i) individuare nuovi indicatori di esposizione, in grado di quantificare l'esposizione ad inquinanti presenti in tracce nell'ambiente di vita o di lavoro, garantendo l'affidabilità e la precisione della misura analitica; (ii) approfondire le conoscenze sugli indicatori di effetto e sui meccanismi che ne regolano le alterazioni in soggetti esposti a basse dosi di inquinanti ambientali ed occupazionali; (iii) contribuire alla validazione di una nuova matrice, il condensato dell'aria espirata, per il monitoraggio biologico di indicatori di esposizione e di effetto per sostanze pneumotossiche, il cui interesse principale è condizionato dall'importanza del polmone come organo bersaglio degli inquinanti aerodispersi.

## **ABSTRACT**

Exposure levels at the workplace are continuously decreasing while the concentration of environmental pollutants shows an opposite increasing trend, thus making the exposure characterization a complex issue. For this reason, it is necessary to develop novel exposure and effect biomarkers capable to distinguish between the two different conditions.

Liquid chromatography tandem mass spectrometry allowed: (i) to develop new exposure biomarkers for human biological monitoring in living and working environments with adequate reliability and satisfying precision even at the trace level; (ii) to widen the knowledge of effect biomarkers and to study mechanisms that cause their modifications in subjects exposed to low levels of environmental and occupational xenobiotics; (iii) to contribute to the validation of a new biological matrix, the exhaled breath condensate, arising from the lungs and useful for the biological monitoring of exposure and effect of pneumotoxic substances.

## Sommario

<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	1
1.1 La spettrometria di massa .....	2
1.2 Applicazioni della spettrometria di massa in campo occupazionale .....	4
1.3 Nuovi sviluppi nel monitoraggio biologico .....	5
1.4 Stress ossidativo.....	7
1.5 Il condensato dell'aria espirata .....	9
1.5.1 Indicatori biologici determinabili nel condensato dell'aria esalata .....	10
1.5.2 Sistemi per la raccolta del condensato dell'aria espirata .....	12
1.5.3 Applicazioni del condensato dell'aria espirata in campo clinico .....	13
<b>2. SCOPI DELLA TESI</b> .....	15
2.1 La qualità del dato e la validità analitica .....	16
2.2 Indicatori di esposizione e di effetto in soggetti esposti a basse dosi di inquinanti ambientali ed occupazionali.....	17
2.3 Il condensato dell'aria espirata .....	19
<b>3. QUALITÀ DEL DATO E VALIDITÀ ANALITICA</b> .....	20
3.1 Affidabilità delle misure e confronto interlaboratorio .....	21
3.1.1 Materiali e Metodi .....	22
3.1.1.1 Soggetti .....	22
3.1.1.2 Reagenti .....	22
3.1.1.3 Disegno dello studio .....	22
3.1.1.4 Monitoraggio biologico .....	23
3.1.2 Risultati e Discussione.....	24
3.2 Analisi quantitativa .....	26
3.2.1 Materiali e Metodi .....	27
3.2.1.1 Soggetti .....	27
3.2.1.2 Reagenti .....	27
3.2.1.3 Modalità di raccolta del condensato dell'aria espirata e preparazione del campione.....	27

3.2.1.4 Determinazione delle aldeidi in campioni di condensato dell'aria espirata	28
3.2.2 Risultati e Discussione	29
4. INDICATORI DI ESPOSIZIONE E DI EFFETTO IN ESPOSTI A BASSE DOSI DI INQUINANTI AMBIENTALI ED OCCUPAZIONALI	31
4.1 Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione a basse dosi di benzene in un gruppo di tassisti: ruolo del polimorfismo genetico	32
4.1.1 Materiali e Metodi	32
4.1.1.1 Soggetti	32
4.1.1.2 Reagenti	33
4.1.1.3 Monitoraggio Ambientale	33
4.1.1.4 Monitoraggio Biologico	34
4.1.1.5 Caratterizzazione dei genotipi metabolici	35
4.1.1.6 Statistica	35
4.1.2 Risultati e Discussione	36
4.2 Indicatori di esposizione e di effetto in soggetti esposti a stirene	39
4.2.1. Materiali e Metodi	41
4.2.1.1 Soggetti	41
4.2.1.2 Reagenti	42
4.2.1.3 Monitoraggio ambientale	42
4.2.1.4 Monitoraggio biologico	42
4.2.1.5 Caratterizzazione genotipica	44
4.2.1.6 Statistica	45
4.2.2 Risultati e Discussione	45
4.2.2.1 Monitoraggio biologico dell'esposizione a stirene	45
4.2.2.2 Indicatori di danno ossidativo al DNA e associazione con l'esposizione a stirene	47
4.2.2.3 Polimorfismo genetico dell'hOgg1	53

5. IL CONDENSATO DELL'ARIA ESPIRATA .....	57
5.1 Materiali e Metodi .....	59
5.1.1 Soggetti .....	59
5.1.2 Modalità di raccolta del condensato dell'aria espirata.....	60
5.1.3 Monitoraggio Ambientale.....	60
5.1.4 Monitoraggio Biologico.....	61
5.1.5 Statistica.....	62
5.2.1 Studio 1: Valutazione dell'influenza della temperatura di raccolta del condensato dell'aria espirata sugli indicatori di effetto .....	63
5.2.2 Studio 2: Indicatori di effetto nel condensato dell'aria espirata di soggetti professionalmente esposti a Cromo .....	65
5.2.3 Studio 3: Indicatori di effetto nel condensato dell'aria espirata di soggetti professionalmente esposti a sostanze irritanti.....	66
6. CONCLUSIONI .....	68
7. BIBLIOGRAFIA .....	70
8. ELENCO ALLEGATI .....	83
9. APPENDICE .....	I

## **1. INTRODUZIONE**

## 1.1 La spettrometria di massa

Tecniche analitiche che si basano sulla spettrometria di massa, anche se relativamente costose, sono considerate tecniche di riferimento in quanto hanno caratteristiche superiori e uniche di specificità, selettività e sensibilità necessarie per l'identificazione e la determinazione di agenti tossici e dei loro metaboliti presenti a livello di tracce o di ultra-tracce in matrici biologiche complesse. La spettrometria di massa viene oggi ampiamente utilizzata come tecnica di riferimento per l'analisi di elementi metallici in tracce utilizzando una sorgente di plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-MS). L'accoppiamento della spettrometria di massa con tecniche cromatografiche ha portato dapprima allo sviluppo ed alla diffusione della gascromatografia-spettrometria di massa (GC-MS) e, in tempi più recenti, a quello della cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS). Queste tecniche rendono possibile, rispettivamente, l'analisi di sostanze organiche volatili e dei loro metaboliti in matrici biologiche. Entrambe queste tecniche sono oggi disponibili in una versione cosiddetta *tandem* (MS/MS) che utilizza due analizzatori quadrupolari in serie separati da una cella di collisione. Questo tipo di configurazione consente di ottenere una ulteriore dimensione nella separazione degli analiti e di aumentare ulteriormente le caratteristiche di selettività delle tecniche in oggetto.

In particolare, l'elevata potenzialità della tecnica combinata LC-MS/MS si basa sulla possibilità di sfruttare e unire i vantaggi delle due tecniche individualmente considerate: la cromatografia liquida, tecnica separativa efficiente e selettiva, è di per sé compatibile con le matrici biologiche acquose; la spettrometria di massa è intrinsecamente specifica e sensibile ed è caratterizzata da intervallo di linearità molto ampio (4-5 ordini di grandezza) nel caso in cui si utilizzino analizzatori quadrupolari. Se confrontata con altre tecniche analitiche, la LC-MS/MS permette la riduzione o, in alcuni casi, l'eliminazione del trattamento del campione, limitando la possibilità di generare artefatti, riduce i tempi di analisi aumentando la produttività, è robusta e automatizzabile, e permette la determinazione di composti presenti nel campione a intervalli di concentrazione differenti.

In tossicologia industriale, la tecnica LC-MS(/MS) è stata utilizzata solo di recente e il numero di applicazioni è ancora limitato rispetto ad altri campi scientifici come la farmacocinetica (Lim *et al.*, 2002), la chimica clinica e la tossicologia forense

(Marquet *et al.*, 2002). Alcuni recenti studi basati sull'utilizzo della LC-MS(/MS) hanno evidenziato chiaramente il potenziale di questa tecnica sia nella determinazione di indicatori di esposizione tradizionali che negli studi di metabolismo volti ad investigare vie metaboliche minori e ad identificare nuovi e più specifici indicatori biologici (Manini *et al.*, 2004).

Benché la possibilità di identificare nuovi metaboliti sia un aspetto ritenuto assai interessante, l'analisi quantitativa rappresenta uno dei principali obiettivi della spettrometria di massa. Questa esigenza rende ragione del fatto che gli analizzatori quadrupolari a bassa risoluzione (inclusi i sistemi MS/MS a triplo quadrupolo) abbiano avuto il sopravvento rispetto ai sistemi ad alta risoluzione, più adatti all'identificazione di nuovi composti attraverso la determinazione della massa esatta. A dispetto dell'apparente semplicità nell'ottenere risultati quantitativi, rispetto ad altre tecniche analitiche, la qualità delle determinazioni dipende da diversi fattori: (i) la concentrazione degli analiti di interesse; (ii) la disponibilità di standard commercialmente disponibili e adeguati standard interni, in particolare quelli marcati isotopicamente; (iii) la disponibilità di campioni di controllo e materiali certificati di riferimento; (iv) e la disponibilità di programmi di controllo qualità esterni. Inoltre, recenti studi hanno evidenziato chiaramente che la LC-MS/MS risente dell'effetto matrice (Choi *et al.*, 2001; Ito *et al.*, 2002). E' stato ipotizzato che esista una competizione tra i componenti della matrice e gli analiti di interesse per la ionizzazione e che l'efficienza di formazione dello ione-analita possa essere favorita o sfavorita a seconda dell'intorno nel quale la ionizzazione avviene. La soppressione del segnale può essere causata da composti non volatili e non trattenuti dalla cromatografia, sovraccaricamento della colonna, o da soluti non volatili. Sfortunatamente sia l'incremento che la depressione del segnale non sono fenomeni prevedibili e sono sia analita che concentrazione dipendente, quindi le problematiche legate all'effetto matrice vanno affrontate ogni volta che si vuole determinare un nuovo composto. Se non adeguatamente considerato nel corso della validazione del metodo, l'effetto matrice può portare a una diminuzione di precisione e accuratezza, specialmente a basse concentrazioni, rendendo inaffidabili i risultati dell'analisi quantitativa.

## 1.2 Applicazioni della spettrometria di massa in campo occupazionale

E' da circa un decennio che le tecniche GC/MS ed LC-MS/MS sono disponibili presso il Laboratorio di Tossicologia Industriale dell'Università di Parma, che è stato uno dei primi centri di ricerca in Italia ad applicare la spettrometria di massa a problematiche di Medicina Occupazionale ed Ambientale. Grazie all'impiego di queste due tecniche è stato possibile rivisitare il metabolismo dell'esano (Andreoli *et al.*, 1998; Manini *et al.*, 1998), solvente di interesse tossicologico per le proprietà neurotossiche del 2,5-esandione (2,5-HD), metabolita di fase I attualmente utilizzato come indicatore per il monitoraggio biologico.

La caratterizzazione dei metaboliti di fase I dell'esano è stata possibile combinando i risultati ottenuti mediante GC/MS ed LC-MS/MS con sistema di ionizzazione *Atmospheric Pressure Chemical Ionization* (APCI) (Andreoli *et al.*, 1998) su campioni di urina di ratto dopo idrolisi enzimatica e acida, mentre i metaboliti di fase II, in particolare i composti glicuro-coniugati, sono stati identificati mediante LC-MS/MS utilizzando la tecnica di ionizzazione *Electrospray* (ESI) (Manini *et al.*, 1998). I risultati ottenuti confrontando le differenti tecniche analitiche e di ionizzazione hanno permesso di individuare nelle forme glicuro-coniugate del 2-esanolo e del 5-idrossi-2-esanone i principali metaboliti urinari dell'esano e di verificare che l'idrolisi del campione seguita da analisi gascromatografica genera artefatti, tra cui metilfurani,  $\gamma$ -valerolattone ed una quantità circa dieci volte superiore di 2,5-HD, il cosiddetto 2,5-HD "totale", rispetto al contenuto di 2,5-HD nelle urine analizzate senza trattamento del campione, chiamato invece 2,5-HD "libero". Questo approfondimento del metabolismo dell'esano ha avuto importanti risvolti in campo occupazionale: il 2,5-HD "libero" è un indicatore appropriato sia da un punto di vista analitico che da un punto di vista tossicologico per obiettivi di monitoraggio biologico, dal momento che il rischio di neurotossicità dei composti coniugati è trascurabile (Manini *et al.*, 1999). E' per questo motivo che nell'anno 2001, l'*American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) ha cambiato il BEI<sup>®</sup> dell'esano, raccomandando la determinazione della forma di 2,5-HD "libera" piuttosto che quella "totale" (ACGIH, 2004).

Un altro composto di cui è stato possibile studiare il metabolismo è rappresentato dal naftalene. Grazie all'impiego della LC-MS/(MS) è possibile effettuare il monitoraggio biologico dell'esposizione a questo idrocarburo policiclico aromatico

determinando i suoi metaboliti solfo- e glicuro-coniugati senza effettuare idrolisi e manipolazione del campione, ma solo dopo filtrazione e acidificazione dell'urina (Andreoli *et al.*, 1999b).

Nel caso del metabolismo dello stirene, l'utilizzo della LC-MS/MS ha reso possibile lo studio di vie metaboliche minori, permettendo la quantificazione (i) dei quattro diastereoisomeri degli acidi mercapturici derivanti dalla coniugazione dello stirene 7,8-ossido con il glutatione e (ii) dei metaboliti solfo- e glicuroconiugati del 4-vinilfenolo che si forma in seguito all'ossidazione dell'anello aromatico dello stirene (Manini *et al.*, 2003). L'importanza di questi metaboliti minori è associata, rispettivamente, allo studio del possibile ruolo degli indicatori di suscettibilità (polimorfismo degli enzimi coinvolti nella biotrasformazione dello stirene) (De Palma *et al.*, 2001) e ad una migliore comprensione dei meccanismi di genotossicità dello stirene stesso (De Palma *et al.*, 2003). Inoltre, l'elevata sensibilità della tecnica ha permesso di definire l'intervallo dei valori di riferimento dei metaboliti principali dello stirene, gli acidi mandelico e fenilgliossilico, nella popolazione generale non professionalmente esposta a stirene (Manini *et al.*, 2004).

### 1.3 Nuovi sviluppi nel monitoraggio biologico

L'utilizzo di tecniche altamente sensibili e selettive ha aperto nuovi sviluppi e prospettive nella ricerca di indicatori biologici e nel significato attribuito al monitoraggio biologico, evidenziando però come la specificità biologica e quella analitica possano, a volte, divergere. La possibilità di determinare composti di interesse tossicologico e loro metaboliti presenti in tracce o ultra-tracce nelle matrici biologiche accessibili ha mostrato come spesso queste sostanze siano in realtà ubiquitarie o possano derivare dal metabolismo endogeno. Come risultato, è possibile che addotti altamente "specifici" o metaboliti di tossici industriali vengano determinati in campioni biologici di persone classificate come "non esposte".

Nonostante i progressi tecnologici abbiano indubbiamente portato ad un miglioramento delle condizioni lavorative, la totale rimozione dei fattori di rischio dagli ambienti di lavoro rimane spesso impraticabile. Inoltre, nei Paesi occidentali a causa dell'aumento dell'industrializzazione, dell'urbanizzazione e dell'utilizzo dei veicoli a motore, si osserva un incremento degli inquinanti ambientali con ricadute sulla salute di tutta la popolazione. Per questo motivo è necessario cercare indicatori di esposizione

più specifici e sensibili, in grado di discriminare le esposizioni ambientali da quelle occupazionali anche alle basse concentrazioni.

La scelta di un indicatore di esposizione deve tenere in considerazione diversi fattori, tra cui le possibili vie di assorbimento, la tossicocinetica, la relazione dose-risposta, i meccanismi di tossicità e il tempo di campionamento. L'indicatore ideale dovrebbe essere specifico per l'esposizione di interesse, rivelabile anche a basse concentrazioni, misurabile con tecniche non invasive, non costoso, associato all'esposizione principale e fornire un buon valore predittivo positivo per uno specifico stato di salute. Generalmente, i metaboliti vengono preferiti al più specifico agente tossico non modificato in quanto sono caratterizzati da un'emivita più lunga e possono quindi riflettere l'esposizione dell'intera giornata o dell'intera settimana lavorativa (Lauwerys, 1984).

Il monitoraggio biologico non si avvale solo degli indicatori di esposizione ma anche degli indicatori di effetto, definiti come "alterazioni biochimiche, morfologiche e funzionali che indicano un ampio spettro di risposte biochimiche: da semplici adattamenti fisiologici a patologie ben definite e a malattie conclamate" (IARC 1983). L'uso più appropriato degli indicatori di effetto è una stima di effetti a lungo termine, allo scopo di individuare eventuali interventi di prevenzione primaria (Mutti, 1995). Questo è possibile solo se gli effetti sono reversibili. La diminuzione dei livelli di esposizione e la crescente complessità delle miscele degli inquinanti che caratterizzano molti ambienti lavorativi e non, insieme all'importanza della prevenzione primaria, hanno spinto i ricercatori ad impegnarsi nello sviluppo di quello che è stato definito "monitoraggio degli effetti biologici" (Mutti, 1999).

Il monitoraggio degli effetti biologici consiste nella valutazione di modificazioni biochimiche o funzionali associate a particolari condizioni espositive, come strumento complementare per una corretta stima del rischio, soprattutto in quei casi in cui non siano conosciute (o non esistano) relazioni dose-effetto e dose-risposta. In queste condizioni, l'uso dei soli indicatori di esposizione o di dose (monitoraggio ambientale o biologico) risultano insufficienti per stimare il rischio di effetti a lungo termine, che possono essere almeno sospettati caratterizzando le condizioni che precedono la malattia conclamata (De Palma *et al.*, 2004).

L'identificazione di un indicatore, sia esso di esposizione o di effetto, passa necessariamente attraverso la conoscenza della biotrasformazione dell'agente tossico d'interesse e dei suoi meccanismi di tossicità. Qualora si studino agenti cancerogeni o

genotossici, l'approfondimento del processo multi-stadio e multi-funzionale che dall'esposizione porta alla comparsa della malattia, attraverso l'accumulo di dose interna e biologicamente efficace, lo sviluppo di effetti biologici precoci, le alterazioni funzionali o strutturali, fino all'insorgenza della patologia, è di fondamentale importanza per la comprensione dei meccanismi che portano in un caso alla cancerogenesi e nell'altro agli effetti genotossici.

Ognuno di questi passaggi può essere influenzato da fattori di variabilità interindividuale. I fattori di variabilità interindividuale geneticamente determinati comprendono i polimorfismi genetici degli enzimi della biotrasformazione e dei sistemi enzimatici preposti alla riparazione del danno al DNA. I primi possono modificare la suscettibilità individuale ai cancerogeni chimici attraverso la modulazione delle capacità di bioattivazione metabolica e di detossificazione individuali; i polimorfismi degli enzimi della riparazione possono influenzare la stabilizzazione delle lesioni al DNA indotte dagli agenti cancerogeni e le conseguenti mutazioni, che peraltro possono coinvolgere siti critici o non critici di geni più o meno importanti nel controllo della proliferazione cellulare, dell'apoptosi e di altre funzioni cellulari essenziali.

#### 1.4 Stress ossidativo

Numerosi studi *in vitro* e *in vivo* associano la cancerogenesi allo stress ossidativo, sia in relazione ad esposizioni occupazionali che ad altri fattori [Bartsch, 1996; Evans *et al.*, 2004; Storz, 2005]. Lo stress ossidativo viene definito come uno squilibrio fra la produzione di radicali liberi e la capacità di difesa di un organismo, a favore della prima. La persistenza nel tempo di questo sbilanciamento a favore delle sostanze ossidanti, come le specie reattive dell'ossigeno (*Reactive Oxygen Species*, ROS) provoca alterazioni biochimiche o funzionali, che sono state associate con la patogenesi ed il peggioramento di svariate malattie tra cui il cancro, l'infarto, i disturbi cardiaci, le malattie cronico-degenerative e l'invecchiamento precoce.

I principali bersagli macromolecolari delle specie reattive, in particolare dei ROS, sono tre: gli acidi nucleici, i lipidi e le proteine. Le modificazioni di questi *targets* e la loro successiva degradazione enzimatica e non-enzimatica portano alla formazione di numerosi prodotti: basi ossidate provenienti dal DNA e dall'RNA, aldeidi da processi di perossidazione lipidica, amminoacidi ossidati dalle proteine.

Il danno ossidativo agli acidi nucleici, e in particolare al DNA, è considerato il più importante per l'insorgenza di malattie correlate con l'età e il cancro. Infatti, è noto da tempo che l'ossidazione delle basi del DNA porta a mutazioni nell'accoppiamento fra le basi. Tra le basi del DNA e dell'RNA, la guanina è quella che viene più facilmente attaccata dal radicale idrossile, in particolare in posizione 8. La guanina ossidata, determinata nei linfociti di sangue periferico come 8-idrossi-2'deossiguanosina (8-oxo-dG), è senza dubbio l'indicatore di danno ossidativo al DNA più studiato. Un aumento dei livelli di guanina ossidata è stato messo in relazione con esposizioni a radiazioni (Zhang *et al.*, 2004), ad agenti ossidanti come il perossido d'idrogeno (Wolf *et al.*, 2002), e con un aumentato rischio di patologie tumorali (Kasai, 1997). I valori di 8-oxo-dG nei linfociti sarebbero indicativi del danno ossidativo subito dal DNA che non è stato riparato dai diversi meccanismi di riparazione esistenti (BER, NER, MMR, ecc). Questo stesso indicatore può essere determinato anche nelle urine, ma in questa matrice assume un significato diverso, in quanto rappresenta la quota di danno subito dal DNA e riparato solo da quei meccanismi che portano alla formazione di 8-oxo-dG come prodotto di eliminazione, in particolare dalle endonucleasi. Occorre però sottolineare che i risultati ottenuti determinando solo questa forma ossidata della guanina nelle urine sono contrastanti fra loro (Slupphaug *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2004; Pilger *et al.*, 2006).

Il danno ossidativo ai lipidi, in particolare agli acidi grassi insaturi dei fosfolipidi di membrana, ad opera dei ROS innesca una serie di reazioni a catena che hanno come prodotti terminali diverse classi di composti (de Zwart *et al.*, 1999), tra cui alcani, alcheni, aldeidi sature ed  $\alpha,\beta$ -insature e loro addotti alle macromolecole. Tra i prodotti di perossidazione lipidica, la malondialdeide (MDA) è quella più ampiamente utilizzata per studi sia *in vitro* che *in vivo*. Per la sua determinazione esistono sistemi di rivelazione spettrofotometrica e fluorimetrica che, previa derivatizzazione con acido tiobarbiturico (TBA), ne permettono l'analisi quantitativa senza che siano necessarie complesse procedure di pretrattamento del campione. Il saggio con il TBA presenta però due principali svantaggi: (i) l'elevata temperatura utilizzata durante il processo di derivatizzazione genera artefatti; (ii) nei campioni biologici esistono diversi composti esogeni ed endogeni che possono reagire con il TBA generando prodotti che, assorbendo alla stessa lunghezza d'onda, portano a una sovrastima del contenuto di MDA (Davey *et al.*, 2005).

Il danno ossidativo alle proteine può portare a una loro modificazione e alla conseguente attivazione dei meccanismi di degradazione proteolitica delle stesse come

forma di difesa dell'organismo o della cellula (Stark, 2005). I principali amminoacidi, bersagli delle specie reattive, sono la tirosina e la fenilalanina. Il destino delle loro forme ossidate o nitrosate però è ancora oggetto di studio.

La determinazione degli indicatori di danno ossidativo nei fluidi biologici e la loro correlazione con l'esposizione a tossici industriali è attualmente sfida e materia di studio per i ricercatori. La complessità nell'affrontare questo argomento dipende da diversi fattori: (i) i prodotti che si ottengono dopo attacco dei radicali liberi e dei ROS sono numerosi e sono spesso presenti a basse concentrazioni; (ii) generalmente questi indicatori sono di natura sistemica, riflettono un generico stato di stress ossidativo e non sono specifici dell'esposizione, anche se possono dipendere da essa; (iii) da un'unica molecola bersaglio possono derivare più indicatori a seconda dell'esistenza e dell'attivazione di differenti meccanismi di riparo; (iv) in un primo stadio dell'esposizione e dell'insorgenza della malattia lo stato di stress ossidativo è un meccanismo dinamico e reversibile; (v) la matrice nella quale questi prodotti vengono determinati (sangue o urina) spesso non proviene dall'organo bersaglio ma ne è solo un surrogato (Cooke *et al.*, 2003; Chevion *et al.*, 2000; Davies *et al.*, 1999; Dalle-Donne *et al.*, 2005).

### 1.5 Il condensato dell'aria espirata

La principale via di assorbimento degli agenti chimici ambientali ed occupazionali è quella inalatoria e il principale organo bersaglio è costituito dal polmone. E' per questo motivo che negli ultimi anni la comunità scientifica ha mostrato interesse per nuove matrici di chiara origine polmonare, come il condensato dell'aria espirata (CAE).

Il CAE rappresenta una nuova metodica non invasiva che permette di monitorare la flogosi e lo stress ossidativo a livello del tratto respiratorio nel corso di patologie polmonari. La metodica si caratterizza per la semplicità dell'esecuzione e per la totale mancanza di invasività, caratteristiche che lo rendono ripetibile a breve distanza di tempo, applicabile a bambini ed a pazienti con gravi patologie polmonari, per i quali non sono attuabili metodiche invasive (Kharitonov *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2003).

Proteine, metaboliti, mediatori e tutte le sostanze non volatili presenti nel fluido che riveste le vie aeree possono essere veicolati in forma aerosolica nell'aria espirata (Beker *et al.*, 1997; Scheidler *et al.*, 1993). L'aria presente nell'apparato respiratorio ad una temperatura di circa 37°C è satura di vapore acqueo, indipendentemente dalla

temperatura e dall'umidità dell'aria inspirata. Il vapore acqueo presente nell'aria espirata, a contatto con una superficie a bassa temperatura, condensa passando alla fase liquida; sfruttando questo fenomeno fisico è possibile raccogliere le sostanze presenti nell'aria espirata. E' per questo motivo che si considera il CAE un liquido biologico rappresentativo del fluido di rivestimento broncoalveolare.

Ai soggetti che si sottopongono alla raccolta del CAE è chiesto di respirare normalmente per 10-15 minuti attraverso un boccaglio monouso dotato di valvola unidirezionale, connesso tramite un tubo in polietilene direttamente alla provetta in cui si forma il condensato posta nel sistema elettrico refrigerante.

### 1.5.1 Indicatori biologici determinabili nel condensato dell'aria esalata

Nel CAE sono state rilevate molecole di modeste dimensioni quali perossido di idrogeno e molecole di dimensioni maggiori quali leucotrieni, prostaglandine, citochine (IL-1, TNF), isoprostani, *markers* tumorali e piccole quantità di DNA. Come emerge da autorevoli rassegne sull'argomento (Kharitonov *et al.*, 2002), sono numerosi gli indicatori che possono essere valutate nel CAE:

1. Perossido d'idrogeno o acqua ossigenata ( $H_2O_2$ ): l'attivazione di cellule infiammatorie, inclusi neutrofili, macrofagi ed eosinofili, determina un'aumentata produzione di  $O_2^-$  che porta alla formazione di  $H_2O_2$  attraverso reazione di dismutazione spontanea o catalizzata da enzimi. L' $H_2O_2$  è meno reattivo rispetto ad altre specie reattive dell'ossigeno ed ha un'emi-vita sufficientemente lunga per attraversare le membrane biologiche ed entrare in altri compartimenti. Poiché è solubile, l' $H_2O_2$  prodotto nel polmone si riequilibra con il vapore acqueo di cui sono saturate le vie aeree. Pertanto, l' $H_2O_2$  esalato può essere interpretato come indice biologico di stress ossidativo polmonare.
2. Eicosanoidi: sono potenti mediatori dell'infiammazione responsabili della vasodilatazione/vasocostrizione, della tosse, del reclutamento di cellule infiammatorie. Essi derivano dall'acido arachidonico ed includono prostaglandine, trombossani, isoprostani e leucotrieni.
  - a. Prostanoidi: includono sia le prostaglandine che i trombossani, composti che si formano grazie all'azione delle ciclo-ossigenasi (COX-2) sul substrato di acido arachidonico.

- b. Isoprostani: sono una nuova classe di prostanoidi che si formano dalla perossidazione lipidica dell'acido arachidonico catalizzata dai radicali liberi. Essi sono inizialmente esterificati nei fosfolipidi di membrana dai quali sono poi separati da una fosfolipasi A<sub>2</sub>, circolano nel plasma e sono escreti nelle urine; possono essere rilevati anche nel CAE e nel liquido di lavaggio broncoalveolare. Il più importante isoprostano nell'uomo è l'8-epi-PGF 2 $\alpha$ , meglio conosciuto come 8-isoprostano. Diversi autori hanno riportato un incremento nel CAE dei livelli 8-isoprostano nei fumatori, nei soggetti affetti da broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO) e nel corso di altre patologie respiratorie quali la fibrosi cistica e l'asma; in quest'ultima si è notata tra l'altro anche una correlazione tra grado di severità ed i livelli di 8-isoprostano (Nowak *et al.*, 1999; Montuschi *et al.*, 1999).
    - c. Leucotrieni (LT): si tratta di una famiglia di mediatori lipidici derivati dall'acido arachidonico attraverso la via della 5-lipo-ossigenasi; sono mediatori proinfiammatori e potenti broncocostrittori. LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub> sono generati prevalentemente dalle mast-cellule e dagli eosinofili e sono in grado di indurre contrazione della muscolatura liscia delle vie aeree, causare essudazione di plasma, stimolare la secrezione mucosa; LTB<sub>4</sub> è invece dotato di una potente attività chemiotattica nei confronti dei neutrofili.
3. Prodotti di perossidazione lipidica: tra i prodotti di perossidazione lipidica le aldeidi sono senza dubbio la classe più studiata. Il metodo più semplice, ma poco specifico, per determinarle consiste nel far reagire il loro gruppo funzionale (il gruppo carbonilico) con l'acido tiobarbiturico. Il metodo è noto come saggio dei TBARS (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*). La specificità del test colorimetrico o fluorimetrico può essere significativamente aumentata se si utilizza la cromatografia liquida con rivelazione fluorimetrica per la determinazione di aldeidi specifiche o di interesse biologico, principalmente la MDA (Lärstad *et al.*, 2002). Aumentati livelli di MDA si riscontrano nel CAE di soggetti fumatori o affetti da patologie polmonari quali l'asma e la BPCO; la MDA è determinabile anche nel CAE di soggetti sani.
4. Proteine e citochine: l'identificazione e la misurazione di proteine nel CAE è ancora controversa. È stato riportato che la quantità di proteine nel CAE di 8 individui sani era compresa tra 4  $\mu$ g e 1,4 mg; queste proteine proverrebbero in parte dal tratto rino-oro-faringeo ed in parte dalla porzione più bassa delle vie aeree (Scheidler *et*

- al.*, 1993). Gli stessi autori riportano anche la presenza nel CAE di citochine, quali IL-1b, IL-6, TNF- $\alpha$ .
5. Nitrati, Nitriti, S-nitrosotoli e nitrotirosine: l'ossido d'azoto (NO) reagisce con il superossido producendo perossinitriti, oppure può indurre modificazioni covalenti in numerose molecole biologiche contenenti gruppi tiolici, come cisteina e glutazione, per formare S-nitrosotoli, quantificabili nel CAE (Lärstad *et al.*, 2005). L'equilibrio tra nitriti/nitrati, S-nitrosotoli e nitrotirosina nel fluido di rivestimento dell'epitelio polmonare, rappresentato dal CAE, fornisce un'idea sulla sintesi di NO e sul suo ruolo nello stress ossidativo e nella flogosi delle vie aeree.
  6. Ammoniaca (NH<sub>3</sub>): è un prodotto dell'idrolisi dell'urea ed è un passaggio chiave nel ciclo dell'NO. Nel tratto respiratorio NH<sub>3</sub> è in grado di neutralizzare i vapori acidi inalati ed è in grado di regolare l'attività della nitrossido-sintetasi. NH<sub>3</sub> è stata determinata nel CAE di soggetti sani (Dwyer *et al.*, 2004).

#### 1.5.2 Sistemi per la raccolta del condensato dell'aria espirata

La raccolta del CAE consiste nel far respirare il soggetto normalmente e spontaneamente, con o senza clip nasale, attraverso un boccaglio monouso dotato di valvola unidirezionale, connesso tramite un tubo in polietilene direttamente alla provetta in cui si forma il condensato, posta nel sistema refrigerante. Diversi sono gli strumenti che permettono la raccolta del CAE. Alcuni sono dispositivi fissi ed utilizzano ingombranti sistemi di raffreddamento, altri sono mobili e possono richiedere o no l'ausilio della corrente elettrica. Al momento, le condizioni e le procedure di raccolta del CAE non sono state standardizzate o codificate. I risultati che si ottengono dalle misure degli indicatori contenuti nel CAE possono essere influenzati da diversi fattori tra cui il sistema di raccolta utilizzato, la temperatura raggiunta per ottenere la condensazione e l'efficienza del processo di condensazione, rendendo difficile il confronto fra dati ottenuti da diversi studi.

E' per questo motivo che il Laboratorio di Tossicologia Industriale dell'Università di Parma ha sviluppato un nuovo condensatore chiamato TURBO-DECCS (*Trasportable Unit for Research Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection Systems*) che, sfruttando l'effetto Peltier, è in grado di condensare a una temperatura fissa, con un margine di tolleranza di  $\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Con questo strumento è possibile effettuare la raccolta del CAE in condizioni di temperatura

controllata, riducendo le variabili che possono influenzare la composizione del CAE. Inoltre, trattandosi di un dispositivo trasportabile, aumenta il numero delle possibili applicazioni di questa nuova metodologia.

### 1.5.3 Applicazioni del condensato dell'aria espirata in campo clinico

Da circa un decennio, il CAE viene raccolto in soggetti sani e in soggetti con patologie polmonari, come asma e BPCO, per determinare alterazioni delle concentrazioni di indicatori di stress ossidativo, di parametri legati agli equilibri acido-base del polmone, come l'ammoniaca e il pH, o di alcuni mediatori dell'infiammazione, come le interleuchine, citochine ed eicosanoidi, a fini diagnostici (Hunt, 2002; Antczak *et al.*, 2002; Effros *et al.*, 2005).

In questi stessi anni, il Laboratorio di Tossicologia Industriale dell'Università di Parma ha dato il proprio contributo allo studio del CAE, per valutare l'utilizzo di questa nuova matrice biologica non solo in campo clinico ma anche in campo occupazionale.

Lo sviluppo di un metodo analitico basato sulla LC-MS/MS ha permesso la determinazione di un *pattern* di aldeidi, prodotte dalla perossidazione lipidica, in campioni di CAE di soggetti sani e di pazienti affetti da diverse patologie polmonari. In particolare, è emerso che i livelli di MDA, acroleina ed esanale sono in grado di discriminare i soggetti in base all'abitudine al fumo di tabacco (Andreoli *et al.*, 2003). Nel CAE di bambini sani e di bambini asmatici in fase acuta e dopo terapia con steroidi, è stato osservato un andamento opposto per la MDA ed il glutatione determinato mediante cromatografia liquida con rivelazione fluorimetrica. I livelli di MDA sono risultati più alti nei bambini asmatici in fase acuta rispetto a bambini sani o rispetto ai valori trovati dopo terapia con steroidi, mentre per il glutatione erano più bassi. Inoltre, è stata osservata una correlazione negativa significativa fra i due indicatori (Corradi *et al.*, 2003). In uno studio sulla BPCO, la MDA ha permesso di discriminare fra soggetti sani non fumatori, soggetti sani fumatori e soggetti con BPCO stabile. In questo studio è stata valutata anche la variabilità individuale e l'influenza delle diverse procedure di raccolta sulla concentrazione delle aldeidi (Corradi *et al.*, 2003a).

Essendo una metodologia di semplice esecuzione e assolutamente non invasiva, la raccolta del CAE è stata ampiamente utilizzata in pazienti in età pediatrica, in particolare nello studio delle patologie polmonari, come l'asma allergica e la fibrosi

cistica attraverso la determinazione di ammoniaca e pH (Carraro *et al.*, 2005), e indicatori di infiammazione come LTB4 e IL-8, e pH (Bodini *et al.*, 2005).

Al fine di validare il CAE come matrice di chiara origine polmonare, sono stati effettuati studi che confrontano i livelli di indicatori di perossidazione lipidica determinati sia nel CAE che nel lavaggio broncoalveolare e nell'espettorato indotto, matrici certamente rappresentative dello stato del polmone, ma che prevedono l'impiego di sistemi di raccolta invasivi. Si è ipotizzato che l'assenza di correlazione tra gli indicatori nelle diverse matrici, osservata per esempio nel caso delle aldeidi, possa dipendere dalla diversa volatilità degli analiti e dai diversi meccanismi che portano alla formazione del CAE (Corradi *et al.*, 2004). Questo risultato evidenzia la necessità di ulteriori studi per approfondire il fenomeno di formazione del CAE ed individuare parametri chimico-fisici utili per la standardizzazione della sua raccolta e la normalizzazione dei risultati ottenuti.

L'utilizzo di un'altra tecnica analitica di riferimento, la spettrometria di massa con una sorgente di plasma ad accoppiamento induttivo (ICP-MS), ha permesso di determinare metalli presenti a livello di tracce ed ultra-tracce nel CAE di soggetti sani e di soggetti professionalmente esposti a metalli pneumotossici, come il cobalto e il tungsteno. Le concentrazioni di questi elementi metallici nel CAE sono risultate significativamente correlate con i livelli di MDA, indicatore di lipoperossidazione lipidica delle membrane polmonari (Goldoni *et al.*, 2004). Questa applicazione pone le basi per possibili sviluppi nell'utilizzo del CAE come matrice per il monitoraggio biologico di soggetti professionalmente esposti ad agenti irritanti e pneumotossici.

## **2. SCOPI DELLA TESI**

L'utilizzo di tecniche altamente sensibili e selettive, come la LC-MS/(MS), ha aperto nuovi sviluppi e prospettive nella ricerca di indicatori biologici di esposizione e di effetto, evidenziando come la specificità biologica e quella analitica possano, a volte, divergere. Parallelamente, la diminuzione delle concentrazioni nelle esposizioni occupazionali e l'aumento degli inquinanti urbani hanno reso sempre più complessa la caratterizzazione dell'esposizione, evidenziando la necessità di nuovi indicatori di esposizione e di effetto sufficientemente sensibili per discriminare le due condizioni. Questi aspetti hanno spinto i ricercatori ad attribuire nuovi significati al monitoraggio biologico e a cercare nuove metodologie e nuove matrici per approfondire i meccanismi d'azione dei tossici e per una corretta stima del rischio.

Gli scopi di questa tesi sono:

- (i) verificare la qualità del dato analitico attraverso il controllo interlaboratorio e l'accuratezza dell'analisi quantitativa, con particolare riferimento alle basse concentrazioni;
- (ii) approfondire le conoscenze sugli indicatori di esposizione e di effetto in soggetti esposti a basse dosi di inquinanti ambientali ed occupazionali;
- (iii) verificare la possibilità di utilizzare il CAE come nuova matrice per il monitoraggio biologico di indicatori di esposizione e di effetto.

## 2.1 La qualità del dato e la validità analitica

La validità analitica si può considerare un pre-requisito affinché un indicatore possa essere correttamente utilizzato per il monitoraggio biologico. Infatti, se la tecnica analitica con cui l'indicatore è stato determinato non è sufficientemente precisa, accurata e sensibile, il risultato che si ottiene dalla misura non è affidabile e l'indicatore stesso perde di significato. Tra i principali problemi che si possono riscontrare nella determinazione quantitativa di indicatori biologici in matrici complesse come urina, sangue e cellule si annoverano: effetti matrice, basse concentrazioni e scarsa stabilità dell'analita, presenza di interferenti, generazione di artefatti, modalità di conservazione e trattamento del campione (Choi *et al.*, 2001).

In questo studio la LC-MS/MS è stata utilizzata come tecnica di riferimento per la determinazione di indicatori di esposizione e di effetto, presenti nei campioni a bassi

livelli di concentrazione, ponendo particolare attenzione ai fattori che possono influenzare l'affidabilità delle misure nello sviluppo dei metodi analitici e l'analisi quantitativa.

Il controllo qualità esterno rappresenta il miglior modo oggi disponibile per verificare la qualità del dato di un singolo laboratorio e per garantire la confrontabilità dei risultati ottenuti da differenti laboratori che effettuano la stessa analisi. Se per gli indicatori biologici tradizionalmente utilizzati nel monitoraggio dell'esposizione a tossici industriali ed ambientali esistono programmi di controllo qualità interlaboratorio e materiali di riferimento certificati, lo stesso non si può dire per i nuovi indicatori che la ricerca in campo tossicologico porta sempre più frequentemente alla ribalta, per esempio metaboliti minori o addotti specifici di tossici industriali. Nell'ambito di un progetto Europeo finalizzato all'approfondimento dei meccanismi di genotossicità dello stirene, è stato messo a punto un controllo qualità interlaboratorio per verificare la confrontabilità dei risultati ottenuti mediante gli unici due metodi analitici oggi disponibili per la determinazione di metaboliti minori dello stirene, gli acidi mercapturici, in campioni di urina di lavoratori esposti (Maestri *et al.*, 1996; Manini *et al.*, 2000). Inoltre, al fine di determinarne le condizioni ideali di conservazione dei campioni prima dell'analisi, nell'ambito di questo confronto è stata studiata la stabilità degli analiti, sottoponendo i campioni di urina a diverse condizioni di conservazione (Allegato 1).

Per migliorare la sensibilità e l'accuratezza di un metodo sviluppato in passato per la determinazione delle aldeidi nel condensato dell'aria espirata (Andreoli *et al.*, 2003), è stato applicato un nuovo metodo di diluizione isotopica denominato *Alternate Isotope-Coded Derivatization Assay*, acronimo AIDA, proposto per la prima volta da Sforza *e coll.* (2005) per la determinazione di zearalenone nelle farine di mais, e concettualmente simile a quello più comunemente utilizzato per le proteine e denominato *Isotope-Coded Affinity Tagging* (ICAT). (Allegato 2)

2.2 Indicatori di esposizione e di effetto in soggetti esposti a basse dosi di inquinanti ambientali ed occupazionali.

La stima del rischio derivante dall'esposizione ad agenti cancerogeni, specie a bassi livelli di esposizione, si deve necessariamente basare su estrapolazioni (da eventi osservati in specie diverse o a livelli di esposizione molto più elevati) oppure sulla

valutazione, contestuale alla misura delle concentrazioni ambientali o biologiche degli agenti chimici in causa, di indicatori di effetto precoce che consentano di predire una malattia conclamata.

Per valutare ed approfondire le relazioni esistenti tra l'esposizione, i fattori di variabilità interindividuale e gli effetti biologici precoci sono stati presi in considerazione il benzene e lo stirene come modelli di esposizione ad agenti chimici. Questi due composti hanno struttura chimica simile e sono entrambi presenti come inquinanti a basse concentrazioni nell'aria urbana; pur essendo entrambi genotossici, essi sono caratterizzati da differenti attività cancerogena. Il benzene è classificato come cancerogeno totipotente e radiomimetico, in grado di agire anche con meccanismi indiretti, di *redox cycling* e stress ossidativo in soggetti carenti di adeguati sistemi di detossificazione; i suoi meccanismi d'azione sono ben noti. Lo stirene, invece, risulta cancerogeno per l'uomo solo in combinazione con altre sostanze, principalmente il butadiene. Esposizioni anche elevate a stirene, come quelle che si realizzano nel comparto dei plastici rinforzati con fibre di vetro, non sembrano comportare un eccesso di rischio di tumore nemmeno in studi dotati di sufficiente potenza statistica. Inoltre, benchè ne siano noti gli effetti, i meccanismi della genotossicità dello stirene devono ancora essere chiariti. Recentemente, è stata formulata una nuova ed interessante ipotesi circa il rischio genotossico derivante dall'esposizione a stirene. 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 (Marczynski *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda l'esposizione a basse dosi di benzene, lo studio condotto nell'ambito di questa tesi ha permesso di dimostrare la validità dell'acido S-fenilmercapturico come indicatore per il monitoraggio biologico dell'esposizione di soggetti esposti a concentrazioni ambientali, evidenziando per la prima volta l'influenza del polimorfismo dell'enzima *GSTM1* sull'escrezione dello stesso acido S-fenilmercapturico. (Allegato 3)

Lo studio sui soggetti professionalmente esposti a stirene ha permesso di verificare un'associazione tra l'esposizione, caratterizzata mediante misurazioni delle concentrazioni ambientali e degli indicatori biologici, ed alterazioni cellulari dei livelli di stress ossidativo, valutati mediante la determinazione di indicatori di effetto di danno ossidativo agli acidi nucleici (Allegato 4) ed interpretati tenendo conto del ruolo di alcuni polimorfismi dei meccanismi di riparazione del DNA (hOgg1).

### 2.3 Il condensato dell'aria espirata

Il condensato dell'aria espirata (CAE) è una matrice biologica ancora relativamente poco esplorata. In campo pneumologico, la sua composizione viene studiata per identificare nuovi indicatori, principalmente di infiammazione e di stress ossidativo, in grado di discriminare soggetti sani da soggetti con patologie polmonari a diversi stadi di gravità. Ancora pochi sono invece gli studi volti ad identificare marcatori biologici di esposizione, di effetto e di suscettibilità utili per monitorare la tossicità polmonare risultante dall'esposizione a composti chimici, come i metalli (Goldoni *et al.*, 2004), contenuti nel fumo di sigaretta e negli ambienti di lavoro (e di vita) inquinati.

Gli studi svolti in questi tre anni hanno permesso di approfondire il comportamento degli indicatori di stress ossidativo in funzione del sistema di raccolta (Allegato 5) e di correlare questi stessi indicatori con l'esposizione professionale a metalli pneumotossici come il cromo (Allegato 6), e a miscele di agenti irritanti, come perossido d'idrogeno, ammoniaca e persolfati nel caso di lavoratori del settore acconciatura (Allegato 7).

### **3. QUALITA' DEL DATO E VALIDITA' ANALITICA**

### 3.1 Affidabilità delle misure e confronto interlaboratorio

È generalmente accettato che l'accuratezza di ogni risultato sperimentale è affetta da un certo grado di incertezza che dipende dal metodo utilizzato per la sua misura e dalla quantità di analita presente nel campione. Infatti, quanto più la concentrazione dell'analita da misurare è bassa tanto maggiore sarà l'incertezza della sua misura. Le caratteristiche del metodo analitico (sensibilità, intervallo di linearità, ripetibilità e selettività) determinano il grado di accuratezza e di affidabilità dei risultati e la scelta di un metodo inadeguato può indurre i ricercatori a trarre conclusioni sbagliate sulla base di risultati non sufficientemente precisi e accurati.

Nella determinazione di nuovi indicatori di esposizione o di effetto è necessario prestare particolare attenzione alla qualità del dato, dal momento che spesso per questi indicatori non esistono standard e materiali di riferimento certificati né circuiti di controllo qualità esterno. In assenza di questi strumenti, soltanto quando due o più metodi indipendenti utilizzati per quantificare gli stessi campioni (o campioni con caratteristiche simili) danno risultati confrontabili, i ricercatori possono ragionevolmente ritenere che i livelli misurati delle concentrazioni degli analiti siano vicini ai valori veri.

Un confronto tra due metodi analitici indipendenti è stato effettuato nel caso della determinazione di alcuni metaboliti minori dello stirene, gli acidi *S*-fenil-idrossietilmercapturici, che rappresentano nell'uomo meno dell'1% dell'escrezione totale dei metaboliti urinari del tossico. Per la determinazione di questi metaboliti sono stati sviluppati due metodi cromatografici che utilizzano sistemi di rivelazione basati su principi fisici indipendenti, la fluorescenza (Maestri *et al.*, 1996) e la spettrometria di massa (Manini *et al.*, 2000).

Lo stirene 7,8-ossido (SO) è un intermedio metabolico dello stirene altamente instabile e presente in natura sotto forma di due enantiomeri, *R*-SO e *S*-SO, la cui detossificazione porta alla formazione di acidi mercapturici mediante attacco del glutatione ed apertura dell'anello epossidico. Questa reazione di sostituzione nucleofila è assistita dagli enzimi appartenenti alla classe delle glutatione-tranferasi e porta alla formazione di quattro diastereoisomeri: (*R,R*)- e (*S,R*)-*N*-acetil-*S*-(1-fenil-2-idrossietil)-*L*-cisteina [(*R,R*)-M1 e (*S,R*)-M1] ed (*R,R*)- e (*S,R*)-*N*-acetil-*S*-(2-fenil-2-idrossietil)-*L*-cisteina [(*R,R*)-M2 e (*S,R*)-M2]. È stato dimostrato che i soggetti appartenenti al genotipo *GSTM1*pos hanno un profilo di escrezione dei quattro diastereoisomeri diverso

da quello dei soggetti con genotipo *GSTM1null* (De Palma *et al.*, 2001). La stereoselettività del metabolismo di SO è di grande interesse in quanto i due enantiomeri hanno differente potenziale mutageno. L'enantiomero *R*-SO risulta più mutageno in studi *in vitro* (Peter *et al.*, 1991) e più pneumo- ed epato-tossico in studi sul topo (Gadberry *et al.*, 1996), mentre l'enantiomero *S*-SO risulta possedere un potenziale genotossico più elevato *in vivo*, sempre da studi sul topo (Sinsheimer *et al.*, 1993).

### 3.1.1 Materiali e Metodi

#### 3.1.1.1 Soggetti

Dieci soggetti professionalmente esposti a diverse concentrazioni di stirene sono stati reclutati su base volontaria e hanno fornito il loro consenso informato allo studio. Lo studio è stato effettuato in conformità con la dichiarazione di Helsinki. Per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 1.

#### 3.1.1.2 Reagenti

Tutti i reagenti commercialmente disponibili così come i solventi per la cromatografia liquida sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. Per la preparazione degli standard e la loro conservazione si rimanda all'Allegato 1.

#### 3.1.1.3 Disegno dello studio

A ciascun soggetto è stato chiesto di raccogliere campioni di urina all'inizio e alla fine turno del lavoro. I campioni sono stati immediatamente suddivisi in più aliquote e congelati. Per verificare le condizioni di conservazione, l'aliquota A è stata scongelata e conservata una settimana a +4°C prima dell'analisi, l'aliquota B è stata sottoposta a quattro cicli di scongelamento-ricongelamento prima dell'analisi, e l'aliquota C è stata conservata in congelatore fino al momento dell'analisi e considerata come aliquota di riferimento. Dopo aver subito le stesse procedure di conservazione e di trattamento, i campioni sono stati analizzati mediante cromatografia liquida con rivelatore fluorimetrico (HPLC-FLD) e LC-MS/MS.

### 3.1.1.4 Monitoraggio biologico

#### *Determinazione degli acidi mercapturici dello stirene urinari mediante HPLC-FLD*

I quattro diastereoisomeri degli acidi mercapturici dello stirene, chiamati (R,R)- e (S,R)-N-acetil-S-(1-fenil-2-idrossietil)-L-cisteina [(R,R)-M1 e (S,R)-M1] e (R,R)- e (S,R)-N-acetil-S-(2-fenil-2-idrossietil)-L-cisteina [(R,R)-M2 e (S,R)-M2] sono stati determinati in campioni di urina di fine turno di soggetti professionalmente esposti a stirene mediante HPLC-FLD (Maestri *et al.*, 1996). Brevemente, dopo filtrazione ed acidificazione 100 µl di urina sono stati iniettati nel sistema cromatografico (pompa Waters modello 600E, Waters, Milford, MA, USA) dotato di precolonna Waters Resolve C<sub>18</sub> ed eluiti con una fase mobile composta da acqua acidificata a pH=3,0 per acido fosforico e metanolo (82:18, v/v). La frazione compresa fra 0,7 e 1,15 minuti è stata raccolta, addizionata con una soluzione contenente 42,000 U/ml di enzima acilasi I in un tampone fosfato (0,5 M e pH=7,0). Il campione è stato conservato a 37°C per 16 ore e, dopo centrifugazione per eliminare le proteine, è stato addizionato con il reagente fluorescente (o-ftalaldeide/mercaptoetanololo). Dopo cinque minuti il campione è stato iniettato nel sistema cromatografico. La separazione è stata effettuata utilizzando una colonna Hypersil C18 (250 x 4,6 mm i.d., 3µm) termostata a 35°C e in gradiente di eluizione, miscelando diverse proporzioni di acido acetico (0,05 M, pH=6,5) e metanolo. Il rivelatore fluorimetrico, modello 820-FP (Jasco, Tokio, Japan) è stato impostato a 330 nm per la lunghezza di eccitazione e a 440 nm per quella di emissione. Il limite di rivelazione del metodo è di 8 µg/l per ciascun diastereoisomero. Le concentrazioni dei metaboliti determinate nelle urine sono state espresse in funzione della creatinina, misurata secondo il metodo di Jaffe.

#### *Determinazione degli acidi mercapturici dello stirene urinari mediante LC-MS/MS*

È stato sviluppato un metodo per la separazione dei quattro diastereoisomeri degli acidi mercapturici dello stirene: (R,R)-M1, (S,R)-M1, (R,R)-M2 e (S,R)-M2. La loro determinazione è stata effettuata mediante LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa PE-Sciex a triplo quadrupolo modello API 365 (Sciex, Thornhill, Canada). La separazione dei quattro metaboliti è stata ottenuta utilizzando una colonna Supelcosil C18-DB (75 x 3.0 mm i.d., 3 µm) utilizzando fasi mobili costituite da acido formico (20 mM) e metanolo in gradiente di eluizione. Prima dell'analisi, il campione di urina è

stato centrifugato e addizionato di acido formico. La ionizzazione è stata ottenuta mediante sorgente *Electrospray* (ESI) in modalità ioni negativi. La rivelazione in MS/MS è stata condotta in modalità *Selected Reaction Monitoring* (SRM), monitorando la transizione  $m/z$  282→153 (energia di collisione, 35 eV) caratteristica di tutti e quattro i composti e la transizione  $m/z$  282→123 (35 eV) caratteristica del solo regioisomero M1. Il metodo sviluppato è stato validato mediante lo studio dell'intervallo di linearità, la determinazione dei limiti di rivelazione (compresi fra 0,7 e 1,0  $\mu\text{g/l}$ ) e della precisione (intra-day e inter-day <7% alla concentrazione di 50  $\mu\text{g/l}$ ) (Manini *et al.*, 2000). Le concentrazioni dei metaboliti sono state espresse in funzione della creatinina, determinata secondo il metodo di Jaffe.

### 3.1.2 Risultati e Discussione

Dal momento che la concentrazione degli acidi *S*-fenil-idrossietilmecapturici è risultata influenzata dalla modalità di conservazione, per aumentare la numerosità dei campioni nel confronto tra i due metodi analitici si è deciso di considerare tutte e sessanta le determinazioni [10 soggetti, campionati in 2 tempi diversi (inizio e fine turno), sottoposti a 3 condizioni di conservazione differenti]. Due diversi tipi di approccio statistico sono stati utilizzati per confrontare i risultati ottenuti con i due differenti metodi analitici. Il primo approccio ha previsto il calcolo dell'equazione della retta e il coefficiente di Pearson mediante l'analisi della regressione lineare, riportando i dati su un grafico X-Y; il secondo ha utilizzato il test di Bland-Altman, test che confronta i residui delle determinazioni effettuate con i due metodi con il valore medio di ciascuna coppia di misure. I risultati del controllo interlaboratorio (riportati nell'Allegato 1) evidenziano che i due metodi forniscono valori confrontabili. Questa conclusione si basa principalmente su tre aspetti: (i) i coefficienti di correlazione delle regressioni lineari sono sempre maggiori di 0,90 sia per i singoli diastereoisomeri sia per la somma di tutti gli acidi mercapturici, confermando così l'esistenza di una correlazione altamente significativa fra le due serie di dati; (ii) i valori della pendenza delle regressioni lineari sono tutti compresi fra 0,90 e 1,01, escludendo una costante sovra- o sotto-stima di un metodo rispetto all'altro; (iii) il valore dell'intercetta della retta sull'asse delle Y è trascurabile, indicando che i campioni per i quali è stata trovata una bassa concentrazione di acidi mercapturici mediante LC-MS/MS dovrebbero contenere livelli bassi di metaboliti dello stirene anche se dosati con il metodo HLPC-FLD.

In modo inatteso, le diverse condizioni di conservazione non evidenziano un calo delle concentrazioni degli analiti ma al contrario si riscontra una chiara tendenza all'aumento se i campioni sono conservati a +4°C, in particolare per tre diastereoisomeri, (*R,R*)-M1, (*S,R*)-M2 e (*R,R*)-M2. Per evitare errori pre-analitici, i campioni raccolti per il monitoraggio biologico o per scopi di ricerca devono essere congelati al più presto e conservati tali fino al momento dell'analisi.

Per la prima volta è stato effettuato un confronto fra le due tecniche analitiche, attualmente disponibili per la determinazione degli acidi mercapturici dello stirene mediante diversi sistemi di rivelazione, per garantire la confrontabilità dei risultati finora pubblicati in letteratura. Questo studio ha inoltre evidenziato come la LC-MS/MS sia da preferirsi rispetto ad altre tecniche analitiche nella determinazione di analiti in matrici complesse come l'urina. Infatti, essa permette una minor manipolazione del campione, riducendo i tempi di preparazione e di analisi; è generalmente più sensibile e selettiva e, in questo specifico caso, non dovendo derivatizzare l'analita, permette la separazione di tutti e quattro i diastereoisomeri.

### 3.2 Analisi quantitativa

L'analisi quantitativa rappresenta uno dei principali obiettivi della spettrometria di massa. A dispetto dell'apparente semplicità nell'ottenere risultati quantitativi, rispetto ad altre tecniche analitiche, la qualità delle determinazioni dipende da diversi fattori: (i) la concentrazione degli analiti di interesse; (ii) la disponibilità di standard commercialmente disponibili ed adeguati standard interni, in particolare quelli marcati isotopicamente; (iii) la disponibilità di campioni di controllo e materiali certificati di riferimento; (iv) la disponibilità di programmi di controllo qualità esterni. Inoltre, recenti studi hanno evidenziato chiaramente che la LC-MS/MS risente dell'effetto matrice. E' stato ipotizzato che esista una competizione tra i componenti della matrice e gli analiti di interesse per la ionizzazione e che l'efficienza di formazione dello ione-analita possa essere favorita o sfavorita a seconda dell'intorno nel quale la ionizzazione avviene. La soppressione del segnale può essere causata da componenti della matrice polari e non trattenuti dalla cromatografia, dal sovra-caricamento della colonna, o dalla presenza di soluti non volatili (Choi *et al.*, 2001). Sfortunatamente sia l'incremento che la depressione del segnale non sono fenomeni prevedibili e sono dipendenti sia dal tipo di analita che dalla sua concentrazione. Come conseguenza, l'effetto matrice può portare a una diminuzione di precisione e accuratezza, particolarmente a basse concentrazioni, rendendo l'analisi quantitativa difficoltosa o, a volte, addirittura impossibile.

Da qualche anno, aldeidi di rilevanza biologica come la MDA e il 4-idrossinonenale (4-HNE) sono state quantificate in campioni di CAE sia di soggetti con patologie polmonari che in soggetti professionalmente esposti ad agenti tossici e ossidanti, mediante LC-MS/MS (Andreoli *et al.*, 2003). Lunghe sedute analitiche, che prevedevano la determinazione di più di 100 campioni, hanno però evidenziato un'inspiegabile aumento nel tempo della risposta dello spettrometro di massa in termini di intensità del segnale degli standard, rendendo problematica l'analisi quantitativa delle aldeidi di interesse. Dal momento che per la MDA non è commercialmente disponibile uno standard interno marcato isotopicamente, il problema della standardizzazione è stato affrontato utilizzando un approccio quantitativo che non si basa sulla costruzione di una curva di calibrazione, sia essa esterna o interna, ma che prevede l'applicazione di un nuovo metodo di diluizione isotopica, chiamato *Alternate Isotope-Coded Derivatization Assay* (AIDA).

### 3.2.1 Materiali e Metodi

#### 3.2.1.1 Soggetti

Dieci soggetti sani sono stati reclutati su base volontaria e hanno fornito il loro consenso informato allo studio. Lo studio è stato effettuato in conformità con la dichiarazione di Helsinki. Per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 2.

#### 3.2.1.2 Reagenti

Tutti i reagenti commercialmente disponibili così come i solventi per la cromatografia liquida sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. Lo standard di [D<sub>3</sub>]-2,4-dinitrofenilidrazina (d<sub>3</sub>-DNPH) è stato ottenuto per sintesi come descritto da Zurek e Karst (2000), e purificato utilizzando una cromatografia veloce su colonna di vetro impaccata con gel di silice ed eluendo con una miscela di acetato di etile/esano (1/9, v/v). La purezza del composto è stata verificata con cromatografia su strato sottile. Per la preparazione degli standard e la loro conservazione si rimanda all'Allegato 2.

#### 3.2.1.3 Modalità di raccolta del condensato dell'aria espirata e preparazione del campione

I campioni di condensato dell'aria espirata (CAE) sono stati raccolti utilizzando un sistema di condensazione chiamato TURBO-DECCS (*Transportable Unit for Research Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection Systems*; Italchill, Parma, Italia). A ciascun soggetto è stato chiesto di respirare a volume corrente per 15 minuti attraverso un boccaglio monouso dotato di valvola unidirezionale, connesso tramite un tubo in polietilene direttamente alla provetta in cui si forma il condensato posta nel sistema elettrico refrigerante, impostato ad una temperatura di -5 °C. I campioni sono stati immediatamente suddivisi in più aliquote e congelati a -20°C. Al momento dell'analisi, i campioni sono stati divisi in due aliquote, derivatizzate una con un ugual volume di dinitrofenilidrazina (DNPH, 12,6mM in acetonitrile e acido formico) e l'altra con d<sub>3</sub>-dinitrofenilidrazina (d<sub>3</sub>-DNPH, 12,6mM in acetonitrile e acido formico). A parte sono state preparate due soluzioni contenenti la stessa concentrazione di MDA (10 nM) e 4-HNE (2,5 nM), una derivatizzata con DNPH e l'altra con d<sub>3</sub>-

DNPH, aggiunti in ugual volume. Dopo due ore dalla prima derivatizzazione il campione derivatizzato con DNPH è stato addizionato della miscela di standard derivatizzata con d<sub>3</sub>-DNPH e viceversa (Figura 1).

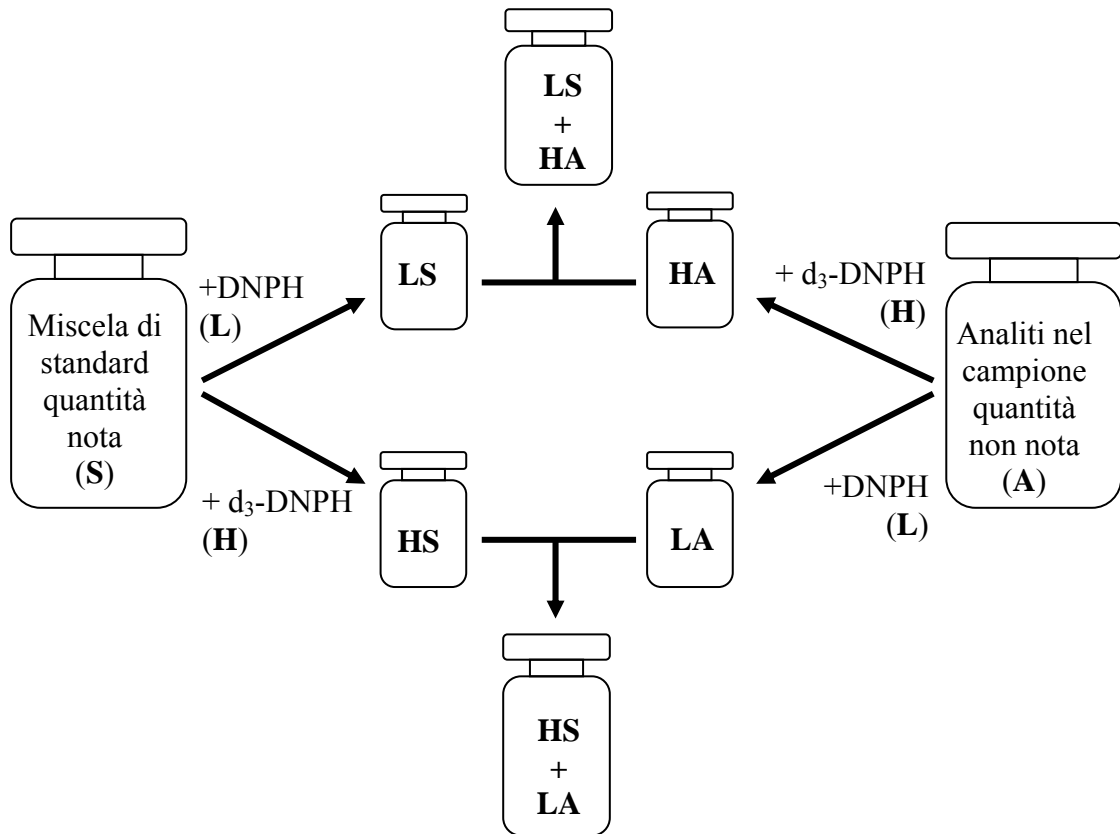


Figura 1. Procedura per l'applicazione del metodo dell'AIDA. Il metodo si basa sulla derivatizzazione alternata di analiti con reagenti che sono disponibili in due forme isotopicamente pure definite "light" (L, DNPH) e "heavy" (H, d<sub>3</sub>-DNPH), utilizzando la miscela di standards derivatizzati con la forma "light" per la quantificazione degli analiti derivatizzati con la forma "heavy" e vice versa. Legenda LS, standard "light"; HS, standard "heavy"; HA, analita "heavy"; LA, analita "light".

#### 3.2.1.4 Determinazione delle aldeidi in campioni di condensato dell'aria espirata

La determinazione delle aldeidi nel CAE è stata effettuata mediante LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa PE-Sciex a triplo quadrupolo modello API 365

dotato di una sorgente *TurboIonspray*. La separazione delle aldeidi derivatizzate è stata ottenuta utilizzando una colonna Supelcosil C18-DB (75 x 3.0 mm i.d., 3 µm) e con una fase mobile costituita da acido acetico (20 mM) e metanolo/acetonitrile (95/5, v/v) in gradiente di eluizione. La ionizzazione è stata ottenuta in modalità ioni positivi per MDA e in modalità ioni negativi per 4-HNE. La rivelazione in MS/MS è stata condotta in modalità SRM, monitorando le transizioni caratteristiche di ciascun composto:  $m/z$  235→159 e  $m/z$  238→162 (energia di collisione, 21 eV) rispettivamente per DNPH-MDA e d<sub>3</sub>-DNPH-MDA, e  $m/z$  335→167 e  $m/z$  338→170 (20 eV) rispettivamente per DNPH-4-HNE e d<sub>3</sub>-DNPH-4-HNE.

### 3.2.2 Risultati e Discussione

Il CAE di dieci soggetti è stato analizzato mediante LC-MS/MS monitorando simultaneamente il segnale degli idrazoni “*light*” e “*heavy*”. In questo modo, per ciascun campione sono state effettuate due quantificazioni indipendenti dalle quali è stato possibile calcolare il fattore di risposta relativo direttamente nel campione analizzato, senza la necessità di effettuare una curva di calibrazione.

Dal momento che l’acqua utilizzata per le soluzioni presenta un contenuto di aldeidi non trascurabile e che fino ad ora non è stato trovato un CAE privo di MDA e 4-HNE da utilizzare come bianco, le formule precedentemente proposte da Sforza *et al.* (2005) sono state modificate per tenere conto del contenuto di analista del bianco. Infatti i calcoli utilizzati dal metodo dell’AIDA, si basano su una retta passante per due punti, uno dei quali è l’origine e l’altro corrisponde alla concentrazione dello standard aggiunto. Se il bianco non è trascurabile, come in questo caso, l’area nominale dello standard interno è la somma dell’area dello standard più il contenuto del bianco. Poiché la retta è forzata per l’origine, la pendenza della retta risulta aumentata, portando a una concentrazione inesatta e sottostimata.

Al fine di verificare l’accuratezza e la precisione dei risultati, per ogni campione sono state effettuate 3 derivatizzazioni indipendenti per ciascun derivatizzante (DNPH e d<sub>3</sub>-DNPH), ed ogni campione è stato iniettato in triplicato a seconda del volume disponibile, per un totale di 18 iniezioni. Risultati confrontabili, con differenze minori dell’1%, sono stati ottenuti calcolando il risultato utilizzando solo due derivatizzazioni indipendenti e due iniezioni per derivatizzazione (8 iniezioni).

Inoltre, un campione di *pool* di CAE precedentemente quantificato mediante il metodo della calibrazione esterna, è stato addizionato di quattro differenti livelli di concentrazione di MDA (2, 4, 10, 20 nM) e di 4-HNE (0,5, 1, 2,5 e 5 nM) per verificare l'accuratezza del metodo. Sono stati ottenuti risultati accettabili applicando il metodo dell'AIDA dopo sottrazione del bianco (accuratezza compresa nell'intervallo 98-108% per la MDA e 93-114% per 4-HNE).

Per verificare la validità di questo approccio, gli stessi dieci campioni di CAE sono stati quantificati utilizzando il metodo della calibrazione esterna. I risultati ottenuti con i due diversi metodi, AIDA e calibrazione esterna, sono confrontabili con deviazioni minori del 10% per la MDA e minori del 20% per il 4-HNE.

L'utilizzo del metodo AIDA ha permesso di migliorare l'accuratezza della quantificazione della MDA e del 4-HNE, compensando sia gli effetti matrice che notoriamente interessano l'analisi di campioni biologici mediante LC-MS, che le variazioni della risposta strumentale da noi osservate col precedente metodo, in particolare nel corso di sessioni analitiche della durata di diversi giorni. Inoltre, poiché l'applicazione del metodo AIDA non richiede di iniettare i livelli della calibrazione a concentrazioni più elevate di standard, si è osservata una diminuzione del fenomeno della contaminazione della sorgente ionica.

Uno degli svantaggi del metodo AIDA è rappresentato dall'elevato numero di derivatizzazioni ed iniezioni necessarie per ciascun campione. La verifica del fatto che, anche riducendo notevolmente il numero delle iniezioni necessarie (da 18 a 8) l'accuratezza e la precisione dei risultati non cambiano, rende possibile l'utilizzo di questo metodo anche per l'analisi di numerosi campioni. Da ultimo, le modifiche apportate alle formule per il calcolo del fattore di risposta permettono di applicare l'AIDA anche per la determinazione di analiti sempre presenti in matrice, per i quali non è possibile trovare un campione bianco.

**4. INDICATORI DI ESPOSIZIONE E DI EFFETTO  
IN ESPOSTI A BASSE DOSI DI INQUINANTI  
AMBIENTALI ED OCCUPAZIONALI**

#### 4.1 Monitoraggio ambientale e biologico dell'esposizione a basse dosi di benzene in un gruppo di tassisti: ruolo del polimorfismo genetico

Il benzene è stato classificato come cancerogeno appartenente alla classe I dalla IARC (*International Agency of Research on Cancer*) dal momento che esposizioni prolungate nel tempo ad alte concentrazioni di benzene provocano danno al midollo osseo, leucemia mieloide acuta ed anemia aplastica (IARC, 1982; WHO, 1993). Nei Paesi Europei, oltre all'industria petrolchimica, le principali esposizioni a benzene riguardano l'ambiente urbano e il fumo di tabacco. Per le sue caratteristiche di tossicità, il benzene ha assunto particolare rilievo tra gli inquinanti dell'aria urbana. In Italia, negli ultimi anni si è osservata una sensibile diminuzione delle concentrazioni di benzene aerodisperso (3-10  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ) in seguito alla riduzione del contenuto massimo di benzene nella benzina, che è passato dal 5 all'1% (DLgs 413/97). Nonostante il benzene sia una tra le sostanze più studiate e materia di legge, nella comunità scientifica italiana è ancora in corso un dibattito su quale metabolita utilizzare per il monitoraggio biologico di esposizione a basse dosi di benzene (Apostoli *et al.*, 2004).

Il presente studio, effettuato su un gruppo di tassisti della città di Parma (Allegato 3) ha come obiettivi: (i) confrontare gli indicatori di esposizione a benzene riconosciuti come i più sensibili e specifici, ovvero l'acido *trans,trans*-muconico (*t,t*-AM), l'acido *S*-fenilmercapturico (AFM) e il benzene urinario e (ii) verificare l'eventuale ruolo dei polimorfismi genetici degli enzimi nella biotrasformazione del benzene, soprattutto per esposizioni alle basse dosi. Gli autisti di taxi si possono considerare soggetti professionalmente esposti a basse dosi di benzene in quanto il loro lavoro li porta a rimanere per diverse ore (fino a 12-15 ore) nel traffico urbano.

##### 4.1.1 Materiali e Metodi

###### 4.1.1.1 Soggetti

Trentasette soggetti (35 maschi, 16 fumatori, di età media  $42,7 \pm 11,7$  anni) sono stati reclutati su base volontaria fra i 60 tassisti della città di Parma (Italia). I soggetti hanno fornito il loro consenso informato allo studio, approvato dal Comitato Etico dell'Università di Parma ed effettuato in conformità con la dichiarazione di Helsinki. Tutti i tassisti che hanno partecipato allo studio guidano auto alimentate a Diesel. Il

campionamento è stato effettuato una sola volta per soggetto durante un turno lavorativo di 12 ore (7:00-19:00), in quattro giorni consecutivi. A ciascun soggetto è stato chiesto di raccogliere un campione estemporaneo di urina all'inizio alla fine del turno di lavoro e un campione di sangue o di *brush* boccale. Inoltre, è stato chiesto di non modificare le abitudini durante tutta la durata dello studio e di completare un questionario per la raccolta di informazioni riguardanti il turno di lavoro e l'abitudine al fumo. Per ulteriori dettagli si rimanda all'Allegato 3.

#### 4.1.1.2 Reagenti

Tutti i reagenti commercialmente disponibili così come i solventi per la cromatografia liquida sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. I composti  $d_4$ -*trans,trans*-muconico ( $d_4$ -*t,t*-AM), acido  $d_5$ -*S*-fenilmercapturico ( $d_5$ -AFM), utilizzati come standard interni degli omologhi metaboliti del benzene, sono stati ottenuti per purificazione da urina di ratto dopo somministrazione di benzene marcato isotopicamente. Per la preparazione degli standard e la loro conservazione si rimanda all'Allegato 3.

#### 4.1.1.3 Monitoraggio Ambientale

Le concentrazioni di benzene nell'aria sono state determinate utilizzando un campionatore passivo a diffusione radiale, denominato Radiello<sup>®</sup> (Fondazione Maugeri, Padova, Italia). Per ciascun soggetto sono stati impiegati due campionatori, il primo è stato consegnato la sera prima della raccolta dei campioni biologici ed è stato subito indossato dal soggetto per ricavarne un'informazione dell'esposizione personale a benzene mediata sulle 24 ore; il secondo è stato consegnato la mattina dello studio e posizionato sul sedile anteriore del taxi, per campionare l'aria all'interno dell'abitacolo dell'auto, durante l'intero turno lavorativo. La determinazione del benzene e degli inquinanti ambientali è stata effettuata in GC con rivelazione a ionizzazione di fiamma previo desorbimento chimico con solfuro di carbonio iperpuro (metodo UNI).

La concentrazione del benzene ambientale era di  $5,85 \pm 1,65 \mu\text{g}/\text{m}^3$ , determinata mediante il primo Radiello<sup>®</sup> e rappresenta il valore di benzene mediato sull'intera giornata e comprende il turno di lavoro, e tutte le attività svolte nell'arco delle 24 ore. La concentrazione all'interno del abitacolo del taxi era di  $7,71 \pm 1,95 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ed è stata determinata analizzando il secondo campionatore passivo.

#### 4.1.1.4 Monitoraggio Biologico

##### *Determinazione del benzene urinario mediante GC-MS*

Il benzene urinario (B-U) e gli altri idrocarburi monoaromatici non modificati escreti con le urine sono stati determinati nei campioni di fine turno dei tassisti mediante la microestrazione in fase solida (SPME) e GC-MS, come descritto in precedenza (Andreoli *et al.*, 1999a). Brevemente, 2,0 ml di urina sono stati immediatamente trasferiti in un contenitore di vetro per SPME da 4,0 ml, contenente 1,0 g di NaCl. Quindi sono stati addizionati 2  $\mu$ l di una miscela di standard interni [ $^{13}\text{C}_6$ -benzene (0,5  $\mu\text{g/l}$ ),  $\text{d}_6$ -etilbenzene (1,0  $\mu\text{g/l}$ ),  $\text{d}_6$ -toluene e  $\text{d}_6$ -p-xilene (2,0  $\mu\text{g/l}$ )] e il campione è stato agitato e conservato a  $-20^\circ\text{C}$ . Il campionamento SPME in modalità spazio di testa è stato effettuato per 30 min a  $45^\circ\text{C}$  agitando il campione e utilizzando una fibra PDMS Carboxen 75  $\mu\text{m}$  (Supelco, Bellafonte, PA, USA) montata su un autocampionatore Combi/Pal (CTC Analytics, Zwingen, Svizzera). Le analisi sono state eseguite su un gas cromatografo HP 6890 accoppiato con un rivelatore spettrometro di massa HP 5973, gestito dal software HP Chem station (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA).

##### *Determinazione dei metaboliti del benzene in urina mediante LC-MS/MS*

E' stato sviluppato un metodo per la separazione simultanea di *t,t*-AM e AFM nella stessa corsa cromatografica. La determinazione dei metaboliti del benzene in campioni di urina è stata effettuata mediante LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa PE-Sciex a triplo quadrupolo modello API 365 dotato di una sorgente *Ionspray*. La separazione dei metaboliti è stata ottenuta utilizzando una colonna Supelcosil LC18-DB (75 x 3.0 mm i.d., 3  $\mu\text{m}$ ) e con una fase mobile costituita da acido formico (20 mM) e metanolo in gradiente di eluizione. Prima dell'analisi, il campione di urina è stato centrifugato addizionato di una miscela di standard interni, contenente  $\text{d}_4$ -*t,t*-AM e  $\text{d}_5$ -AFM e addizionato di acido formico. La ionizzazione è stata ottenuta mediante tecnica ESI in modalità ioni negativi. La rivelazione in MS/MS è stata condotta in modalità SRM, monitorando le transizioni caratteristiche di ciascun composto:  $m/z$  141 $\rightarrow$ 97 (energia di collisione, 12 eV) per *t,t*-AM;  $m/z$  145 $\rightarrow$ 101 (12 eV) per  $\text{d}_4$ -*t,t*-AM;  $m/z$  238 $\rightarrow$ 109 (12 eV) per AFM e  $m/z$  243 $\rightarrow$ 114 (12 eV) per  $\text{d}_5$ -AFM. Le concentrazioni dei metaboliti determinata nelle urine sono state espresse in funzione della creatinina, misurata secondo il metodo di Jaffe.

#### *Determinazione della cotinina in urina mediante LC-MS/MS*

Per caratterizzare l'esposizione a fumo di tabacco, il principale interferente nel monitoraggio biologico dell'esposizione a benzene, è stata determinata la concentrazione della cotinina urinaria (COT), metabolita della nicotina. La determinazione della COT in campioni di urina è stata effettuata mediante LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa PE-Sciex a triplo quadrupolo modello API 365 dotato di sorgente *TurboIonspray*. La separazione della COT è stata ottenuta utilizzando una colonna Atlantis<sup>®</sup>dC<sub>18</sub> (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. Prima dell'analisi i campioni di urina sono stati addizionati con una soluzione contenente lo standard interno, d<sub>3</sub>-Cotinina (d<sub>3</sub>-COT). La ionizzazione degli analiti è stata ottenuta in ioni positivi e la rivelazione in MS/MS, in modalità SRM, monitorando le transizioni caratteristiche:  $m/z$  177→80 (energia di collisione, 28 eV) per COT e  $m/z$  180→101 (28 eV) per d<sub>3</sub>-COT. Il metodo sviluppato è stato validato mediante lo studio dell'intervallo di linearità, la determinazione dei limiti di rivelazione e della precisione (*intra-day* e *inter-day*). Le concentrazioni della COT determinata nelle urine sono state espresse in funzione della creatinina, misurata secondo il metodo di Jaffe.

#### 4.1.1.5 Caratterizzazione dei genotipi metabolici

Il polimorfismo degli enzimi *GSTM1* e *GSTT1*, appartenenti alla classe delle glutatione-transferasi, è stato caratterizzato applicando il protocollo PCR multiplex che prevede l'utilizzo dell'albumina come standard interno (Arand *et al.*, 1996).

#### 4.1.1.6 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. Per gli indicatori che non avevano una distribuzione normale è stato necessario effettuare la trasformazione logaritmica dei dati. Differenze tra gruppi sono state valutate mediante *t*-test per dati indipendenti mentre differenze fra inizio e fine turno sono state valutate mediante *t*-test per dati appaiati. L'analisi della correlazione è stata effettuata mediante test parametrici (correlazione di Pearson). Test

non parametrici (test di Mann-Whitney, test di Wilcoxon e test di Spearman) sono stati applicati come conferma dei risultati ottenuti con i test parametrici. L'analisi della covarianza (ANCOVA) e i modelli per l'analisi della regressione lineare multipla sono stati utilizzati per valutare il contributo dei polimorfismi genetici e dei altre covariate (abitudini al fumo espressa come COT urinaria, benzene personale) sulla variabilità dell'escrezione dei metaboliti.

#### 4.1.2 Risultati e Discussione

La caratterizzazione dell'esposizione a benzene è stata effettuata mediante monitoraggio ambientale personale e monitoraggio biologico. Per stimare l'esposizione a fumo di tabacco, il principale interferente nel monitoraggio biologico dell'esposizione a benzene, è stata determinata la concentrazione della cotinina urinaria (COT), metabolita della nicotina. La concentrazione del benzene ambientale nelle 24 ore ( $5,85 \pm 1,65 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) è risultata significativamente diversa da quella misurata all'interno dell'abitacolo del taxi ( $7,71 \pm 1,95 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) applicando il *t*-test per dati appaiati ( $p < 0,05$ ). Le differenze sono state osservate considerando sia l'intero gruppo che dividendo i tassisti in due gruppi sulla base dell'abitudine al fumo. Nessuna differenza è invece stata riscontrata tra fumatori e non-fumatori in entrambi i campionamenti. Questo risultato porta ad escludere un contributo del fumo passivo all'interno del taxi.

I risultati del monitoraggio biologico degli indicatori di esposizione e della COT urinaria sono riportati in Tabella 1. I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard per *t,t*-AM e COT, essendo questi indicatori normalmente distribuiti (l'ultima solo dopo stratificazione per abitudine al fumo), e come media geometrica e deviazione standard geometrica per AFM e B-U, in quanto hanno una distribuzione log-normale.

Mentre per l'*t,t*-AM non si sono riscontrate differenze significative né fra inizio e fine turno né fra fumatori e non fumatori, l'AFM distingueva entrambe le condizioni testate. Per quanto riguarda il B-U (disponibile solo a fine turno), la media geometrica (MG) dei valori dei soggetti fumatori era circa 5 volte superiore a quella dei non fumatori, a differenza della MG dell'AFM che era circa il doppio. Questo comportamento porterebbe a suggerire il B-U come l'indicatore più sensibile di esposizione a benzene, se non fosse per l'elevata deviazione standard geometrica nel gruppo dei soggetti fumatori. Tale variabilità può essere spiegata tenendo conte delle note problematiche pre-analitiche legate alla determinazione del B-U (Perbellini *et al.*,

1995), oppure più probabilmente essa deve essere messa in relazione a fattori cinetici. Trattandosi di un indicatore con un'emivita biologica piuttosto rapida (per il quale il momento del prelievo risulta "critico"), esso non può essere correttamente utilizzato per il monitoraggio di un turno di lavoro di 12 ore poiché riflette solo le ultime ore del turno.

Tabella 1. Indicatori di esposizione a benzene e cotinina urinaria in campioni di inizio e fine turno dei tassisti, divisi per abitudini al fumo. I dati sono espressi come media  $\pm$  DS o come media geometrica [deviazione standard geometrica] in funzione della distribuzione (normale o log-normale) dei dati.

Indicatore <sup>a</sup>	Non fumatori (n=22)	Fumatori (n=15)
<i>t,t</i> -AM IT ( $\mu\text{g/g}$ Creatinina)	105,4 $\pm$ 67,0	130,9 $\pm$ 62,0
<i>t,t</i> -AM FT ( $\mu\text{g/g}$ Creatinina)	122,0 $\pm$ 70,3	154,4 $\pm$ 70,0
AFM IT ( $\mu\text{g/g}$ Creatinina)	2,23 [1,72]	2,81 [1,93]
AFM FT ( $\mu\text{g/g}$ Creatinina)	2,14 [1,87]	3,79 [1,50]*.#
COT IT ( $\mu\text{g/g}$ Creatinina)	1,41 $\pm$ 1,22	789 $\pm$ 673*
COT FT ( $\mu\text{g/g}$ Creatinina)	1,45 $\pm$ 1,28	1100 $\pm$ 879*.#
B-U FT ( $\mu\text{g/l}$ )	0,44 [1,79]	2,58 [4,23]*

<sup>a</sup> Legenda: *t,t*-AM, acido *trans,trans*-muconico; AFM, acido *S*-fenilmercapturico; COT, cotinina; B-U, Benzene urinario; IT, inizio turno; FT, fine turno.

\*  $p < 0,002$ , t test per campioni indipendenti (fumatori vs. non fumatori)

#  $p < 0,05$ , t test per dati appaiati (FT vs. IT)

Sono state osservate correlazioni significative tra le concentrazioni di AFM di inizio e fine turno limitatamente al gruppo dei fumatori (coefficiente di Pearson,  $r=0,78$ ,  $p < 0,01$ ). Questo a conferma del fatto che il peso del fumo di tabacco supera di gran lunga quello dell'esposizione professionale a queste concentrazioni di benzene.

Sempre nel gruppo dei fumatori, è stata inoltre riscontrata una correlazione tra le concentrazioni di AFM FT e B-U FT con la COT urinaria, ( $r=0,67$  e  $r=0,63$ ,  $p < 0,01$ , rispettivamente). Tale correlazione non è stata invece osservata nel caso di *t,t*-AM FT.

Nel loro insieme i risultati ottenuti in questo studio mostrano come l'AFM urinario sia l'indicatore più sensibile per caratterizzare le esposizioni a basse dosi di benzene e l'influenza del fumo di tabacco.

Per la prima volta è stata osservata un'influenza del polimorfismo della *GSTM1* sull'escrezione di AFM, anche per livelli di esposizione così bassi. L'analisi della covarianza ha evidenziato che, a parità di esposizione valutata tramite la misura del benzene personale ( $5,86 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ), i soggetti che esprimono l'attività enzimatica *GSTM1* eliminano concentrazioni significativamente maggiori di AFM a fine turno. L'andamento si osserva in entrambi i gruppi di lavoratori classificati secondo l'abitudine al fumo di tabacco, anche se in questo caso non viene raggiunta la significatività statistica, probabilmente a causa della scarsa numerosità del campione.

Contrariamente a quanto riportato da Sørensen *e coll.* (2004), non abbiamo invece osservato alcun effetto del genotipo *GSTT1* sui livelli di AFM. Questo può essere dovuto, in primo luogo, alla scarsa numerosità del campione che, combinata con la bassa frequenza attesa del genotipo *GSTT1null* nei Caucasicci (20%), non ha permesso di raggiungere un'adeguata rappresentatività del sottogruppo (solo 5 soggetti, 3 non fumatori e 2 fumatori). In secondo luogo, se i risultati del nostro studio fossero confermati su casistiche più vaste, si potrebbe ipotizzare un ruolo diverso per i due enzimi, probabilmente dipendente dalle concentrazioni di benzene.

## 4.2 Indicatori di esposizione e di effetto in soggetti esposti a stirene

Lo stirene è un noto agente genotossico, che risulta cancerogeno per l'uomo soltanto quando è utilizzato in combinazione con altre sostanze, come ad esempio il butadiene. Recentemente, è stata formulata una nuova ed interessante ipotesi circa il rischio genotossico derivante dall'esposizione a stirene (Figura 2). I risultati di alcuni studi *in vitro* e *in vivo* hanno suggerito che lo stress ossidativo possa essere implicato nella genotossicità dello stirene (Marczynski *et al.*, 2000).

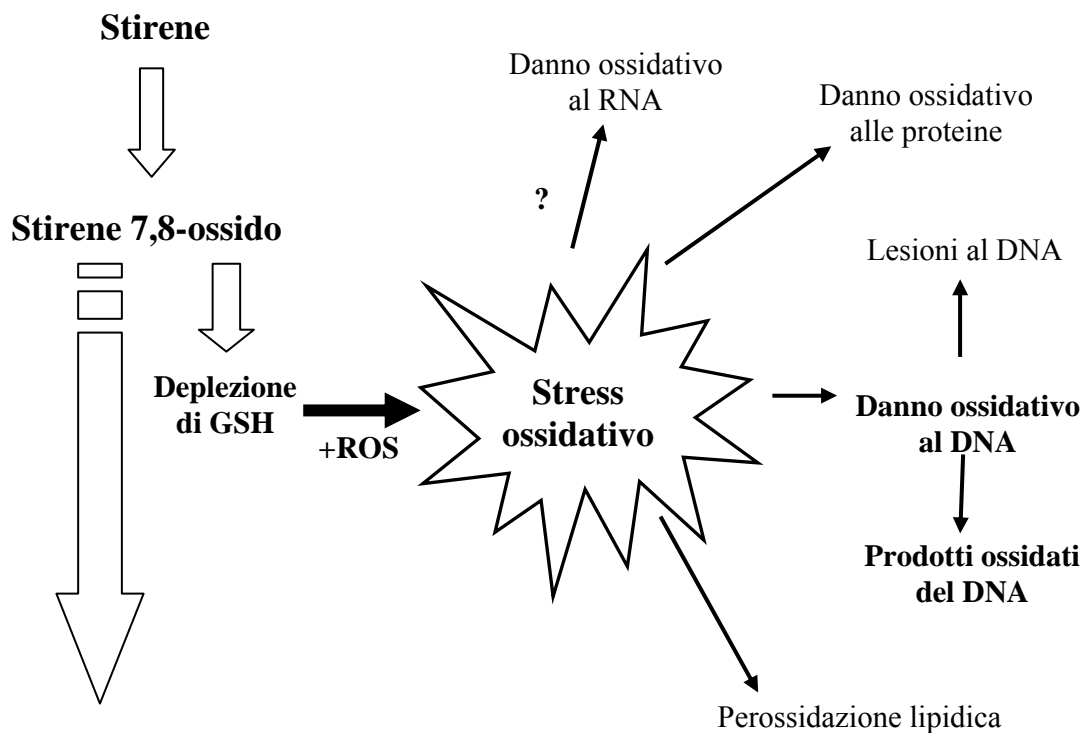


Figura 2. Modello proposto per spiegare il meccanismo degli effetti genotossici dello stirene. GSH, Glutatione; ROS, *Reactive Oxygen Species*. Adattato da Marczynski e *coll.* (2000).

Per verificare questa ipotesi in relazione all'esposizione a stirene, è stato sviluppato un nuovo metodo analitico mediante LC-MS/MS che consente la determinazione simultanea dei tre principali indicatori di danno ossidativo alla guanina in posizione 8, presenti nelle urine in forma libera. Oltre all'indicatore più studiato, l'8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-oxo-dG) che deriva dalla riparazione del danno ossidativo alla guanina principalmente ad opera delle endonucleasi, nelle urine sono stati identificati altri due indicatori, l'8-idrossiguanina (8-oxo-G) che viene rilasciata ad opera delle

glicosilasi e l'8-idrossi-guanosina (8-oxo-Guo), che proviene invece dal catabolismo dell'RNA. Dal momento che 8-oxo-G e 8-oxo-Guo sono da considerarsi nuovi indicatori e non esistono per essi né valori di riferimento né informazioni relative alla loro variabilità intra- ed inter-individuale, è stato disegnato uno studio metodologico finalizzato ad acquisire le informazioni necessarie per la corretta interpretazione di questi indicatori di danno ossidativo efficacemente riparato. Inoltre, i risultati riportati in letteratura per 8-oxo-dG sono contrastanti e non permettono di interpretare in modo univoco e convincente il significato di questo indicatore.

Lo studio ha previsto il reclutamento di 11 soggetti sani, non fumatori e di età media  $35,5 \pm 5,1$  anni, a cui è stato chiesto di raccogliere campioni estemporanei di urina a intervalli di quattro ore per un'intera giornata. Un soggetto ha ripetuto la procedura di raccolta per cinque giornate con lo scopo di valutare anche la variabilità intra-individuale. L'analisi dei risultati dello studio ha evidenziato l'assenza di ritmo circadiano nell'escrezione di questi indicatori. La consistenza interna dei dati e l'affidabilità delle misure costituiscono un saldo presupposto per l'utilizzo di questi parametri come validi *biomarkers* di effetto, anche se l'elevata variabilità inter-individuale dell'8-oxo-G richiede ulteriori approfondimenti (Allegato 4). Questi risultati sono stati confermati anche raddoppiando il numero di soggetti esaminati (dati non mostrati). Poiché il tempo di campionamento non sembra influenzare significativamente le concentrazioni degli indicatori di effetto, eventuali variazioni nei livelli riscontrabili tra l'inizio e la fine del turno di lavoro potrebbero essere attribuibili a fattori di ordine cinetico e/o al meccanismo di azione dell'agente che ha generato lo stress ossidativo.

Alla luce dei risultati di questo studio metodologico, si è ritenuto di potere utilizzare questi indicatori per studiare il ruolo dello stress ossidativo associato all'esposizione a stirene. A tale scopo, sono stati reclutati due gruppi di lavoratori esposti a stirene, un gruppo di soggetti ex-esposti e un gruppo di controllo. L'esposizione è stata caratterizzata mediante monitoraggio ambientale e quello biologico. Il danno ossidativo agli acidi nucleici è stato caratterizzato determinando: (i) la quota di danno al DNA non riparata presente nei linfociti di sangue periferico; (ii) il danno al DNA riparato ad opera delle glicosilasi e delle endonucleasi e rappresentato, rispettivamente da 8-oxo-G e 8-oxo-dG escrete in forma libera nell'urina; (iii) il danno ossidativo all'RNA, rispecchiato dalle concentrazioni urinarie di 8-oxo-Guo. Inoltre, poiché è noto che l'enzima 8-idrossiguaninaglicosilasi (hOgg1) è coinvolto nella riparazione dell'ossidazione della guanina in posizione 8 ed è noto che

la sostituzione di una serina (Ser) con una cisteina (Cys) sul codone 326 (Ser326Cys) ne modifica la funzionalità (Kohn *et al.*, 1998), tutti i soggetti reclutati per questo studio sono stati caratterizzati per questo polimorfismo.

#### 4.2.1. Materiali e Metodi

##### 4.2.1.1 Soggetti

E' stato condotto uno studio trasversale su due gruppi di lavoratori del comparto della vetroresina, reclutati in Repubblica Ceca e professionalmente esposti a stirene in due diversi impianti di produzione. Gli studi sono stati effettuati in conformità con la dichiarazione di Helsinki ed approvati dal Comitato Etico dell'Università di Parma.

*Impianto A:* Sono stati reclutati 13 soggetti, tutti di sesso maschile, di età media di  $35 \pm 12$  anni, 6 fumatori dei quali, addetti alla produzione di piccoli aeroplani in vetroresina. I soggetti sono stati esposti ad una concentrazione media di stirene ambientale pari a  $16,4 \pm 22,2$  mg/m<sup>3</sup>, inferiore all'attuale valore limite per le 8 ore lavorative (TLV-TWA, 85 mg/m<sup>3</sup>).

*Impianto B:* Sono stati reclutati 46 soggetti, 28 maschi e 18 femmine, di età media  $38 \pm 10$  anni, 20 dei quali fumatori, addetti alla laminazione manuale di parti in vetroresina per autobus e camion. I soggetti sono stati esposti ad una concentrazione media di stirene ambientale pari a  $135 \pm 48,2$  mg/m<sup>3</sup>, ben superiore all'attuale valore limite per le 8 ore lavorative (TLV-TWA, 85 mg/m<sup>3</sup>). In questo gruppo, 15 lavoratori (pari al 39,5%) presentavano concentrazioni della somma di acidi mandelico e fenilgliossilico (AM+AFG) superiori al BEI<sup>®</sup> di 400 mg/g di creatinina raccomandato dalla ACGIH per campioni di fine turno.

*Controlli:* Il gruppo dei controlli è costituito da 38 soggetti, 27 maschi e 11 femmine, non professionalmente esposti a stirene, di età media di  $40 \pm 12$  anni, di cui 16 fumatori.

*Ex-esposti:* Sono stati reclutati 17 soggetti di età media  $45 \pm 10$  anni, tutti di sesso maschile, di cui 9 fumatori, non più esposti a stirene da almeno 3 mesi. Attualmente i soggetti sono impiegati in lavori di manutenzione; precedentemente essi sono 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.

#### 4.2.1.2 Reagenti

Tutti i reagenti commercialmente disponibili così come i solventi per la cromatografia liquida sono stati utilizzati senza ulteriore purificazione. Solo lo standard interno [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>] 8-oxo-dG è stato ottenuto per sintesi a partire da [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>] dG, apportando modifiche minori al metodo di Hu *et coll.* (2004).

#### 4.2.1.3 Monitoraggio ambientale

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 (Vodicka *et al.*, 1995).

#### 4.2.1.4 Monitoraggio biologico

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. I campioni sono stati aliquotati e conservati a -20°C fino al momento dell'analisi.

##### *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 (Vodicka *et al.*, 1995).

##### *Determinazione dei metaboliti urinari dello stirene mediante LC-MS/MS*

E' stato sviluppato un metodo per la separazione simultanea di AM e AFG nella stessa corsa cromatografia. La loro determinazione è stata effettuata mediante LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa PE-Sciex a triplo quadrupolo modello API 365. La separazione di tutti questi metaboliti è stata ottenuta utilizzando una colonna Supelcosil C18-DB (75 x 3.0 mm i.d., 3 µm) ed una fase mobile costituita da acido formico (20 mM) e metanolo in gradiente di eluizione. Prima dell'analisi, il campione di

urina è stato centrifugato e addizionato di acido formico. La ionizzazione è stata ottenuta mediante ionizzazione ESI in modalità ioni negativi. La rivelazione in MS/MS è stata condotta in modalità SRM, monitorando le transizioni caratteristiche di ciascun composto:  $m/z$  149→105 (energia di collisione 11 eV) per AFG;  $m/z$  150→107 (9 eV) per AM. Il metodo sviluppato è stato validato mediante lo studio dell'intervallo di linearità (0,1-500 mg/l per AM e AFG), la determinazione dei limiti di rivelazione (100 µg/l per AM e AFG) e della precisione analitica (*intra-day* e *inter-day*, <9%) (Manini *et al.*, 2002). Le concentrazioni dei metaboliti sono state espresse in funzione della creatinina, determinata secondo il metodo di Jaffe.

#### *Determinazione degli indicatori di stress ossidativo urinari LC-MS/MS*

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 (PE-Sciex modello API 365) dotato di sorgente *TurboIonspray* (Allegato 4). La separazione dei tre analiti nella stessa corsa cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna Atlantis<sup>®</sup>dC<sub>18</sub> (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. Prima dell'analisi i campioni di urina sono stati diluiti con un uguale volume di tampone litio acetato 100 mM (pH=6,4), contenente la miscela di standard interni. La ionizzazione degli analiti è stata ottenuta in ioni positivi e la rivelazione in MS/MS, in modalità denominata SRM, monitorando le transizioni caratteristiche di ciascun composto:  $m/z$  168→140 (energia di collisione, 21 eV) per 8-oxo-G;  $m/z$  171→142 (21 eV) per [<sup>13</sup>C<sub>1</sub>, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>] 8-oxo-G;  $m/z$  300→168 (25 eV) per 8-oxo-Guo;  $m/z$  284→168 (25 eV) per 8-oxo-dG e  $m/z$  289→173 (25 eV) per [<sup>15</sup>N<sub>5</sub>] 8-oxo-dG. Il metodo sviluppato è stato validato mediante lo studio dell'intervallo di linearità (2 ordini di grandezza), la determinazione dei limiti di rivelazione (compresi tra 0,1 nM per 8-oxo-dG e 8 nM per 8-oxo-G) e della precisione (*intra-day* e *inter-day*, <7%). Le concentrazioni di tutti gli analiti determinati sono state espresse in funzione della creatinina urinaria, determinata secondo il metodo di Jaffe.

#### *Determinazione di 8-oxo-dG e 2'-deossiguanosina (dG) 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 seguendo la metodica descritta da Dalhaus e Appel (1993), con alcune modifiche (Marczynski *et al.*, 1997). Il risultato è stato espresso come rapporto molare 8-oxo-dG/10<sup>5</sup> 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), la determinazione del limite di rivelazione (1,5 residui/10<sup>5</sup> dG) e della precisione analitica (*intra-day* e *inter-day*, <15%).

#### 4.2.1.5 Caratterizzazione genotipica

Il polimorfismo del gene 8-idrossiguaninaglicosilasi (hOgg1) è stato determinato con metodica di PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) su DNA genomico estratto da circa 3 ml di sangue intero utilizzando il Kit commerciale PureGene (Gentra). Tale polimorfismo porta alla sostituzione di una serina (Ser) con una cisteina (Cys) sul codone 326 (Ser326Cys). Un frammento di 207 bp è stato amplificato in PCR mediante i *primers*: *forward* 5'ACTGTCACTAGTCTCACCAG3' e *reverse* 5'TGAATTCGGAA GGTGCTTGGGGAAT3'. Ogni reazione di PCR conteneva 1xPCR Buffer, 1,5 mM di MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM di ogni deossinucleotide, 4 pmol di ciascun *primer* e 1U di Taq polimerasi (Applied Biosystem). Il programma di amplificazione prevedeva un ciclo di denaturazione di 2 minuti a 94°C seguito da 35 cicli composti ognuno da 1 ciclo a 94°C di 30 secondi, 1 ciclo a 61°C di 30 secondi e 1 ciclo a 72°C di 30 secondi, il tutto seguito da un ciclo di allungamento finale a 72°C di 2 minuti. Il prodotto di PCR è stato quindi digerito con enzima di restrizione Fnu4HI (New England BioLabs) a 37°C per 6 ore, analizzato in elettroforesi orizzontale su gel di agarosio (Cambrex BioScience) al 2% colorato con bromuro di etidio (Invitrogen) e successivamente visualizzato su transilluminatore Gel DOC 1000 (BioRad). L'omozigote selvatico Ser/Ser, non tagliato dall'enzima presentava un'unica banda di 207 bp, l'omozigote mutato Cys/Cys, tagliato dall'enzima presentava due bande dai 107 e 100 bp ed infine l'eterozigote Ser/Cys presentava le bande 207, 107 e 100 bp.

#### 4.2.1.6 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. Per gli indicatori di esposizione, AM+AFG e per lo stirene nel sangue e per 8-oxo-dG nei linfociti è stato necessario effettuare la trasformazione logaritmica dei dati. 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). 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.

#### 4.2.2 Risultati e Discussione

##### 4.2.2.1 Monitoraggio biologico dell'esposizione a stirene

In Tabella 2 sono riportati i risultati del monitoraggio biologico dell'esposizione a stirene espressi come mediana e intervallo interquartile dello stirene nel sangue e di AM+AFG nelle urine, nei diversi gruppi esaminati. Le concentrazioni di stirene nel sangue sono espresse come mg/l, mentre le concentrazioni urinarie dei metaboliti sono espresse in mg/g di creatinina.

Tabella 2. Mediane e intervallo interquartile [25°-75°] dello stirene nel sangue (mg/l) e dei suoi metaboliti urinari (espresse in mg/g creatinina) nei diversi gruppi in esame.

Indicatore <sup>a</sup>	Matrice	Controlli	ex-Esposti	Impianto A	Impianto B	<i>p</i> <sup>b</sup>
stirene	sangue	0,20 [0,02-0,37]	0,37 [0,30-0,51]	0,31 [0,25-0,50]	1,79 [1,20-2,60]	<0,0001
AM+AFG	urina	0,43 [0,30-0,67]	0,97 [0,38-1,21]	17,8 [9,68-78,8]	420 [156-646]	<0,0001

<sup>a</sup>Legenda: AM+AFG, acido mandelico+acido fenilgliossilico.

<sup>b</sup>ANOVA a una via seguita dal test di Tukey per confronti multipli.

I risultati del monitoraggio ambientale e biologico dei lavoratori esposti a stirene (Tabella 2) 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. Dal monitoraggio ambientale è emerso che i lavoratori dell'impianto A effettivamente sono stati esposti a valori medio bassi di stirene ambientale (media  $\pm$  DS,  $16,4 \pm 22,2$  mg/m<sup>3</sup>) mentre i lavoratori dell'impianto B sono stati esposti a valori molto elevati di stirene ( $135 \pm 48,2$  mg/m<sup>3</sup>), mediamente superiori al TLV-TWA di 85 mg/m<sup>3</sup> raccomandato dall'ACGIH. A conferma del dato ambientale, circa il 40% dei soggetti appartenenti a questo impianto presentava valori di AM+AFG superiori al BEI<sup>®</sup> di 400 mg/g di creatinina raccomandato dall'ACGIH per campioni di fine turno.

Differenze significative sono state riscontrate tra i vari gruppi sia per quanto riguarda lo stirene nel sangue che i metaboliti urinari. Come atteso, l'indicatore più sensibile di esposizione a stirene, la somma AM+AFG, è stato in grado di discriminare significativamente tutti i gruppi tranne i Controlli dal gruppo di ex-Esposti. L'unico indicatore in grado di distinguere tra Controlli ed ex-Esposti è risultato lo stirene nel sangue, anche se nel caso dei Controlli esso era stato determinato solo nel 20% dei campioni.

Al fine di valutare l'eventuale associazione tra gli indicatori di danno ossidativo al DNA e 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 classificati come Non Esposti 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 (Manini *et al.*, 2004). Il gruppo degli Esposti, 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.

In Tabella 3 sono riportate le concentrazioni di stirene nel sangue (esprese in mg/l) e le concentrazioni urinarie (esprese in funzione della creatinina urinaria, mg/g creatinina) dei metaboliti dello stirene (AM+AFG) nei quattro gruppi di soggetti classificati sulla base della dose interna di stirene. Poiché gli indicatori non erano normalmente distribuiti nella popolazione in studio, le concentrazioni sono state riportate in Tabella come mediana e intervallo interquartile [25°-75°]. Per i due

indicatori di esposizione, l'analisi della varianza a una via (ANOVA) seguita dal test di Tukey per confronti multipli ha evidenziato differenze significative ( $p < 0,001$ ) fra tutti i gruppi, tranne che fra Non Esposti e soggetti a Bassa Esposizione e fra soggetti a Media ed Alta Esposizione per lo stirene nel sangue.

Tabella 3. Mediane e intervallo interquartile [25°-75°] dello stirene nel sangue (mg/l) e dei suoi metaboliti urinari (espresse in mg/g creatinina) nei diversi gruppi riclassificati secondo la distribuzione degli indicatori di dose interna.

Indicatore <sup>a</sup>	Matrice	Non Esposti	Bassa Esposizione	Media Esposizione	Alta Esposizione	$p^b$
stirene	sangue	0,20 [0,02-0,31]	0,33 [0,26-0,59]	1,43 [0,81-2,34]	1,78 [1,24-2,90]	<0,0001
AM+AFG	urina	0,44 [0,33-0,80]	11,4 [9,30-48,9]	200 [103-351]	646 [577-882]	<0,0001

<sup>a</sup>Legenda: AM+AFG, acido mandelico+acido fenilgliossilico.

<sup>b</sup> ANOVA a una via seguita dal test di Tukey per confronti multipli:

$p < 0,001$  fra tutti i gruppi tranne Non Esposti vs. Bassa Esposizione e Media Esposizione vs. Alta Esposizione per stirene nel sangue.

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 (coefficiente di correlazione di Pearson,  $r=0,706$ ,  $p < 0,0001$ ) (Manini *et al.*, 2003), analizzando entrambe le classificazioni. Inoltre, le correlazioni sono state confermate applicando test non parametrici, come la correlazione di Spearman.

#### 4.2.2.2 Indicatori di danno ossidativo al DNA e associazione con l'esposizione a stirene

Per la corretta interpretazione dei risultati di questo studio è necessario ricordare che il danno ossidativo agli acidi nucleici 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 dello danno stesso. Il valore di 8-oxo-dG nei linfociti rappresenta il danno residuo subito e non riparato dai vari meccanismi cellulari (BER, NER, MMR, etc.). Elevati valori di questo indicatore si possono associare sia ad

elevate esposizioni che ad una limitata capacità di riparazione. Mentre nel sangue l'ossidazione della guanina in posizione 8 genera un solo prodotto, 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 i prodotti determinabili nelle urine e rappresentativi dell'ossidazione alla guanina. Le concentrazioni degli indicatori urinari rappresentano il risultato della riparazione ad opera dei diversi meccanismi: 8-oxo-dG e 8-oxo-G nelle urine rappresentano, rispettivamente, la quota eliminata proveniente dal *pool* degli acidi nucleici o dal DNA ad opera delle endonucleasi, e dal solo DNA ad opera delle glicosilasi. Infine, 8-oxo-Guo rappresenta l'entità del danno ossidativo a carico dell'RNA. 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 perché non è ancora noto se esistano o meno meccanismi di riparazione dell'RNA o se la 8-oxo-Guo sia un suo prodotto di degradazione, dall'altro perché l'origine ed il significato dell'indicatore 8-oxo-dG non sono univoci.

In una prima fase i risultati dello stress ossidativo sono stati analizzati considerando due soli gruppi: Esposti (n=54) e Non Esposti (n=54), classificati sulla base della dose interna di stirene. La mediana ed il range interquartile [25°-75°] del rapporto 8-oxo-dG/10<sup>5</sup> dG nei linfociti era pari a 0,27 [0,23-0,45] negli Esposti e 0,36 [0,27-0,53] nei Non Esposti. Le concentrazioni urinarie di 8-oxo-G, 8-oxo-Guo e 8-oxo-dG (espresse come media ± DS) erano rispettivamente 17,58 ± 7,07, 5,57 ± 2,06 e 3,78 ± 1,30 µg/g creatinina negli Esposti e 15,50 ± 5,67, 4,51 ± 1,47 e 3,87 ± 1,38 µg/g creatinina nei Non Esposti. I lavoratori presentavano concentrazioni significativamente più basse di 8-oxo-dG nei linfociti ma più elevate di 8-oxo-Guo nelle urine rispetto ai controlli ( $p=0,024$  e  $p=0,003$ , rispettivamente, *t*-test per dati indipendenti), mentre non sono state riscontrate differenze significative per 8-oxo-G e 8-oxo-dG ( $p=0,099$  e  $p=0,772$ , *t*-test per dati indipendenti).

Il risultato, ottenuto dall'analisi del danno ossidativo nel sangue, che mostra una diminuzione delle concentrazioni di 8-oxo-dG nei linfociti passando dai lavoratori ai soggetti Non Esposti, è in contraddizione almeno apparente con uno studio che aveva dimostrato come il rapporto 8-oxo-dG/10<sup>5</sup> dG nei linfociti di 17 lavoratori esposti a stirene fosse significativamente più elevato rispetto ad un gruppo di Non Esposti ( $2,23 \pm 0,54$  vs.  $1,52 \pm 0,45$ ,  $p < 0,001$ ) (Marczynski *et al.*, 1997). Mentre i lavoratori appartenenti alla casistica in esame erano esposti soltanto a stirene, non si può escludere che quei lavoratori addetti alla produzione di imbarcazioni fossero coesposti ad altre sostanze chimiche, per esempio diisocianati. Inoltre, questi dati porterebbero a concludere che lo stirene non causa stress ossidativo. D'altra parte però nelle urine le concentrazioni di 8-oxo-Guo, indicatore di danno ossidativo all'RNA mostrano un andamento opposto, dimostrando che lo stirene causa stress ossidativo. Tra le macromolecole cellulari, l'RNA sembrerebbe essere quella più sensibile rispetto al danno ossidativo indotto dall'esposizione a stirene, in quanto molecola più labile, contenuta principalmente nel citoplasma e meno protetta del DNA (Nunomura *et al.*, 2006).

In modo inatteso, le concentrazioni urinarie di 8-oxo-dG, l'indicatore più studiato e più ampiamente utilizzato in studi clinici e di tossicologia occupazionale, non sembrano invece risentire in alcun modo dell'esposizione a stirene. Questo risultato pone dei dubbi sull'utilizzo della sola 8-oxo-dG urinaria come indicatore di stress ossidativo, confermando peraltro i risultati contrastanti della letteratura.

Anche per l'8-oxo-G non sono state osservate differenze tra Esposti e Non Esposti, probabilmente a causa dell'elevata variabilità dell'indicatore attribuibile in parte all'influenza del polimorfismo dell'hOgg1.

Avendo osservato delle differenze significative di concentrazione tra alcuni degli indicatori di stress ossidativo tra Esposti e Non Esposti, si è valutato l'andamento degli indicatori di danno ossidativo in funzione dell'esposizione a stirene suddividendo i soggetti in gruppi a Bassa, Media e Alta Esposizione (come in Tabella 3). In Tabella 4 sono riportate le concentrazioni degli indicatori di stress ossidativo espresse come media  $\pm$  DS o come mediana e range interquartile [25°-75°], in funzione della distribuzione delle variabili nella popolazione in esame (normale o non normale). Le concentrazioni dell'indicatore di danno ossidativo nei linfociti del sangue periferico sono espresse come rapporto fra il numero di basi ossidate su 10<sup>5</sup> basi non modificate

(8-oxo-dG/10<sup>5</sup> dG), mentre le concentrazioni degli indicatori urinari sono espresse in µg/g di creatinina.

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<sup>5</sup> dG. In particolare, tali differenze riguardavano soltanto il Gruppo dei Non Esposti e il Gruppo di Alto Esposti sia per 8-oxo-G ( $p=0,049$ ) che per 8-oxo-Guo ( $p=0,008$ ), come ha evidenziato il test di Tukey per confronti multipli. Non sono state invece riscontrate differenze significative tra i gruppi di lavoratori, probabilmente a causa della scarsa numerosità dei sottogruppi ( $n=18$ ).

Tabella 4. Mediane e intervallo interquartile [25°-75°] e media ± deviazione standard (DS) degli indicatori di stress ossidativo nei diversi gruppi. I dati sono espressi come 8-oxo-dG/10<sup>5</sup> dG per i campioni di sangue e come µg/g di creatinina per i campioni di urina.

Indicatore <sup>a</sup>	Matrice	Non Esposti	Bassa Esposizione	Media Esposizione	Alta Esposizione	$p^b$
8-oxo-dG	Linfociti	0,36 [0,27-0,53]	0,31 [0,25-0,50]	0,27 [0,23-0,37]	0,33 [0,20-0,50]	ns <sup>c</sup>
8-oxo-G	Urina	15,5 ± 5,67	14,9 ± 4,65	17,6 ± 6,71	20,0 ± 8,40	0,035
8-oxo-Guo	Urina	4,51 ± 1,47	5,00 ± 1,79	5,52 ± 1,78	6,10 ± 2,49	0,008
8-oxo-dG	Urina	3,86 ± 1,38	3,50 ± 0,81	3,67 ± 1,32	4,16 ± 1,55	ns <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Legenda: 8-oxo-G, 8-idrossi-guanina; 8-oxo-Guo, 8-idrossi-guanosina; 8-oxo-dG, 8-idrossi-2'-deossiguanosina.

<sup>b</sup> ANOVA a una via seguita dal test di Tukey per confronti multipli:  $p=0,049$  Non Esposti vs. Alta Esposizione per 8-oxo-G e  $p=0,008$  Non Esposti vs. Alta Esposizione per 8-oxo-Guo.

<sup>c</sup> ns, non significativo.

L'andamento del rapporto 8-oxo-dG/10<sup>5</sup> dG nei quattro gruppi di soggetti sembra suggerire che ci sia una diminuzione progressiva del danno ossidativo non riparato per medio e basse esposizioni a stirene, mentre nel caso delle alte esposizioni si osserva una tendenza opposta nel bilancio tra riparazione e danno. Se questo risultato fosse confermato da studi su casistiche più ampie, si potrebbe ipotizzare che, per esposizioni

superiori a 20-30 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. Benché l'analisi della varianza abbia evidenziato differenze significative tra i gruppi per due dei tre indicatori urinari, 8-oxo-Guo e 8-oxo-G, queste differenze riguardavano sempre il gruppo dei Non Esposti e quello degli Alti Esposti. Tra i lavoratori, invece, si sono osservate solo tendenze non significative ad un aumento degli indicatori urinari con la dose interna di stirene, probabilmente a causa della bassa numerosità dei sottogruppi nei quali sono stati suddivisi i lavoratori e dell'elevata variabilità inter-individuale degli indicatori.

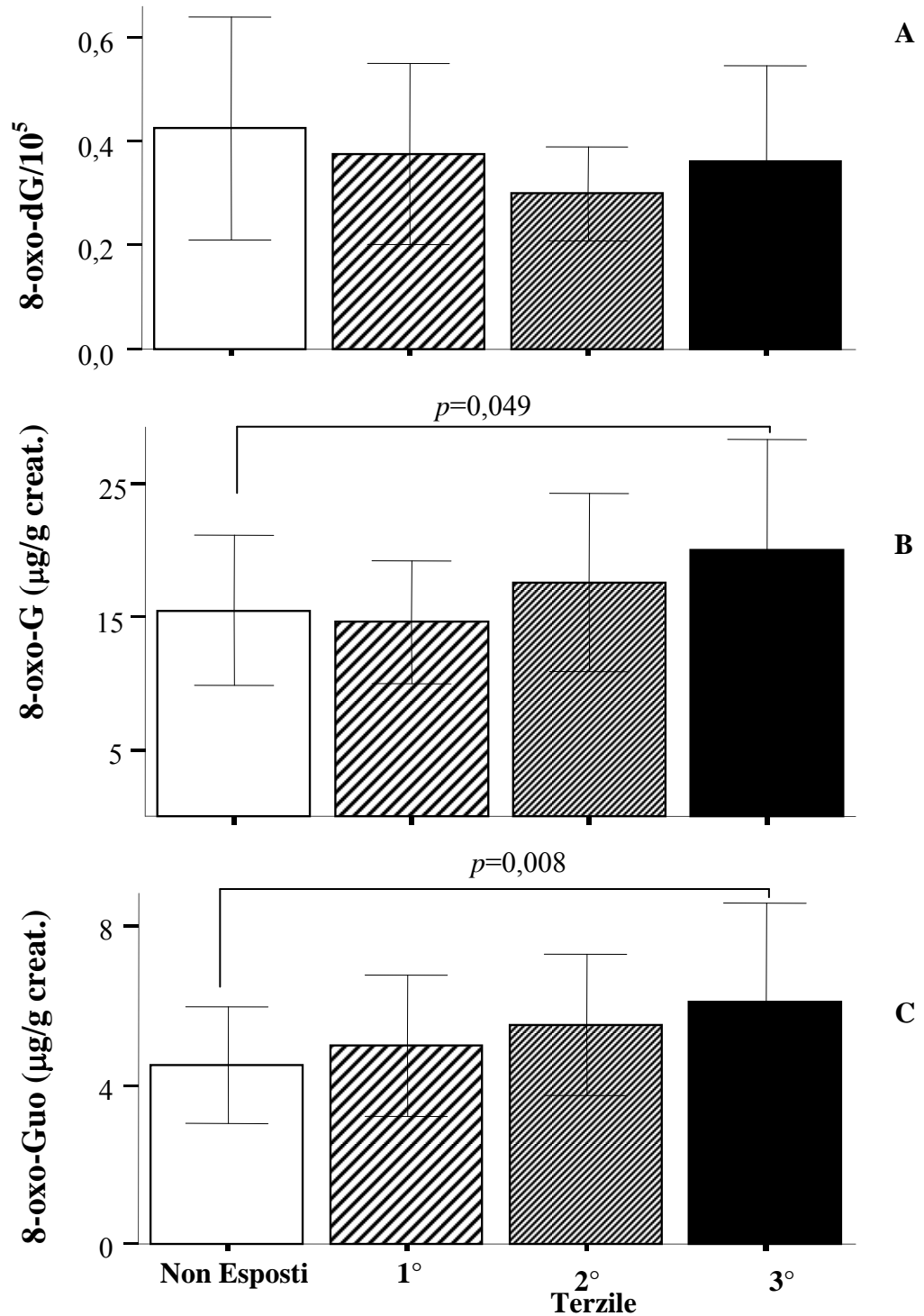


Figura 4. Andamento delle medie ( $\pm$  DS) del rapporto di 8-oxo-dG/10<sup>5</sup> dG nei linfociti (A), della concentrazione urinaria di 8-oxo-G (B) e di 8-oxo-Guo (C) nei quattro gruppi di soggetti classificati sulla base della dose interna di stirene in: Non Esposti (AM+AFG<3,5 mg/g creat., n=54), primo terzile (3,5<AM+AFG<84, n=18), secondo terzile (84<AM+AFG<450, n=18), terzo terzile (AM+AFG>450, n=18); *one-way* ANOVA, seguita da test di Tukey per confronti multipli.

Nelle Figure 4A, 4B e 4C sono mostrati gli andamenti delle medie del rapporto di 8-oxo-dG/10<sup>5</sup> dG nei linfociti e delle concentrazioni di 8-oxo-G e di 8-oxo-Guo nelle urine nei quattro gruppi di soggetti classificati sulla base della dose interna di stirene.

L'indicatore urinario 8-oxo-Guo mostrava una debole ma significativa correlazione con l'età ( $r=0,225$ ,  $p<0,020$ ) se si considera la totalità dei soggetti. Mediante il test delle correlazioni parziali, si è verificato che tale correlazione influenzava però solo parzialmente il comportamento di questo indicatore in funzione dell'esposizione. L'abitudine al fumo e il sesso non correlavano con i parametri di danno ossidativo, anche se le concentrazioni urinarie di questi indicatori erano maggiori nelle femmine rispetto ai maschi. Una possibile spiegazione è da attribuirsi al fatto che le femmine appartengono solo ai gruppi a Media e Alta Esposizione.

Gli indicatori di stress ossidativo determinati nelle urine sono risultati significativamente intercorrelati ( $p<0,0001$ ), con coefficiente di correlazione di Pearson  $r=0,626$  tra 8-oxo-G e 8-oxo-dG,  $r=0,734$  tra 8-oxo-G e 8-oxo-Guo, ed  $r=0,826$  tra 8-oxo-Guo e 8-oxo-dG. Tale comportamento veniva confermato dalla correlazione di Spearman (rispettivamente,  $\rho=0,719$ ,  $\rho=0,755$ , e  $\rho=0,857$ ,  $p<0,0001$ ). Tali correlazioni si mantenevano significative anche all'interno dei singoli gruppi. Non è stata invece riscontrata nessuna correlazione fra 8-oxo-dG/10<sup>5</sup> dG determinato nei linfociti e gli indicatori di danno ossidativo determinati nelle urine. Inoltre, considerando la totalità dei soggetti, una debole correlazione è stata riscontrata fra gli indicatori di esposizione a stirene e quelli di stress ossidativo. In particolare, nelle urine 8-oxo-Guo è risultata correlata con la somma AM+AFG ( $r=0,210$ ,  $p<0,030$ ). Le correlazioni sono state confermate mediante test di Spearman. Una debole correlazione negativa con il danno ossidativo nel sangue è stata osservata per la somma AM+AFG ( $r=-0,240$ ,  $p<0,018$ ). Lo stirene nel sangue ha evidenziato una debole correlazione positiva con 8-oxo-G urinaria ( $r=0,314$ ,  $p<0,009$ ).

#### 4.2.2.3 Polimorfismo genetico dell'hOgg1

L'enzima hOgg1 è specifico del meccanismo di riparazione del DNA per escissione di basi (BER), e presenta un'alta selettività per l'8-oxo-G accoppiata con C. Infatti, esso agisce tagliando il legame fra la guanina ossidata e lo zucchero, con 8-oxo-G come prodotto di eliminazione. Poiché è noto che il polimorfismo che determina la

sostituzione di una serina con una cisteina nel codone 326 riduce la funzionalità dell'enzima (Kohno *et al.*, 1998), le distribuzioni degli indicatori di danno ossidativo sono state valutate tenendo conto del polimorfismo genetico dell'hOgg1.

Il contenuto delle basi ossidate nei linfociti, espresso come media  $\pm$  DS del rapporto 8-oxo-dG/10<sup>5</sup>dG, è risultato significativamente inferiore nei 70 soggetti con genotipo omozigote *wild type* ("ww") rispetto ai 43 soggetti con genotipo eterozigote o mutato ( $0,35 \pm 0,02$  vs.  $0,43 \pm 0,04$ ,  $p < 0,008$ , *t*-test per dati indipendenti). Poiché nel sangue si determina la quota di guanina ossidata non riparata dall'enzima, nei soggetti con la variante "ww", la forma biologicamente più attiva, il rapporto 8-oxo-dG/10<sup>5</sup>dG è risultato significativamente più basso rispetto ai soggetti appartenenti alle altre varianti. L'ipotesi che lo stirene induca i meccanismi di riparazione del danno agli acidi nucleici trova una parziale conferma se si considerano le concentrazioni di 8-oxo-dG nei linfociti dei soli soggetti Esposti. Infatti, anche in questo sottogruppo si osservano valori mediani dei soggetti con genotipo "ww" minori rispetto a quelli con genotipo eterozigote o mutato ( $0,32 \pm 0,14$  vs.  $0,38 \pm 0,17$ ) ed in entrambi i casi i valori sono minori, seppur di poco, della totalità dei soggetti esaminati. L'assenza di significatività è da attribuirsi allo scarso numero dei soggetti con genotipo eterozigote o mutato (n=19).

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 (Rozalski *et al.*, 2005).

Considerando i soli soggetti con genotipo "ww", si è osservata una differenza significativa nelle concentrazioni urinarie di 8-oxo-G della totalità dei soggetti Esposti rispetto ai Non Esposti ( $18,73 \pm 8,01$  vs.  $14,4 \pm 4,48$   $\mu\text{g/g}$  creatinina,  $p=0,01$ , *t*-test per dati indipendenti).

Nel sottogruppo di soggetti "ww" 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. In Figura 5 sono illustrati gli andamenti di 8-oxo-dG/10<sup>5</sup> dG nei linfociti, 8-oxo-G e 8-oxo-Guo nelle urine. Nei linfociti il rapporto 8-oxo-dG/10<sup>5</sup>dG diminuisce all'aumentare dell'esposizione, anche se non in maniera significativa (ANOVA,  $p=0,082$ ).

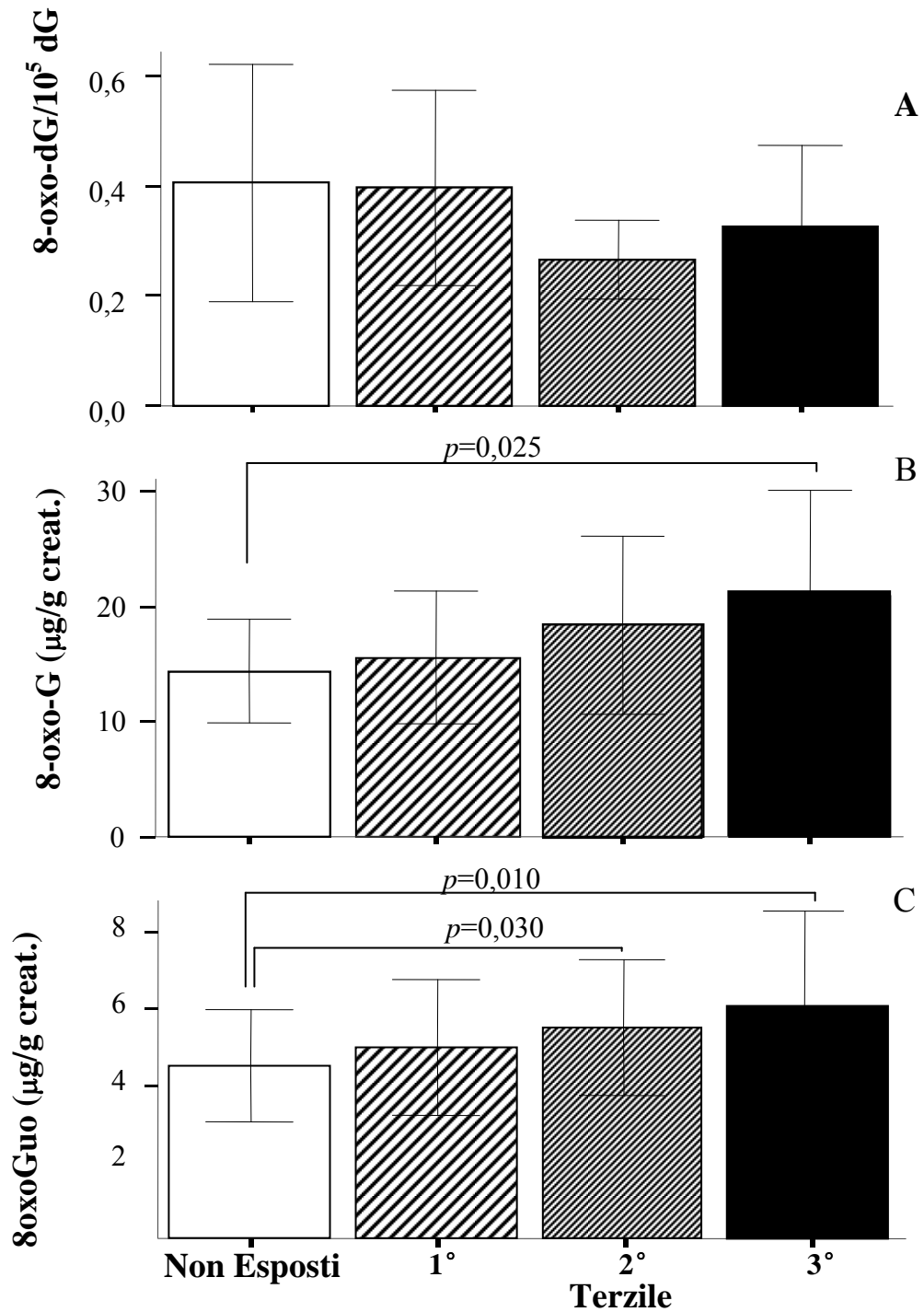


Figura 5. Andamento del rapporto 8-oxo-dG/10<sup>5</sup> dG nei linfociti (A) e delle concentrazioni urinarie di 8-oxo-G (B) e di 8-oxo-Guo (C) nei soli soggetti con genotipo “ww” e classificati in quattro gruppi sulla base della dose interna di stirene (*one-way* ANOVA, seguita da test di Tukey per confronti multipli).

Questo risultato conferma parzialmente l'ipotesi formulata in precedenza per cui l'esposizione a stirene determina stress ossidativo ma che essa induce allo stesso tempo i meccanismi di riparazione del DNA. Nelle urine le concentrazioni di 8-oxo-G e 8-oxo-Guo aumentano in maniera statisticamente significativa (ANOVA,  $p=0,029$  e  $p=0,001$  rispettivamente). Applicando il test di Tukey per confronti multipli, il Gruppo dei Non Esposti è risultato significativamente diverso dal Gruppo degli Alto Esposti per 8-oxo-G ( $p=0,025$ ); e il Gruppo dei Non Esposti dai Medio Esposto e dagli Alto Esposti per 8-oxo-Guo (rispettivamente  $p=0,030$  e  $p=0,010$ ). Non sono state invece riscontrate differenze significative tra i gruppi di soggetti esposti a crescenti concentrazioni di stirene.

Nei soli soggetti con genotipo "ww", si è osservato l'andamento complementare degli indicatori di danno nel sangue e nelle urine. All'aumentare dell'esposizione a stirene il danno nel sangue non riparato diminuisce mentre aumenta il prodotto di eliminazione specifico dell'enzima hOgg1 (8-oxo-G) nelle urine (Figura 5).

In conclusione, i risultati del presente studio dimostrano: (i) che esiste un'associazione tra l'esposizione occupazionale a stirene ed il danno ossidativo agli acidi nucleici, come dimostrato dalle correlazioni tra gli indicatori di esposizione a stirene e gli indicatori di stress ossidativo; in particolare, tra gli indicatori urinari 8-oxo-Guo sembra essere l'indicatore più sensibile 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; (iii) che l'esposizione a stirene sembra indurre i meccanismi di riparazione del danno ossidativo al DNA.

## **5. IL CONDENSATO DELL'ARIA ESPIRATA**

Il CAE è un liquido principalmente costituito da acqua, considerato rappresentativo del fluido di rivestimento broncoalveolare e si ottiene condensando l'aria esalata mediante appositi sistemi di raffreddamento. Alcuni degli analiti di interesse biologico contenuti in esso sono presenti in concentrazione molto basse e la loro determinazione richiede l'utilizzo di tecniche di rivelazione sensibili e specifiche come la spettrometria di massa.

Il CAE è una matrice di elevato interesse in quanto proviene direttamente dal polmone, organo bersaglio di molti inquinanti ambientali e occupazionali. Essendo una matrice relativamente nuova, dagli studi riportati in letteratura emergono la necessità di approfondire i meccanismi alla base della formazione del CAE e l'importanza di standardizzare le procedure per la sua raccolta. Nonostante questi aspetti non siano stati ancora del tutto chiariti, è comunque evidente l'utilità del CAE nella comprensione di meccanismi di flogosi e di insorgenza di patologie polmonari. Recentemente, la raccolta del CAE è stata suggerita anche per valutare esposizioni professionali a metalli, allargando così le possibili applicazioni di questa nuova metodologia anche al monitoraggio biologico in campo occupazionale (Goldoni *et al.*, 2004).

L'utilizzo di una tecnica altamente sensibile come la LC-MS/MS unitamente allo sviluppo di un nuovo sistema di raccolta del condensato in grado di controllare la temperatura (TURBO-DECCS), ha permesso di studiare l'influenza della temperatura di raccolta del CAE sulle concentrazioni di alcuni indicatori di effetto, in particolare MDA, 4-HNE e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Allegato 5).

E' stato inoltre possibile studiare il comportamento di questi biomarcatori in relazione ad esposizioni professionali ad agenti cancerogeni, come il cromo esavalente [Cr(VI)], o a sostanze irritanti utilizzate nel settore acconciatura, come ammoniaca, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e persolfati, che hanno come organo bersaglio il polmone.

I lavoratori del comparto della cromatura galvanica sono stati reclutati come soggetti professionalmente esposti ad agenti cancerogeni per l'uomo. In particolare, il Cr(VI) è stato classificato dalla IARC come appartenente al gruppo I (IARC, 1990) e ci sono studi in letteratura che riportano danni all'apparato respiratorio sia per esposizioni acute che per esposizioni croniche (ATSDR, 2000; De Flora, 2000; Bradshaw *et al.*, 1998). Inoltre, poiché la tossicità del Cr è legata alla sua riduzione e alla formazione di radicali liberi (De Flora, 2000), si può ipotizzare una correlazione fra l'esposizione a Cr e indicatori di infiammazione come H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e di perossidazione lipidica come MDA e 4-HNE (Allegato 6).

I lavoratori del settore acconciatura sono da considerarsi soggetti professionalmente esposti ad agenti irritanti in quanto l'esposizione prolungata e quotidiana a sostanze con elevato potenziale irritante e sensibilizzante, come H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ammoniaca e persolfati contenuti nei decoloranti, nelle tinture, nei liquidi per permanenti e nei detergenti, può associarsi ad alterazioni flogistiche ed indurre la comparsa di patologie respiratorie quali rinite o asma indotte da meccanismo irritativo od immunologico (IgE mediato o non IgE mediato) (Allegato 7).

## 5.1 Materiali e Metodi

### 5.1.1 Soggetti

Tutti i soggetti sono stati reclutati su base volontaria e hanno fornito il loro consenso informato allo studio. I singoli studi sono stati effettuati in conformità con la dichiarazione di Helsinki e sono stati approvati dal Comitato Etico dell'Università di Parma. Per ulteriori dettagli si rimanda ai singoli allegati.

#### *Studio 1: Influenza della temperatura di raccolta del CAE sugli indicatori di effetto*

Sono stati reclutati 24 soggetti volontari, sani, asintomatici e atopici, con parametri spirometrici compresi nel range di normalità, con età media di  $30 \pm 4$  anni. Per ciascun soggetto, il CAE è stato raccolto a quattro diverse temperature (-10°C, -5°C, 0°C e +5°C) scegliendo quattro diverse sequenze di temperatura di raccolta. La raccolta dei campioni è durata due settimane e per stimare la variabilità tra una sessione e l'altra a 10 soggetti è stato chiesto di raccogliere il CAE sia a -10°C che a +5°C per quattro volte consecutive.

#### *Studio 2: Lavoratori professionalmente esposti a Cromo*

*Esposti:* Sono stati reclutati 24 lavoratori di una ditta di cromatura galvanica. A ciascun soggetto è stato chiesto di raccogliere un campione di CAE in tre diversi momenti: a inizio turno del venerdì (T<sub>0</sub>), a fine turno dello stesso giorno (T<sub>1</sub>) e all'inizio turno del lunedì successivo (T<sub>2</sub>). Per il monitoraggio biologico, agli stessi tempi, è stato raccolto anche un campione estemporaneo di urina.

*Controlli:* Il gruppo dei controlli è costituito da 25 soggetti sani, non professionalmente esposti a Cr(VI); un sottogruppo di 10 controlli ha effettuato la raccolta del CAE anche in fabbrica, per stimare qualunque fonte di contaminazione presente sul posto di lavoro.

*Studio 3: Lavoratori esposti a sostanze irritanti utilizzate nel settore acconciatura*

*Esposti:* Sono stati reclutati due gruppi di soggetti: 23 lavoratori di età media  $34 \pm 11$  anni (Gruppo 1) nel loro giorno di riposo, e 12 lavoratori di età media  $34 \pm 10$  anni (Gruppo 2) durante un giorno lavorativo. *Controlli:* Il gruppo dei controlli è costituito da 18 soggetti sani di età media  $31 \pm 4$  anni, non fumatori e non professionalmente esposti ad agenti irritanti.

I soggetti appartenenti al gruppo dei Controlli e al Gruppo 1 sono stati sottoposti a prelievo venoso, raccolta del CAE, a spirometria e a misura di Fe<sub>NO</sub>. I soggetti appartenenti al Gruppo 2 sono stati sottoposti al protocollo dello studio a inizio turno (IT) ed è stato chiesto loro di ripetere a fine turno (FT) la raccolta del CAE e la misura di Fe<sub>NO</sub>. A tutti i soggetti è stato chiesto di compilare un questionario.

### 5.1.2 Modalità di raccolta del condensato dell'aria espirata

Il CAE è stato raccolto utilizzando uno strumento portatile (TURBO-DECCS, ItalChill, Parma, Italia). La procedura di raccolta consiste nel far respirare il soggetto a volume corrente per circa 10-15 minuti, attraverso un boccaglio monouso dotato di valvola unidirezionale, connesso tramite un tubo in polietilene direttamente alla provetta in cui si forma il condensato posta nel sistema elettrico refrigerante, impostato generalmente ad una temperatura di -5 °C. Al termine della procedura di raccolta, la provetta contenente il CAE viene estratta dallo strumento e conservata a -80°C fino al momento delle analisi. La contaminazione da saliva è stata esclusa mediante saggio colorimetrico per la determinazione dell' $\alpha$ -amilasi (*Infinity amylase reagent*, Sigma Milano, Italia).

### 5.1.3 Monitoraggio Ambientale

*Determinazione del Cromo ambientale*

Il particolato ambientale è stato raccolto su filtri di cloruro di polivinile, porosità 5,0  $\mu$ m e 25 mm di diametro) in accordo con il protocollo 7300 del National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH, 2003) eseguendo campionamenti in due

diversi periodi del venerdì, uno rappresentativo dell'esposizione del mattino e uno del pomeriggio. La determinazione del Cr totale è stata effettuata mediante spettroscopia ad assorbimento atomico, seguendo la procedura 886 dell'Associazione per l'Unificazione del Settore dell'Industria Chimica (UNICHIM, 1995).

#### 5.1.4 Monitoraggio Biologico

##### *Determinazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nel CAE*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stato misurato utilizzando un Kit commerciale (*Ampex Red Hydrogen Peroxide assay Kit*, Molecular Probes, Eugene, USA) con un limite di rivelazione di 0,01 µM, come descritto in precedenza (Corradi *et al.*, 2002). La determinazione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> è stata effettuata entro 2-3 giorni dalla raccolta del CAE, conservato a -80°C fino al momento dell'analisi.

##### *Determinazione delle aldeidi nel CAE mediante LC-MS/MS*

La determinazione delle aldeidi nel CAE ha richiesto la loro derivatizzazione con dinitrofenilidrazina (DNPH) prima della rivelazione mediante LC-MS/MS. Il derivatizzante (DNPH, 50 mg) è stato sciolto in 20 ml di acetonitrile ed acidificato con 0,4 ml di acido formico. La soluzione (12,6 mM) è risultata stabile per una settimana se conservata a +4°C. La derivatizzazione delle aldeidi è stata ottenuta miscelando 100 µl di EBC (o standard) con 100 µl di derivatizzante ed incubando la reazione a temperatura ambiente per 2 ore. Nella fase di sviluppo del metodo sono stati utilizzati diversi acidi organici (formico ed acetico) ed inorganici (cloridrico e perclorico), diverse temperature (fino a 70°C) e tempi di derivatizzazione, diversi rapporti analita/derivatizzante.

La determinazione delle aldeidi nel condensato dell'aria espirata è stata effettuata mediante LC-MS/MS utilizzando uno spettrometro di massa PE-Sciex a triplo quadrupolo modello API 365 dotato di una sorgente *Heated Nebulizer* per la ionizzazione chimica a pressione atmosferica (APCI). La separazione delle aldeidi derivatizzate è stata ottenuta utilizzando una colonna Supelcosil LC18-DB (75 x 4.6 mm i.d., 3 µm) e una fase mobile costituita da acido acetico (20 mM) e metanolo/acetonitrile (95/5, v/v) in gradiente di eluizione. La ionizzazione è stata ottenuta mediante tecnica APCI in modalità ioni positivi per MDA e ioni negativi per 4-HNE. La rivelazione in MS/MS è stata condotta in modalità SRM, monitorando le

transizioni caratteristiche di ciascun composto:  $m/z$  235→159 (energia di collisione, 20 eV) per DNPH-MDA e  $m/z$  335→167 (18 eV) per DNPH-4-HNE. Il metodo sviluppato è stato validato mediante lo studio dell'intervallo di linearità, la determinazione dei limiti di rivelazione e della precisione (*intra-day* e *inter-day*), come descritto in precedenza (Andreoli *et al.*, 2003).

#### *Determinazione del Cromo (Cr) nelle urine e nel CAE*

Il Cr urinario è stato determinato nei campioni di inizio e fine turno del venerdì e di inizio turno del lunedì successivo mediante spettroscopia ad assorbimento atomico (limite di rivelazione di 0,05 µg/l). I risultati ottenuti sono stati espressi in funzione della creatinina, determinata con il metodo di Jaffe. Il Cr nel CAE è stato determinato mediante spettroscopia ad assorbimento atomico. Il metodo è stato validato utilizzando la tecnica di riferimento ICP-MS disponibile in un laboratorio esterno. Il confronto dei risultati ottenuti con le due tecniche ha fornito un coefficiente di correlazione di 0,95 e una deviazione media fra i campioni inferiore al 10%.

#### 5.1.5 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. Per gli indicatori che non avevano una distribuzione normale è stato necessario effettuare la trasformazione logaritmica dei dati. Differenze tra esposti e controlli sono state valutate mediante *t*-test per dati indipendenti mentre differenze fra inizio e fine turno sono state valutate mediante *t*-test per dati appaiati. L'analisi della correlazione è stata effettuata sia mediante test parametrici (correlazione di Pearson) sia mediante test non parametrici (test di Spearman). Per ulteriori dettagli si rimanda ai singoli allegati.

## 5.2 Risultati e Discussione

### 5.2.1 Studio 1: Valutazione dell'influenza della temperatura di raccolta del condensato dell'aria espirata sugli indicatori di effetto

In Tabella 5 sono riportati i risultati espressi come media  $\pm$  DS per i dati normalmente distribuiti e come media geometrica e deviazione standard geometrica per i dati log-normali. Gli indicatori di infiammazione e di perossidazione lipidica sono espressi sia come concentrazione che come quantità assoluta, e la conducibilità è riportata sia in  $\mu\text{S}/\text{cm}$  che moltiplicandola per il volume raccolto ( $\mu\text{S}^*/\text{cm}^2$ ).

Tabella 5. Valori medi  $\pm$  DS per il volume raccolto, per le quantità assolute di  $\text{H}_2\text{O}_2$  e MDA, media geometrica [DSG] per le concentrazioni degli indicatori e per i valori di conducibilità.

Parametro <sup>a</sup>	Unità di misura	Temperatura (°C)			
		-10	-5	0	+5
Volume	$\mu\text{l}$	1095 $\pm$ 285	865 $\pm$ 244*	773 $\pm$ 223*	638 $\pm$ 242* <sup>#</sup>
$\text{H}_2\text{O}_2$	$\mu\text{M}$	0,102 [1,83]	0,110 [1,91]	0,102 [1,83]	0,123 [1,96]
	pmol	124 $\pm$ 64	108 $\pm$ 58	97 $\pm$ 55*	90 $\pm$ 54*
MDA	nM	5,56 [1,34]	6,46 [1,29]	6,57 [1,37]* <sup>#</sup>	7,06 [1,29] <sup>#</sup>
	pmol	6,24 $\pm$ 2,18	5,62 $\pm$ 1,69	5,07 $\pm$ 1,53* <sup>#</sup>	4,88 $\pm$ 1,43
Conducibilità	$\mu\text{S}/\text{cm}$	2,0 [2,36]	3,0 [3,35]	3,3 [2,87]*	5,3 [2,17] <sup>#</sup>
	$\mu\text{S}^*\text{cm}^2$	2,1 [2,39]	2,5 [3,55]	2,4 [2,63]	3,2 [2,19]

<sup>a</sup>Legenda:  $\text{H}_2\text{O}_2$ , perossido d'idrogeno; MDA, malondialdeide.

\* $p < 0,01$   $-10^\circ\text{C}$  vs.  $-5^\circ\text{C}$ ,  $-10^\circ\text{C}$  vs.  $0^\circ\text{C}$ ,  $-10^\circ\text{C}$  vs.  $+5^\circ\text{C}$ ,  $-5^\circ\text{C}$  vs.  $+5^\circ\text{C}$  per il volume,  $-10^\circ\text{C}$  vs.  $0^\circ\text{C}$ ,  $-10^\circ\text{C}$  vs.  $+5^\circ\text{C}$  per la quantità assoluta di  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e  $-10^\circ\text{C}$  vs.  $+5^\circ\text{C}$  per la MDA, sia in termini di concentrazione che di quantità assoluta e per la conducibilità; <sup>#</sup> $p < 0,05$   $0^\circ\text{C}$  vs.  $+5^\circ\text{C}$  per il volume,  $-10^\circ\text{C}$  vs.  $0^\circ\text{C}$  e  $-5^\circ\text{C}$  vs.  $+5^\circ\text{C}$  per la concentrazione di MDA,  $-10^\circ\text{C}$  vs.  $0^\circ\text{C}$  per la quantità assoluta di MDA e per la conducibilità,  $-5^\circ\text{C}$  vs.  $+5^\circ\text{C}$  per la conducibilità.

I volumi raccolti alle diverse temperature sono tutti statisticamente diversi fra loro tranne che il volume raccolto a 0°C e a -5°C. Per quanto riguarda H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, l'unica differenza in termini di concentrazioni si osserva fra le temperature -10°C e +5°C, mentre in termini di quantità assoluta si osserva un andamento decrescente all'aumentare della temperatura, con differenze significative fra -10°C vs. 0°C e -10°C vs. +5°C (p<0,01). L'andamento della MDA è confrontabile con quello di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Infatti si osservano concentrazioni significativamente differenti fra -10°C vs. +5°C e -5°C vs. +5°C (p<0,05) e fra -10°C vs. 0°C (p<0,01). Anche per la MDA all'aumentare della temperatura di raccolta si osserva una diminuzione della quantità assoluta con differenze significative fra -10°C vs. 0°C (p<0,05) e fra -10°C vs. +5°C (p<0,01). Per quanto riguarda la conducibilità differenze significative si osservano fra -10°C vs. 0°C e -5°C vs. +5°C (p<0,05) e fra -10°C vs. +5°C (p<0,01) anche se bisogna segnalare valori di deviazione standard geometrica più grandi rispetto a quelli di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA.

Correlazioni negative si osservano fra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e volume raccolto (coefficiente di correlazione di Pearson, r=-0,29, p<0,01) e fra MDA e volume raccolto (r=-0,54, p<0,01), mentre una correlazione positiva si osserva fra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA (r=0,53, p<0,01). Questo risultato suggerisce che la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e la perossidazione lipidica, di cui la MDA è un indicatore, possono essere coinvolte in processi *in vivo* in soggetti sani oltre che in soggetti con infiammazione all'apparato respiratorio.

L'analisi sui campioni dei 10 soggetti che hanno ripetuto 4 volte l'esperimento non ha evidenziato alcuna differenza statisticamente significativa per nessuno degli indicatori studiati, dimostrando la riproducibilità nel tempo della raccolta del CAE.

In conclusione, da questo studio si evince che la temperatura deve essere controllata durante la fase di raccolta e riportata per rendere confrontabili i risultati ottenuti in studi differenti; dal momento che la temperatura di raccolta influenza il volume finale e, di conseguenza, la concentrazione di alcuni analiti questa deve essere scelta sulla base delle necessità analitiche (volume complessivo richiesto, sensibilità del metodo); l'acqua è il principale fattore di diluizione e quindi il volume finale raccolto dovrebbe essere registrato ed eventualmente utilizzato come cofattore nell'analisi dei risultati; infine, la temperatura di raccolta può influenzare in maniera differente i diversi indicatori determinati sulla base della loro volatilità relativa e della loro solubilità, quindi al momento si ritiene che non possa esistere un unico fattore di normalizzazione

ma che questi debbano essere di volta in volta cercati e cambiati sulla base delle proprietà chimico-fisiche degli analiti di interesse.

### 5.2.2 Studio 2: Indicatori di effetto nel condensato dell'aria espirata di soggetti professionalmente esposti a Cromo

I risultati del monitoraggio biologico sono riportati in Tabella 6. I lavoratori presentano valori di Cr urinario e di Cr nel CAE significativamente più elevati rispetto ai controlli a tutti e tre i tempi di campionamento ( $p < 0,01$ ). I livelli di Cr urinari sono significativamente più alti nei campioni di fine turno del venerdì rispetto agli altri tempi di campionamento ( $p < 0,01$ ), mentre nel CAE la differenza è significativa solo fra fine turno del venerdì e inizio turno del lunedì successivo ( $p < 0,05$ ). Per quanto riguarda gli indicatori di effetto,  $H_2O_2$  nel CAE dei lavoratori è significativamente più alto rispetto ai livelli dei controlli ai tempi  $T_0$  ( $p < 0,05$ ) e  $T_1$  ( $p < 0,01$ ); all'interno dei tre diversi tempi di campionamento si osservano differenze fra  $T_0$  vs.  $T_2$  e  $T_1$  vs.  $T_2$  (rispettivamente  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ ) ma non fra  $T_0$  vs.  $T_1$ . Per i valori di MDA si osserva un andamento crescente in funzione dell'esposizione e rispetto ai controlli ma l'unica differenza significativa è fra  $T_1$  vs.  $T_2$  ( $p < 0,01$ ).

Tabella 6. Valori del monitoraggio biologico espressi come media geometrica [deviazione standard geometrica].

Indicatore <sup>a</sup>	Matrice	Controlli	Lavoratori		
			T <sub>0</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>
Cr (µg/g creatinina)	Urina	0,25 [2,3]	8,2 [21]**	9,4 [2,1]**,#	5,7 [2,2]**,##,§
Cr (µg/L)	CAE	0,28 [2,6]	5,3 [2,9]**	6,4 [3,4]**	2,8 [3,2]**,#,§
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (µM)	CAE	0,09 [1,6]	0,36 [2,4]*	0,59 [2,0]**	0,19 [2,6]#.§
MDA (nM)	CAE	6,0 [1,5]	8,2 [1,5]	9,7 [1,7]	6,6 [1,5]§

<sup>a</sup>Legenda: Cr, Cromo; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, perossido d'idrogeno; MDA, malondialdeide; CAE, condensato dell'aria espirata; T<sub>0</sub>, inizio turno del venerdì; T<sub>1</sub>, fine turno del venerdì; T<sub>2</sub>, inizio turno del lunedì successivo.

\* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$  Controlli vs. T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>; # $p < 0,05$  e ## $p < 0,01$  T<sub>0</sub> vs. T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>; § $p < 0,01$  T<sub>1</sub> vs. T<sub>2</sub>.

Si è osservata una debole correlazione fra il Cr determinato nelle urine e quello determinato nel CAE (coefficiente di Pearson,  $r=0,25$ ,  $p<0,05$ ), mentre una buona correlazione è stata riscontrata fra il Cr nel CAE e gli indicatori di effetto (rispettivamente  $r=0,54$ ,  $p<0,01$  per  $H_2O_2$  e  $r=0,59$ ,  $p<0,01$  per MDA). La scarsa correlazione tra il Cr urinario e quello nel CAE è da attribuirsi alle diverse cinetiche di assorbimento del Cr all'interno del corpo, alla sua diversa emivita nei diversi organi e probabilmente al fatto che il contenuto di Cr nel CAE riflette un'esposizione a breve termine mentre quello nelle urine riflette un'esposizione prolungata nel tempo. Inoltre, mentre il contributo del Cr nel CAE si può attribuire solo all'assorbimento per via inalatoria, quello del Cr urinario può derivare da più vie, incluso l'assorbimento cutaneo. Nei lavoratori esposti a Cr è stata confermata l'esistenza di una correlazione positiva fra  $H_2O_2$  e MDA ( $r=0,49$ ,  $p<0,05$ ) già osservata in precedenza su 24 soggetti sani (Allegato 5).

I risultati ottenuti in questo studio confermano un'attività tossica del Cr a danno dell'organo bersaglio e dimostrano come il CAE possa essere considerato una matrice rappresentativa di quanto avviene nel polmone, non tanto in termini di stima e valutazione dell'esposizione, data la debole correlazione con il Cr urinario, ma in quanto contiene quegli indicatori che manifestano l'insorgenza di modificazioni biologiche precoci. Infatti, sia i livelli di  $H_2O_2$  che quelli di MDA, anche se questi ultimi non in maniera significativa, aumentano nel CAE dei soggetti professionalmente esposti rispetto ai controlli e sono modulati dall'esposizione.

### 5.2.3 Studio 3: Indicatori di effetto nel condensato dell'aria espirata di soggetti professionalmente esposti a sostanze irritanti

Solo 5 soggetti sui ventitre appartenenti al Gruppo 1 hanno mostrato livelli di  $Fe_{NO}$  superiori ai valori di riferimento proposti recentemente dal nostro gruppo di ricerca in soggetti sani (3,5-20 ppb). Non sono state riscontrate differenze significative per i valori di  $Fe_{NO}$  tra IT e FT nei soggetti del Gruppo 2, anche in questo Gruppo però 5 soggetti hanno mostrato valori superiori al limite di riferimento, indipendentemente dal momento della misurazione. I risultati del monitoraggio biologico sono riportati in Tabella 7. L' $H_2O_2$  e l'4-HNE sono risultati essere significativamente superiori nei campioni di CAE sia del Gruppo 1 che del Gruppo 2 a IT rispetto ai Controlli ( $p<0,001$ )

ad indicare uno stato di infiammazione delle vie aeree che persiste nel tempo nonostante la sospensione dell'esposizione. Nessuna differenza è stata riscontrata per la MDA.

Tabella 7. Mediana e range interquartile [25°-75°] degli indicatori di effetto determinati nel CAE dei controlli (n=18), dei lavoratori nel loro giorno di riposo (Gruppo 1, n=23) e di 12 soggetti a inizio e fine turno di una giornata lavorativa (Gruppo 2, IT e FT).

Indicatore <sup>a</sup>	Controlli	Gruppo 1	Gruppo 2 (IT)	Gruppo 2 (FT)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nM)	50 [20-90]	160 [50-190] <sup>^</sup>	110 [30-280] <sup>^</sup>	560 [230-3620] <sup>**</sup>
MDA (nM)	3,9 [3,6-5,0]	4,1 [2,5-5,4]	4,1 [3,5-5,2]	5,2 [4,9-6,0] <sup>*</sup>
4-HNE (nM)	0,61 [0,49-0,78]	0,94 [0,82-1,2] <sup>^</sup>	1,1 [0,96-1,3] <sup>^</sup>	1,3 [1,1-1,4]

<sup>a</sup> Legenda: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, perossido d'idrogeno; MDA, malondialdeide; 4-HNE, 4-idossinonenale; IT, inizio turno; FT, fine turno.

<sup>^</sup>  $p < 0,001$  Controlli vs. Gruppo 1 e controlli vs. Gruppo 2 (IT) per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HNE, <sup>\*</sup>  $p = 0,024$  IT vs. FT per la MDA, <sup>\*\*</sup>  $p = 0,001$  IT vs. FT per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Analizzando i lavoratori a IT e FT, per valutare la comparsa e l'entità di eventuali effetti acuti indotti dalle sostanze utilizzate durante l'attività lavorativa, si osservano aumenti significativi a FT delle concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA (rispettivamente 560 vs. 110 nM per H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 5,21 vs. 4,12 nM per MDA,  $p < 0,03$ ). Si può ipotizzare che l'esposizione acuta ad agenti irritanti attivi dei meccanismi di infiammazione che inducano stress ossidativo portando ad un aumento temporaneo della concentrazione di MDA, aldeide derivante principalmente dal catabolismo dell'acido arachidonico e di acidi grassi con più di 3 insaturazioni. Mentre un'esposizione cronica agli stessi agenti, potrebbe attivare meccanismi di perossidazione lipidica che prediligono acidi grassi  $\omega$ -6, i quali degradandosi eliminano 4-HNE.

Dai risultati ottenuti indagando un ristretto gruppo di addetti del settore acconciatura, tramite metodiche non invasive, si è riscontrato che, pur in assenza di alterazioni della funzionalità respiratoria, sono riscontrabili nel CAE dei lavoratori iniziali alterazioni di carattere prettamente biochimico, come mostrato dal riscontro di livelli significativamente maggiori di alcuni indicatori di stress ossidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 4-HNE) nei lavoratori rispetto a soggetti non professionalmente esposti e dall'incremento di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA nei campioni di FT rispetto a quelli di IT.

## **6. CONCLUSIONI**

La riduzione dei livelli di esposizione in campo occupazionale e l'aumento dell'inquinamento ambientale hanno reso sempre meno definita la linea che separa i soggetti esposti da quelli non esposti.

Studi recenti hanno dimostrato come sia necessario un approccio interdisciplinare, peculiare delle Scienze della Prevenzione, per rispondere all'esigenza di sviluppare nuovi indicatori di esposizione, di effetto e di suscettibilità in grado di identificare e caratterizzare i meccanismi che determinano alterazioni biochimiche precoci in soggetti presumibilmente sani, quali i lavoratori esposti a basse concentrazioni di miscele complesse e variabili di tossici ambientali e occupazionali.

Questa necessità ha permesso l'ingresso nei laboratori di Tossicologia Industriale e Medicina del Lavoro, di nuove tecnologie quali la biologia molecolare e la spettrometria di massa.

In particolare, la LC-MS/MS rappresenta un valido strumento nello sviluppo di nuovi indicatori per esposizioni a basse dosi, in quanto tecnica altamente sensibile e selettiva.

Nel loro insieme, i risultati di questa Tesi dimostrano che:

- (i) nonostante si abbassino sempre di più le concentrazioni degli indicatori da determinare nelle matrici biologiche, l'elevata sensibilità della tecnica permette la quantificazione degli composti di interesse, anche se presenti in tracce, e garantisce l'affidabilità e la precisione della misura analitica;
- (ii) l'elevata selettività della LC-MS/MS permette di approfondire le conoscenze sugli indicatori di esposizione e di effetto in soggetti esposti a basse dosi di inquinanti ambientali ed occupazionali e i meccanismi che ne regolano le alterazioni;
- (iii) la LC-MS/MS può contribuire nell'identificazione e nella validazione di una nuova matrice, come il condensato dell'aria espirata, da utilizzare per il monitoraggio biologico di indicatori di esposizione e di effetto per sostanze pneumotossiche, il cui interesse principale è condizionato dall'importanza del polmone come organo bersaglio degli inquinanti aerodispersi.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

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.

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 in People Exposed to Air Pollutants. *Chromatographia*, 1999a; 50: 167-172.

Andreoli R, Manini P, Bergamaschi E, Mutti A, Franchini I, Niessen WMA. Determination of naphthalene metabolites in human urine by liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. *J Chromatogr A*, 1999b; 847: 9-17.

Andreoli R, Manini P, Corradi M, Mutti A, Niessen WMA. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003; 17: 637-645.

Andreoli R, Manini P, Mutti A, Bergamaschi E, Niessen WMA. Determination of n-hexane metabolites by liquid chromatography/mass spectrometry. 1. 2,5-hexanedione and other phase I metabolites in untreated and hydrolyzed urine samples by atmospheric pressure chemical ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1998; 12: 1410-1416.

Antczak A, Górski P. Markers of pulmonary diseases in exhaled breath condensate. *Int J Occup Med Environ Health*, 2002; 15: 317-323.

Apostoli P, Bergonzi R, Catalani S, Neri G, Sarnico M, Foà V, Fustinoni S, Colombi A, Buratti M, Campo L, Scibetta L, Cannolo N, Pieri M, Basile A, Bartolucci GB, Carrieri M, Scapellato ML, Manini P, Poli D, Corradi M, Andreoli R, Goldoni M, Mutti A, Imbriani M, Ghittori S, Maestri L, Negri S, Pira E, Pavan I, Di Scalzi G, Perbellini L. Nuovi indicatori di esposizione. *G Ital Med Lav Ergon*, 2004; 26: 278-297.

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*, 1996; 236: 184-186.

ATSDR. Final report of toxicological profile for chromium. NTIS Accession No. PB2000-108022, 2000; Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.

Bartsch H. DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship. *Mutat Res*, 1996; 340: 67-79.

Beker G, Winsel K, Beck E, Neubauer G, Stresemann E. Breath condensate as a method of noninvasive assessment of inflammation mediators from the lower airways. *Pneumologie* 1997; 51: 456-459.

Bodini A, D'Orazio C, Peroni D, Corradi M, Folesani G, Baraldi E, Assale BM, Boner A, Piacentini GL. Biomarkers of neutrophilic inflammation in exhaled air of cystic fibrosis children with bacterial airway infections. *Pediatr Pulmonol*, 2005; 40: 494-499.

Bradshaw LM, Fishwick D, Slater T, Pearce N. Chronic bronchitis, work related respiratory symptoms, and pulmonary function in welders in New Zealand. *Occup Environ Med*, 1998; 55: 150-154.

Carraro S, Folesani G, Corradi M, Zanconato S, Gaston B, Baraldi E. Acid-base equilibrium in exhaled breath condensate of allergic asthmatic children. *Allergy*, 2005; 60: 476-481.

Chevion M, Berenshtein E, Stadtman ER. Human studies related to protein oxidation: protein carbonyl content as a marker of damage. *Free Radic Res*, 2000; 33 Suppl: S99-108.

Choi BK, Hercules DM, Gusev AI. Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression. *J Chromatogr A*, 2001; 907: 337-342.

Cooke MS, Evans MD, Dizdaroglu M, Lunec J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J*, 2003; 17: 1195-1214.

Corradi M, Alinovi R, Goldoni M, Vettori MV, Folesani G, Mozzoni P, Cavazzini S, Bergamaschi E, Rossi L, Mutti A. Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone. *Toxicol Lett*, 2002; 134: 219-225.

Corradi M, Folesani G, Andreoli R, Manini P, Bodini A, Piacentini G, Carraio S, Zanconato S, Baraldi E. Aldehydes and Glutathione in Exhaled Breath Condensate of Children with Asthma Exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003; 167: 395-399.

Corradi M, Pignatti P, Manini P, Andreoli R, Goldoni M, Poppa M, Moscato G, Balbi B, Mutti A. Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Resp J*, 2004; 24: 1-7.

Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, Manini P, Caglieri A, Poli D, Alinovi R, Mutti A. Aldehydes in Exhaled Breath Condensate of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003; 167: 1380-1386.

Dalle-Donne I, Scaloni A, Giustarini D, Cavarra E, Tell G, Lungarella G, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev*, 2005; 24: 55-99.

Davey MW, Stals E, Panis B, Keulemans J, Sewnneen RL. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Anal Biochem*, 2005; 337: 201-207.

Davies MJ, Fu S, Wang H, Dean RT. Stable markers of oxidant damage to proteins and their application in the study of human disease. *Free Radic Biol Med*, 1999; 27: 1151-1163.

De Flora S. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2000; 21: 533-541.

De Palma G, Corradi M, Mutti A, Baccarelli A, Pesatori A, Albertazzi PA. Nuovi indicatori di effetto. *G Ital Med Lav Erg* 2004; 26: 302-310.

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

De Palma G, Mozzoni P, Scotti E, Manini P, Andreoli R, Naccarati A, Mercati F, Migliore L, Mutti A. Polimorfismi genetici degli enzimi della biotrasformazione ed effetti genotossici dello stirene. *G Ital Med Lav Ergon*. 2003; 25: 63-64.

de Zwart LL, Meerman JH, Commandeur JN, Vermeulen NP. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radic Biol Med*, 1999; 26: 202-226.

DFG. Deutsche Forschungsgemeinschaft, 2004. List of MAK and BAT values. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

Dwyer TM. Sampling airway surface liquid: non-volatiles in the exhaled breath condensate. *Lung*, 2004; 182: 241-250.

Effros RM, Su J, Casaburi R, Shaker R, Biller J, Dunning M. Utility of exhaled breath condensates in chronic obstructive pulmonary disease: a critical review. *Curr Opin Pulm Med*, 2005; 11: 135-139.

Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*, 2004; 567: 1-61.

Gadberry MG, DeNicola DB, Carlson GP. Pneumotoxicity and hepatotoxicity of styrene and styrene oxide. *J Toxicol Environ Health*, 1996; 48: 273-294.

Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, Bergonzi R, Apostoli P, Mutti A. Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten. *Environ Health Perspect*, 2004; 112: 1293-1298.

Hu CW, Wu MT, Chao MR, Pan CH, Wang CJ, Swenberg JA, Wu KY. Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry and by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004; 18: 505-510.

Hunt J. Exhaled breath condensate: an evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin Immunol*, 2002; 110: 28-34.

IARC International Agency for Research on Cancer) 1982. Benzene in: Some Industrial Chemicals and Dyestuffs IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, vol. 29, 93-148.

IARC (International Agency for Research on Cancer) 1990. Chromium, Nickel and Welding. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum, 1009; 49: 1-677.

Ito S, Tsukada K. Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins. *J Chromatogr A*, 2002; 943: 39-46.

Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res*, 1997; 387: 147-163.

Kharitonov SA, Barnes P. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath. *Biomarkers*, 2002; 7: 1-32.

Kohno T, Shinmura K, Tosaka M, Tani M, Kim SR, Sugimura H, Nohmi T, Kasai H, Yokota J. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene*, 1998; 16: 3219-3225.

Lärstad M, Ljungkvist G, Olin AC, Toren K. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2002; 766: 107-114.

Lärstad M, Soderling AS, Caidahl K, Olin AC. Selective quantification of free 3-nitrotyrosine in exhaled breath condensate in asthma using gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Nitric Oxide*, 2005; 13: 134-144.

Lauwerys R. Basic concepts of monitoring human exposure. *IARC Sci Publ*. 1984; 59: 31-6.

Lim CK, Lord G. Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis. *Biol Pharm Bull*, 2002; 25: 547-57.

Maestri L, Ghittori S, Imbriani M. Determination of urinary mercapturic acids of styrene in man by HPLC with fluorescence detection. *J Chromatogr B*, 1996; 687: 387-394.

Manini P, Andreoli R, Bergamaschi E, De Palma G, Mutti A, Niessens WMA. A New Method for the Analysis of Styrene Mercapturic Acids by Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2000; 14: 2055-2060.

Manini P, Andreoli R, Mutti A, Bergamaschi E, Franchini I. Determination of free and glucuronated hexane metabolites without prior hydrolysis by liquid- and gas-chromatography coupled with mass spectrometry. *Toxicol Lett*, 1999; 108: 225-231.

Manini P, Andreoli R, Mutti A, Bergamaschi E, Niessen WMA. Determination of n-hexane metabolites by liquid chromatography/mass spectrometry. 2. Glucuronide-conjugated metabolites in untreated urine samples by electrospray ionization. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1998; 12: 1615-1624.

Manini P, Andreoli R, Niessen WMA. Liquid chromatography-mass spectrometry in occupational toxicology: a novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals. *J Chromatogr A*, 2004; 1058: 21-37.

Manini P, Andreoli R, Poli D, De Palma G, Mutti A, Niessen WMA. Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry characterization of styrene metabolism in man and in rat. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2002; 16: 2239-2248.

Manini P, Buzio L, Andreoli R, Goldoni M, Bergamaschi E, Jakubowski M, Vodicka P, Hirvonen A, Mutti A. Assessment of biotransformation of the arene moiety of styrene in volunteers and occupationally exposed workers. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2003; 189: 160-169.

Manini P, De Palma G, Andreoli R, Goldoni M, Mutti A. Determination of urinary styrene metabolites in the general Italian population by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int Arch Occup Environ Health*, 2004; 77: 433-436.

Marczynski B, Peel M, Baur X. New aspects in genotoxic risk assessment of styrene exposure – a working hypothesis. *Medical Hypotheses*, 2000; 54: 619-623.

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*, 1997; 71: 496-500.

Marquet P. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology. *Ther Drug Monit*, 2002; 24: 255-276.

Montuschi P, Corradi M, Ciabattini G, Nightingale J, Kharitonov SA, Barnes PJ. Increased 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, in exhaled condensate of asthma patient. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999; 160: 216-220.

Mutti A. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. *Toxicol Lett*, 1999; 108: 77-89.

Mutti A. Use of intermediate end-points to prevent long-term outcomes. *Toxicol Lett*, 1995; 77: 121-125.

NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health) 2003. NIOSH method 7703: Hexavalent Chromium by Field-Portable Spectrophotometry. Available: <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/7703.pdf> [accessed 10 July 2005].

Nowak D, Kasielski M, Antczak A, Pietras T, Bialasiewicz P. Increased content of thiobarbituric acid-reactive substances and hydrogen peroxide in the expired breath condensate of patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: no significant effect of cigarette smoking. *Respir Med*, 1999; 93: 389-396.

Nunomura A, Honda K, Takeda A, Hirai K, Zhu X, Smith MA, Perry G. Oxidative damage to RNA in neurodegenerative diseases. *J Biomed Biotechnol*, 2006; 3: 82323.

Perbellini L, Buratti M, Fiorentino ML, Fustinoni S, Pasini F, Magnaghi S. Matrix interferences in the analysis of benzene in urine. *Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999; 724: 257-264.

Peter H, Marczynski B, Karels H, Goergens HW. Stereochemical influences in the reaction of chiral epoxides with nucleic acids indicate different genotoxic potential of the enantiomers. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1991; 117: S12.

Pilger A, Rüdiger HW. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health*, 2006; 80: 1-15.

Rahman I, Kelly F. Biomarkers in breath condensate: a promising new non-invasive technique in free radical research. *Free Radic Res*, 2003; 37: 1253-1266.

Rozalski R, Siomek A, Gackowski D, Foksinski M, Gran C, Klungland A, Olinski R. 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*, 2005; 37: 1331-1336.

Scheidler L, Menke HG, Schwulera U, Inacker O, Hammerle H. Detection of nonvolatile macromolecules in breath. A possible diagnostic tool? *Am Rev Respir Dis*, 1993; 148: 778-784.

Sforza S, Dall'Asta C, Moseriti A, Galaverna G, Dossena A, Marchelli R. Alternate Isotope-Coded Derivatization Assay: an isotope dilution method applied to the quantification of zearalenone in maize flour. *Angew Chem Int Ed*, 2005; 44: 5126-5129.

Sinsheimer JE, Chen R, Das SK, Hooberman BH, Osorio S, You Z. The genotoxicity of enantiomeric aliphatic epoxides. *Mutat Res*, 1993; 298: 197-206.

Slupphaug G, Kavli B, Krodan HE. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mut Res*, 2003; 531: 231-251.

Sørensen M, Poole J, Autrup H, Muzyaka V, Jensen A, Loft S, Knudsen LE. Benzene exposure assessed by metabolite excretion in Estonian oil shale mineworkers: influence of glutathione s-transferase polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004; 13: 1729-1735.

Stark G. Functional consequences of oxidative membrane damage. *J Membr Biol*, 2005; 205: 1-16.

Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci*, 2005; 10: 1881-1896.

UNICHIM (Associazione per l'Unificazione del Settore dell'Industria Chimica. 1995. 886: Ambienti di Lavoro – Determinazione di Nichel, Manganese e Cromo nei Fumi di Saldatura – Metodo con Spettrometro ad Assorbimento Atomico con Fornetto di Grafite. Disponibile on-line all'indirizzo: [http://www.unichim.it/htm/pagine\\_publicazioni/pagina\\_iniziale\\_publicazioni.htm](http://www.unichim.it/htm/pagine_publicazioni/pagina_iniziale_publicazioni.htm) [accessibile 15 Ottobre 2005].

Vodicka P, Bastlová T, Vodicková L, Peterková K, Lambert B, Hemminki K. Biomarkers of styrene exposure in lamination workers: levels of O<sup>6</sup>-guanine DNA adducts, DNA strand breaks and mutant frequencies in the hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase gene in T-lymphocytes. *Carcinogenesis*, 1995; 16: 1473-1481.

WHO 1993, WHO Environmental Health Criteria 155. Biomarkers and risk assessment, concepts and principles. ICPS, Geneva.

Wolf FI, Torsello A, Covacci V, Fasanella S, Montanari M, Boninsegna A, Cittadini A. Oxidative DNA damage as a marker of aging in WI-38 human fibroblasts. *Exp Gerontol*, 2002; 37: 647-656.

Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta*, 2004; 339: 1-9.

Zhang X, Wu RS, Fu W, Xu L, Lam PK. Production of reactive oxygen species and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in KB cells co-exposed to benzo[a]pyrene and UV-A radiation. *Chemosphere*, 2004; 55: 1303-1308.

Zurek G, Karst U. 2,4-Dinitro-3,5,6-trideuterophenylhydrazones for the quantitation of aldehydes and ketones in air samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2000; 869: 251-259.

## **8. ELENCO ALLEGATI**

- ALLEGATO 1: Negri S, Maestri L, **Andreoli R**, Manini P, Mutti A, Ghittori S. Mercapturic acids of styrene in man: comparability of the results obtained by LC/MS/MS and by HPLC-fluorimeter, and stability of samples under different storage conditions. *Toxicol Lett*, 2006; 162; 225-233.
- ALLEGATO 2: **Andreoli R**, Manini P, Sforza S, Dall'Asta C, Galaverna G, Mutti A, Niessen WMA. Evaluation of Alternate Isotope-coded Derivatization Assay (AIDA) to the LC-MS/MS analysis of aldehydes in exhaled breath condensate. *Manoscritto in preparazione*.
- ALLEGATO 3: 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 drivers. *Toxicol Lett*, 2006; 167: 142-151.
- ALLEGATO 4: **Andreoli R**, Manini P, Alinovi R, Goldoni M, De Palma G, Mutti A. Importanza della valutazione cronobiologica degli indicatori di effetto per una corretta strategia di campionamento. *G Ital Med Lav Ergon*, 2005; 27(3): 318-321.
- ALLEGATO 5: Goldoni M, Caglieri A, **Andreoli R**, Poli D, Manini P, Vettori MV, Corradi M, Mutti A. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulmonary Medicine*, 2005; 5: 10-19.
- ALLEGATO 6: Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, **Andreoli R**, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A. The Effect of Inhaled Chromium on Different Exhaled Breath Condensate Biomarkers among Chrome-plating Workers. *Environmental Health Perspectives*, 2006; 114: 542-546.
- ALLEGATO 7: Corradi M, Jordana Sanchez M, Acampa O, Caglieri A, Goldoni M, **Andreoli R**, Manini P, Mutti A. Valutazione non invasiva della patobiologia polmonare in una coorte di lavoratori del settore acconciatura. *Med Lav*, 2008; 99: 49-57.

## **ALLEGATO 1**

**Mercapturic acids of styrene in man: comparability of the results obtained by LC/MS/MS and by HPLC-fluorimeter, and stability of samples under different storage conditions.**

Negri S, Maestri L, **Andreoli R**, Manini P, Mutti A, Ghittori S.

Toxicol Lett, 2006; 162; 225-233.

# Mercapturic acids of styrene in man: Comparability of the results obtained by LC/MS/MS and by HPLC-fluorimeter, and stability of samples under different storage conditions

Sara Negri<sup>a,\*</sup>, Luciano Maestri<sup>a</sup>, Roberta Andreoli<sup>b</sup>,  
Paola Manini<sup>b</sup>, Antonio Mutti<sup>b</sup>, Marcello Imbriani<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Research Laboratory on Airborne Pollutants, LabS-MEIA, Salvatore Maugeri Foundation, IRCCS, Via Ferrata 8, 27100 Pavia, Italy

<sup>b</sup> Laboratory of Industrial Toxicology, University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy

<sup>c</sup> Section of Occupational Health, Department of Preventive, Occupational and Community Medicine, University of Pavia, Italy

Available online 19 October 2005

## Abstract

Two analytical methods (HPLC-fluorimeter [HPLC-FLD] and tandem mass spectrometry LC/MS/MS) are available to assay phenyl-hydroxyethylmercapturic acids (PHEMAs), the mercapturic acids of styrene in humans. In the past, each method was used to check different populations of subjects, but until now no attempt has been made to compare the two methods. This study was designed to verify whether the two methods actually give comparable results. The influence of different conditions of sample storage in altering the concentration of PHEMAs was also investigated. Urine samples were collected at the beginning and at the end of the workshift from 10 workers exposed to different levels of styrene. Each sample was analysed both by LC/MS/MS after storage under different conditions (respectively, at  $-20$  and  $+4$  °C, and after repeated freezing–thawing cycles), and by HPLC-FLD (in the same conditions of storage).

Strong correlations were found between the two methods both for total PHEMAs and for each of the isomers measured, including the minor (*S,R*)-M1. Also an alternative approach, the Bland–Altman test, confirmed the agreement between the two methods. The different storage conditions tested did not decrease the concentration of PHEMAs but, surprisingly, a clear trend to increase was shown, particularly for (*R,R*)-M1, (*S,R*)-M2 and (*R,R*)-M2 in samples stored at  $+4$  °C for 1 week. In conclusion, the study demonstrates that the methods give comparable results. Indirectly, this confirms also the main characteristics of PHEMAs, showed in the previous experiments: low biotransformation rates of styrene into PHEMAs; large inter-individual variability; and the presence of a clear preference in the excretion of the isomers deriving from (*S*)-styrene oxide. PHEMAs appear stable under different storage conditions, but further studies are needed to explain the increase of levels that occurs when samples are not kept frozen. To avoid pre-analytical errors, samples collected for biomonitoring or research purposes should be frozen as soon as possible, and thawed only one time just before the analysis.

© 2005 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Styrene; Mercapturic acids; HPLC; Mass spectrometry; Inter-lab control

## 1. Introduction

Styrene is an important chemical used in many applications including reinforced plastics, latex paints and coating, synthetic rubbers and polyester resins. Though there is a potential of environmental exposure from

\* Corresponding author. Tel.: +39 0382 592345;  
fax: 39 0382 592072.

E-mail address: [snegri@fsm.it](mailto:snegri@fsm.it) (S. Negri).

ambient air, food or drinking water, the most substantial human exposure to styrene occurs in occupational settings (Murphy et al., 1992).

Styrene is a volatile compound entering the body mainly through the lungs or skin (Dutkiewicz and Tyras, 1968). The initial step of its metabolism is conversion to styrene-7,8-epoxide (SO) by hepatic cytochrome P-450 (Jenkins and Fennell, 1994). SO is present in two distinct enantiomeric forms, namely (*R*)(+)-SO and (*S*)(-)-SO (Watabe et al., 1981). SO is considered directly responsible for some toxic effects of styrene because is an electrophilic intermediate and it is able of binding to macromolecules just as proteins and DNA (Vodicka and Hemminki, 1988). The main subsequent detoxification process of SO involves two different metabolic pathways (Jenkins and Fennell, 1994). In the major pathway, SO is hydrolysed to styrene glycol (SG) and further metabolised into the urinary metabolites mandelic acid (MA), phenylglyoxylic acid (PGA), benzoic acid and hippuric acid; MA and PGA are commonly used in the biological monitoring of exposure to styrene. In the minor pathway, SO is conjugated with glutathione (GSH) and gives origin to the urinary mercapturic acid of styrene (PHEMAs): *N*-acetyl-*S*-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cysteine (M1) and *N*-acetyl-*S*-(2-phenyl-2-hydroxyethyl)-*L*-cysteine (M2) which are regioisomers, each existing in two diastereoisomeric forms, respectively (*R,R*) and (*S,R*) (Ghittori et al., 1997; Manini et al., 2002a). The biotransformation rate of styrene into mercapturic acid in man is constantly <1%, hence the urinary levels of PHEMAs are low even after heavy exposure to styrene (Manini et al., 2002b).

The determination of urinary PHEMAs has been proposed by Ghittori et al. (1997) as a complementary approach to styrene biological monitoring but these authors observed large inter-individual variations in urinary excretion of these metabolites. This variability seems due to the polymorphism of glutathione-*S*-transferase (GSTM1+ or GSTM1null) whose genotyping is absolutely necessary when considering PHEMAs in a biological monitoring program (Haufrond et al., 2001,2002; De Palma et al., 2001; Manini et al., 2002b). The measurement of such low levels of these analytes in a dirty matrix like urine involves the use of sensitive and selective analytical methods. Until now only two methods have been developed for dosing PHEMAs. The first one (Maestri et al., 1996) involves the use of high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD); the method needs a chromatographic clean-up of samples, followed by enzymatic deacetylation of PHEMAs and their conversion to fluorescent

*o*-phthalaldehyde derivatives: by this procedure, it is possible to measure separately three of the four isomers of PHEMAs, namely (*R,R*)-M1, (*S,R*)-M1, and M2 [dosed as the sum of the (*S,R*)- and (*R,R*)-isomers]. The second method (Manini et al., 2000) is more recent and takes advantages of the unique characteristics of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS): this method allows the complete resolution of the diastereoisomeric pattern and the determination of urinary concentrations of all four isomers, without any sample treatment. Until now no attempt was made to compare the results obtained by applying both the analytical procedure to the same cohorts of subjects. In view of the possible use of PHEMAs as biomarker of exposure to styrene, it is important to assess standard procedures for the collection and storage of samples: generally, it is well known that an incorrect storage of samples could give origin to a certain degree of analyte decomposition or to an alteration of the urinary matrix, that could be responsible for the unusual presence of by-products.

The aim of the present work was to compare the results obtained by applying two analytical methods (HPLC-FLD and LC/MS/MS) to the same urine samples, in such a way as to perform an inter-laboratory control of the data present in the scientific literature concerning the measurement of PHEMAs.

This control seems particularly proper to assure the comparability of the results coming from the studies already carried out independently by means of the two methods, and for future researches.

Another aim was to study the behaviour of PHEMAs in samples stored for 1 week under different conditions of temperature, to find out the best storage conditions. Such information will be particularly useful in the case that PHEMAs will be used for biomonitoring purposes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Analytical techniques

Details on the analytical methods used for the measurement of urinary PHEMAs have been published previously (Maestri et al., 1996; Manini et al., 2000).

Briefly, Lab. 1 performed the analysis using a system consisting of a Waters (Milford, MA, USA) 600E pump, equipped with a Hypersil C18 column (250 mm × 4.6 mm i.d., 3 μm), and connected to a Jasco (Tokyo, Japan) 820-FP spectrofluorometer and a Waters 484 UV detector (for the purification of the samples).

Sample clean-up was realised as follows: a 100 μL volume of filtered and acidified urine was injected onto the chromatographic system equipped with a Water Resolve C<sub>18</sub> precolumn;

the mobile phase consisted of a water– (adjusted to pH 3.0 with H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) methanol (82:18, v/v) mixture delivered at a flow rate of 2 mL/min. To each purified sample that was collected between 0.7 and 1.15 min, a solution containing 42,000 U/mL of acylase I in 0.5 M phosphate buffer (pH 7.0) was added. After 16 h at 37 °C, samples were deproteinised by centrifugal ultrafiltration and then an aliquot was derivatised with a fluorescent reagent (*o*-phthaldialdehyde/mercaptoethanol) for 5 min and injected onto the HPLC apparatus. Separation was performed at 35 °C by gradient elution with solvent A (acetate buffer, 0.05 M, pH 6.5) and solvent B (methanol), delivered at different proportions. The fluorimetric detector was set at 330 nm for excitation and 440 nm for emission. The limit of detection (LOD) of this method was 8 µg/L for each isomer of PHEMAs (at the signal-to-noise ratio = 3), and the limit of quantification (LOQ = 3 × LOD) was about 24 µg/L.

Lab. 2 realised the analysis using a system consisting of an Applied Biosystems-Sciex API 365 triple–quadrupole mass spectrometer (Sciex, Concord, Canada). Briefly, PHEMAs were separated on a Supelcosil™ LC18-DB column (75 mm × 3.0 mm i.d., 3 µm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) using variable proportion of 20 mM aqueous formic acid (pH 3.0) and methanol at a flow-rate of 0.5 mL/min. Analytes were ionised by ESI in negative-ion mode (electrospray voltage, –3800 V; orifice voltage, –30 V) and detection was performed in selected reaction monitoring (SRM) mode following the transition characteristic of all mercapturic acids, *m/z* 282 → 153. The LOD of the method was 1.0 µg/L (LOQ = about 3 µg/L) for (*S,R*)-M1 and 0.7 µg/L (LOQ = about 2.1 µg/L) for the other isomers.

## 2.2. Collection, storage and treatment of urine samples

Ten subjects, already examined in previous studies and known to be occupationally exposed to different levels of styrene, were selected. For each subject two urinary samples were collected (both on Wednesday): one sample at the beginning, and the other one at the end of the same workshift. This scheme of sample collection was chosen because it assured to obtain samples with different concentrations of PHEMAs. As soon as the 20 samples were collected, they were divided into six aliquots and immediately frozen: one laboratory (Lab. 1) held three aliquots, and the remaining three were packed in dry ice and sent to the other laboratory (Lab. 2).

A further common scheme of sample storage and treatment was applied by the two laboratories: one aliquot of each sample (aliquot A) was thawed and then stored at +4 °C for 1 week just before the analysis; one other aliquot of each sample (aliquot B) underwent four freezing–thawing cycles; and the third aliquot of each sample (aliquot C) was taken frozen and was thawed one time just before the analysis (this was regarded as the “reference” aliquot).

After the above storage and treatment, samples were dosed by means of HPLC-FLD (Lab. 1) and by LC/MS/MS (Lab. 2).

## 2.3. Statistical analysis

For the comparison of the results obtained by the two analytical methods, two kinds of approach were followed. A regression analysis was performed to calculate the equation of the linear regression line and the Pearson correlation coefficient; data were also plotted in *X–Y* graphs. As an alternative approach, a Bland–Altman test was performed by plotting the residuals between the two methods versus the mean values of each couple of measurement (Bland and Altman, 1986).

## 3. Results

The concentrations of total PHEMAs (sum of all isomers) measured in the whole set of samples were found to range between 14 and 1990 µg/L (mean = 529.8 µg/L), the (*R,R*)-M1 isomer ranged between 3 and 979 µg/L (mean = 179.4 µg/L), the (*S,R*)-M1 isomer ranged between <1 and 60 µg/L (mean = 13.8 µg/L); the concentrations of the M2 regioisomer [sum of the two (*R,R*)- and (*S,R*)-diastereoisomers] were comprised between 9 and 1496 µg/L (mean = 336.5 µg/L).

Since the concentration of PHEMAs was modified by different sample treatment (see below), we decided to consider the results of all the 60 samples for the comparison of the two analytical methods. The equation of the regression lines, as well as the Pearson correlation coefficient (*r*) and the statistical significance (*p*-values) are summarised in Table 1. The regression analysis showed high correlation between the two series of data (*r* ≥ 0.90, *p* < 0.0001); the slopes of the lines were comprised in the range 0.90–1.01. Figs. 1 and 2 show the diagrams obtained by plotting the data on *X–Y* graphs.

The diagrams obtained by the Bland–Altman test are reported in Fig. 3. Further elaboration of the data was performed in order to obtain more information

Table 1

Equation of the regression lines, Pearson correlation coefficient (*r*) and statistical significance (*p*) of the comparison between the results obtained by HPLC-FLD and LC/MS/MS

Compound	Equation of the regression line	<i>r</i>	<i>p</i>
Total PHEMAs (sum of all isomers)	$Y = 0.96X + 78.51$	0.984	<0.0001
( <i>R,R</i> )-M1	$Y = 1.01X + 31.64$	0.972	<0.0001
( <i>S,R</i> )-M1	$Y = 0.91X + 7.49$	0.901	<0.0001
M2 [sum of ( <i>S,R</i> )-M2 and ( <i>R,R</i> )-M2] <sup>a</sup>	$Y = 0.90X + 31.34$	0.986	<0.0001

*X*, results obtained by LC/MS/MS; *Y*, results obtained by HPLC-FLD.

<sup>a</sup> Owing to the fact that the HPLC-FLD method did not allow to separate the diastereoisomers of M2, only the sum of their concentrations can be given for comparative purposes, even if the LC/MS/MS method was able to dose (*S,R*)-M2 and (*R,R*)-M2.

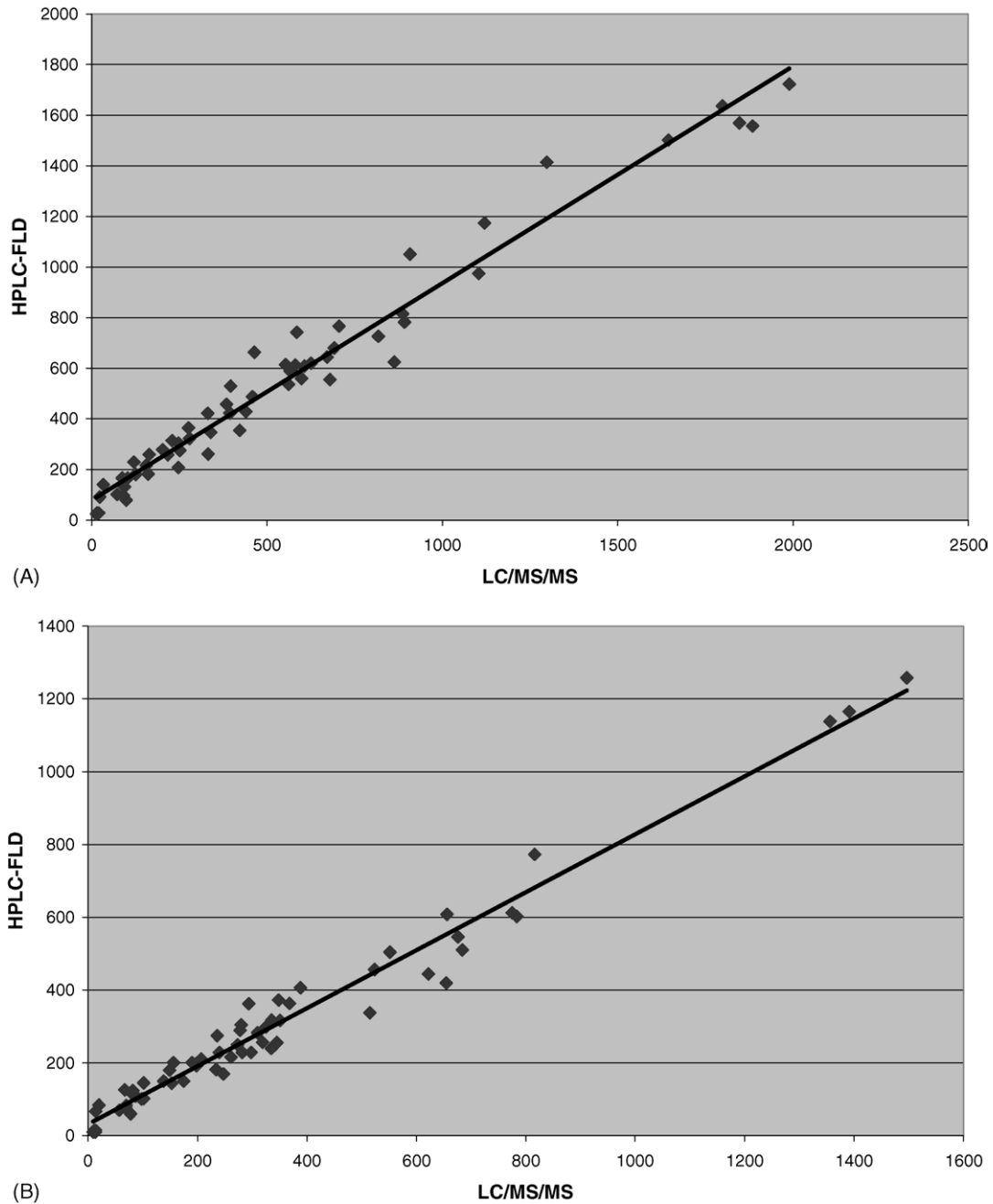


Fig. 1. Correlation diagrams between the results obtained by applying LC/MS/MS (X-axis) and HPLC-FLD (Y-axis) to the measurement of: (A) total PHEMAs (sum of all the isomers); (B) the M2 regioisomer [sum of the (*S,R*)- and (*R,R*)-isomers]. Further details on the regression lines and the degree of correlation are given in Table 1.

about the agreement of the two methods. To verify the impact of the discrepancies between the methods on the results of measurements, we calculated the mean and the standard deviation of the differences (residuals) at two levels for each isomer and for total PHEMAs. The results were the following: (i) for total

PHEMAs, at the “low” level (<500  $\mu\text{g/L}$ , mean concentration = 393  $\mu\text{g/L}$ ), the mean difference (Md) was  $-42 \mu\text{g/L}$  ( $-10.7\%$ ) and the standard deviation of the differences (Sd) was 57.8  $\mu\text{g/L}$  (14.7%); at the “high” level (>1200  $\mu\text{g/L}$ , mean concentration = 1655  $\mu\text{g/L}$ ), Md = 128  $\mu\text{g/L}$  (10.7%) and Sd = 116  $\mu\text{g/L}$  (9.7%).

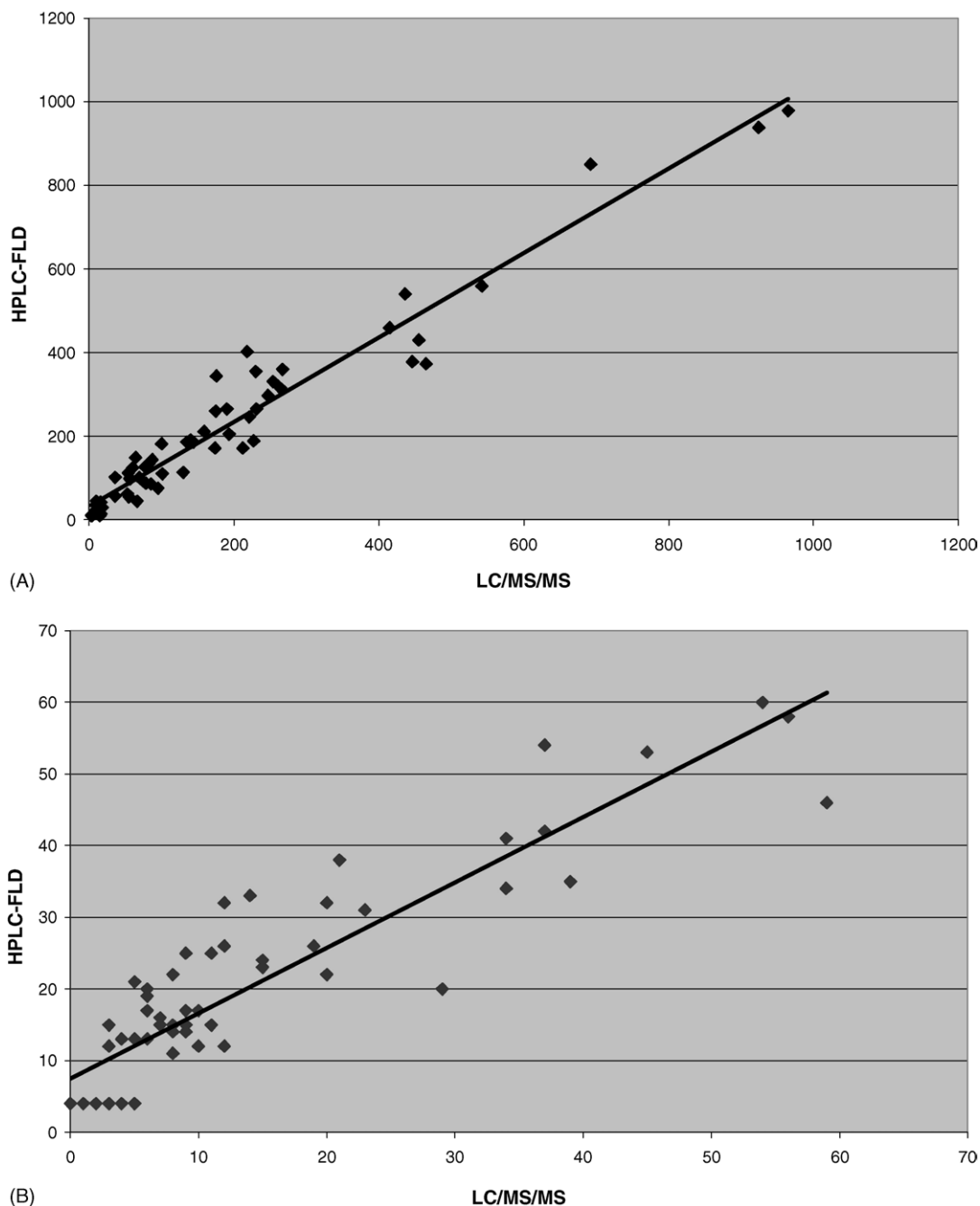


Fig. 2. Correlation diagrams between the results obtained by applying LC/MS/MS (X-axis) and HPLC-FLD (Y-axis) to the measurement of the single diastereoisomers of M1. (A) (R,R)-M1; (B) (S,R)-M1. Further details on the regression lines and the degree of correlation are given in Table 1.

(ii) For the M1 isomer, at the “low” level (<300  $\mu\text{g/L}$ , mean concentration = 154  $\mu\text{g/L}$ ), Md = -29  $\mu\text{g/L}$  (-18.6%) and Sd = 32  $\mu\text{g/L}$  (20.7%); at the “high” level (>600  $\mu\text{g/L}$ , mean concentration = 852  $\mu\text{g/L}$ ), Md = 55  $\mu\text{g/L}$  (-6.5%) and Sd = 74  $\mu\text{g/L}$  (8.7%). (iii) For the M2 isomer, at the “low” level (<400  $\mu\text{g/L}$ , mean

concentration = 190  $\mu\text{g/L}$ ), Md = 2  $\mu\text{g/L}$  (-1.1%) and Sd = 40  $\mu\text{g/L}$  (21.1%); at the “high” level (>700  $\mu\text{g/L}$ , mean concentration = 1183  $\mu\text{g/L}$ ), Md = 188  $\mu\text{g/L}$  (15.9%) and Sd = 93.5  $\mu\text{g/L}$  (7.9%).

Since the two analytical methods gave comparable results, and LC/MS/MS allowed to measure all four

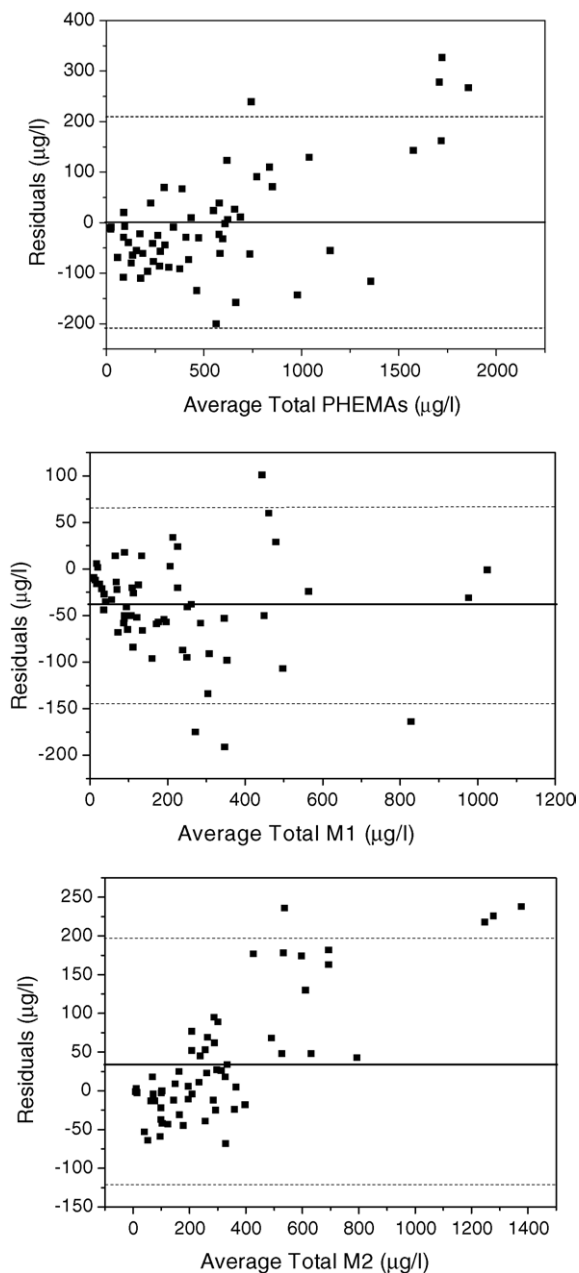


Fig. 3. Bland–Altman graph of the comparison between LC/MS/MS and HPLC-FLD techniques for the measurements of total PHEMAs (top), and of the M1 regioisomer (middle) and of the M2 regioisomer (bottom) in 60 urine samples. Continuous line = mean deviation between the two methods; dashed lines = mean  $\pm 2 \times$  S.D.

isomers with a better sensitivity than HPLC-FLD, only the data obtained with the former method were used to evaluate the effects of different protocols for sample storage and treatment. The concentrations of PHEMAs measured in aliquots A and B were compared with the results of aliquot C (regarded as the “reference storage

conditions”). The results of this comparison, expressed as the mean percentage of the relative differences of each sample, are summarised in Table 2. The two storage conditions gave origin to different changes in the concentration of PHEMAs: taken the data as a whole, treatment A (1 week at  $+4^\circ\text{C}$ ) produced a more pronounced effect than treatment B (four freezing–thawing cycles). Even under the same storage condition, however, the isomers of PHEMAs showed different behaviours: in particular, (S,R)-M1 was the only isomer that decreased both after storage in refrigerator and after repeated freezing–thawing.

#### 4. Discussion

It is generally accepted that the accuracy of any experimental result is affected by a degree of uncertainty that depends on the method actually used for the measurement. The characteristics of the analytical method (mainly sensitivity, linearity of the response, repeatability and selectivity) may influence the trueness and the reliability of data collected from experimental researches and from monitoring programs, leading even to wrong conclusions on the results of the experiment or on the level of a pollutant, respectively. Only when two (or more) independent methods applied to the same samples (or kind of samples) give comparable results, one could be reasonably sure that the measured analyte levels are sufficiently near to the “true” values.

Till now, only two methods have been successfully used for the determination of styrene-derived mercapturic acids (PHEMAs) in human samples, owing to their low urinary concentrations even after occupational exposure. These two methods (HPLC-FLD and LC/MS/MS) are rather different. The HPLC-FLD method (Maestri et al., 1996) needs a complicated sample clean-up and subsequent modification of the chemical structure of the analytes (deacetylation and derivatization with *o*-phthalaldehyde/mercaptoethanol) to give fluorescent derivatives. Each of the above steps may be a possible source of errors: the purification could not be effective for all samples and its recovery could vary; the enzymatic reaction could be reduced by inhibitors randomly present in some samples; and finally, the derivatization could give a non-linear signal, owing to the presence of an excessive concentration of analytes or, more frequently, to the presence of other compounds that can react with the labelling reagent or can act as “quencher” of fluorescence. With respect to sample preparation, the second LC/MS/MS-based method (Manini et al., 2000) seems much simpler, since it does not require any sample treatment apart from the filtration and acidification of urine,

Table 2  
Influence of sample storage and treatment on the urinary concentration of PHEMAs

Compound	Treatment A (1 week at +4 °C) (%)	Treatment B (repeated freezing and thawing) (%)
( <i>R,R</i> )-M1	+21.5	+8.3
( <i>S,R</i> )-M1	−8.0	−12.3
Total M1 [sum of ( <i>R,R</i> )- and ( <i>S,R</i> )-isomers]	+18.9	+5.3
( <i>S,R</i> )-M2	+16.9	+5.2
( <i>R,R</i> )-M2	+12.5	+2.3
Total M2 [sum of ( <i>R,R</i> )- and ( <i>S,R</i> )-isomers]	+17.5	+4.3
Total PHEMAs (sum of all isomers)	+18.0	+4.7

so that there are few possible sources of errors. Moreover, the use of tandem mass spectrometry detection assures a unique and high selectivity; for this reason, it was regarded as the reference method in the present work. Nevertheless, this method cannot be assumed absolutely free from possible errors, especially when used for quantitative purposes at very low analyte levels. Recent studies demonstrated that LC/MS/MS is susceptible to the matrix effect (King et al., 2000), that is the interference of co-eluting compounds, which may diminish the efficiency of the ionization of the analytes, giving rise to a signal lower than expected. This effect can be very important when the analyte has to be measured in a complex matrix (like urine), and when to increase the sensitivity, the sample is not diluted prior to the analysis: this was exactly the case of the measurement of urinary PHEMAs in man.

Up to now, no attempt has been made to check whether the two methods give comparable results in the determination of PHEMAs: this seems important in view of the possible use of each method for the realization of researches on the excretion of these metabolites and on the possible influence of genotype, but also for any suggested application in the field of the biological monitoring of the exposure to styrene (Ghittori et al., 1997). In order to perform a suitable inter-laboratory (and inter-method) control, some precautions must be taken so as to avoid systematic errors. First of all, we collected samples from a cohort of subjects known to be exposed to different doses of styrene; then, we collected not only post-shift but also pre-shift urines, in order to obtain samples with a broad range of PHEMA concentrations. The collection of samples from workers actually exposed to styrene was preferred over the addition of known amounts of PHEMAs to one or few urines, since our purpose was to test the validity of the methods in the case of “authentic” samples. Another important precaution concerned the sample storage and shipment conditions of samples: to this regard, urine samples were

immediately frozen and sent to Lab. 2 packaged in dry ice, thus avoiding any possible alteration of samples. Finally, the chemical standard used for instrument calibration was the same for both laboratories and all the samples were analysed in a unique sample set.

The results of the inter-laboratory control clearly showed that the two methods gave comparable results. This conclusion was based mainly on the following observations: (i) the correlation coefficients of the regression lines were always >0.90 for all individual isomers and for total PHEMAs, confirming that a highly significant correlation exists between the two sets of data; (ii) the slope values of the regression lines were comprised between 0.90 and 1.01, thus excluding any systematic over- or under-estimation of HPLC-FLD versus LC/MS/MS; (iii) the value of the *Y*-intercept was negligible, meaning that samples found to contain very low or null concentrations of PHEMAs by LC/MS/MS would show very low concentrations also when analysed by HPLC-FLD.

Among PHEMAs diastereoisomers, the measurement of (*S,R*)-M1 by the two methods gave a relatively poor correlation ( $r=0.90$ ) as compared to other isomers ( $r \geq 0.97$ ). This result was not unexpected if one consider that (*S,R*)-M1 was found at very low concentrations in urine samples taken for our study (from <1 up to 59  $\mu\text{g/L}$ , as measured by LC/MS/MS) and taking into account that the detection limit of the HPLC-FLD method was 8  $\mu\text{g/L}$ : 6 out of 60 samples showed concentrations lower than this limit (their levels were conventionally set at 4  $\mu\text{g/L}$  for HPLC-FLD) and 44 out of 60 were lower than the LOQ ( $3 \times$  detection limit) value. The low levels of (*S,R*)-M1 in urine is a consequence of the low bioconversion rates of styrene into this isomer, that was found to be 8–40 times lower than that of (*R,R*)-M1 (Ghittori et al., 1997; Manini et al., 2002a,b).

Finally, the hypothesis that the two methods give comparable results was further checked by an alternative test, proposed by Bland and Altman in 1986. This kind of

test was proposed for assessing agreement between two methods of clinical measurement, but could get information also in the case of methods used for biomonitoring or research purposes, as is our case. The graphs of the difference between the methods against their mean (Fig. 3) show that, for each isomer and for total PHEMAs the discrepancies are not constant within the whole range of measurement, since they appear lower at low concentration and higher at high concentration. Generally, when checking the performance of an analytical method, the precision and accuracy are calculated at two levels (low and high) of concentration. In an analogous manner, we selected two levels for each isomeric form and for total PHEMAs, and then we calculated the mean and the standard deviation of the differences (residuals) between the two methods.

The mean relative differences found between the methods were <20% for each level checked and the highest relative standard deviation was 21.1%.

The above results should be evaluated also taking into account the intrinsic performance of each method, namely (Maestri et al., 1996; Manini et al., 2000): for the HPLC-FLD method, the relative standard deviation ranges from 1.43% to 4.12%, depending on the concentration level; the repeatability of LC/MS/MS method ranges from 3.1% to 6.9%.

The Bland–Altman graph for M2 (Fig. 3, bottom) shows a significant trend towards a bias depending on the concentration level. This means that for this isomeric form of PHEMAs the HPLC-FLD method tends to underestimate the concentration in samples containing high levels of the compound, compared to LC/MS/MS. Various hypotheses can be proposed to explain this finding, however, in our opinion the most probable is that the recovery of the analyte after the complex sample cleanup, or the efficiency of the deacetylation/derivatization steps involved in this method could decrease when applied to highly concentrated samples.

Taking all in all, the agreement between the two methods seems in line with the results generally obtained when comparing methods based on different techniques, as is in this case; in particular, it can be affirmed that both the methods may be used for biomonitoring as well as for research purposes.

One point should be underlined: the chemical standards used for calibration by each laboratory involved in this study were not commercially available and were produced by custom synthesis (Alchemy, Bologna, Italy) (till now, no PHEMAs standard is commercially available). This means that the comparison between both analytical methods does not guarantee a total comparability between data from different laboratories using the same

analytical methods, since differences originating from different chemical standards are still possible. In other words, an inter-comparison programme between totally independent laboratories remains to be performed.

The results on the effects of sample storage on the PHEMAs concentrations were somewhat surprising: these metabolites showed to be rather stable, since no or little decrease (due to decomposition) was observed, either after storage at +4 °C for 1 week, or when samples were repeatedly frozen and thawed. Conversely, an unexpected increase of total PHEMAs occurred, especially after storage in the refrigerator. Up to now, a satisfactory explanation of these phenomena was not found. First of all, the phenomenon was quantitatively relevant, especially as regards the changes occurred at +4 °C: the percentages reported in Table 2 (ranging from –8% to +21.5%) must be compared with the intra-day precision of the LC/MS/MS method, which varied from 4.8% to 3.6% (relative standard deviation, R.S.D.%), respectively, at the 50 µg/L and at the 1 mg/L levels (Manini et al., 2000). The possibility of an analytical artefact, arising from either decomposition of labile urine components into by-products or partial evaporation of samples taken at +4 °C, was taken in great consideration, but discarded: since the results of sample analyses obtained by independent methods were comparable, it seems not realistic that the same interference(s) occurred for both the methods. Also the hypothesis of a mere concentration of the samples due to evaporation was discarded, since each isomer showed different changes: as an example, in samples taken at +4 °C (*R,R*)-M1 increased while (*S,R*)-M1 showed a slight decrease, that is not compatible with the hypothesis of evaporation. A possible sign of the origin of this apparently paradoxical phenomenon could come from the observation that the increase of PHEMAs was proportional to the initial concentration of the same compounds determined in each sample: this means that in samples taken from subjects not exposed to styrene, that contain no detectable PHEMAs, we do not expect to observe any increase after any kind of storage. Taking the above consideration, we should propose as working hypothesis (to be submitted to further experimental verification) that the amount of PHEMAs formed during storage could come from the conversion of some metabolites of styrene, perhaps some precursors of PHEMAs themselves. For mercapturates of other aromatic solvents, the existence of precursors generically called pre-mercapturic acids has been proven. This is the case of *S*-phenylmercapturic acid (the mercapturic acid of benzene) (Inoue et al., 2000) and *S*-benzylmercapturic acid (one of the mercapturic acids of toluene) (Inoue et al., 2004). Authors also showed that the conversion of these

precursors into the final mercapturic acid is influenced by the pH of sample and is time-dependent. However, no hint to the presence of such precursors in the case of PHEMAs is given in the scientific literature.

## 5. Conclusions

In conclusion, the present research demonstrates that:

- (i) the two analytical methods available at the present time for the determination of urinary concentrations of PHEMAs in humans gave comparable results. Indirectly, this confirmed also the validity of previous findings on styrene-derived mercapturic acids, obtained using one or the other method: low biotransformation rates of styrene into PHEMAs; large inter-individual variability, mostly due to genetic polymorphism of the genes for GST enzymes; and the presence of a clear preference in the excretion of the isomers deriving from *S*-styrene 7,8-oxide.
- (ii) Both the methods can be used to perform quantitative analysis in human samples, and each laboratory can choose the method depending on the availability of instrumentation; however, taking into account the possibility offered by LC/MS/MS (measurement of all isomers, better sensitivity, and less sample treatment), this method should be preferred when possible.
- (iii) Any further method that could be developed in the future should be compared with one of the two methods considered here.
- (iv) PHEMAs appear to undergo no or little decomposition under the different storage conditions; however, they tend to increase when samples are not kept frozen. Although further studies are needed to explain this apparent paradox, as a practical rule, we recommend that samples collected for biomonitoring or research purposes are frozen as soon as possible, and that they are thawed only one time just before the analysis.

## Acknowledgement

This work was financially supported by the European Community (Contract No. QLK4-CT-1999-01368).

## References

Bland, J.M., Altman, D.G., 1986. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1 (8476), 307–310.

- 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.
- Dutkiewicz, T., Tyras, H., 1968. Skin absorption of toluene, styrene, and xylene by man. *Br. J. Ind. Med.* 25 (3), 243.
- Ghittori, S., Maestri, L., Imbriani, M., Capodaglio, E., Cavalleri, A., 1997. Urinary excretion of specific mercapturic acids in workers exposed to styrene. *Am. J. Ind. Med.* 31, 636–644.
- Haufroid, V., Buchet, J.P., Gardinal, S., Ghittori, S., Imbriani, M., Hirvonen, A., Lison, D., 2001. Importance of genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes for the interpretations of biomarkers of exposure to styrene. *Biomarkers* 6 (3), 236–249.
- Haufroid, V., Jakubovsky, M., Janasik, B., Ligocka, D., Buchet, J.P., Bergamaschi, E., Manini, P., Mutti, A., Ghittori, S., Arand, M., Hangen, N., Oesch, F., Hirvonen, A., Lison, D., 2002. Interest of genotyping and phenotyping of drug-metabolizing enzymes for the interpretation of biological monitoring of exposure to styrene. *Pharmacogenetics* 12 (9), 691–702.
- Inoue, O., Kanno, E., Kakizaki, M., Watanabe, T., Higashikawa, K., Ikeda, M., 2000. Urinary phenylmercapturic acid as a marker of occupational exposure to benzene. *Ind. Health* 38, 195–204.
- Inoue, O., Kanno, E., Kasai, K., Ukai, H., Okamoto, S., Ikeda, M., 2004. Benzylmercapturic acid is superior to hippuric acid and *o*-cresol as a urinary marker of occupational exposure to toluene. *Toxicol. Lett.* 147, 177–186.
- Jenkins, S., Fennell, T.R., 1994. Review of the metabolic fate of styrene. *Crit. Rev. Toxicol.* 24 (S1), S11–S33.
- King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., Olah, T., 2000. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11, 942–950.
- Maestri, L., Ghittori, S., Imbriani, M., 1996. Determination of urinary mercapturic acids of styrene in man by HPLC with fluorescence detection. *J. Chromatogr. B* 687, 387–394.
- Manini, P., Andreoli, R., Bergamaschi, E., De Palma, G., Mutti, A., Niessen, W.M., 2000. A new method for the analysis of styrene mercapturic acids by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Spectrom.* 14, 2055–2060.
- Manini, P., Andreoli, R., Poli, D., De Palma, G., Mutti, A., Niessen, W.M.A., 2002a. Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry characterization of styrene metabolism in rat and in man. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 2239–2248.
- Manini, P., De Palma, G., Mozzoni, P., Andreoli, R., Poli, D., Bergamaschi, E., Franchini, I., Mutti, A., 2002b. GSTM1 polymorphism and styrene metabolism: insights from an acute accidental exposure. *Toxicol. Lett.* 134 (1–3), 201–208.
- Murphy, P.G., MacDonald, D.A., Lickly, T.D., 1992. Styrene migration from general-purpose and high-impact polystyrene into food-simulating solvents. *Food Chem. Toxicol.* 30 (3), 225–232.
- Vodicka, P., Hemminki, K., 1988. Identification of alkylation products of styrene oxide in single- and double-stranded DNA. *Carcinogenesis* 9 (9), 1657–1660.
- Watabe, T., Ozawa, N., Yoshikawa, K., 1981. Stereochemistry in the oxidative metabolism of styrene by hepatic microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 30 (12), 1695–1698.

## **ALLEGATO 2**

**Evaluation of Alternate Isotope-coded Derivatization Assay (AIDA) to  
the LC-MS/MS analysis of aldehydes in exhaled breath condensate.**

**Andreoli R, Manini P, Sforza S, Dall'Asta C, Galaverna G, Mutti A, Niessen WMA.**

Manoscritto in preparazione

**Evaluation of Alternate Isotope-coded Derivatization Assay (AIDA) to the LC-MS/MS  
analysis of aldehydes in exhaled breath condensate**

Roberta Andreoli<sup>1,2</sup>, Paola Manini<sup>1,2</sup>, Stefano Sforza<sup>3</sup>, Chiara Dall'Asta<sup>3</sup>, Gianni Galaverna<sup>3</sup>,  
Antonio Mutti<sup>2</sup>, Wilfried M.A. Niessen<sup>4</sup>

<sup>1</sup> ISPEL (Istituto Superiore per la Prevenzione e la Sicurezza sul Lavoro) Research Center at  
the University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy

<sup>2</sup> Laboratory of Industrial Toxicology, Department of Clinical Medicine, Nephrology and  
Health Sciences, University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma Italy

<sup>3</sup> Department of Organic and Industrial Chemistry, University of Parma, Parco Area delle  
Scienze 17/A, 43100, Parma, Italy

<sup>4</sup> hyphen MassSpec Consultancy, De Wetstraat 8, 2332 XT Leiden, The Netherlands

**Corresponding author:**

Paola Manini, PhD

Laboratory of Industrial Toxicology

Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences

University of Parma

Via Gramsci 14, 43100 Parma

Tel.: +39 0521 033060

Fax: +39 0521 033076

e-mail: [paola.manini@unipr.it](mailto:paola.manini@unipr.it)

**Abstract** We present the application of a novel isotopic dilution method, named Alternate Isotope-Coded Derivatization Assay (AIDA), to the quantitative analysis of malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) hydrazones in exhaled breath condensate (EBC) samples. AIDA is based on the alternate derivatization of the analyte(s) with reagents that are available in two pure isotopic forms, “light” and “heavy”, by using light-derivatized standards for the quantitation of the heavy-derivatized analytes, and *vice versa*. To this purpose, 2,4-dinitro-3,5,6-trideuterophenylhydrazine ( $d_3$ -DNPH) has been synthesized and used as “heavy” reagent in combination with commercial “light” DNPH. Using the AIDA method, the unknown concentration of the analyte in the matrix can be calculated without the need of a calibration curve. External and internal calibration methods have been also investigated for comparative purpose. The analysis of long sample series ( $n>100$ ) and the injection of high standard concentrations revealed a time drift of the MS response of analytes, probably due to ion-source contamination. This phenomenon could not be corrected by internal standardization, as a mutual enhancement effect between analyte and isotopically labeled internal standard was observed. Both these effects were compensated by AIDA method. The precision of AIDA assay, calculated as %RSD, was within 3.5-8% for MDA and 5-11% for 4-HNE. Accuracy was tested by analyzing a spiked EBC pool sample and acceptable results (accuracy within 98-108% for MDA and 93-114% for 4-HNE) were obtained by AIDA after subtraction of the blank, which was not negligible. The results of quantitative analysis of MDA and 4-HNE in EBC samples obtained by AIDA assay were in good agreement with those obtained by external calibration method on the same samples.

**Keywords:** Malondialdehyde, 4-Hydroxynonenal, Exhaled breath condensate, Alternate Isotope-Coded Derivatization Assay (AIDA), LC-MS, Ionization enhancement, Matrix effect

## Introduction

Biologically relevant aldehydes, namely malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) can be determined in exhaled breath condensate (EBC) samples by liquid chromatography-*tandem* mass spectrometry (LC-MS/MS) after derivatization with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) [1]. Although EBC concentrations of aldehydes are in the low nM range, these biomarkers of lipid peroxidation were found to be significantly increased in patients with several lung pathologies compared to healthy controls [2,3] and were positively associated with exposure biomarkers in workers exposed to oxidizing agents, such as cobalt and chromium [4,5]. Nevertheless, the analysis of large batches of samples ( $n > 100$ ) revealed an unaccountable increase of the MS response with time, thus making aldehyde quantitation troublesome. The use of stable isotope-labeled analogues would be desirable to compensate this trend and also to correct for matrix effects that are known to affect LC-MS quantitative bioanalysis [6]. Unfortunately, these standards are often not commercially available (*e.g.*, for MDA) or extremely expensive. The synthesis of 2,4-dinitro-3,5,6-trideuterohydrazine for derivatizing the carbonyl compounds into the corresponding deuterated hydrazones and subsequent use as internal standards in the LC-MS analysis of aldehydes and ketones in air samples has been proposed by Zurek and Karst [7], as an alternative to the use of labeled carbonyls as starting materials [8]. This second approach is less expensive and easily extendable to any carbonyl compound for which labeled carbonyl analogues are not commercially available.

In this study, we have investigated the possibility of applying a novel isotopic dilution method, named Alternate Isotope-Coded Derivatization Assay (AIDA), originally proposed for the quantification of zearalenone in maize flour [9], to the quantitative analysis of MDA and 4-HNE in EBC. The method is based on the alternate derivatization of the analyte(s) with

reagents that are available in two pure isotopic forms, “light” and “heavy” (L and H). The analyte in matrix sample is split in two fractions, which are derivatized with either a non-labeled or a stable isotope labeled reagent (LA or HA). To the non-labeled sample fraction, a known amount of analyte in standard solution derivatized with the stable isotope labeled reagent (HS) is added, and *vice versa* (LS, Figure 1). The unknown concentration of the analyte in the matrix can be calculated from the ratios of non-labeled analyte and labeled standard in one fraction and of labeled analyte and non-labeled standard in the other fraction: the combination of the two measurements allows to calculate the response factor and thus the true analyte content without the need of a calibration curve. To this purpose, 2,4-dinitro-3,5,6-trideuterophenylhydrazine ( $d_3$ -DNPH) has been synthesized and used as H-reagent in combination with commercial DNPH, used as L-reagent.  $d_3$ -DNPH has also been used to prepare labeled standards for internal calibration. The results of quantitative analysis of MDA and 4-HNE in EBC samples obtained by AIDA assay have been compared with those obtained by external calibration method on the same samples.

## **Experimental**

### *Chemicals and standards*

The 2,4-dinitro-3,5,6-trideuterophenylhydrazine ( $d_3$ -DNPH) was synthesized essentially as described by Zurek and Karst [7], whereas compound purification was carried out by flash chromatography on a glass column packed with a 15 cm-bed of silica gel by using a ethyl acetate:hexane 1:9 mixture as eluent. The compound purity was verified by TLC (silica gel plates, eluent mixture ethyl acetate:hexane 1:2,  $R_f = 0.5$ , single spot both by UV and ninhydrine detection) and its identity was verified by ESI-MS (positive ion mode, calculated

for  $MH^+$  202.0 m/z, found 202.1 m/z). No bis-, mono- or undeuterated compound was detectable by ESI-MS analysis. 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH, purity 97%), malondialdehyde (MDA) tetrabutylammonium salt (98%), acetic acid (>99%) and formic acid (>98%) were obtained by Sigma-Aldrich (Milan, Italy). 4-Hydroxy-2-nonenal (4-HNE, 98%) dissolved in ethanol (87.6 mM) was purchased from Cayman Chemicals (Michigan, USA). This solution is stable for 6 months at  $-80^{\circ}C$ . A standard stock solution of MDA (about 50 mM) was prepared in acetonitrile and stored at  $-20^{\circ}C$  for up to 1 month. Acetonitrile was used for serial dilutions of stock solutions to obtain calibration working solutions, as previously described [1]. DNPH or  $d_3$ -DNPH (25 mg) was dissolved in 10 mL of acetonitrile and acidified with 0.2 mL of formic acid (final concentration 12.6 mM). HPLC-grade methanol and acetonitrile were from Carlo Erba (Milan, Italy). Sterile non-pyrogenic water (Bieffe Medital, Italy) was used as mobile phase and for standard preparation.

For external and internal calibrations, a set of 8 calibrating standard solutions was prepared and diluted in water to produce the following aldehyde concentrations: 0, 4, 10, 20, 40, 80, 200 and 400 nM for MDA, and 0, 1, 2.5, 5, 10, 20, 50 and 100 nM for 4-HNE. These standards were derivatized with an equal volume of either DNPH or  $d_3$ -DNPH (12.6 mM) and injected into the LC-MS/MS system in order to obtain external calibrations for L- or H-hydrazones, respectively.

For internal standardization, an internal standard (IS) mixture containing MDA (10 mM) and 4-HNE (2.5 mM) was prepared and derivatized with either DNPH or  $d_3$ -DNPH (12.6 mM). Internal calibration for L-hydrazones was obtained by adding to each calibrating standard derivatized with DNPH an equal volume of the IS mixture derivatized with  $d_3$ -DNPH. *Vice versa*, in the case of H-hydrazones the IS mixture derivatized with DNPH was added to each calibrating standard derivatized with  $d_3$ -DNPH.

For AIDA, a standard solution containing MDA (10 nM) and 4-HNE (2.5 nM) was prepared daily in water and derivatized with an equal volume of either 12.6 mM DNPH (*light* standard, LS) or  $d_3$ -DNPH (*heavy* standard, HS). Water was also derivatized with either DNPH or  $d_3$ -DNPH to estimate the aldehyde concentrations of the blank.

#### *EBC sample collection and preparation*

EBC samples were collected using a commercially available TURBO DECCS breath condenser (Italchill, Parma, Italy), which is a transportable device equipped with temperature controls. Ten subjects were asked to breathe tidally through the mouthpiece without nose clip for 15 min at the collecting temperature of  $-5^{\circ}\text{C}$ , in order to obtain an EBC volume of at least 0.5 mL.

An aliquot of the samples was analyzed in triplicate as previously described [1] and the LC-MS/MS system was calibrated in the biological range of interest, *e.g.*, 2-40 nM for MDA and 0.5-10 nM for 4-HNE, using the external calibration method. Three calibration sets were run, at the beginning, in the middle (after 5 samples), and at the end of the sample series.

For AIDA assay, the remaining volume of each sample was split into six fractions (50  $\mu\text{L}$  each), three of them were derivatized with an equal volume of DNPH (*light* analyte, LA) and the remaining three with  $d_3$ -DNPH (*heavy* analyte, HA). After 2 h, a volume of 100  $\mu\text{L}$  of HS was added to each LA fraction, and *vice versa*. Six independent determinations (three with HS and three with LS) were run in triplicate for every sample. The scheme of the AIDA sample preparation is shown in Figure 1.

#### *LC-MS/MS analysis*

LC-MS/MS determinations were carried out on an Applied Biosystems-Sciex API 365 triple quadrupole mass spectrometer (Sciex, Thornhill, Canada) equipped with a TurboIonSpray<sup>TM</sup>

(TIS) interface. Chromatography was performed on a Supelcosil™ LC-18-DB column (75 x 3.0 mm i.d., 3µm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) using variable proportions of 20 mM aqueous acetic acid and methanol/acetonitrile (95/5, v/v) at a flow-rate of 0.5 ml/min. A volume of 20 µL was injected on column. MDA and 4-HNE hydrazones were ionized in positive-ion (PI) and in negative-ion (NI) mode, respectively. ESI conditions: for PI, ionspray voltage 5500 V, orifice voltage 30 V; for NI, ionspray voltage -4000 V, orifice voltage -20 V. The TIS temperature was set at 350°C. The detection was obtained in selected-reaction monitoring (SRM) mode by following the reactions  $m/z$  235→159 and  $m/z$  238→162 (collision energy, 21 eV) for DNPH-MDA and  $d_3$ -DNPH-MDA, and  $m/z$  335→167 and  $m/z$  338→170 (20 eV) for DNPH-4-HNE and  $d_3$ -DNPH-4-HNE, respectively. For comparative purposes, some experiments were also performed on a Quattro micro triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Milford, MA, USA). Source parameters: capillary voltage 3.2 KV; sample cone voltage 28 V; source temperature 120°C; desolvation gas temperature 350°C. For MS/MS experiments, argon (99.995%) was used as collision gas with a pressure of  $3.3 \times 10^{-3}$  mbar in the collision cell; collision energy 20 eV.

## **Results and discussion**

### *Time drift and other phenomena affecting MS response of MDA and 4-HNE hydrazones*

Since EBC is a relatively clean matrix, and therefore less prone to matrix effects, internal standardization seemed not to be necessary. In fact, good and reliable results were obtained and reported in previous studies [1-5] involving relatively small sample batches within one analytical session ( $n < 50$ ). However, when in subsequent studies larger batches were analyzed ( $n > 100$ ), we observed an unexpected time drift in the APCI-MS response of DNPH-

hydrazones. This trend did not change when, more recently, we improved the sensitivity of the method by using a Turboionspray ion-source in combination with a 3 mm i.d. column instead of APCI and a 4.6 mm i.d. column. In order to investigate whether this drift problem was dependent on the ion-source geometry, a series of experiments were performed using a Quattro micro system, featuring a Z-spray source design rather than the turbo-ionspray/curtain plate design of the API365.

An orange deposit was observed on both the curtain plate of API365 and the sample cone of the Quattro Micro, probably due to the deposition of unreacted DNPH and perhaps other non-volatile compounds. Unreacted DNPH elutes prior to MDA and 4-HNE, but in the case of MDA analysis, which is performed in the positive-ion mode, it is not detected, as it is not ionized under these conditions. However, it is known that even undetected compounds can also still exert a significant matrix effect [6]. The practical consequence of this deposit formation is that both the slope and the intercept of the calibration curves increased with time, calibration after calibration, without impairment of the correlation coefficient. As an example, the slope of the calibration curve for MDA was found to double within a working week (*e.g.*, the time needed to run about 120-150 samples), whereas that of 4-HNE increased about 50%. These problems can be overcome by performing very frequent calibration of the system (after every 5-10 samples), as was done in some previous studies. However, this results in an increase in the number of injections and in the absolute amount of standards and unreacted DNPH injected, thereby in fact aggravating the problem.

Although we did not observe significant matrix effects for EBC when the response of standards in matrix and in water was compared [1], the standard addition method has been also evaluated as a possible solution to the drift problem. The standard addition method would be the method of choice when no proper analogue standards would be available and/or when no blank matrix is available to produce matrix-matched calibration standards [6]. The latter is

obviously the case of EBC samples. Moreover, since the water used to prepare the standard solutions was found to contain a non-negligible content of aldehydes, the addition of an unknown concentration of aldehydes from water to spiked samples would have greatly affected the accuracy of the calculations of the standard addition method. A further disadvantage of the standard addition method is that the number of injections per sample increases considerably.

The availability of  $d_3$ -DNPH enabled the synthesis of 2,4-dinitro-3,5,6-trideuterophenylhydrazones, which could be applied as ISs. This should result in more reliable results. However, we found that the response of the IS was also affected by the time drift phenomenon and that it was even more strongly dependent on the concentration of the standard analyte injected. As an example, Figure 2a shows the increase in the response of  $d_3$ -DNPH-MDA (used as IS) with increasing DNPH-MDA concentration in the 0-400 nM range. This enhancement effect was more pronounced at the higher levels of the calibration series, suggesting that the IS signal increase might be at least in part due to an isotope effect. However, considering that a  $d_3$ -IS was used, the isotope effect alone could not explain the 2- to 3-fold increase observed in the IS signal when a 20- to 40-fold higher analyte concentration was injected. In fact, the isotope effect was definitely excluded when we observed a superimposable increase using L-hydrazones as IS and H-hydrazones as analyte. This rather indicates that a mutual enhancement effect between analyte and IS may have occurred. Similar suppression or enhancement effects have been described for ESI and APCI [10]. As a result, linear calibration curves over a wide range of concentrations (up to 400 nM for MDA and 100 nM for 4-HNE) were obtained using external calibration, whereas the use of the  $d_3$ -IS and dividing the analyte peak by the IS peak area resulted in non-linear calibration curves, that is concave downward at lower concentration. The comparison between external and internal calibration for DNPH-MDA is illustrated in Figure 2b and 2c. Similar behavior was

observed using the Quattro micro LC-MS/MS system (data not shown), suggesting that the phenomenon is independent of the ion-source geometry.

Although to date we do not have a definitive explanation for this behavior, we believe it is probably the result of two phenomena: an irreversible time drift due to source contamination by unreacted DNPH observed during both external and internal calibration and a reversible enhancement effect between analyte and IS observed in the case of internal calibration only.

Therefore, we decided to evaluate whether the application of an alternative isotopic method, like AIDA, would be helpful to solve these problems in the quantification of MDA and 4-HNE in EBC, especially because with AIDA a calibration curve is not needed. An additional advantage of AIDA over both external and internal calibration methods is that injection of high levels of calibration standards resulting in ion-source contamination are avoided. In addition, mutual enhancement or suppression effects between labeled and non-labeled compounds in the same sample would be compensated for by the AIDA approach.

#### *Applicability of AIDA assay to aldehyde derivatization with DNPH*

In order to apply the AIDA method, it is necessary that the derivatizing agent rapidly and irreversibly reacts with the analytes. This is the case for carbonyl derivatization with DNPH [11]. In addition, the reaction should give the same conversion both for the matrix and the standard solution. Considering that EBC samples are mainly constituted of water, this second condition is also satisfied, as we previously reported [1].

The stability of DNPH and  $d_3$ -DNPH derivatives was verified by excluding any exchange of hydrazones with each other. To this purpose,  $d_3$ -DNPH (12.6 mM) was added to a mixture of MDA and 4-HNE (10 nM and 2.5 nM) previously derivatized with DNPH (12.6 mM), and *vice versa*. The results of this experiment are shown in Figure 3. When samples

after two hours were analyzed by LC-MS/MS, SRM chromatograms only revealed the traces of L-derivatives (or *vice versa*, the traces of the H-derivatives, data not shown), suggesting that the derivatization reaction was complete and DNPH and  $d_3$ -DNPH did not mutually exchange. As already reported [7], deuterium/hydrogen exchange reactions of trideuterated DNPH are highly unlikely due to the extremely low acidity of the aromatic hydrogen or deuterium atoms ( $pK_a$  value of 43).

The derivatization reactions of MDA and 4-HNE with either of the two derivatizing reagents, DNPH and  $d_3$ -DNPH, exhibited a superimposable kinetics and a comparable yield (data not shown). The MS response of both DNPH and  $d_3$ -DNPH hydrazones was similar in a wide range of concentrations, as shown by comparison of the slopes of the calibration lines of analytes derivatized with either DNPH or  $d_3$ -DNPH reagent, *i.e.*,  $147.5 \pm 1.1$  vs  $149.7 \pm 1.7$  for MDA (in the 0-200 nM range,  $n=63$ ,  $r^2>0.993$ ), and  $184.1 \pm 1.9$  vs  $195.1 \pm 1.8$  for 4-HNE (in the 0-50 nM range,  $n=63$ ,  $r^2>0.997$ ). In the biological range of interest, *e.g.*, 2-40 nM for MDA and 0.5-10 nM for 4-HNE, the MS response of both L- and H-hydrazones used as IS at fixed concentrations exhibited a similar time drift and a comparable enhancement with increasing concentrations of H- and L-hydrazones used as standard analytes, as displayed in Figure 4.

#### *Precision and accuracy*

The precision of the method, calculated as %RSD of three independent reacted samples derivatized with both L- and H-reagents (each injected in triplicate,  $2 \times 3 \times 3$ ,  $n=18$ ) at six concentration levels was within 3.5-8% for MDA and 5-11% for 4-HNE. Since the high number of derivatizations and injections per sample could be considered as the main drawback of AIDA assay, particularly when a little sample volume is available (like in the case of EBC), we have verified that reducing the number of both independent derivatizations

and injections to 2 did not result in a loss of analytical performances in terms of precision. In the case of 2 derivatizations x 2 reagents x 2 injections per sample (2x2x2, n=8), the precision was within 3.7-7.2% for MDA and 4.5-10% for 4-HNE. Interestingly, the results of AIDA calculations differed for less than 1% by comparing the 2x3x3 or 2x2x2 sample preparation approaches.

Using the AIDA method, the unknown concentration of the analyte in the matrix can be calculated without the need of a calibration curve [9]. Since water used to prepare both L- and H-standards contains a non-negligible concentration of MDA and 4-HNE, the equations originally used for AIDA calculations have been adapted, by subtracting the area of the blank derivatized with *d*<sub>3</sub>-DNPH from the area of that of heavy standards used in the calculation of light analytes, and *vice versa*.

$$q_L = (Rf_L/Rf_H) \times [A_L/(A_H^S - A_{blkH}^S)] \times q_H^S \quad (1)$$

$$q_H = (Rf_H/Rf_L) \times [A_H/(A_L^S - A_{blkL}^S)] \times q_L^S \quad (2)$$

$$(Rf_L/Rf_H)^2 = [(A_H^S - A_{blkH}^S) / A_L] \times [A_H/(A_L^S - A_{blkL}^S)] \quad (3)$$

where q: quantity; Rf: response factor; A: area; the superscript S indicates the use as internal standard; blk: blank; L and H are “light” and “heavy” hydrazones, H is used as standard for L in (1) and L is used as standard for H in (2).

This step is critical since AIDA calculations are ideally based on a straight line passing through two points, one of them is the origin and the other is the point corresponding to the concentration of the standard. If the blank is not negligible, the area of the IS corresponding to the nominal concentration, *e.g.*,  $A_H^S$  corresponding to  $q_H$  in (1), is rather due to sum of the nominal concentration and the blank concentration of standard. Since the ideal straight line is forced through the origin, its slope would therefore increase, finally leading to inaccurate and underestimated concentrations. As in both (1) and (2) the term corresponding to the IS area is at in denominator, both formulas used in the calculation of the unknown concentration of

analyte would give the same underestimated result, without compensating the underestimation effect among each other. In addition, to minimize the mutual suppression or enhancement between analyte and IS it is necessary to choose an appropriate concentration of standard used for AIDA. Ideally, it should be close to the expected analyte concentration in EBC samples.

The accuracy of the method was tested by analyzing an EBC pool sample, whose aldehyde concentration (MDA: 10.62 nM, 4-HNE: 2.24 nM) has been previously determined by external calibration method, spiked at four concentration levels, *e.g.*, 2, 4, 10 and 20 nM for MDA and 0.5, 1, 2.5 and 5 nM for 4-HNE. Acceptable results (accuracy within 98-108% for MDA and 93-114% for 4-HNE) were obtained by AIDA after subtraction of the blank. Finally, the comparison of the results obtained by both AIDA and external calibration on the same EBC samples are summarized in Table 1. Results obtained by two methods were in good agreement, with deviations < 10% for MDA and <20% for 4-HNE.

## **Conclusion**

This study demonstrates that AIDA assay, initially proposed for the derivatization of hydroxyl groups with acetic anhydride, is applicable to other analytes and reagents, *e.g.*, the derivatization of the aldehydic function with DNPH. Therefore, the AIDA method potentially appears to be applicable for a wide range of compounds and derivatizing reactions. In the case of the determination of nM concentrations of MDA and 4-HNE in EBC samples, AIDA calculations have been adapted to take into account the aldehyde content of the blank, which is not negligible in water used for standard preparation. Comparable results were obtained by AIDA and external calibration methods on the same samples, indicating that both methods are applicable to the quantification of low concentrations of MDA and 4-HNE in EBC. As

compared to external calibration method, the main advantage in the application of AIDA assay consists in the lower contamination of the ion-source, as the injection of the highest levels of calibration standards is avoided. In terms of the number of injections per sample, satisfactory precision was obtained when the number of injections initially proposed for AIDA was significantly reduced, *i.e.*, from 18 to 8. Additional experiments are needed to evaluate the possibility of further reducing the number of injections without impairing method precision and accuracy. Finally, AIDA method could compensate not only for matrix effects that are very marginal in EBC samples, but also for time drift of the MS response observed during long analytical sessions and for the mutual enhancement effect between analyte and IS remarked on the MS signal of DNPH-hydrazones.

## References

1. Andreoli R, Manini P, Corradi M, Mutti A, Niessen WMA (2003) *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:637-645
2. Corradi M, Folesani G, Andreoli R, Manini P, Bodini A, Piacentini G, Carraro S, Zanconato S, Baraldi E (2003) *Am J Respir Crit Care Med* 167: 395-399
3. Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, Manini P, Caglieri A, Poli D, Alinovi R, Mutti A (2003) *Am J Respir Crit Care Med* 167:1380-1386
4. Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, Bergonzi R, Apostoli P, Mutti A (2004) *Environ Health Perspect* 112:1293-1298
5. Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, Andreoli R, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A (2006) *Environ Health Perspect* 114:542-546
6. Niessen WMA, Manini P, Andreoli R (2006) *Mass Spectrom Rev* 25:881
7. Zurek G, Karst U (2000) *J Chromatogr A* 869:251-259
8. Zurek G, Luftmann H, Karst U (1999) *Analyst* 124:1291-1295
9. Sforza S, Dall'Asta C, Moseriti A, Galaverna G, Dossena A, Marchelli R (2005) *Angew Chem Int Ed* 44:5126-5129
10. Liang HR, Foltz RL, Meng M, Bennett P (2003) *Rapid Commun Mass Spectrom* 17: 2815-2821
11. Vogel M, Büldt A, Karst U (2000) *Fresenius J Anal Chem* 366:781-791

## Legends to Figures

**Figure 1.** Procedure for the application of the AIDA method. The method is based on an alternate derivatization of the analyte(s) with reagents that are available in two pure isotopic forms, “light” (L, DNPH) and “heavy” (H,  $d_3$ -DNPH), by using light derivatized standards for the quantification of the heavy derivatized analytes, and *vice versa* [9]. Legend: LS, light standard; HS, heavy standard; HA, heavy analyte; LA, light analyte.

**Figure 2.** (a) Response of  $d_3$ -DNPH-MDA (IS, 10 nM) as a function of DNPH-MDA concentration in the 0-400 mM range. Comparison of (b) external and (c) internal calibration for DNPH-MDA in the 0-400 nM concentration range.

**Figure 3.** Stability of derivatized hydrazones. SRM chromatograms of a mixture of MDA (10 nM) and 4-HNE (2.5 nM) derivatized with DNPH (12.6 mM) and added with  $d_3$ -DNPH (12.6 mM) after 2 h. SRM transitions: (a)  $m/z$  235→159 for DNPH-MDA and (b)  $m/z$  238→162 for  $d_3$ -DNPH-MDA; (c)  $m/z$  335→167 for DNPH-4-HNE and (d)  $m/z$  338→170 for  $d_3$ -DNPH-4-HNE.

**Figure 4.** MS response of both L- and H-hydrazones of (a) MDA and (b) 4-HNE used as IS at fixed concentrations (MDA, 10 nM; 4-HNE, 2.5 nM) as a function of the number of injections and the concentration of H- and L-hydrazones used as standard analytes in the concentration range of biological range, *e.g.*, up to 40 and 10 nM for MDA and 4-HNE, respectively. For each of the six levels of the calibration (separated by vertical grids), nine injections were performed alternating standard analytes derivatized with both H- and L-reagent, for a total of 108 injections. Calibration levels: (a) MDA: 0, 2, 4, 10, 20, and 40 nM; (b) 4-HNE 0, 0.5, 1, 2.5, 5, and 10 nM.

Figure 1

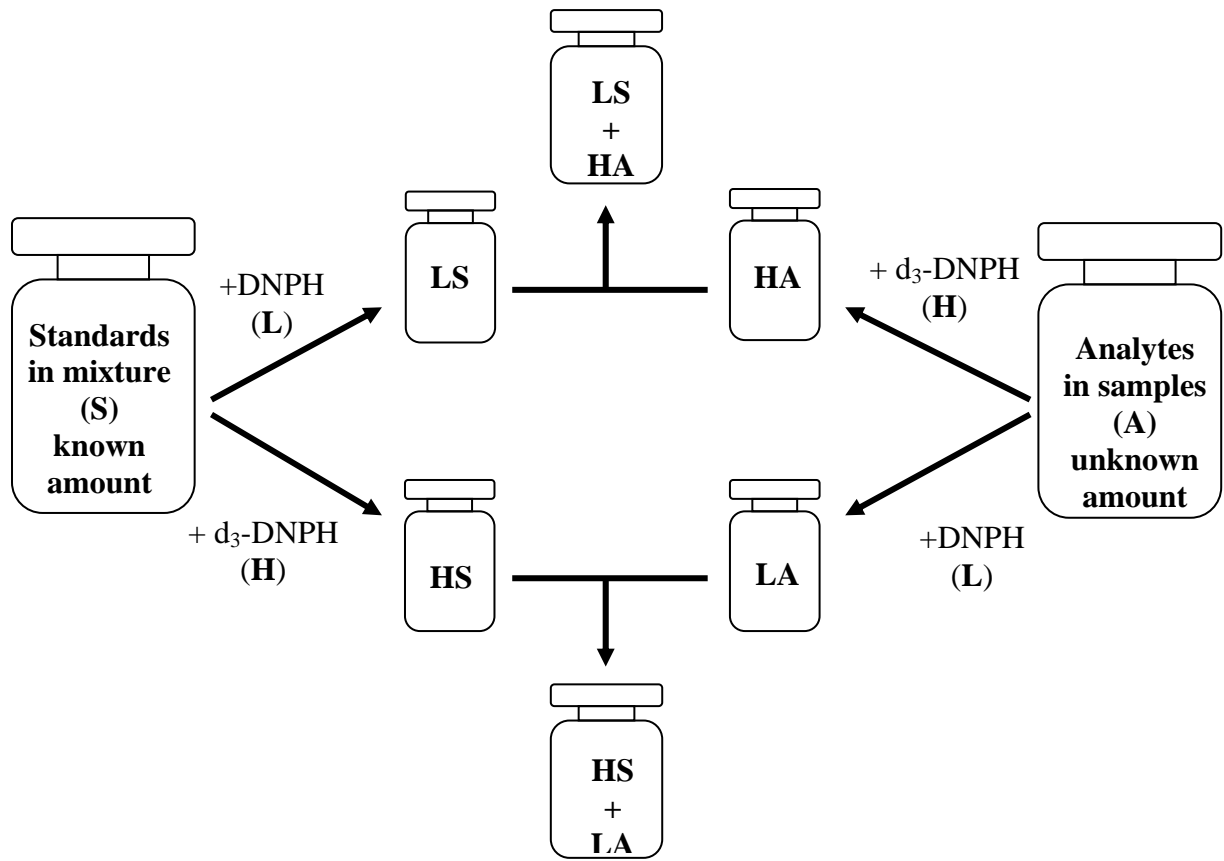


Figure 2

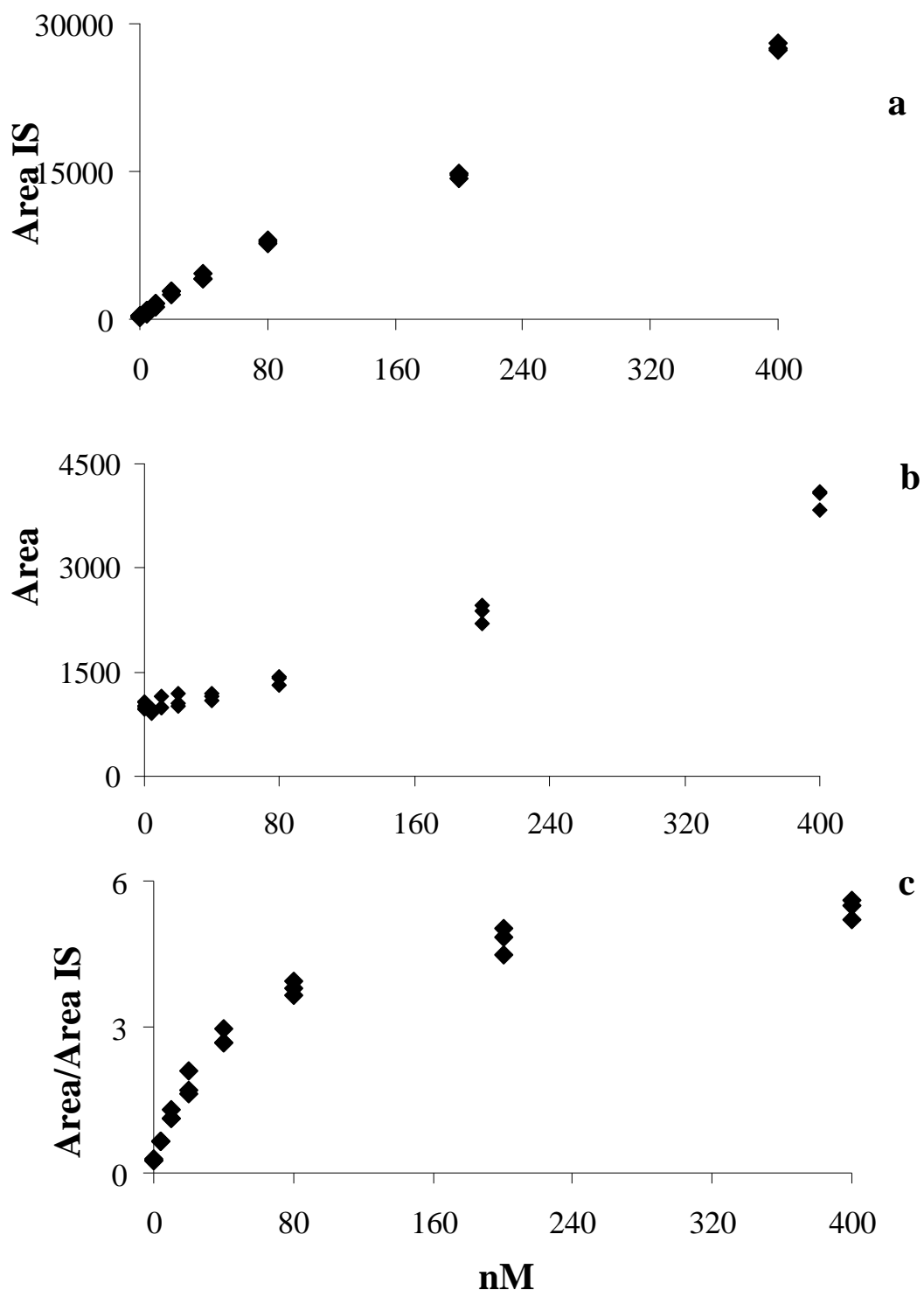


Figure 3

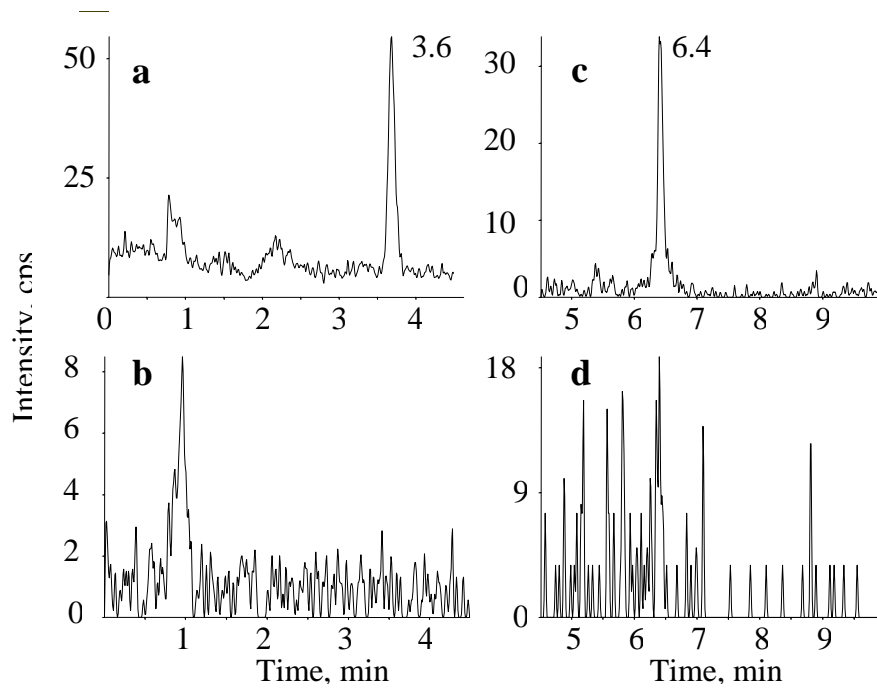


Figure 4

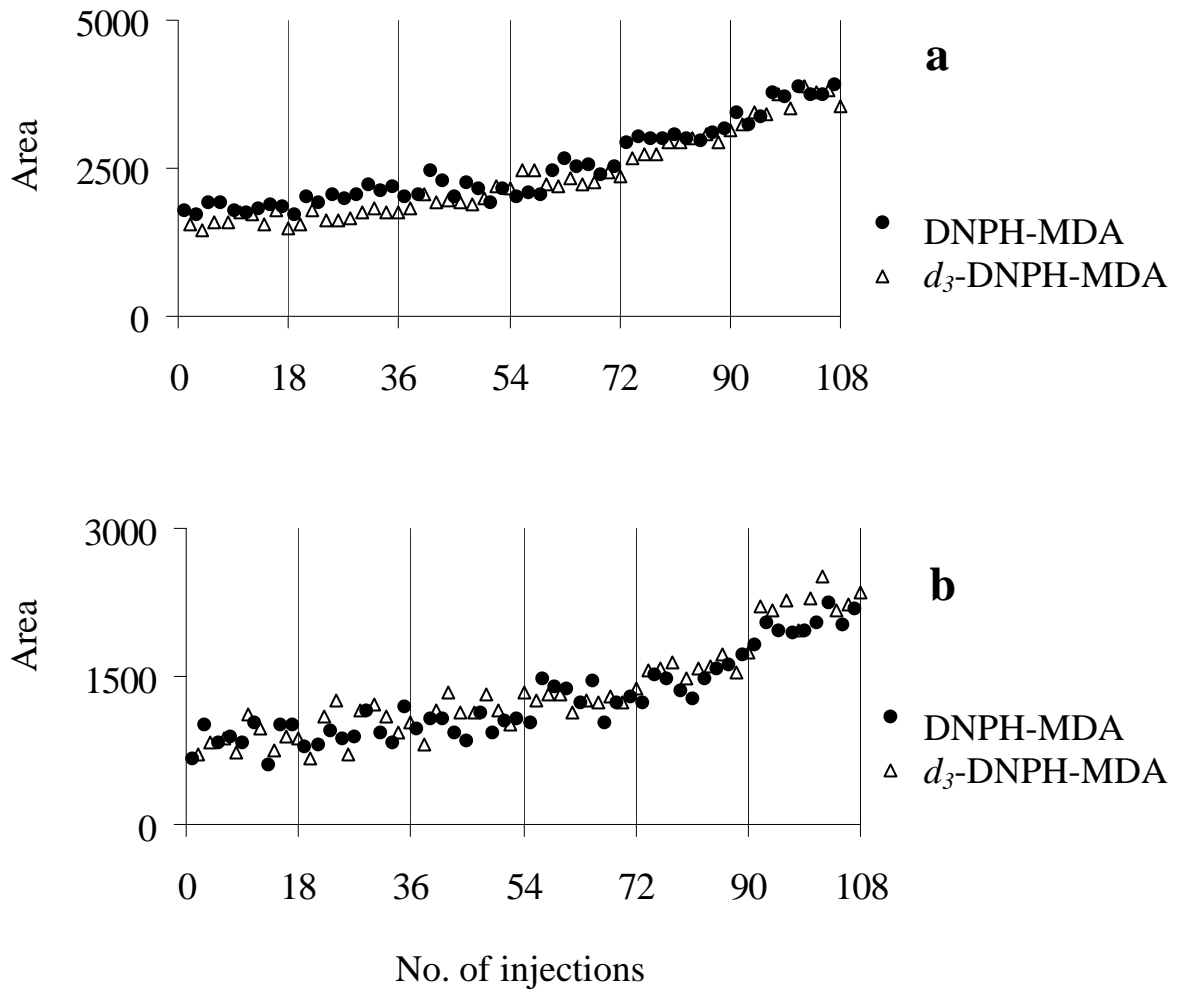


Table 1. Exhaled breath condensate analyses by AIDA and external calibration methods.

Sample	MDA (nM)			4-HNE (nM)		
	AIDA <sup>a</sup>	Ext. Calibration	% Diff. <sup>b</sup>	AIDA <sup>a</sup>	Ext. Calibration	% Diff. <sup>b</sup>
# 1	7.25 ± 0.65	7.58 ± 0.19	4.5	3.06 ± 0.31	2.79 ± 0.68	9.7
#2	9.51 ± 0.49	8.98 ± 0.79	7.9	3.29 ± 0.33	2.99 ± 0.53	10.0
#3	11.00 ± 0.66	11.83 ± 1.04	7.0	4.28 ± 0.73	3.64 ± 1.13	17.6
#4	9.77 ± 0.72	9.22 ± 0.70	6.0	3.92 ± 0.83	3.44 ± 0.94	14.0
#5	10.49 ± 0.62	10.53 ± 0.70	9.5	3.33 ± 1.05	3.25 ± 0.53	2.5
#6	10.62 ± 0.98	11.04 ± 0.15	3.8	4.26 ± 0.37	3.62 ± 0.82	17.7
#7	12.22 ± 0.63	13.38 ± 0.52	8.7	3.19 ± 0.90	2.67 ± 0.70	19.5
#8	11.67 ± 0.76	12.57 ± 0.48	7.2	3.23 ± 1.09	3.29 ± 0.51	1.8
#9	11.61 ± 0.70	11.13 ± 0.50	4.3	3.82 ± 1.28	3.65 ± 0.63	4.7
#10	14.13 ± 0.86	14.18 ± 0.91	0.4	4.7 ± 0.99	4.17 ± 0.39	12.7

<sup>a</sup> calculated after subtraction of the blank

<sup>b</sup> % Diff, calculated as  $[(\text{Conc.}_{\text{ExtCal}} - \text{Conc.}_{\text{AIDA}}) / \text{Conc.}_{\text{ExtCal}}] \times 100$

## **ALLEGATO 3**

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

Manini P, De Palma G, **Andreoli R**, Poli D, Mozzoni P, Folesani G, Mutti A,  
Apostoli P.

Toxicol Lett, 2006; 167: 142-151.

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

Paola Manini<sup>a,b,\*</sup>, Giuseppe De Palma<sup>a</sup>, Roberta Andreoli<sup>a,b</sup>, Diana Poli<sup>b</sup>,  
Paola Mozzoni<sup>a,b</sup>, Giuseppina Folesani<sup>a,b</sup>, Antonio Mutti<sup>a</sup>, Pietro Apostoli<sup>c</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Industrial Toxicology, Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences,  
University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy*

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

<sup>c</sup> *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 *GSTM1**pos* genotype [3.61 (1.15)  $\mu\text{g}/\text{g creat.}$ ] excreted significantly higher *S*-PMA concentrations than *GSTM1**null* 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](mailto: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  $42.7 \pm 11.7$  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 ( $11.1 \pm 1.7$  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 ( $23.9 \pm 1.2$  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  $\mu\text{g}$  (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  $\mu\text{g}$  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  $-20^\circ\text{C}$  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  $\mu\text{l}$  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  $-20^\circ\text{C}$ . Headspace SPME sampling was performed at  $45^\circ\text{C}$  for 30 min under stirring conditions using a 75  $\mu\text{m}$  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*<sub>4</sub> and *S*-PMA-*d*<sub>5</sub>, 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*<sub>4</sub>, *m/z* 238 → 109 for *S*-PMA, and *m/z* 243 → 114 for *S*-PMA-*d*<sub>5</sub>. 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*<sub>3</sub>) and centrifuged at 5000 × *g* for 10 min. Chromatography was performed on an Atlantis® dC<sub>18</sub> 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*, *GSTAI*, *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 *GSTAI* (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: *GSTAI*\**A*\**A* 33%, *GSTAI*\**A*\**B* 58%,

*GSTAI*\**B*\**B* 9%; *GSTM1* positive 53%; *GSTT1* positive 85%; *EPHX113* Tyr/Tyr 54%, *EPHX113* Tyr/His 27%, *EPHX113* His/His 19%; *EPHX139* His/His 62%; *EPHX139* His/Arg 27%; *EPHX139* 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  $\rho$ ). 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. *GSTAI* 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	$5.9 \pm 1.7$	$6.0 \pm 1.7$	$5.6 \pm 1.7$
	Taxicab	$7.7 \pm 2.0^*$	$7.5 \pm 1.9^\#$	$8.1 \pm 2.2^*$
Toluene	24 h Personal	$29.6 \pm 18.5$	$34.7 \pm 21.1$	$24.5 \pm 9.1$
	Taxicab	$35.2 \pm 25.7^\#$	$36.5 \pm 30.6$	$34.2 \pm 18.0^*$
Ethylbenzene	24 h Personal	$4.4 \pm 1.4$	$4.6 \pm 1.6$	$4.0 \pm 0.9$
	Taxicab	$6.2 \pm 1.9^*$	$6.3 \pm 1.9^*$	$6.1 \pm 2.0^*$
Xylenes	24 h Personal	$20.3 \pm 6.1$	$21.1 \pm 6.7$	$19.1 \pm 5.0$
	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 ( $\mu\text{g}/\text{g creat.}$ )	$105.4 \pm 67.0$	$130.9 \pm 62.0$
EOS $t,t$ -MA ( $\mu\text{g}/\text{g creat.}$ )	$122.0 \pm 70.3$	$154.4 \pm 70.0$
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 ( $\mu\text{g}/\text{g creat.}$ )	$1.41 \pm 1.22$	$789 \pm 673^*$
EOS U-cotinine ( $\mu\text{g}/\text{g creat.}$ )	$1.45 \pm 1.28$	$1100 \pm 879^*, \#$

$t,t$ -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 <sup>#</sup>	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 <sup>#</sup>	0.57 <sup>#</sup>	0.42
EOS <i>S</i> -PMA				0.43	0.67 <sup>*</sup>
EOS U-B					0.63 <sup>#</sup>

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  $\mu\text{g/l}$ .

\* $p < 0.01$ , <sup>#</sup> $p < 0.05$ , 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

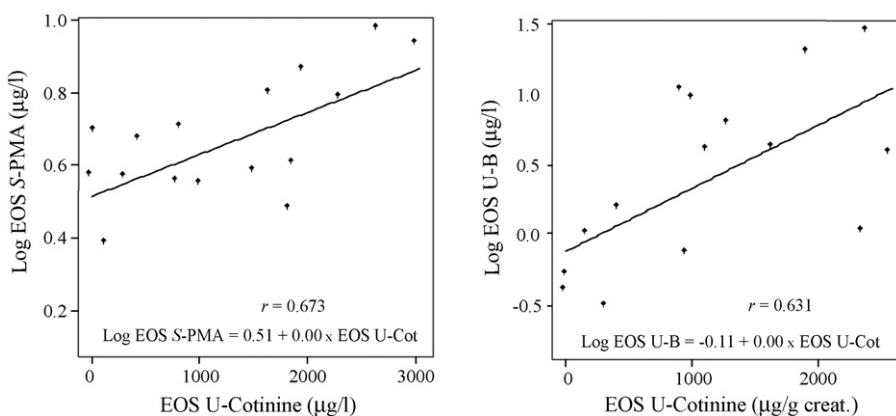


Fig. 1. Relationships between U-cotinine and *S*-PMA and between U-cotinine and U-B at the end of shift in samples from smoking taxi drivers ( $n = 16$ ).

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 <sup>#</sup> [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)].

<sup>#</sup>  $p < 0.05$ , 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	$\beta$	<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  $\text{mg}/\text{m}^3$ ; median exposure 3.2 ppm or 10.2  $\text{mg}/\text{m}^3$ ) 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 miners (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*<sup>\*B</sup>\*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*<sup>\*A</sup>

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., Gamberale, 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.
- Haufroid, 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., Jaechk, 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., Pavanello, 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 4**

### **Importanza della valutazione cronobiologica degli indicatori di effetto per una corretta strategia di campionamento.**

**Andreoli R**, Manini P, Alinovi R, Goldoni M, De Palma G, Mutti A.

G Ital Med Lav Ergon, 2005; 27(3): 318-321.

R. Andreoli<sup>1,2</sup>, P. Manini<sup>1,2</sup>, R. Alinovi<sup>1</sup>, M. Goldoni<sup>1,2</sup>, G. De Palma<sup>1,2</sup>, A. Mutti<sup>1</sup>

## Importanza della valutazione cronobiologica degli indicatori di effetto per una corretta strategia di campionamento

<sup>1</sup> Università di Parma, Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione, Parma

<sup>2</sup> Centro Studi e Ricerche ISPESEL di Parma, Parma

### RIASSUNTO

L'aumento delle concentrazioni urinarie degli indicatori di danno ossidativo al DNA viene sempre più frequentemente associato con esposizioni professionali ad agenti ossidanti. Oltre all'8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-oxo-dG), nelle urine sono stati identificati altri prodotti provenienti dall'ossidazione in posizione 8 della guanina, tra cui l'8-idrossi-guanina (8-oxo-G) e l'8-idrossi-guanosina (8-oxo-Guo). Scopo del presente studio era la caratterizzazione di questi indicatori di effetto in termini di variabilità inter- ed intra-individuale e di profilo di escrezione giornaliero. Sono stati esaminati 11 volontari, che hanno fornito sei campioni di urina nell'arco di 24 ore. Le concentrazioni di 8-oxo-G, 8-oxo-Guo e 8-oxo-dG sono state determinate mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa *tandem*. La variabilità inter-individuale, espressa come coefficiente di variazione, è risultata compresa negli intervalli 85-150% per 8-oxo-G, 20-45% per 8-oxo-Guo e 30-45% per 8-oxo-dG. L'analisi statistica delle misure ripetute ai vari tempi di campionamento ha dimostrato che nessun indicatore di danno ossidativo presentava variazioni significative durante la giornata, escludendo così l'esistenza di un ritmo circadiano nell'escrezione di questi indicatori. Il momento del prelievo del campione risulta pertanto non critico.

**Parole chiave:** DNA, danno ossidativo, urine, ritmo circadiano, campionamento.

### ABSTRACT

*[Chronobiological evaluation of effect biomarkers and sampling] Occupational exposure to oxidants is often associated with an increase in the levels of oxidative DNA damage in urine. Besides 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), other products of position-8 guanine oxidation have been identified in urine, including 8-hydroxy-guanine (8-oxo-G) and 8-hydroxy-guanosine (8-oxo-Guo). The aim of the present study was the characterization of these effect biomarkers in terms of inter- and intra-individuals variability, as well as in terms of their excretion profile during a 24 h-period. Urine samples were collected from 11 volunteers (6 samples/day). Urine concentrations of 8-oxo-G, 8-oxo-Guo, and 8-oxo-dG were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The inter-individual variability, expressed as variation coefficient, was 85-150% for 8-oxo-G, 20-45% for 8-oxo-Guo, and 30-45% for 8-oxo-dG. The statistical analysis for repeated measurements showed that none of the biomarkers was affected by significant variation during the day (one-way ANOVA,  $p < 0.05$ ), thus excluding the existence of a circadian rhythm. We conclude that the sampling time is not critical for the assessment of oxidative DNA damage in urine.*

**Key words:** DNA, oxidative damage, urine, circadian rhythm, sampling.

### Introduzione

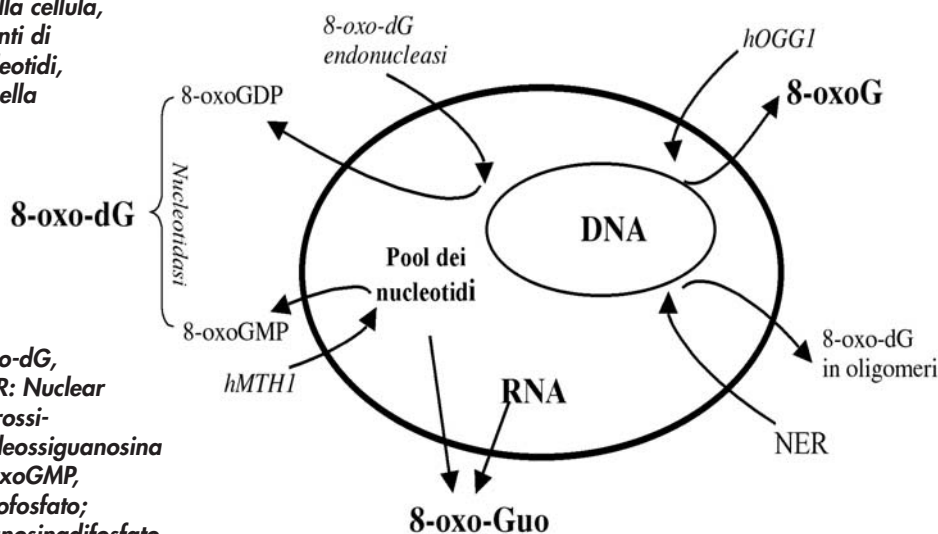
Il DNA rappresenta un importante bersaglio delle specie reattive dell'ossigeno (ROS). Benché nel corso di studi *in vitro* ed *in vivo* siano stati identificati oltre 20 prodotti di ossidazione alle basi del DNA (1), l'indicatore di stress ossidativo più studiato è senz'altro l'8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-oxo-dG). Le ragioni dell'interesse per questo indicatore sono diverse: (i) la guanina è la base più suscettibile all'attacco dei ROS e (ii) il suo prodotto di ossidazione, l'8-oxo-dG, è mutageno in quanto determina una spontanea perdita di specificità di accoppiamento fra le basi (GC->TA) (2); inoltre (iii) esistono metodiche analitiche sufficientemente sensibili per determinarne la concentrazione nelle matrici biologiche accessibili, come sangue periferico ed urina (3).

Se quello generato dal radicale idrossile rappresenta quantitativamente il più importante addotto al DNA presente nel sangue periferico (1 addotto su  $10^6$  basi non modificate), nel caso dell'urina l'esistenza di diversi meccanismi di riparazione del danno agli acidi nucleici determina la presenza di numerosi prodotti, la cui origine ed il cui significato biologico sono ancora in fase di studio. Nel caso specifico dell'ossidazione in posizione 8 della guanina, l'attacco del radicale idrossile e la successiva riparazione dell'addotto generano principalmente tre prodotti di eliminazione, a seconda che la base sia presente nel DNA, nell'RNA o nel pool dei nucleotidi, ed in funzione del meccanismo di riparazione che viene attivato. In Figura 1 è proposto uno schema semplificato dei meccanismi di riparazione del danno ossidativo nella cellula (3), in cui si ipotizza che l'8-oxo-dG si formi principalmente a partire dal DNA ad opera dell'azione combinata delle endonucleasi e delle nucleotidasi o, in alternativa, dal pool dei nucleotidi ad opera dell'enzima hMTH1 e delle nucleotidasi; e che l'8-idrossi-guanina (8-oxo-G) derivi dall'azione delle glicosilasi, in particolare dell'hOGG1, mentre l'8-idrossi-guanosina (8-oxo-Guo) dalla riparazione dell'RNA.

Negli ultimi anni, le concentrazioni urinarie di danno ossidativo al DNA, e di 8-oxo-dG in particolare, sono state utilizzate come indicatori di stress ossidativo sistemico nelle malattie degenerative e nelle esposizioni professionali ad agenti ossidanti (4, 5), con aumenti significativi dell'indicatore nei soggetti patologici e nei lavoratori ri-

**Figura 1. Schema semplificato della cellula, in cui sono indicate le possibili fonti di guanina idrossilata (Pool dei nucleotidi, RNA, DNA), gli enzimi coinvolti nella riparazione del danno ossidativo alla guanina (hOGG1, hMTH1, 8-oxo-dG-endonucleasi, nucleotidasi) ed i prodotti di eliminazione (8-oxo-G, 8-oxo-Guo e 8-oxo-dG).**

**Legenda: hOGG1, 8-idrossi-2'-deossiguanosina DNA glicosilasi; 8-oxo-G, 8-idrossi-guanina; 8-oxo-dG, 8-idrossi-2'-deossiguanosina; NER: Nuclear Excision Repair; 8-oxo-Guo, 8-idrossi-guanosina, hMTH1, 8-idrossi-2'-deossiguanosina 5'-trifosfato pirofosfoidrolasi; 8-oxoGMP, 8-idrossi-2'-deossiguanosinamonomofosfato; 8-oxoGDP, 8-idrossi-2'-deossiguanosinadifosfato. Adattato da (3)**



spetto a popolazioni di controllo opportunamente selezionate. Non sono peraltro disponibili informazioni cronobiologiche che consentano di interpretare le differenze intra-individuali in rapporto all'esposizione ad ossidanti ambientali e di riferire le variazioni osservate ad agenti di cui si ignora spesso la cinetica o, data la complessità delle matrici, addirittura la composizione.

Si è pertanto ritenuto opportuno valutare la possibile esistenza di un ritmo circadiano nell'eliminazione dell'8-oxo-dG e degli altri prodotti di danno ossidativo alla guanina, per la corretta interpretazione del significato dell'indicatore e per stabilire l'eventuale orario più opportuno per il campionamento.

Scopo del seguente lavoro era la caratterizzazione del profilo di escrezione degli indicatori di danno ossidativo alla guanina, quali 8-oxo-G, 8-oxo-Guo e 8-oxo-dG, presenti nell'urina in forma libera, in campioni di volontari raccolti nell'arco di 24 ore. Per tenere conto della possibile interferenza delle fisiologiche variazioni della funzionalità renale, negli stessi campioni sono state determinate le concentrazioni urinarie di due indicatori precoci di danno renale per i quali è già stata dimostrata l'esistenza di ritmi circadiani: l'albumina e la *retinol-binding protein* (RBP) (6).

## Materiali e Metodi

### Studio sperimentale su volontari

Sono stati esaminati 11 volontari (5 maschi, età media  $35,5 \pm 5,1$  anni), reclutati tra il personale del laboratorio, non fumatori e non professionalmente esposti ad agenti ossidanti. A ciascun soggetto è stato chiesto di raccogliere sei campioni estemporanei di urina nell'arco delle 24 ore, alle ore 7.00 ( $T_1$ ), 11.00 ( $T_2$ ), 15.00 ( $T_3$ ), 19.00 ( $T_4$ ), 23.00 ( $T_5$ ) ed alle ore 7.00 del giorno successivo ( $T_6$ ), senza modificare le normali abitudini lavorative e voluttuarie. Un soggetto ha ripetuto il protocollo dello studio per cinque giorni diversi, al fine di valutare la variabilità intra-individuale. I campioni sono stati conservati a  $-20^\circ\text{C}$  fino al momento dell'analisi.

### Reagenti

Gli standard di 8-idrossi-2'-deossiguanosina (8-oxo-dG), 8-idrossi-guanina (8-oxo-G), 8-idrossi-guanosina (8-oxo-Guo) e albumina umana sono stati ottenuti dalla ditta Sigma Aldrich (Milano, Italia), la *retinol-binding protein* (RBP) dalla ditta Calbiochem (Merck, Darmstadt, Germania). Gli standard interni marcati,  $^{13}\text{C}_1, ^{15}\text{N}_2$ -8-idrossi-guanina ( $[^{13}\text{C}_1, ^{15}\text{N}_2]$  8-oxo-G) e  $^{15}\text{N}_5$ -2'-deossiguanosina ( $[^{15}\text{N}_5]$  dG), sono stati acquistati dalla ditta Cambridge Isotope Laboratories, INC. (MA, USA). Lo standard interno  $[^{15}\text{N}_5]$  8-oxo-dG è stato ottenuto per sintesi a partire da  $[^{15}\text{N}_5]$  dG, apportando modifiche minori al metodo di Wu *et al.* (7).

### Determinazione di 8-oxo-G, 8-oxo-Guo e 8-oxo-dG mediante LC-MS/MS

Le concentrazioni di 8-oxo-G, 8-oxo-Guo e 8-oxo-dG, escrete nelle urine in forma libera, sono state determinate mediante cromatografia liquida-spettrometria di massa *tandem* (LC-MS/MS) utilizzando uno spettrometro di massa PE-Sciex a triplo quadrupolo modello API 365, dotato di interfaccia TurboIonspray (Sciex, Concord, Canada). La separazione di 8-oxo-G, di 8-oxo-Guo e di 8-oxo-dG nella stessa corsa cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna Atlantis<sup>®</sup>dC<sub>18</sub> (100 x 3,0 mm i.d., 3  $\mu\text{m}$ , Waters) ed una fase mobile costituita da acido formico 10 mM (pH 3,75) e metanolo in gradiente di eluizione. Prima dell'analisi i campioni di urina sono stati diluiti con un uguale volume di tampone litio acetato 100 mM (pH 6,4). La ionizzazione degli analiti è stata ottenuta in ioni positivi e la rivelazione in MS/MS, in modalità denominata *selected-reaction monitoring* (SRM), monitorando le transizioni caratteristiche:  $m/z$  168 $\rightarrow$ 140 (energia di collisione, 21 eV) per 8-oxo-G;  $m/z$  171 $\rightarrow$ 142 (21 eV) per  $[^{13}\text{C}_1, ^{15}\text{N}_2]$  8-oxo-G;  $m/z$  300 $\rightarrow$ 168 (25 eV) per 8-oxo-Guo;  $m/z$  284 $\rightarrow$ 168 (25 eV) per 8-oxo-dG e  $m/z$  289 $\rightarrow$ 173 (25 eV) per  $[^{15}\text{N}_5]$  8-oxo-dG.

Il metodo sviluppato è stato validato mediante lo studio dell'intervallo di linearità, la determinazione dei limiti di rivelazione (LdR) e della precisione (*intra-day* e *inter-day*). L'escrezione urinaria dell'albumina e della RBP è

stata valutata con metodi immunoenzimatici originali, sviluppati e validati presso il nostro laboratorio. In particolare per l'albumina è stato utilizzato un "competitive enzyme-linked immunosorbent assay" (C.E.L.I.S.A.), mentre per la RBP un "sandwich" E.L.I.S.A. (8, 9). Le concentrazioni di tutti gli analiti determinati sono state espresse in funzione della creatinina urinaria.

### Statistica

L'analisi della varianza (ANOVA a una via per misure ripetute seguita dal test di Duncan) è stata effettuata utilizzando il software GraphPad Prism 4; nel caso dell'8-oxo-G è stato invece applicato il test di Friedman. Il software SPSS/PC+ (13,0 per Windows) è stato utilizzato per verificare l'affidabilità delle misure ( $\alpha$  di Cronbach,  $\alpha > 0,7$ ), l'omogeneità della scala (*interclass correlation coefficient*, ICC  $> 0,45$ ), l'omoschedasticità della varianza (test di Mauchly,  $p > 0,05$ ), e la normalità della distribuzione delle singole variabili (test di Kolmogorov-Smirnov).

### Risultati

La linearità nell'intervallo di concentrazioni di interesse, i limiti di rivelazione e l'imprecisione del metodo, espressa come coefficiente di variazione *intra-* e *inter-day*, sono riportati in Tabella I. Le concentrazioni medie degli indicatori di effetto, misurate nei campioni di urina dei volontari ai diversi tempi di raccolta sono riassunte in Tabella II. Per nessuno degli indicatori di danno ossidativo è stato osservato un

ritmo di escrezione di tipo circadiano, che invece è stato confermato per gli indicatori di danno renale. I livelli urinari di 8-oxo-Guo e 8-oxo-dG sono risultati dello stesso ordine di grandezza (rispettivamente  $1,3 \pm 0,1$  e  $1,9 \pm 0,2$   $\mu\text{mol/mol}$  creat.), mentre valori più elevati sono stati osservati per 8-oxo-G (mediana  $9,8$   $\mu\text{mol/mol}$  creat., range 7,7-11,6). In tutti i campioni di urina esaminati, le concentrazioni di albumina e RBP sono risultate inferiori ai rispettivi valori di riferimento ( $< 20$  mg/g di creatinina per albumina e  $< 130$   $\mu\text{g/g}$  di creatinina per RBP). La variabilità inter-individuale, espressa come coefficiente di variazione, è risultata compresa negli intervalli 85-150% per 8-oxo-G, 20-45% per 8-oxo-Guo, e 30-45% per 8-oxo-dG. Coefficienti di variazione minori sono stati riscontrati nell'analisi della variabilità intra-individuale calcolata su 5 giorni consecutivi (13-70% per 8-oxo-G, 8-40% per 8-oxo-Guo, 15-35% per 8-oxo-dG). I parametri statistici relativi all'affidabilità delle misure ed alla consistenza interna dei dati sono riportati in Tabella III.

### Discussione

Secondo il *National Research Council* (NRC) (10), un indicatore di effetto è definito come "un'alterazione biochimica, biologica 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". La validazione di un indicatore di effetto passa attraverso la caratterizzazione preventiva del *background* nella

**Tabella I. Parametri della validazione del metodo LC-MS/MS: intervallo di linearità, limiti di rivelazione e imprecisione del metodo**

Indicatore <sup>a</sup>	Intervallo (nM)	LdR <sup>b</sup>	CV% <sup>c</sup>	
			Intra-day	Inter-day
8-oxo-G	4,5-450	0,8	<3	<5
8-oxo-Guo	2,5-250	0,3	<6	<7
8-oxo-dG	0,75-75	0,1	<3	<7

<sup>a</sup> Legenda: 8-oxo-G, 8-idrossi-guanina; 8-oxo-Guo, 8-idrossi-guanosina; 8-oxo-dG, 8-idrossi-2'-deossiguanosina.

<sup>b</sup> LdR, Limite di Rivelazione espresso come rapporto segnale/rumore (S/N)=3.

<sup>c</sup> CV%, coefficiente di variazione, n = 6.

**Tabella III. Riproducibilità degli indicatori di effetto. Parametri statistici relativi all'affidabilità delle misure ( $\alpha$  di Cronbach), alla varianza fra gruppi (ICC) e al test di di Mauchly**

Indicatore <sup>a</sup>	$\alpha$ di Cronbach	ICC <sup>b</sup>	Test di Mauchly
8-oxo-G	0,735	0,735	ns
8-oxo-Guo	0,931	0,691	ns
8-oxo-dG	0,962	0,809	ns

<sup>a</sup> Legenda: 8-oxo-G, 8-idrossi-guanina; 8-oxo-Guo, 8-idrossi-guanosina; 8-oxo-dG, 8-idrossi-2'-deossiguanosina.

<sup>b</sup> ICC, interclass correlation coefficient; ns, non significativo.

**Tabella II. Concentrazioni medie ( $\pm$  DS) degli indicatori di danno ossidativo (espresse in mmol/mol creatinina) e di effetto renale (in mg/g creatinina per albumina e  $\mu\text{g/g}$  creatinina per RBP), determinate ai diversi tempi di campionamento (T<sub>1</sub>-T<sub>6</sub>) nelle urine dei volontari (n = 11)**

Indicatore <sup>a</sup>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>6</sub>	p
8-oxo-G <sup>#</sup>	11,9 (7,5-47,1)	10,4 (7,3-22,3)	9,6 (7,0-18,4)	11,7 (9,7-19,4)	10,5 (8,4-40,6)	8,3 (6,4-13,2)	ns
8-oxo-Guo	1,6 $\pm$ 0,5	2,1 $\pm$ 0,5	2,0 $\pm$ 0,7	2,0 $\pm$ 0,7	1,8 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,9	ns
8-oxo-dG	1,2 $\pm$ 0,4	1,3 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,5	ns
Albumina	3,1 $\pm$ 2,5*	5,4 $\pm$ 3,0	9,0 $\pm$ 5,4** <sup>^</sup>	6,8 $\pm$ 3,3	4,2 $\pm$ 3,0	4,4 $\pm$ 2,9	<0,01
RBP	27,8 $\pm$ 21,4**	39,4 $\pm$ 28,7	43,1 $\pm$ 24,0	66,6 $\pm$ 35,8 <sup>^</sup>	61,7 $\pm$ 40,0	26,7 $\pm$ 14,9	<0,01

<sup>a</sup> Legenda: 8-oxo-G, 8-idrossi-guanina; 8-oxo-Guo, 8-idrossi-guanosina; 8-oxo-dG, 8-idrossi-2'-deossiguanosina; RBP, Retinol-binding Protein;

<sup>#</sup> mediane e range interquartile; ns, non significativo.

\* $p < 0,001$  T<sub>1</sub> vs. T<sub>3</sub> per albumina, \*\* $p < 0,01$  T<sub>3</sub> vs. T<sub>6</sub> per albumina e T<sub>1</sub> vs. T<sub>4</sub> per RBP, <sup>^</sup> $p < 0,05$  T<sub>3</sub> vs. T<sub>5</sub> per albumina e T<sub>4</sub> vs. T<sub>6</sub> per RBP.

popolazione generale e della variabilità *inter-* ed *intra-*individuale. Inoltre, per la corretta interpretazione dei risultati sarebbe importante conoscere i parametri tossicocinetici e tossicodinamici dell'indicatore; in particolare, il profilo di escrezione può essere utile per valutare il corretto momento in cui effettuare il campionamento.

Questo è il primo studio volto a determinare contemporaneamente le tre specie idrossilate della guanina, 8-oxo-G, 8-oxo-Guo e 8-oxo-dG, finalizzato alla caratterizzazione del profilo di escrezione urinario giornaliero ed alla valutazione della variabilità inter-individuale di questi indicatori. Studi precedenti si sono limitati a confrontare le concentrazioni di 8-oxo-dG in campioni estemporanei di urina con quelle delle urine raccolte nelle 24 ore (11, 12).

Il metodo LC-MS/MS è risultato sufficientemente sensibile per la determinazione dei tre indicatori di stress ossidativo nei campioni di urina dei volontari. L'assenza di manipolazione del campione prima della misura analitica e l'utilizzo di standard interni marcati hanno permesso di ridurre sia i tempi di analisi sia la possibile creazione di artefatti, evento ben documentato in letteratura (13, 14). Dai parametri di validazione del metodo, si evince che l'imprecisione della metodica sviluppata (CV% < 9) è trascurabile rispetto alla variabilità biologica degli indicatori. Tale variabilità *inter-* e *intra-*individuale è risultata contenuta entro il 45% per 8-oxo-dG e 8-oxo-Guo, ma ben più elevata per 8-oxo-G (85-150%).

Rispetto ai composti presi in esame, il principale prodotto di riparo del danno ossidativo al DNA eliminato nelle urine sembra essere proprio 8-oxo-G. Questo è in accordo con quanto riportato in letteratura, e cioè che la rimozione di questa modificazione avviene principalmente ad opera di un enzima, l'8-idrossi-2'-deossiguanosina DNA glicosilasi (hOGG1) (3). La maggiore variabilità inter-individuale di questa specie rispetto alle altre forme di guanina idrossilata potrebbe essere, almeno in parte, attribuibile all'esistenza di diverse forme polimorfiche dell'enzima (15). Quest'aspetto è in fase di studio presso il nostro laboratorio e sarà oggetto di ulteriori approfondimenti.

L'analisi statistica delle misure ripetute ai vari tempi di campionamento ha dimostrato che, a differenza dell'albumina e dell'RBP per le quali è nota l'esistenza di un ritmo circadiano, nessun indicatore di danno ossidativo presenta variazioni significative nell'arco della giornata (Tabella II,  $p > 0,05$ ). Inoltre, la consistenza interna dei dati e l'affidabilità delle misure (Tabella III) costituiscono un saldo presupposto per l'utilizzo di questi parametri come validi *bio-markers* di effetto.

## Conclusioni

I risultati ottenuti hanno permesso di escludere l'esistenza di un ritmo circadiano per gli indicatori di stress ossidativo studiati ed hanno consentito di evidenziare che la variabilità sia *intra-* che *inter-*individuale per 8-oxo-Guo e

8-oxo-dG, ma non per 8-oxo-G, è assai modesta. Poiché il tempo di campionamento non sembra influenzare significativamente le concentrazioni degli indicatori di effetto, eventuali variazioni nei livelli riscontrabili tra l'inizio e la fine del turno di lavoro possono essere attribuibili all'esposizione a fattori di rischio professionali e richiedono un'interpretazione che deve far riferimento alla cinetica degli agenti nocivi, al loro meccanismo di azione, nonché alla cinetica di eliminazione delle basi modificate dallo stress ossidativo.

## Bibliografia

- 1) Weimann A, Riis B, Poulsen HE. Oligonucleotides in human urine do not contain 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine. *Free Radic Biol Med* 2004; 36: 1378-1382.
- 2) Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. *J Biol Chem* 1992; 267: 166-172.
- 3) Lunec J, Holloway KA, Cooke MS, Faux S, Griffiths HR, Evans MD. Urinary 8-oxo-2'-deoxyguanosine: redox regulation of DNA repair in vivo? *Free Radic Biol Med* 2002; 7: 875-885.
- 4) Wu LL, Chiou C-C, Chang P-Y, Wu JT. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clin Chim Acta* 2004; 339: 1-9.
- 5) Kuo HW, Chang SF, Wu KY, Wu FY. Chromium (VI) induced oxidative damage to DNA: increase of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine concentrations (8OHdG) among electroplating workers. *Occup Environ Med* 2003; 60: 590-594.
- 6) Buzio C, Mutti A, Capani F, Andrulli S, Perazzoli F, Alinovi R, Negro A, Rustichelli R. Circadian rhythm of proteinuria: effects of an evening meat meal. *Nephrol Dial Transplant* 1989; 4: 266-270.
- 7) Hu C-W, Wu M-T, Chao M-R, Pan C-H, Wang C-J, Swenberg JA, Wu K-Y. Comparison of analyses of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by isotope-dilution liquid chromatography with electro-spray tandem mass spectrometry and by enzyme-linked immunosorbent assay. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; 18: 505-510.
- 8) Alinovi R, Mutti A, Bergamaschi E, Franchini I. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay (CELISA) of urinary albumin. *Clin Chem* 1988; 34: 993-994.
- 9) Lucertini S, Valcavi P, Mutti A, Franchini I. Enzyme-linked immunosorbent assay of retinol-binding protein in serum and urine. *Clin Chem* 1984; 30: 149-151.
- 10) NRC (National Research Council). Biological markers in environmental health research. *Environ Health Perspect* 1987; 74: 3-9.
- 11) Pilger A, Ivancsits S, Germadnik D, Rüdiger HW. Urinary excretion of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine measured by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *J Chromatogr B* 2002; 778: 393-401.
- 12) Miwa M, Matsumaru H, Akimoto Y, Naito S, Ochi H. Quantitative determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine level in healthy Japanese volunteers. *BioFactors* 2004; 22: 249-253.
- 13) Collins AR, Cadet J, Möller L, Poulsen HE, Viña J. Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cell? *Arch Biochem Biophys* 2004; 423: 57-65.
- 14) Cadet J, D'Ham C, Douki T, Pouget JP, Ravanat JL, Sauvaigo S. Facts and artifacts in the measurement of oxidative base damage to DNA. *Free Rad Res* 1998; 29: 541-550.
- 15) Wikman H, Risch A, Klimek F, Schmezer P, Spiegelhalter B, Dienemann H, Kayser K, Schulz V, Drings P, Bartsch H. hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in caucasian population. *Int J Cancer* 2000; 88: 932-937.

## **ALLEGATO 5**

### **Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters.**

Goldoni M, Caglieri A, **Andreoli R**, Poli D, Manini P, Vettori MV, Corradi M,  
Mutti A.

BMC Pulmonary Medicine, 2005; 5: 10-19.

Research article

Open Access

## Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters

Matteo Goldoni<sup>1,2</sup>, Andrea Caglieri<sup>2</sup>, Roberta Andreoli<sup>1,2</sup>, Diana Poli<sup>1,2</sup>, Paola Manini<sup>1,2</sup>, Maria Vittoria Vettori<sup>1</sup>, Massimo Corradi<sup>1,2</sup> and Antonio Mutti<sup>\*2</sup>

Address: <sup>1</sup>National Institute of Occupational Safety and Prevention, Research Center at the University of Parma, Parma, Italy and <sup>2</sup>Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences, University of Parma, Parma, Italy

Email: Matteo Goldoni - matgold@libero.it; Andrea Caglieri - andrea\_caglieri@yahoo.it; Roberta Andreoli - robertaandreoli@yahoo.it; Diana Poli - dpoli7@unipr.it; Paola Manini - paola.manini@ipruniv.cce.unipr.it; Maria Vittoria Vettori - mariavittoria.vettori@unipr.it; Massimo Corradi - massimo.corradi@unipr.it; Antonio Mutti\* - antonio.mutti@unipr.it

\* Corresponding author

Published: 01 September 2005

Received: 09 May 2005

BMC Pulmonary Medicine 2005, 5:10 doi:10.1186/1471-2466-5-10

Accepted: 01 September 2005

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2466/5/10>

© 2005 Goldoni et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Background:** The effects of changes in cooling temperature on biomarker levels in exhaled breath condensate have been little investigated. The aim of the study was to test the effect of condensation temperature on the parameters of exhaled breath condensate and the levels of selected biomarkers.

**Methods:** Exhaled breath condensate was collected from 24 healthy subjects at temperatures of -10, -5, 0 and +5 C degrees. Selected parameters (condensed volume and conductivity) and biomarkers (hydrogen peroxide, malondialdehyde) were measured.

**Results:** There was a progressive increase in hydrogen peroxide and malondialdehyde concentrations, and condensate conductivity as the cooling temperature increased; total condensate volume increased as the cooling temperature decreased.

**Conclusion:** The cooling temperature of exhaled breath condensate collection influenced selected biomarkers and potential normalizing factors (particularly conductivity) in different ways *ex vivo*. The temperature of exhaled breath condensate collection should be controlled and reported.

### Background

Exhaled breath condensate (EBC) is a biological fluid that mainly consists of water, but also contains small droplets of airway lining fluid. Much of the interest of EBC lies in the fact that its collection is totally non-invasive and does not lead to any discomfort or risk [1]. It has been used to assess inflammatory airway diseases such as asthma [2], chronic obstructive pulmonary disease [3], lung cancer

[4], interstitial lung disease [5] and acute respiratory distress syndrome [6], and has recently also been extended to the biological monitoring of workers exposed to cobalt and tungsten [7].

EBC contains both volatile and non-volatile substances. Volatile or semi-volatile substances have appreciable vapour pressure at body temperature, and can therefore be

**Table 1: Characteristics of the study subjects. Data are expressed as mean  $\pm$  SD.**

<b>Number of Subjects</b>	24 (13 M; 11 F)
<b>Age, Years</b>	30 $\pm$ 4
<b>Smokers/Ex-Smokers/Non Smokers</b>	0/3/21
<b>FVC, % of predicted</b>	108.4 $\pm$ 10.4
<b>FEV<sub>1</sub>, % of predicted</b>	103.7 $\pm$ 11.4
<b>FEV<sub>1</sub>/FVC, % of predicted</b>	81.9 $\pm$ 6.3

breathed out as gases; furthermore, volatile substances in gaseous phase can be dissolved in condensed water during EBC collection depending on their physico-chemical properties [8]. Non-volatile substances, such as salts and proteins, are mainly expired in small droplets, and further diluted with exhaled water vapours [8,9]. It is thought that the droplets are formed as a result of random convective processes, and may not be directly related to water vapour production.

This has raised the question of variable droplet dilution, and given rise to some concerns regarding the interpretation of EBC biomarkers on the basis of their absolute concentration [9]. Some authors have suggested normalising for ion concentrations (Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, K<sup>+</sup>) or urea, assuming that they are equally concentrated in the airway lining fluid and serum of healthy and diseased subjects [8,10], and conductivity measurements of lyophilised EBC have also been proposed as a normalization factor [11]. On the other hand, the use of non-volatile parameters to normalise the volatile or semi-volatile compounds in EBC could ignore their condensation pathways as their *ex vivo* evaporation from the airways is different from droplet condensation in EBC collection systems. Ideally, a normalisation factor should be identified among substances with the same physical and chemical characteristics (i.e., volatility and solubility) as the measured parameters.

Volatility is generally assessed by means of a status diagram, which represents the relationship between the compounds' vapour pressure and temperature [12]. In a condensing system, the vapour pressure of volatile compounds depends on condensation temperature, and so the physical and chemical properties of exhaled compounds can be weighted by changing the condensation temperature. This may be particularly relevant in the case of EBC, in which the condensation of each substance may be affected by the presence of other compounds in the same solution.

A new type of condenser has been specifically designed to control the temperature of EBC collection, and test the effect of different condensation temperatures on the recovery of selected biomarkers (hydrogen peroxide,

malondialdehyde). We also measured the conductivity after EBC lyophilisation, a parameter that reflects the overall concentration of salts. A rigorously precise study design controlling these aspects may represent a major advance in our understanding of condensation mechanisms, and in the validation of EBC as a suitable source of biomarkers reflecting the pathobiology underlying lung diseases.

## Methods

### Subjects

EBC was collected from 24 healthy non-smokers (table 1): i.e. asymptomatic and non-atopic individuals with normal spirometry results who showed no bronchial hyper-responsiveness to methacholine. The study was conducted in conformity with the declaration of Helsinki and was approved by the Ethical Committee of the University of Parma. All of the subjects gave their informed written consent.

### Study design

The number of volunteers was exactly the same as the total number of possible sequence combinations of 4 temperatures (4! = 24). EBC was randomly collected from each subject using a different sequence of the four temperatures. The duration of the clinical part of the study was about two weeks in order to avoid the possible influence of climatic changes on EBC parameters. In order to assess inter-session variability, 10 of the 24 subjects underwent four consecutive EBC collections at the two extremes of temperature (-10°C and +5°C).

### Collecting system

TURBO-DECCS (Transportable Unit for Research on Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection Systems) is a new and commercially available device for EBC collection (ItalChill, Parma, Italy). TURBO is a refrigerating system relying on a thermo electrical module giving rise to Peltier effect, which is activated by an electronic circuit in continuous current fed with main voltages. The cold side of the Peltier module is connected to an aluminium support shaped to house the test tube. A thermostat allows the collecting temperature to be regulated with a tolerance of  $\pm 1^\circ\text{C}$ . The working

temperature is adjustable from  $-10^{\circ}\text{C}$  to room temperature or higher.

TURBO is supplied with DECCS, a disposable polyethylene device for collecting EBC that consists of a mouthpiece equipped with a one-way valve and saliva trap, connected to a collecting vial (50 ml) by means of a tube.

### **EBC collection**

The subjects were asked to breath tidally through the mouthpiece without a nose clip for 10 minutes at collecting temperatures of  $-10^{\circ}\text{C}$ ,  $-5^{\circ}\text{C}$ ,  $0^{\circ}\text{C}$  and  $+5^{\circ}\text{C}$ , with a 5-min interval after every collection. The subjects collected their EBC all in the same laboratory and no one collected EBC at home. EBC from every subject was collected according to different temporal combinations of the four temperatures covering the 24 possible combinations. The subjects were strictly instructed to maintain constant tidal breathing during the test and to form a complete seal around the mouthpiece; excess saliva was periodically eliminated and the mouth was rinsed with water. Salivary contamination was excluded by means of the colorimetric detection of alpha-amylase (Infinity amylase reagent, Sigma, Milan, Italy). The EBC samples were centrifuged for 1 min at 1000 g immediately after collection so that all of the water droplets were driven to the bottom of the flask, and the total volumes were measured. The samples were then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### **EBC analysis**

#### *Volume*

The collected EBC volume was measured using a calibrated 200  $\mu\text{l}$  pipette (Gilson International, Den Haag, The Netherlands) with an experimental error of  $\pm 10 \mu\text{l}$ .

#### *Conductivity*

EBC was lyophilised using a Heto FD 1.0 lyophilizer (Heto, Allerod, Denmark) and then re-suspended in ultra-pure water (Sigma, St. Louis, MO, USA). Conductivity was measured by means of an Istek 430c conductivity meter (Istek, Seoul, Republic of Korea). The Limit of Detection (LOD) of the method was about  $0.1 \mu\text{S}/\text{cm}$ . Contamination of the storage vials was carefully assessed and excluded.

#### *Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )*

$\text{H}_2\text{O}_2$  in EBC was measured as previously described [13] using a commercial kit (Amplex Red Hydrogen Peroxide assay kit, Molecular Probes, Eugene, USA) with a LOD of  $0.01 \mu\text{M}$ . The analysis was made within 2–3 days of EBC collection after freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$ , in order to avoid the relative instability of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in EBC [14].

#### *Malondialdehyde (MDA)*

EBC MDA was measured by means of liquid chromatography-mass spectrometry tandem (LC-MS/MS) as previously described [15] within two weeks of EBC collection after storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  because of the relative high stability of MDA [16].

### **Statistical analysis**

Data distribution was assessed using the Shapiro-Wilk test. Mean values  $\pm$  SD were used for the normally distributed data, and geometric means [geometric SD] for the data with a lognormal distribution. Between-group differences were calculated using one-way ANOVA for repeated measures, followed by Tuckey's *post-hoc* test using the experimental data points or their logarithms, depending on the distribution of the experimental values. Regressions were performed using the least-squares method on either the experimental data points or their logarithms, using the Pearson's correlation coefficient to test goodness-of-fit. Intra-individual variability due to repeated measures was assessed using the dummy variables method for the multiple regression analysis [17]. A significance level of 0.05 was chosen for all of the statistical tests. The data were statistically analysed using two software programmes: SPSS 12.0 (SPSS inc., Chicago, IL, USA) and PRISM 3.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

### **Results**

Table 2 shows the inter-session variability in 10 of the 24 subjects at the two extreme temperatures ( $-10^{\circ}\text{C}$  and  $+5^{\circ}\text{C}$ ). No statistically significant differences were found in the total volume,  $\text{H}_2\text{O}_2$  level or conductivity values of the four consecutive collections.

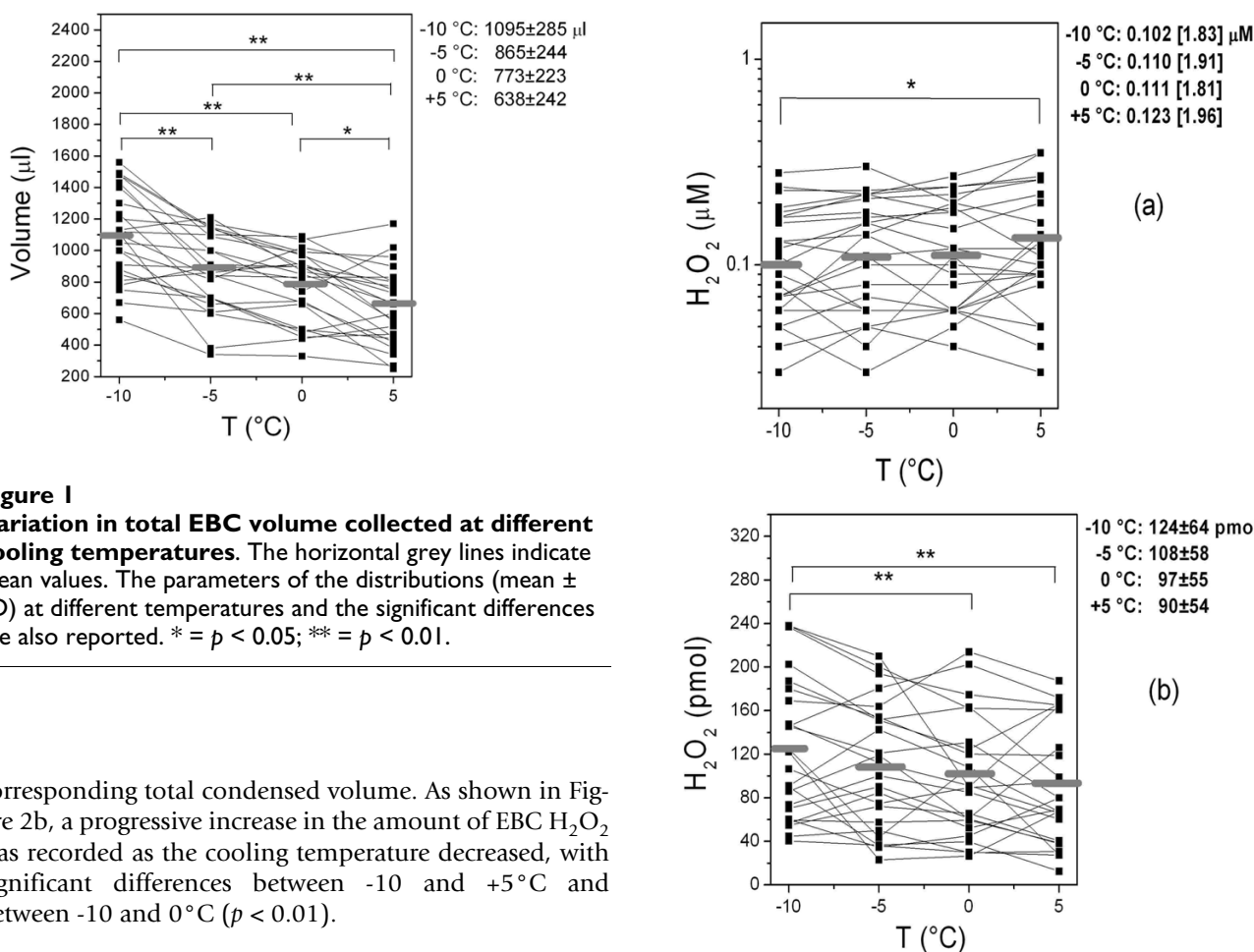
The measurements of the variables in the samples collected at different temperatures are shown in Figures 1, 2, 3, 4, which also show their distribution parameters (mean  $\pm$  SD or geometric mean [geometric SD]). There was a clear trend toward increasing EBC sample volumes with decreasing collection temperatures (Figure 1), which affected both the concentration and absolute amounts of the selected analytes to different extents.

All of the differences in volume between temperature pairs were statistically significant, except for the comparison between  $-5^{\circ}\text{C}$  and  $0^{\circ}\text{C}$ . At a fixed temperature, the total volume of expired air closely correlated with the total condensed volume ( $r > 0.95$ , data not shown).

The  $\text{H}_2\text{O}_2$  concentrations measured in the EBC samples collected at different cooling temperatures (Figure 2a) were significantly different between  $-10^{\circ}\text{C}$  and  $+5^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0.05$ ). The absolute amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (in pmol) was calculated by multiplying its concentration by the

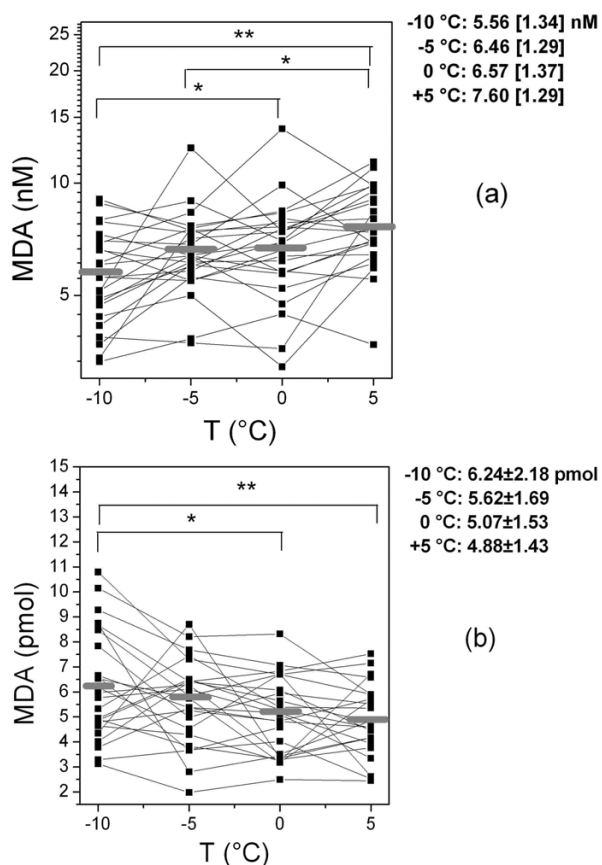
**Table 2: Inter-session variability of the selected parameters.**  $t_1, \dots, t_4$  represent four consecutive EBC collections from 10 healthy subjects. No significant differences were found using repeated measures ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. MDA was excluded from the analysis because its reliability has been previously measured [15,16]. Mean  $\pm$  SD or geometric mean [geometric SD] are also reported.

T	Total Volume ( $\mu$ l)				$H_2O_2$ ( $\mu$ M)				Conductivity ( $\mu$ S/cm)			
	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$	$t_1$	$t_2$	$t_3$	$t_4$
-10°C	1080 $\pm$ 270	1050 $\pm$ 220	1120 $\pm$ 250	1150 $\pm$ 220	0.097 [1.85]	0.092 [1.95]	0.108 [1.97]	0.112 [1.95]	1.8 [2.26]	2.6 [2.76]	2.4 [2.75]	1.5 [2.19]
+5°C	610 $\pm$ 200	680 $\pm$ 230	660 $\pm$ 250	600 $\pm$ 250	0.135 [1.92]	0.118 [1.88]	0.125 [1.91]	0.140 [2.00]	6 [2.95]	4.8 [2.70]	5.5 [2.50]	6.5 [2.33]

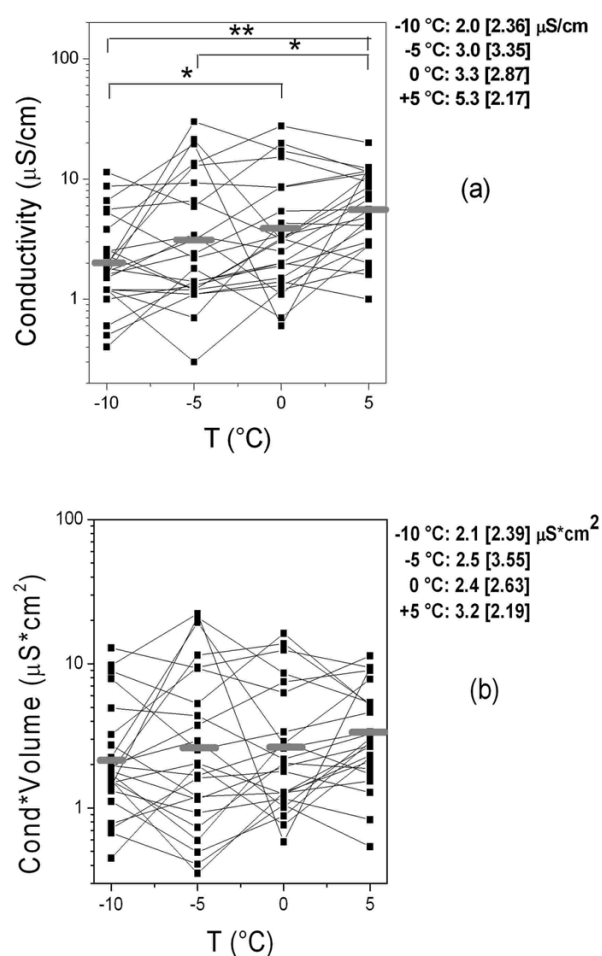


corresponding total condensed volume. As shown in Figure 2b, a progressive increase in the amount of EBC  $H_2O_2$  was recorded as the cooling temperature decreased, with significant differences between -10 and +5°C and between -10 and 0°C ( $p < 0.01$ ).

Figure 3a shows the differences in MDA concentration measured in the EBC samples collected at different cooling temperatures (between -10 and 0°C and between -5 and +5°C,  $p < 0.05$ ; between -10 and +5°C,  $p < 0.01$ ). Figure 3b shows that the absolute amount of MDA (in pmol) decreased with increasing temperature, with some residual statistically significant differences between -10 and 0°C ( $p < 0.05$ ) and between -10 and +5°C, ( $p < 0.01$ ).



**Figure 3**  
**Concentration (a) and absolute quantity (b) of EBC MDA at different cooling temperatures.** The horizontal grey lines indicate geometric mean (a) and mean values (b). The parameters of the distributions (geometric mean [geometric SD] and mean  $\pm$  SD for a and b respectively) at different temperatures and the significant differences are also reported. \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ .



**Figure 4**  
**EBC conductivity (a) and EBC conductivity\*EBC volume values (b) at different cooling temperatures.** The horizontal grey lines indicate geometric mean values. The parameters of the distributions (geometric mean [geometric SD]) at different temperatures and the significant differences are also reported. \* =  $p < 0.05$ ; \*\* =  $p < 0.01$ .

There was a progressive increase in EBC conductivity values at different cooling temperatures (Figure 4a), with significant differences between -10 and 0°C, between -5 and +5°C ( $p < 0.05$ ) and between -10 and +5°C ( $p < 0.01$ ). These differences disappeared when conductivity was multiplied by volume (thus expressing results as  $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^2$ ), as shown Figure 4b.

On the basis of the geometric standard deviation (GSD) of the values shown in Figures 2a, 3a and 4a, conductivity was more variable (range 2.17–3.35) than either  $\text{H}_2\text{O}_2$  (range 1.81–1.96) or MDA (range 1.29–1.37) concentrations.

Table 3 shows the parameters of regressions between measured variables: Pearson's correlation coefficient with its significance, and the intercept with Y axis (A) and the slope (B). The regressions were performed using the least-square method either on experimental data points or their logarithms, with Pearson's correlation coefficient being used to test the goodness-of-fit. Intra-individual variability due to repeated measures was assessed using the dummy variable method for multiple regression analysis. The results indicated a weak negative correlation between total volume and  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $r = -0.29, p < 0.01$ ) but, considering B values in table 3, the intra-individual contribution

**Table 3: Regressions between the measured variables. Regressions between the measured variables using the general model (second column) and the dummy variable method (third column). ns = not significant. Cond. = Conductivity, Vol. = Volume. r = Pearson's correlation coefficient; p = significance of r; A: intercept with Y-axis (±SD is also expressed); B: Slope of the regression line (±SD is also expressed); p (B): significance of B. The correlations refer to the concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA. E<sub>i</sub> = dummy variable. Its value is 1 for the i-th subject, -1 for the last subject, 0 elsewhere.**

	Log (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) = A + B*Volume			Log (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) = A + B*Volume + Σ <sub>i</sub> C <sub>i</sub> E <sub>i</sub>				
	r	P	A	B	p (B)	A	B	p (B)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs Vol.</b>	-0.29	<0.01	-0.73 ± 0.08	(-2.7 ± 0.9)*10 <sup>-5</sup>	<0.01	-0.88 ± 0.08	(-8.5 ± 5.2)*10 <sup>-5</sup>	ns
	Log (MDA) = A + B*Volume			Log (MDA) = A + B*Volume + Σ <sub>i</sub> C <sub>i</sub> E <sub>i</sub>				
	r	P	A	B	p (B)	A	B	p (B)
<b>MDA vs Vol.</b>	-0.54	<0.01	1.01 ± 0.04	(-2.4 ± 0.4)*10 <sup>-4</sup>	<0.01	1.00 ± 0.04	(-2.3 ± 0.4)*10 <sup>-4</sup>	<0.01
	Log (Cond.) = A + B*Volume			Log (Cond.) = A + B*Volume + Σ <sub>i</sub> C <sub>i</sub> E <sub>i</sub>				
	r	P	A	B	p (B)	A	B	p (B)
<b>Cond. vs Vol.</b>	-0.34	<0.01	0.94 ± 0.13	(-5.2 ± 1.5)*10 <sup>-4</sup>	<0.01	1.05 ± 0.13	(-6.5 ± 1.4)*10 <sup>-4</sup>	<0.01
	Log (MDA) = A + B*Log (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )			Log (MDA) = A + B*Log (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) + Σ <sub>i</sub> C <sub>i</sub> E <sub>i</sub>				
	r	P	A	B	p (B)	A	B	p (B)
<b>MDA vs H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	0.53	<0.01	1.05 ± 0.04	0.25 ± 0.04	<0.01	1.16 ± 0.09	0.37 ± 0.10	<0.01
	Log (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) = A + B*Log (Cond.)			Log (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) = A + B*Log (Cond.) + Σ <sub>i</sub> C <sub>i</sub> E <sub>i</sub>				
	r	P	A	B	p (B)	A	B	p (B)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vs Cond.</b>	0.12	Ns			Ns			ns
	Log (MDA) = A + B*Log (Cond.)			Log (MDA) = A + B*Log (Cond.) + Σ <sub>i</sub> C <sub>i</sub> E <sub>i</sub>				
	r	P	A	B	p (B)	A	B	p (B)
<b>MDA vs Cond.</b>	0.21	<0.05	0.78 ± 0.02	0.06 ± 0.03	<0.05	0.76 ± 0.02	0.10 ± 0.03	<0.01

was not significant. There was also a negative correlation between total volume and MDA ( $r = -0.54, p < 0.01$ ) with a similar inter-individual and intra-individual contribution. Conductivity showed a similar, albeit weaker correlation ( $r = -0.34, p < 0.01$ ). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA levels positively correlated ( $r = 0.53, p < 0.01$ ). There was no significant correlation between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and conductivity ( $r = 0.1, p = ns$ ), but a significant, albeit weak correlation between MDA and conductivity ( $r = 0.21, p < 0.05$ ), with a higher intra-individual contribution to variability.

**Discussion**

Although EBC is mostly water, it contains appreciable concentrations of volatile and non-volatile solutes. The presence of salts and peptides in EBC suggests a transfer of non-volatile compounds to the air phase, probably in the form of small droplets to allow the vapour stream to go through convective processes. Mathematical models based on *in vitro* experiments [18] have been developed in order to understand more about the physical phenomenon of droplet formation, and the size distribution of exhaled droplets has been characterized [19,20]. Other Authors have proposed complex mathematical models designed to account for the presence of non-volatile solutes in ambient air [21,22].

Various approaches have been proposed as a mean of normalising biomarker concentrations in EBC [8-11], including the use of endogenous non-volatile substances (ions, urea) or parameters (osmolality, conductivity after lyophilisation). One controversial assumption is that

serum and airway surface lining fluid are isotonic, but this is not supported by available evidence [23-25]. Although a normalisation factor may be useful for non-volatile molecules such as proteins and electrolytes, the *ex vivo* volatility of some currently measured biomarkers in EBC is still unclear, and their normalization by any non-volatile factor could actually lead to ignore their different exhalation pathways and consequent focusing ability in EBC collecting systems.

In this study, we assessed the *ex vivo* volatility of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA, which are respectively considered to be reliable biomarkers of airway inflammation and membrane peroxidation [26,27]; the volatility and solubility of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> are well known in aqueous solutions [28], but little is known about MDA. We also measured total condensed volume, which reflects overall subject ventilation [29], and conductivity after EBC lyophilisation, which reflects the concentration and charge of non-volatile electrolytes [11].

As expected, total condensed volume inversely related to temperature. On a pretty constant subject expiration, the number of condensed water molecules derived from the aqueous vapour phase depends on condensation temperature; with lower temperatures condensating a larger number of water molecules. Assuming an EBC density of approximately 1 g/cm<sup>3</sup> (near to that of pure water), the increase in the number of water molecules in the selected range of cooling temperatures can be calculated using the equation:

% increase water = Volume (-10°C)/Volume (+5°C) = 1.72,

On the basis of the mean values calculated in Figure 1. This ratio is significantly different from 1 ( $p < 0.01$ ).

The same equation (with different means and geometric means depending on the data distribution) was used to calculate the absolute amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA. As the ratios were significantly different from 1 (1.37 for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 1.28 for MDA,  $p < 0.01$ , Figures 2b and 3b), these biomarkers can be considered volatile compounds *ex vivo*. In both cases, the percentage of recovery is less than that of water. Therefore, as the condensation temperature decreased, the increase in their absolute amount was less than that of water.

The behaviour of EBC conductivity is an important comparative parameter. Like H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA, conductivity increased with temperature, although in this case the absolute increase was greater and inversely related to volume (Figure 4a). Assuming that EBC conductivity is proportional to mono-charged ion EBC concentration, which should represent more than 80% of the total [11], the product of conductivity by volume should be approximately proportional to the number of electrolyte molecules and, as expected, the differences between collection temperatures were no longer significant (Figure 4b). This may be due to the fact that the number of expired droplets (and therefore the absolute amount of recovered ions) is not temperature dependent, whereas the observed decrease in conductivity at lower temperatures should only depend on number of condensed water molecules with the subsequent dilution of non-volatile substances. We calculated the percent increase in salt molecules using the equation:

% increase salts molecules  $\approx$  Conductivity\*Volume (-10°C)/Conductivity\*Volume (+5°C) = 0.66,

on the basis of the geometric mean values shown in figure 4b. The ratio is not significantly different from 1.

On the basis of our data, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA should both be considered volatile substances *ex vivo*, whereas conductivity should not. The normalisation of these volatile substances by non-volatile compounds or parameters would therefore not take into account their specific excretion pathway. Further, the high variability of conductivity (Figure 4a) suggests that its level in EBC is not regulated by a specific biological elimination mechanism, but depends on a random process, that would make its use as a normalisation factor hazardous. Effros *et al.* [9] suggested that volatile compounds should be measured in the gas phase of expiration rather than in EBC, but our findings show

that, although the determination of low-volatility compounds is influenced by the condensation temperature, their determination in EBC is not nonsensical provided that the EBC collection temperature is fixed: at the relatively high condensation temperature of +5°C, about 70% of the total molecules measured at -10°C were present in solution.

The intra-session variability study (Table 2) showed that temperature-related differences in collected marker levels can not be attributed to intra-individual variability. MDA reliability was not assessed as it has already been demonstrated [15,16].

The between-variable correlations and regressions gave further information concerning the mutual relationships of the compounds. When regression was calculated without making any distinction for repeated measures, the contribution of temperature was mixed with other possible contributions, such as that of ventilatory volume, which closely correlated with the total collected volume at a fixed temperature. Isolation of the intra-individual effect by means of the dummy variable method distinguished the effect of temperature from the other contributions as the ventilatory volume of the same subject was kept constant at the different temperatures, and made it possible to estimate its effect on the parameters describing the regression.

EBC H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations showed a weak negative correlation with EBC total volume ( $r = -0.29$ ), but this was not significant when only the intra-individual effect was considered (Table 3). Although the temperature-induced variations in volume did not correlate with the variations in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration, the inter-individual variability in volume due to other contributions moderately affected H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrations. On the contrary, EBC MDA concentration negatively correlated with total EBC volume ( $r = -0.54$ ), with a similar contribution of inter-individual and intra-individual effect (Table 3). As a result, total volume could be a relevant parameter, particularly if the EBC biomarker correlates with EBC volume and the effect of condensation temperature is ruled out. When sampling occurs at a constant temperature, any inter-individual difference in EBC volume can be ascribed to total ventilation volume. Under these circumstances, the use of total EBC volume as a covariate could normalise the effect of total ventilation volume on biomarker concentrations.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA positively correlated ( $r = 0.53$ ). These data suggest that, in addition to their volatility, hydrogen peroxide production and lipid peroxidation could also be related processes *in vivo* in healthy subjects, as already observed in subjects affected by respiratory tract inflammation [30].

Finally, although there was no correlation between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration and conductivity values, thus reinforcing the idea that non-volatile compounds and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in EBC have different physico-chemical properties, a very weak positive correlation was found between MDA and conductivity ( $r = 0.21$ ): this suggests that a slight contribution to the total concentration of MDA in EBC could derive from MDA-containing droplets. In fact, the lack of correlation between conductivity and volatile components indicates that non-volatile ions reflect the number of airway lining fluid droplets joining the vapour stream, a mechanism that would complement evaporation. The latter seems to be the main determinant of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (which is volatile) and MDA (which is also slightly volatile) content in EBC.

## Conclusion

On the basis of the present study, we suggest that:

1. the temperature of EBC collection should be controlled and reported;
2. cooling temperatures should be chosen on the basis of analytical needs (required EBC volumes, sensitivity of the method, etc.);
3. water is the main variable dilution factor, and so total condensed volume should be recorded;
4. the cooling temperature related to EBC collection may differently influence biomarkers and normalizing factors, which should belong to the same class as the analytes requiring normalization (e.g., in terms of relative volatility and solubility).

## Abbreviations

EBC = Exhaled Breath Condensate; MDA = Malondialdehyde; LOD = Limit of Detection; LC-MS/MS = liquid chromatography-mass spectrometry tandem; TURBO-DECCS = Transportable Unit for Research on Biomarkers Obtained from Disposable Exhaled Condensate Collection Systems.

## Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

MG: substantial contribution to conception and design, acquisition of data, analysis and interpretation of data, involved in drafting the article.

AC: substantial contribution to conception and design, collection of samples, revision of the draft critically for important intellectual content.

RA: acquisition of data, revision of the draft critically for important intellectual content.

DP: substantial contribution to conception and design, revision of the draft critically for important intellectual content.

PM: substantial contribution to conception and design, revision of the draft critically for important intellectual content.

MVV: substantial contribution to conception and design, acquisition of data, revision of the draft critically for important intellectual content.

MC: substantial contribution to conception and design, analysis and interpretation of data, involved in drafting the article.

AM: substantial contribution to conception and design, statistical analysis and interpretation of data, involved in drafting the article, final approval of the version to be published.

## Acknowledgements

This work was supported by the National Heart, Blood and Lung Institute (NHLBI), Bethesda, MD, USA (grant 1R01 HL72323-01), and by the Italian Ministry of Education, University and Research (PRIN 200306145). Contents of this article are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the NHLBI or the National Institutes of Health.

## References

1. Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I: **Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans.** *Am J Respir Crit Care Med* 2001, **164**:731-737.
2. Mondino C, Ciabattini G, Koch P, Pistelli R, Trove A, Barnes PJ, Montuschi P: **Effects of inhaled corticosteroids on exhaled leukotrienes and prostanoids in asthmatic children.** *J Allergy Clin Immunol* 2004, **114**:761-767.
3. Effros RM, Su J, Casaburi R, Shaker R, Biller J, Dunning M: **Utility of exhaled breath condensates in chronic obstructive pulmonary disease: a critical review.** *Curr Opin Pulm Med* 2005, **11**:135-139.
4. Carpagnano GE, Foschino-Barbaro MP, Resta O, Gramiccioni E, Carpagnano F: **Endothelin-1 is increased in the breath condensate of patients with non-small-cell lung cancer.** *Oncology* 2004, **66**:180-184.
5. Carpagnano GE, Kharitonov SA, Wells AU, Pantelidis P, Du Bois RM, Barnes PJ: **Increased vitronectin and endothelin-1 in the breath condensate of patients with fibrosing lung disease.** *Respiration* 2003, **70**:154-160.
6. Gessner C, Hammerschmidt S, Kuhn H, Seyfarth HJ, Sack U, Engelmann L, Schauer J, Wirtz : **Exhaled breath condensate acidification in acute lung injury.** *Respir Med* 2003, **97**:1188-1194.
7. Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, Bergonzi R, Apostoli P, Mutti A: **Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten.** *Environ Health Perspect* 2004, **112**:1293-1298.
8. Dwyer TM: **Sampling airway surface liquid: non-volatiles in the exhaled breath condensate.** *Lung* 2004, **182**:241-250.
9. Effros RM, Dunning MB 3rd, Biller J, Shaker R: **The promise and perils of exhaled breath condensates.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004, **287**:L1073-80.

10. Effros RM, Hoagland KW, Bosbous M, Castillo D, Foss B, Dunning M, Gare M, Lin W, Sun F: **Dilution of respiratory solutes in exhaled condensates.** *Am J Respir Crit Care Med* 2002, **165**:663-669.
11. Effros RM, Biller J, Foss B, Hoagland K, Dunning MB, Castillo D, Bosbous M, Sun F, Shaker R: **A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **168**:1500-1505.
12. Atkins PW: *Physical Chemistry* 6th edition. Oxford: Oxford University Press; 1998.
13. Corradi M, Alinovi R, Goldoni M, Vettori MV, Folesani G, Mozzoni P, Cavazzini S, Bergamaschi E, Rossi L, Mutti A: **Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone.** *Toxicol Lett* 2002, **134**:219-225.
14. Nowak D, Kalucka S, Bialasiewicz P, Krol M: **Exhalation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> AND Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) by healthy subjects.** *Free Rad Biol Med* 2001, **30**:178-186.
15. Andreoli R, Manini P, Corradi M, Mutti A, Niessen WM: **Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry.** *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003, **17**:637-645.
16. Corradi M, Pignatti P, Manini P, Andreoli R, Goldoni M, Poppa M, Moscato G, Balbi B, Mutti A: **Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation.** *Eur Respir J* 2004, **24**:1011-1017.
17. Glantz SA, Slinker BK: *Primer of Applied Regression and Analysis of Variance* 2nd edition. Columbus, OH: McGraw-Hill Education; 2000.
18. Moriarty JA, Grotberg JB: **Flow-induced instabilities of a mucous bilayer.** *J Fluid Mech* 1999, **397**:1-22.
19. Papineni RS, Rosenthal FS: **The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects.** *J Aerosol Med* 1997, **10**:105-116.
20. Edwards DA, Man JC, Brand P, Katstra JP, Sommerei K, Stone HA, Nardell E, Scheuch G: **Inhaling to mitigate exhaled bioaerosols.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:17383-17388.
21. Mikhailov E, Vlasenko S, Niessner R, Poschl U: **Interaction of aerosol particles composed of protein and salts with water vapor: hygroscopic growth and microstructural rearrangement.** *Atmos Chem Phys Discuss* 2003, **3**:4755-4832.
22. Clement CF: **Mean field theory for condensation on aerosols and application to multi-component organic vapours.** *Aerosol Sci* 2003, **34**:27-40.
23. Joris L, Dab I, Quinton PM: **Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and diseased airways.** *Am Rev Respir Dis* 1993, **148**:1633-1637.
24. Knowles MR, Robinson JM, Wood RE, Pue CA, Mentz WM, Wager GC, Gatzky JT, Boucher RC: **Ion Composition of Airway Surface Liquid of Patients with Cystic Fibrosis as Compared with Normal and Disease-control Subjects.** *J Clin Invest* 1997, **100**:2588-2595.
25. Widdicombe JH: **Altered NaCl concentration of airway surface liquid in cystic fibrosis.** *Pflugers Arch* 2001, **443**(Suppl 1):S8-10.
26. De Benedetto F, Aceto A, Dragani B, Spacone A, Formisano S, Pela R, Donner CF, Sanguinetti CM: **Long-term oral n-acetylcysteine reduces exhaled hydrogen peroxide in stable COPD.** *Pulm Pharmacol Ther* 2005, **18**:41-47.
27. Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, Manini P, Caglieri A, Poli D, Alinovi R, Mutti A: **Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease.** *Am J Respir Crit Care Med* 2003, **167**:1380-1386.
28. **Introduction to Hydrogen Peroxide-Physical and Chemical Properties – Physical** [<http://www.h2o2.com/intro/properties/physical.html>]
29. McCafferty JB, Bradshaw TA, Tate S, Greening AP, Innes JA: **Effects of breathing pattern and inspired air conditions on breath condensate volume, pH, nitrite, and protein concentrations.** *Thorax* 2004, **59**:694-698.
30. Mylonas C, Kouretas D: **Lipid peroxidation and tissue damage.** *In Vivo* 1999, **13**:295-309.

### Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2466/5/10/prepub>

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:  
[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



## **ALLEGATO 6**

### **The Effect of Inhaled Chromium on Different Exhaled Breath Condensate Biomarkers among Chrome-plating Workers.**

Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, **Andreoli R**, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P,  
Mutti A.

Environmental Health Perspectives, 2006; 114: 542-546.

## The Effect of Inhaled Chromium on Different Exhaled Breath Condensate Biomarkers among Chrome-Plating Workers

Andrea Caglieri,<sup>1</sup> Matteo Goldoni,<sup>1,2</sup> Olga Acampa,<sup>1</sup> Roberta Andreoli,<sup>1,2</sup> Maria Vittoria Vettori,<sup>1,2</sup> Massimo Corradi,<sup>1,2</sup> Pietro Apostoli,<sup>3</sup> and Antonio Mutti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Industrial Toxicology, Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences, University of Parma, Italy; <sup>2</sup>National Institute of Occupational Safety and Prevention, Research Centre at the University of Parma, Parma, Italy; <sup>3</sup>Laboratory of Industrial Hygiene, Department of Experimental and Applied Medicine, University of Brescia, Brescia, Italy

Chromium is corrosive, cytotoxic, and carcinogenic for humans and can induce acute and chronic lung tissue toxicity. The aim of this study was to investigate Cr levels in exhaled breath condensate (EBC) of workers exposed to Cr(VI) and to assess their relationship with biochemical changes in the airways by analyzing EBC biomarkers of oxidative stress, namely, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and malondialdehyde (MDA). EBC samples were collected from 24 chrome-plating workers employed in a chrome-plating plant both before and after the Friday work shift and before the work shift on the following Monday. Cr-EBC levels increased from the beginning (5.3 µg/L) to the end of Friday (6.4 µg/L) but were considerably lower on Monday morning (2.8 µg/L). A similar trend was observed for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-EBC levels (which increased from 0.36 µM to 0.59 µM on Friday and were 0.19 µM on Monday morning) and MDA-EBC levels (which increased from 8.2 nM to 9.7 nM on Friday and were 6.6 nM on Monday). Cr-EBC levels correlated with those of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-EBC ( $r = 0.54$ ,  $p < 0.01$ ) and MDA-EBC ( $r = 0.59$ ,  $p < 0.01$ ), as well as with urinary Cr levels ( $r = 0.25$ ,  $p < 0.05$ ). The results of this study demonstrate that EBC is a suitable matrix that can be used to investigate both Cr levels and biomarkers of free radical production sampling the epithelial-lining fluid of workers exposed to Cr(VI). **Key words:** chromium, exhaled breath condensate, hydrogen peroxide, lung, malondialdehyde. *Environ Health Perspect* 114:542–546 (2006). doi:10.1289/ehp.8506 available via <http://dx.doi.org/> [Online 8 December 2005]

Chromium is a transition element occurring in the environment (soil, rocks, plants, dust, and gases), primarily in the elemental, trivalent [Cr(III)], and hexavalent [Cr(VI)] oxidation states. Both Cr(III) and Cr(VI) are environmentally stable, and their toxicologic profiles are well known; Cr(III) has limited toxicologic properties [De Flora et al. 1990; International Agency for Research on Cancer (IARC) 1990] and is considered to be an essential trace metal in humans (Anderson 1981), whereas various Cr(VI) compounds are considered to be human carcinogens [Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) 2000; De Flora 2000; Ding and Shi 2002; IARC 1990; Kawanishi et al. 2002; O'Brien et al. 2003], are known to induce both acute and chronic toxic effects (ATSDR 2000), and are of the greatest occupational and environmental health concern.

The respiratory tract is the main target organ of Cr(VI) toxicity associated with both acute (short-term) and chronic (long-term) inhalation (ATSDR 2000; De Flora 2000): acute exposure may cause shortness of breath, coughing, and wheezing (Sobaszek et al. 2000). Chronic exposure leads to ulcerations and perforations of the nasal septum, chronic bronchitis, decreased pulmonary function, pneumonia, and other respiratory effects (Bradshaw et al. 1998). On the basis of experimental and epidemiologic evidence (De Flora 2000; Gibb et al. 2000; Luippold et al. 2005; Park et al. 2004), IARC has classified

Cr(VI) as a class 1 carcinogen (recognized human carcinogen).

Cr(VI) compounds are used in several industrial applications (chrome plating, welding inox steel and other special steels, painting, leather tanning, and wood preserving). Occupational exposure mainly occurs by inhalation, but it may involve the gastrointestinal tract and skin (De Flora 2000). Therefore, the respiratory tract is the primary target organ for Cr(VI) compounds. Experimental work on the rat showed that lung accumulation of Cr(VI) can be observed even after intravenous administration (Mutti et al. 1979). The mechanism of Cr(VI) cytotoxicity is not completely understood, but several studies have shown that Cr(VI) compounds induce oxidative stress, DNA damage, apoptotic cell death, and altered gene expression (Bagchi et al. 2002; Wise et al. 2002; Zhitkovich 2005). The reduction in Cr(VI) levels induced by redox-active enzymes and small molecules generates intermediate unstable states, such as Cr(V) or Cr(IV), that may mediate the formation of free hydroxyl, thiyl, ascorbate, and carbon-based radicals (Ding and Shi 2002; Levina and Lay 2005; O'Brien et al. 2003) that are capable of damaging macromolecular targets, such as DNA (Stohs et al. 2001). Interestingly, although Cr(III) reacts with DNA and proteins, it is unable to cross cell membranes. The opposite occurs for Cr(VI) species, which do not react with nucleophilic targets but can easily cross cell membrane through anion

channels. Once inside the cell, Cr(VI) is rapidly reduced to the trivalent state, and Cr(III) then interacts with cell proteins and DNA (Levina and Lay 2005).

Improved work areas, procedures, and hygiene measures have minimized occupational exposure to Cr(VI) compounds and led to a reduction in traditional adverse effects on the lung, such as tracheobronchitis or pneumonia; however, long-term Cr(VI) exposure may still cause airway disorders, including airway irritation, sensitization, and lung cancer. Sensitive tests are therefore needed to evaluate early biochemical changes that occur in the respiratory tract after Cr(VI) exposure. Furthermore, because the respiratory tract is the primary route of exposure to Cr(VI), the quantification of biomarkers of free radical production at the target organ level could improve the sensitivity and specificity of putative biomarkers.

We have recently shown that exhaled breath condensate (EBC), a fluid formed as a result of the cooling of expired air, is a suitable matrix not only for assessing the biomarkers of oxidative stress in exposed workers [malondialdehyde (MDA)] but also for quantifying the levels of some pneumotoxic substances in the lung, in particular, cobalt (Goldoni et al. 2004). The synergistic effect of tungsten to power the lipid peroxidation caused by cobalt has also been demonstrated (Goldoni et al. 2004).

The aim of the present study was to investigate Cr levels in the EBC of workers employed in the chrome-plating industry and to assess early biochemical changes in the airways by analyzing EBC biomarkers of oxidative stress, such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and MDA.

Address correspondence to A. Mutti, Laboratory of Industrial Toxicology, Department of Clinical Medicine, Nephrology and Health Sciences, University of Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma, Italy. Telephone: 39-0521-033075. Fax: 39-0521-033076. E-mail: antonio.mutti@unipr.it

This study was supported by the National Heart, Blood and Lung Institute (NHLBI; grant R01 HL72323) and the Italian Ministry of Education, University and Research (PRIN 200306145).

The contents of this article are solely the responsibility of the authors and do not necessarily represent the official views of the NHLBI or the National Institutes of Health.

The authors declare they have no competing financial interests.

Received 15 July 2005; accepted 8 December 2005.

## Materials and Methods

**Subjects.** Table 1 shows the demographic and clinical characteristics of the 24 chrome-plating workers recruited in the study, each of whom carried out various tasks during the same work day. Four of these subjects have a history of light smoking status (< 10 cigarettes/day, corresponding to < 10 packs/year), but we did not find any differences in exhaled biomarker levels between smoking and nonsmoking workers. All of the workforce volunteered to participate in this study, which took place during paid work hours. The “healthy worker effect” cannot be ruled out, owing to preemployment selection procedures. However, all of these workers underwent medical health surveillance, and all were asymptomatic and presumably healthy. The control group consisted of 25 healthy adult volunteers with no significant history of lung disease and who were not occupationally exposed to Cr. The workers also exhibited normal spirometric indices and did not report any significant previous or current respiratory diseases. None of them had any symptoms of acute respiratory illness during the 4 weeks preceding the study. We found no differences between male and female control subjects for the studied biomarkers.

**Study design.** Before enrollment, the subjects completed a short questionnaire concerning their current and previous medical history and underwent a spirometric examination. The EBC and urine samples of the workers were assessed three times: *a*) before the work shift on Friday ( $T_0$ ); *b*) at the end of the same shift, after 8 hr of work ( $T_1$ ); and *c*) before exposure on the following Monday ( $T_2$ ). EBC and urine samples from the controls were collected in our laboratory during a normal work day, and a subgroup of 10 subjects repeated the procedures in the office area of the workplace in order to exclude any contamination by the office environmental air.

All of the subjects gave their written informed consent to the procedures, which were approved by our local ethics committee. The biologic material was sampled as described in the Declaration of Helsinki (World Medical Association 2002).

**Spirometric measurements.** Spirometry was performed using a pneumotachograph

(Koko Spirometer, Sensormedics, Milan, Italy). Mean forced expiratory volume in 1 sec ( $FEV_1$ ) and forced vital capacity (FVC) were obtained from the three best acceptable test values of lung function, as recommended by the American Thoracic Society (1995).

**Environmental measurements.** Ambient monitoring was carried out by personal samplers. Briefly, airborne particulate was collected on polyvinyl chloride membrane filters (5.0  $\mu$ m porosity, 25 mm diameter) according to National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH) protocol 7300 (NIOSH 2003a) at a constant flow of 3 L/min for a period ranging from 90 to 150 min in the morning or afternoon of the Friday work shift. The membranes were weighed in a thermohygrometrically conditioned cabinet using a precision balance with a sensitivity of 0.01 mg and dissolved in concentrated hyperpure nitric acid (70%), and the solution was diluted with ultrapure water. The analytical blank was obtained from virgin membranes. Total Cr was analyzed by means of electrothermal atomic absorption spectroscopy (ETAAS) with Zeeman background correction following UNICHIM (Italian Association for Unification in the Sector of Chemical Industry) method 886 (UNICHIM 1995), and expressed as micrograms per cubic meter. To validate the precision and the sensitivity of our method, we used the standard addition method using a certified Cr(VI) standard solution (Fluka, Milan, Italy). The amount of soluble hexavalent Cr in the ambient air was estimated following NIOSH protocol 7703 (NIOSH 2003b) after air collection using stationary samplers in the work rooms and office of the plant.

Airborne concentrations of total Cr for the Friday work shift were 8.8 (2.6)  $\mu$ g/m<sup>3</sup> [GM (GSD)] in the morning and 5.0 (2.5)  $\mu$ g/m<sup>3</sup> in the afternoon, and the weighted average was 7.8 (2.3)  $\mu$ g/m<sup>3</sup>. Workers were significantly more exposed in the morning ( $p < 0.05$ ) than during the afternoon half-shift, whereas there were no significant differences in the collection times between morning and afternoon. Soluble Cr(VI) was about 70% of the total Cr

monitored in the environment (data not shown); therefore, all measured Cr samples were below the limit proposed by the American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH 1999) for water-soluble Cr(VI) organic compounds (50  $\mu$ g/m<sup>3</sup>).

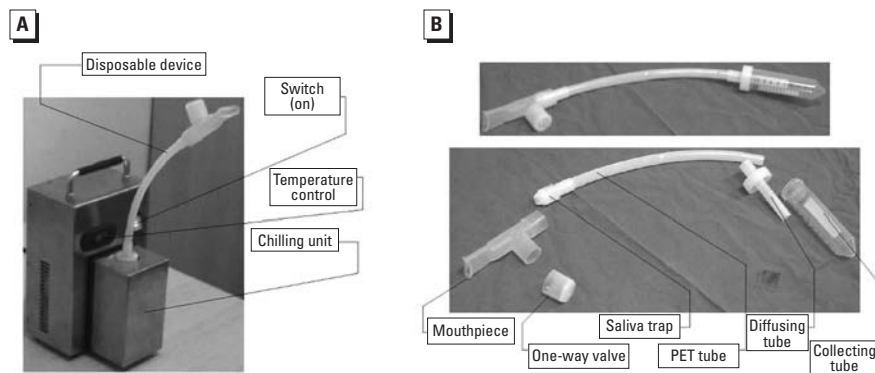
**EBC collection.** EBC was collected using a new portable TURBO-DECCS condenser (transportable unit for research on biomarkers obtained from disposable exhaled condensate collection systems; ItalChill, Parma, Italy; Figure 1A) specifically designed to collect EBC in clinical and work settings. The condenser has a refrigerating system (TURBO) that thermostatically controls the working temperature, and a disposable respiratory system (DECCS) that consists of a mouthpiece connected to a one-way aspiration valve and (through a tube with a special stopper) an EBC collection test tube at the end (Figure 1B). On the basis of preliminary data (not shown), we chose a condensation temperature of  $-5^\circ\text{C}$  (Goldoni et al. 2005), a good compromise between the yield in terms of volume for multianalyses and detectable concentrations of the selected analytes.

The subjects were asked to breathe tidally through the mouthpiece for 15 min, while sitting comfortably in the workplace office where the level of total Cr was < 0.1  $\mu$ g/m<sup>3</sup> (workers) or in the laboratory office (controls). They were instructed to form a complete seal around the mouthpiece with their mouths, which had to be kept dry by periodically swallowing excess saliva; they were also asked to rinse their mouths thoroughly before the maneuver and every 5 min during the test. To prevent any contamination from the skin, the subjects were asked to wash their hands before EBC and urine collection and to wear disposable latex gloves during the collecting procedures. EBC sample volume was accurately measured with a calibrated pipette, and salivary contamination was excluded by means of the colorimetric detection of alpha-amylase activity (Infinity amylase reagent; Sigma, Milan, Italy). Moreover, we measured the levels of Cr in saliva of five workers and found a

**Table 1.** Demographic and clinical data of subjects participating in this study (mean  $\pm$  SD).

	Controls	Chrome-plating workers
No. of subjects	25	24
Sex (male/female)	13/12	24/0
Age (years)	31.0 $\pm$ 6.7	37.7 $\pm$ 6.3
Smokers/ex-/non <sup>a</sup>	0/5/20	4/2/18
FVC (% predicted)	108 $\pm$ 10.4	89.8 $\pm$ 10.7
$FEV_1$ (% predicted)	103.7 $\pm$ 11.4	91.8 $\pm$ 12.0
$FEV_1$ :FVC	81.9 $\pm$ 6.3	83.1 $\pm$ 7.5

<sup>a</sup>Smokers/ex-smokers/nonsmokers.



**Figure 1.** (A) TURBO-DECCS condenser. (B) DECCS-system disposable device. PET, polyethylene.

maximum salivary Cr level of about 10 times higher than the corresponding EBC value, not sufficient to justify salivary contamination, given that the limit of detection (LOD) of the amylase kit was much lower (between 1/10,000 and 1/5,000) than the amylase activity measured in saliva. Finally, the EBC samples were transported in dry ice to the laboratory and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis.

**Analysis of Cr in urine and EBC.** Urinary Cr (Cr-U) was measured by ETAAS and expressed as a function of creatinine. Urinary overcorrection was excluded because none of the subjects presented creatinine levels  $< 30\text{ mg/L}$  or  $> 300\text{ mg/L}$ . The LOD was  $0.05\text{ }\mu\text{g/L}$ , and a certified standard (Fluka) was repeated every 10 samples.

The ETAAS analysis protocol was applied to the EBC samples, and the results were confirmed by inductively coupled plasma–mass spectrometry (ICP-MS) in a separate laboratory, with an interlaboratory regression coefficient of 0.95 and an average deviation between samples of about 10% (data not shown). The LOD was  $0.05\text{ }\mu\text{g/L}$ .

**$\text{H}_2\text{O}_2$ -EBC measurements.**  $\text{H}_2\text{O}_2$ -EBC was measured as previously described (Corradi et al. 2002) using a commercial kit (Amplex Red hydrogen peroxide assay kit; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) with an LOD of  $0.01\text{ }\mu\text{M}$ . The analyses were made 2–3 days after EBC collection. Samples were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  up to 3 days at the most (Goldoni et al. 2005).

**MDA-EBC measurements.** MDA-EBC was measured by tandem liquid chromatography–mass spectrometry as previously described by Andreoli et al. (2003), with an LOD of  $1\text{ nM}$ .

**Statistical analysis.** The data were analyzed using SPSS 13.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) and PRISM 3.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA). The measured parameters showed a log-normal distribution (Shapiro-Wilk test) for all the considered groups of subjects; therefore, the data were log-transformed for all of the statistical tests, and the results were expressed as the geometric mean (GM) and geometric SD (GSD). Median values and interquartile ranges are also reported. We analyzed log-transformed data using repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparisons or a paired Student *t*-test in order to assess the differences within the workers' group at different times. One-way ANOVA, followed by Dunnett's multiple comparisons, was used to assess the differences between the workers and controls. Pearson's *r* was used to assess the correlations between variables in the log-scale. The normality is required for all parametric comparison tests, whereas for tests assessing differences between repeated measures in dependent samples, a normal distribution is required for those differences. A log-transformation of our data was necessary to satisfy both the above requirements. Moreover, such a log-transformation was necessary to limit the

undue influence of the highest values on the *r*- and *p*-values. A *p*-value of  $< 0.05$  (two-tailed) was considered significant for all of the tests.

## Results

Ambient Cr levels sampled during the afternoon moderately correlated with Cr-U ( $r = 0.48$ ,  $p < 0.05$ ) and Cr-EBC at  $T_1$  ( $r = 0.47$ ,  $p < 0.05$ ), as shown in Figure 2.

Table 2 shows the Cr-U and Cr-EBC levels at the different time points. Compared with the controls, the exposed workers had higher levels of both at all of the time points (except for a few Cr-EBC levels at  $T_2$ ) ( $p < 0.01$ ). Cr-U levels were higher at  $T_1$  than at  $T_0$  ( $p < 0.05$ ) and  $T_2$  ( $p < 0.01$ ), and the difference between  $T_0$  and  $T_2$  was also significant ( $p < 0.01$ ). Cr-EBC levels were higher at  $T_0$  and  $T_1$  than at  $T_2$  ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively), whereas no difference was observed between  $T_0$  and  $T_1$ .

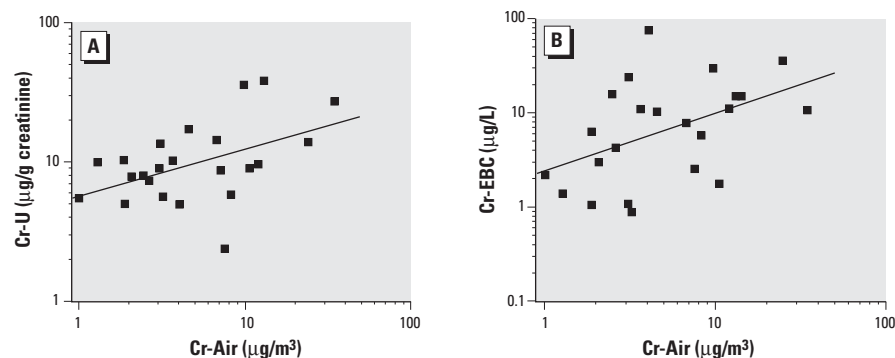
Workers'  $\text{H}_2\text{O}_2$ -EBC levels were higher than those of the controls at  $T_0$  ( $p < 0.05$ ) and  $T_1$  ( $p < 0.01$ ), and there was a significant difference between  $T_2$  and both  $T_0$  and  $T_1$  ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively); the difference between  $T_0$  and  $T_1$  was not significant (Table 2).

The MDA-EBC levels of workers were not significantly higher than those of the controls at every time point, although 12 of 24 workers (whose median of Cr-EBC was  $11\text{ }\mu\text{g/L}$ ) presented MDA levels above the 95% confidence interval (CI) upper limit for controls ( $10\text{ nM}$ ) at  $T_1$ . The other workers with MDA-EBC  $< 10\text{ nM}$  showed a median of  $2.5\text{ }\mu\text{g/L}$  of Cr-EBC. The only significant difference in MDA-EBC was between  $T_1$  and  $T_2$  ( $p < 0.01$ , Table 2).

All nonparametric tests gave results consistent with those observed using their parametric counterpart on log-transformed values. Cr-U and Cr-EBC levels presented a weak-to-moderate correlation at all time points ( $r = 0.25$ ,  $p < 0.05$ ; Figure 3A). Cr-EBC and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -EBC correlated closely ( $r = 0.54$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 3B), particularly at  $T_1$  ( $r = 0.72$ ,  $p < 0.01$ ; data not shown); Cr-EBC also correlated with MDA-EBC ( $r = 0.59$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 3C).  $\text{H}_2\text{O}_2$  and MDA were positively correlated with each other ( $r = 0.49$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 3D).

There was also a correlation between  $\text{H}_2\text{O}_2$ -EBC and Cr-U levels—although it was lower than the correlation between Cr-EBC and  $\text{H}_2\text{O}_2$ -EBC ( $r = 0.41$ ,  $p < 0.01$ ; Figure 3E)—whereas the correlation between Cr-U and MDA-EBC was not significant (Figure 3F). The significance of all the correlations was confirmed by the Spearman non-parametric correlation test.

We observed no statistically significant differences in EBC-collected volumes between exposed workers (mean  $\pm$  SD,  $1,545 \pm 255\text{ }\mu\text{L}$  at  $T_0$ ,  $1,460 \pm 270\text{ }\mu\text{L}$  at  $T_1$ , and  $1,570 \pm$



**Figure 2.** Correlations, with linear regression lines and Pearson's *r*, between environmental airborne Cr (Cr-Air) and Cr-U (A;  $r = 0.48$ ,  $p < 0.05$ ) and between Cr-Air and Cr-EBC (B;  $r = 0.47$ ,  $p < 0.05$ ).

**Table 2.** Cr-U, Cr-EBC,  $\text{H}_2\text{O}_2$ -EBC, and MDA-EBC levels of controls and of workers at different sampling times.

	Cr-U ( $\mu\text{g/g creatinine}$ )	Cr-EBC ( $\mu\text{g/L}$ )	$\text{H}_2\text{O}_2$ -EBC ( $\mu\text{M}$ )	MDA-EBC (nM)
Controls				
GM (GSD)	0.25 (2.3)	0.28 (2.6)	0.09 (1.6)	6.0 (1.5)
Median (25th–75th percentile)	0.24 (0.09–0.45)	0.25 (0.1–0.44)	0.12 (0.05–0.2)	6.5 (5.0–8.2)
Workers ( $T_0$ )				
GM (GSD)	8.2 (2.1)**	5.3 (2.9)**	0.36 (2.4)*	8.2 (1.5)
Median (25th–75th percentile)	7.9 (6.2–10.8)	7.3 (2.3–9.2)	0.44 (0.22–0.61)	7.7 (6.6–11.5)
Workers ( $T_1$ )				
GM (GSD)	9.4 (2.1)**,#	6.4 (3.4)**	0.59 (2.0)**	9.7 (1.7)
Median (25th–75th percentile)	9.0 (5.6–13.4)	7.8 (2.1–15.2)	0.69 (0.42–0.86)	10.7 (6.9–13.4)
Workers ( $T_2$ )				
GM (GSD)	5.7 (2.2)**,#,†	2.8 (3.2)**,#,†	0.19 (2.6)#,†	6.6 (1.5)†
Median (25th–75th percentile)	5.6 (3.1–6.7)	4.0 (1.1–6.6)	0.21 (0.09–0.35)	6.8 (5.3–8.0)

\* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  compared with controls. # $p < 0.05$  and ## $p < 0.01$  compared with  $T_0$ . † $p < 0.01$  compared with  $T_1$ .

280  $\mu\text{L}$  at  $T_2$ ) and controls ( $1,585 \pm 240 \mu\text{L}$ ). The exhaled markers did not correlate with total condensed volume, and because there were no statistical differences between the total EBC volumes at the different time points, total condensed volume was excluded from the analysis. The total expired air was not measured because, as already demonstrated by Gessner et al. (2001), the total volume of expired air is highly correlated ( $r = 0.95$ ) with the total volume of EBC.

## Discussion

Blood and urine are currently used for the biologic monitoring of workers exposed to Cr (Franchini and Mutti 1988; Mutti et al. 1984, 1985), and thus represent the gold standard matrices for the assessment of exposure. However, they provide little information concerning lung levels, which are not necessarily related to absorbed dose, but are certainly responsible for local inflammation on the respiratory tract. EBC analysis is a novel approach to biologic monitoring, enabling us to quantify both internal dose levels of inhaled metals and to assess epithelial-lining fluid levels of biomarkers of free radical production. The results of our study show that EBC is a suitable medium for assessing biomarkers of inflammation (i.e., oxidative stress) and that it can be used to investigate lung tissue levels and biomarkers of effect in workers exposed to Cr(VI). However, future studies are needed to look at the quantitative relationship between Cr concentration in air and EBC levels as well as the association with relevant clinical outcome to assess health effects, such as spirometry, or methacholine reactivity, and so forth.

Our study was designed to assess biologic markers at different sampling times in order to evaluate the consequences of long-term and daily lung exposure. Cr-EBC and Cr-U levels were much higher in exposed subjects than in controls at all time points. Furthermore, the two variables were only slightly positively correlated with each other, such a weak-to-moderate correlation being possibly explained by the relatively complex kinetics of Cr (long-life kinetic components inside the body, in particular after chronic exposure) and the presence of other absorption routes (e.g., dermal).

Owing to their moderate correlation with Cr levels in ambient air, both Cr-EBC and Cr-U can be considered biomarkers of exposure. However, further work is needed for a full validation of Cr-EBC as a biomarker of exposure and before this metric can be used independently to assess exposure or health risk.

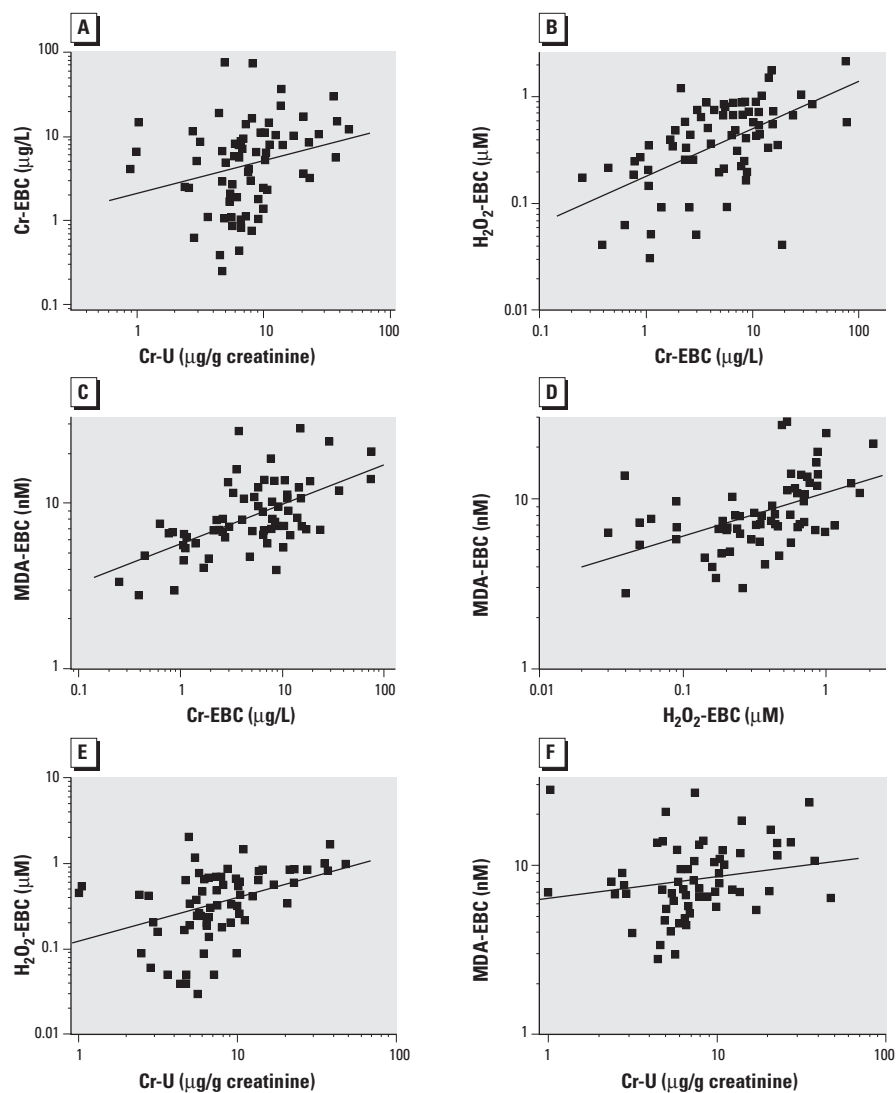
Looking at the different correlations between variables, Cr-U and Cr-EBC levels seem to provide different information: there were weak or no correlations between Cr-U and biomarkers of free radical production, whereas Cr-EBC concentrations correlated

with higher and significant  $r$ -values with both MDA and  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels in EBC, thus suggesting that they may be more representative of the lung dose responsible for local free radical production.

We assessed inflammation in the lung after Cr exposure, relying on biomarkers of oxidative stress, which may be sensitive end points for evaluating early biochemical changes in the airways. This approach will probably overcome the limitations of traditional spirometric tests, which often indicate late and frequently irreversible lung dysfunction.

Analyses of MDA and  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels in EBC have shown that they are reliable indices of airway oxidative stress (Corradi et al. 2003; Forteza et al. 2005), and they may be of some help in assessing and understanding the underlying mechanisms of metal-induced carcinogenesis. Accumulated evidence suggests that

the oxidative stress caused by an imbalance of cellular free radical generation and anti-oxidative defense plays an important role in metal-induced cell responses and carcinogenesis (Desoize 2003; Sorensen et al. 2005). Although MDA and  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels were in the normal range after 2 days away from work,  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels increased to above-normal values after a weekly and a daily Cr exposure, whereas 50% of workers (the most exposed) showed MDA levels higher than the 95% CI upper limit of control MDA levels at the end of the work shift. However, we speculate that further influencing factors, such as individual susceptibility to Cr, may modify MDA levels. As in the case of the toxic effect of cigarette smoke on the lungs, it cannot be excluded that an intermittent and repeated inhaled Cr stimulus may also be responsible for lung damage. It is worth noting that the increased  $\text{H}_2\text{O}_2$  levels observed



**Figure 3.** Correlations between variables, with linear regression lines, Pearson's  $r$ , and significance. (A) Cr-U versus Cr-EBC ( $r = 0.25$ ,  $p < 0.05$ ). (B) Cr-EBC versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ -EBC ( $r = 0.54$ ,  $p < 0.01$ ). (C) Cr-EBC versus MDA-EBC ( $r = 0.59$ ,  $p < 0.01$ ). (D)  $\text{H}_2\text{O}_2$ -EBC versus MDA-EBC ( $r = 0.49$ ,  $p < 0.01$ ). (E) Cr-U versus  $\text{H}_2\text{O}_2$ -EBC ( $r = 0.41$ ,  $p < 0.01$ ). (F) Cr-U versus MDA-EBC ( $r = 0.19$ , not significant).

in EBC of our workers at the end of a work day were similar to those reported by Gerritsen et al. (2005) in chronic obstructive pulmonary disease patients during exacerbations.

Unlike their H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> levels, the workers' MDA-EBC levels did not increase after a day's exposure, which suggests that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> may be a more sensitive marker of acute lung free radical production in more highly Cr-exposed workers. However, MDA-EBC and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-EBC were positively correlated, thus confirming the idea that the biologic induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (a marker of inflammatory processes) may increase *in vivo* oxidative stress and lipid peroxidation products.

Because there is a good correlation between Cr levels and airway free radical production and because many studies have identified Cr(VI) as the most toxic form of Cr, we are carrying out further studies on the characterization of Cr species in EBC samples after exposure to Cr(VI).

Finally, to explain the interindividual variability (e.g., workers with an anomalous trend compared with the average), it should be considered that different jobs and tasks in a chrome-plating plant may imply exposure to different Cr species. Different physicochemical properties, in terms of valence and solubility, may imply different kinetic and dynamic properties, thus accounting for a different behavior of lining fluid (EBC) compared with urine, whose Cr content is only justified by absorption of soluble Cr(VI).

In conclusion, EBC can be considered a promising medium for investigating both long-term and recent Cr exposure at target tissue level and, together with biomarkers of free radical production, it can provide insights into the oxidative lung interactions between pulmonary tissue and pneumotoxic metals occurring in exposed workers.

## REFERENCES

- ACGIH 1999. Chromium. Documentation of the Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists.
- American Thoracic Society. 1995. Standardization of spirometry, 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1107–1136.
- Andersson RA. 1981. Nutritional role of chromium. *Sci Tot Environ* 17:13–29.
- Andreoli R, Manini P, Corradi M, Mutti A, Niessen WM. 2003. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 17:637–645.
- ATSDR. 2000. Final Report of Toxicological Profile for Chromium. NTIS Accession No. PB2000-108022. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Bagchi D, Stohs SJ, Downs BW, Bagchi M, Preuss HG. 2002. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicology* 180:5–22.
- Bradshaw LM, Fishwick D, Slater T, Pearce N. 1998. Chronic bronchitis, work related respiratory symptoms, and pulmonary function in welders in New Zealand. *Occup Environ Med* 55:150–154.
- Corradi M, Alinovi R, Goldoni M, Vettori MV, Folesani G, Mozzoni P, et al. 2002. Biomarkers of oxidative stress after controlled human exposure to ozone. *Toxicol Lett* 134:219–225.
- Corradi M, Rubinstein I, Andreoli R, Manini P, Caglieri A, Poli D, et al. 2003. Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 167:1380–1386.
- De Flora S. 2000. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21:533–541.
- De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zanacchi P. 1990. Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res* 238:99–172.
- Desoize B. 2003. Metals and metal compounds in carcinogenesis. *In Vivo* 17:529–539.
- Ding M, Shi X. 2002. Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 234/235:293–300.
- Forteza R, Salathe M, Miot F, Forteza R, Conner GE. 2005. Regulated hydrogen peroxide production by Duox in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32:462–469.
- Franchini I, Mutti A. 1988. Selected toxicological aspects of chromium(VI) compounds. *Sci Total Environ* 71:379–387.
- Gerritsen WB, Asin J, Zanen P, van den Bosch JM, Haas FJ. 2005. Markers of inflammation and oxidative stress in exacerbated chronic obstructive pulmonary disease patients. *Respir Med* 99:84–90.
- Gessner C, Kuhn H, Seyfarth HJ, Pankau H, Winkler J, Schauer J, et al. 2001. Factors influencing breath condensate volume. *Pneumologie* 55:414–419.
- Gibb HJ, Lees PSJ, Pinsky PF, Rooney BC. 2000. Lung cancer among workers in chromium chemical production. *Am J Ind Med* 38:115–126.
- Goldoni M, Caglieri A, Andreoli R, Poli D, Manini P, Vettori MV, et al. 2005. Influence of condensation temperature on selected exhaled breath parameters. *BMC Pulm Med* 5:10; doi: 10.1186/1471-2466-5-10 [online 1 September 2005].
- Goldoni M, Catalani S, De Palma G, Manini P, Acampa O, Corradi M, et al. 2004. Exhaled breath condensate as a suitable matrix to assess lung dose and effects in workers exposed to cobalt and tungsten. *Environ Health Perspect* 112:1293–1298.
- IARC (International Agency for Research on Cancer). 1990. Chromium, Nickel and Welding. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Hum 49:1–677.
- Kawanishi S, Hiraku Y, Murata M, Oikawa S. 2002. The role of metals in site-specific DNA damage with reference to carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 32:822–832.
- Levina A, Lay PA. 2005. Mechanistic studies of relevance to the biological activities of chromium. *Coord Chem Rev* 249:281–298.
- Luippold RS, Mundt KA, Dell LD, Birk T. 2005. Low-level hexavalent chromium exposure and rate of mortality among US chromate production employees. *J Occup Environ Med* 47:381–385.
- Mutti A, Cavatorta A, Borghi L, Canali M, Giaroli C, Franchini I. 1979. Distribution and urinary excretion of chromium. Studies on rats after administration of single and repeated doses of potassium dichromate. *Med Lav* 70:171–179.
- Mutti A, Lucertini S, Valcavi P, Neri TM, Fornari M, Alinovi R, et al. 1985. Urinary excretion of brush-border antigen revealed by monoclonal antibody: early indicator of toxic nephropathy. *Lancet* 26:914–917.
- Mutti A, Pedroni C, Arfini G, Franchini I, Minoia C, Micoli G, et al. 1984. Biological monitoring of occupational exposure to different chromium compounds at various valency states. *Int J Environ Anal Chem* 17:35–41.
- NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health). 2003a. NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM). 4th ed. Method 7300: Elements by ICP (Nitric/Perchloric Acid Ashing). Available: <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/7300.pdf> [accessed 18 October 2005].
- NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health). 2003b. NIOSH Method 7703: Hexavalent Chromium by Field-Portable Spectrophotometry. Available: <http://www.cdc.gov/niosh/nmam/pdfs/7703.pdf> [accessed 10 July 2005].
- O'Brien TJ, Ceryak S, Patierno SR. 2003. Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mut Res* 533:3–36.
- Park RM, Bena JF, Stayner LT, Smith RJ, Gibb HJ, Lees PS. 2004. Hexavalent chromium and lung cancer in the chromate industry: a quantitative risk assessment. *Risk Anal* 24:1099–1108.
- Sobaszek A, Boulenguez C, Frimat P, Robin H, Haguenoer JM, Edme JL. 2000. Acute respiratory effects of exposure to stainless steel and mild steel welding fumes. *J Occup Environ Med* 42:923–931.
- Sorensen M, Schins RP, Hertel O, Loft S. 2005. Transition metals in personal samples of PM<sub>2.5</sub> and oxidative stress in human volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1340–1343.
- Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E, Bagchi M. 2001. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20:77–88.
- UNICHIM (Italian Association for Unification in the Sector of Chemical Industry). 1995. 886: Ambienti di Lavoro—Determinazione di Nichel, Manganese e Cromo nei Fumi di Saldatura—Metodo con Spettrometro ad Assorbimento Atomico Dotato di Fornetto di Grafite. Available: [http://www.unichim.it/htm/pagine\\_publicazioni/pagina\\_iniziale\\_publicazioni.htm](http://www.unichim.it/htm/pagine_publicazioni/pagina_iniziale_publicazioni.htm) [accessed 15 October 2005].
- Wise JP Sr, Wise SS, Little JE. 2002. The cytotoxicity and genotoxicity of particulate and soluble hexavalent chromium in human lung cells. *Mut Res* 517:221–229.
- World Medical Association. 2002. World Medical Association Declaration of Helsinki. Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. Ferny-Voltaire, France: World Medical Association. Available: <http://www.wma.net/e/policy/pdf/17c.pdf> [accessed 15 April 2005].
- Zhitkovich A. 2005. Importance of chromium-DNA adducts in mutagenicity and toxicity of chromium(VI). *Chem Res Toxicol* 18:3–11.

## **ALLEGATO 7**

### **Valutazione non invasiva della patobiologia polmonare in una coorte di lavoratori del settore acconciatura.**

Corradi M, Jordana Sanchez M, Acampa O, Caglieri A, Goldoni M, **Andreoli R**,  
Manini P, Mutti A.

Med Lav, 2008; 99: 49-57.

# Valutazione non invasiva della patobiologia polmonare in una coorte di lavoratori del settore acconciatura

M. CORRADI\*, MARIA DEL MAR JORDANA SANCHEZ\*, OLGA ACAMPA\*, \*\*, A. CAGLIERI\*, \*\*, M. GOLDONI\*, \*\*, ROBERTA ANDREOLI\*, \*\*, PAOLA MANINI\*, \*\*, A. MUTTI\*

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

\*\* Centro Studi e Ricerche ISPEL presso l'Università degli Studi di Parma

## KEY WORDS

?????

## SUMMARY

«*Not invasive assessment of lung pathobiology in hairdressers*». **Background:** Hairdressers are exposed to chemical agents with potentially irritant and sensitizing effects on airways. **OBJECTIVES:** To assess the presence of respiratory symptoms, airway biochemical and functional modifications in a cohort of hairdresser. **Methods:** Respiratory symptoms, lung function test, fractional exhaled nitric oxide ( $FE_{NO50}$ ) and selected oxidative stress biomarkers [hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (HNE)] in exhaled breath condensate (EBC) were assessed in 23 hairdressers in a rest day (Group 1); 12 workers (Group 2) were willing to performed the above mentioned tests at the beginning (BS) and at the end of a shift (ES). Eighteen subjects non occupationally exposed to airway irritants formed the control group. **Results:** Most of the hairdressers referred respiratory symptoms during working activities; however, all (except one) showed normal spirometric indexes.  $FE_{NO50}$  levels were within reference limits and did not change comparing BS vs. ES sampling.  $H_2O_2$  and HNE values in EBC were higher in Group 1 ( $H_2O_2$ : 0.16 [0.05-0.19]  $\mu M$ ; HNE: 0.94 [0.82-1.22] nM) than in controls ( $H_2O_2$ : 0.05 [0.02-0.09]  $\mu M$ ; HNE: 0.61 [0.49-0.78] nM,  $p < 0.001$ ). In Group 2,  $H_2O_2$  and MDA levels were higher in EBC collected at ES (0.56 [0.23-3.62] mM and 5.21 [4.93-5.95] nM) in comparison with the BS values (0.11 [0.03-0.28] mM and 4.12 [3.46-5.16] nM,  $p < 0.001$  and  $p < 0.02$ , respectively). **Conclusions:** High levels of oxidative stress biomarkers are detectable in EBC of hairdresser, without impairment in respiratory function. Exhaled biomarkers of oxidative stress may be sensitive end points for evaluating early biochemical changes in the airways of hairdressers.

## RIASSUNTO

I parrucchieri sono esposti a diverse sostanze chimiche sensibilizzanti ed irritanti che possono causare affezioni a carico delle vie respiratorie. In questo studio sono stati valutati i sintomi respiratori, la funzionalità respiratoria, la frazione di ossido nitrico esalato ( $FE_{NO50}$ ) e alcuni indicatori di stress ossidativo [perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ), la malondialdeide (MDA) ed il 4-idrossi-nonenale (HNE)] nel condensato dell'aria esalata (CAE) in 23 parrucchieri (Gruppo 1) durante il giorno di riposo e in 12 lavoratori (Gruppo 2) ad inizio turno (IT) e fine turno (FT) di uno stesso giorno lavorativo. Il gruppo di controllo era formato da 18 soggetti non occupazionalmente esposti. La

Pervenuto il 1.6.2007 - Accettato il 6.11.2007

Corrispondenza: Prof. Mutti Antonio, Laboratorio di Tossicologia Industriale, Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione Università di Parma, Via Gramsci 14, 43100 Parma - Tel. 0521-033075 - Fax 0521-033076

E-mail: antonio.mutti@unipr.it

*maggior parte dei lavoratori riferiva sintomi respiratori in assenza di alterazioni dei parametri spirometrici (eccezion fatta per un soggetto) e valori di FE<sub>NO</sub>50 sostanzialmente entro i valori di riferimento. Non si sono riscontrate variazioni significative di FE<sub>NO</sub>50 tra IT e FT. Nel CAE H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HNE erano più elevati nel Gruppo 1 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0,16 [0,05-0,19] μM; HNE: 0,94 [0,82-1,22] nM) rispetto ai controlli (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 0,05 [0,02-0,09] μM; HNE: 0,61 [0,49-0,78] nM, p<0,001). Si è osservato un incremento significativo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA nei campioni di CAE di FT (0,56 [0,23-3,62] μM e 5,21 [4,93-5,95] nM) rispetto quelli di IT (0,11 [0,03-0,28] μM e 4,12 [3,46-5,16] nM, p<0,001 e p<0,02, rispettivamente). Questo studio dimostra che alti livelli di indicatori di stress ossidativo sono rilevabili nel CAE dei parrucchieri in assenza di alterazioni della funzionalità respiratoria. Gli indicatori di stress ossidativo possono essere utili parametri per la valutazione di precoci alterazioni biochimiche a carico delle vie respiratorie, superando i limiti dei tradizionali test spirometrici che evidenziano alterazioni tardive e spesso irreversibili.*

## INTRODUZIONE

I lavoratori del settore acconciatura sono esposti a molteplici fattori di rischio per la salute, per i quali sono tutelati secondo la normativa vigente (D.Lgs 626/94 e D.Lgs 25/02). Il principale rischio presente in questo comparto lavorativo è rappresentato dal rischio chimico, dato l'elevato numero di sostanze irritanti, sensibilizzanti e tossiche, presenti nei prodotti di utilizzo (decoloranti, tinture, liquidi per permanente, detersivi).

Una recente valutazione sulle concentrazioni di alcune sostanze utilizzate in questo comparto lavorativo (16), ha mostrato livelli ambientali medi di perossido d'idrogeno, ammoniaca e persolfati rispettivamente pari a 0,04 mg/m<sup>3</sup>, 0,68 mg/m<sup>3</sup> e 0,019 mg/m<sup>3</sup>.

L'inalazione di polveri, vapori e aerosol od il contatto cutaneo prolungato durante la preparazione e l'applicazione dei prodotti, sono in grado di causare disturbi respiratori (rinite, tosse stizzosa, bronchite cronica, asma) (11-15, 17) ed affezioni a carico della cute (dermatiti da contatto, irritative o allergiche, orticaria) (5, 9, 10).

Nonostante siano presenti in questo comparto lavorativo rischi per la salute che configurano l'opportunità di sottoporre a sorveglianza sanitaria i lavoratori, anche in presenza di rischio chimico moderato, tale pratica non è sempre effettuata.

Un recente studio condotto durante il periodo di formazione professionale di un gruppo di apprendisti acconciatori, ha evidenziato l'efficacia di spe-

cifici interventi formativi nel ridurre l'entità di alcuni rischi lavorativi (3).

L'esposizione a sostanze con elevato potenziale irritante e sensibilizzante, presenti in questo settore lavorativo, può associarsi ad alterazioni flogistiche ed indurre la comparsa di patologie respiratorie quali rinite o asma indotte da meccanismo irritativo od immunologico (IgE mediato o non IgE mediato) (14, 15).

In questo studio è stata valutata la risposta polmonare alle sostanze presenti in questo comparto lavorativo, tramite l'analisi di indicatori biologici presenti nell'aria esalata utilizzando metodiche non invasive quali la raccolta del condensato dell'aria espirata (CAE), ottenuto raffreddando l'aria esalata e la misurazione della frazione di ossido nitrico esalato (FE<sub>NO</sub>) su lavoratori reclutati nella provincia di Parma.

Nel CAE, ritenuto rappresentativo della composizione del fluido di rivestimento broncoalveolare (8) è possibile determinare la concentrazione di varie molecole quali citochine, eicosanoidi, aldeidi, perossido d'idrogeno, che permettono di monitorare l'infiammazione e lo stress ossidativo a livello del tratto respiratorio nel corso di patologie polmonari (2, 4, 21, 23).

Il FE<sub>NO</sub>, considerato un indicatore di infiammazione eosinofila delle vie aeree, è stato utilizzato da diversi autori nella diagnosi e nel monitoraggio dell'asma allergico e delle sue riacutizzazioni e nella risposta alla terapia anti-infiammatoria (20, 22, 24, 25).

## DISEGNO DELLO STUDIO

Tutti i lavoratori che hanno partecipato allo studio, dopo aver fornito il loro consenso informato, sono stati intervistati tramite questionario e sono stati sottoposti a valutazione della funzionalità respiratoria, prelievo venoso, misurazione del  $FE_{NO}$  e raccolta del CAE.

Supponendo che l'esposizione protratta per diversi anni di attività lavorativa, sia in grado di determinare alterazioni persistenti a carico delle vie aeree, 23 lavoratori (Gruppo 1) sono stati sottoposti al protocollo di studio il giorno di riposo, a circa 38 ore di distanza dal termine dell'esposizione, presso gli ambulatori del nostro Dipartimento.

Per valutare la comparsa e l'entità di eventuali effetti acuti indotti dalle sostanze utilizzate durante l'attività lavorativa, sono stati reclutati 12 parrucchieri (Gruppo 2) sottoposti al protocollo di studio direttamente sul posto di lavoro ad inizio turno (IT) e che hanno acconsentito a ripetere la misurazione del  $FE_{NO}$  e la raccolta del CAE a fine turno (FT) della stessa giornata lavorativa.

Le caratteristiche clinico-demografiche dei lavoratori sono riassunte in tabella 1.

**Tabella 1** - Caratteristiche demografiche dei lavoratori; Gruppo 1: lavoratori valutati nella giornata di riposo; Gruppo 2: lavoratori valutati ad inizio e fine turno. I dati sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard

**Table 1** - Demographic characteristics of the study groups; Group 1: workers evaluated during the rest day; Group 2: workers evaluated at the beginning of the shift and at the end of the shift. Data are expressed as mean  $\pm$  SD

	Gruppo 1	Gruppo 2
Età (anni)	33,9 $\pm$ 11,0	34,0 $\pm$ 10,0
Maschi/Femmine	4/19	3/9
Fumatori/Non Fumatori	12/11	6/6
Anzianità lavorativa (anni)	16,4 $\pm$ 10,9	16,5 $\pm$ 10,5
CVF (percentuale del predetto)	107 $\pm$ 13,9	104 $\pm$ 12,6
VEMS (percentuale del predetto)	104 $\pm$ 11,5	111 $\pm$ 13,0
Indice di Tiffenau (VEMS/CVF)	0,83 $\pm$ 0,06	0,81 $\pm$ 0,07
PFE (percentuale del predetto)	89,7 $\pm$ 16,6	99,5 $\pm$ 13,1
FEF <sub>25%-75%</sub> (percentuale del predetto)	89,0 $\pm$ 13,2	86,3 $\pm$ 25,8

Legenda: VEMS: volume espiratorio massimo nel primo secondo; CVF: capacità vitale forzata, FEF<sub>25%-75%</sub>: flusso espiratorio forzato tra il 25% e il 75% della capacità vitale; PFE: picco di flusso espiratorio.

I risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli di un gruppo di controllo, costituito da 18 volontari sani (11 femmine, 7 maschi, con età media di 30,8 $\pm$ 4,1), non professionalmente esposti, valutati nello stesso periodo presso i nostri ambulatori.

## MATERIALI E METODI

**Questionario:** Tramite questionario sono state raccolte informazioni inerenti l'anamnesi fisiologica, familiare e patologica, le abitudini voluttuarie, la storia professionale con particolare attenzione alla mansione attualmente svolta, ai tipi di lavorazioni effettuati, alla sintomatologia accusata durante l'attività lavorativa ed ai prodotti o lavorazioni identificati come potenziali cause.

**Spirometria:** La funzionalità respiratoria è stata indagata mediante pneumotacografo, (Koko® Sensormedics, Italia) ottenendo la determinazione del volume espiratorio massimo nel primo secondo (VEMS), della capacità vitale forzata (CVF), del flusso espiratorio forzato tra il 25% e il 75% della capacità vitale (FEF 25-75%) e del picco di flusso espiratorio (PFE). I test sono stati condotti ed interpretati secondo le raccomandazioni della American Thoracic Society (1).

**Prelievo venoso:** sul sangue ottenuto dal prelievo venoso sono stati effettuati l'esame emocromocitometrico completo di formula leucocitaria e il dosaggio delle immunoglobuline E (IgE) sieriche totali tramite test immunoenzimatici (ELISA). Nei casi in cui le IgE sono risultate elevate (oltre 100 U/mL), sono state ricercate le IgE specifiche per allergeni inalanti (graminacee, piante erbacee, piante arboree, acari, muffe-lieviti) mediante test radioimmunologici (RAST).

**Misurazione del  $FE_{NO}$ :** L'analisi del  $FE_{NO}$  è stata effettuata attraverso uno strumento portatile (NIOX MINO® Aerocrine, Svezia), dotato di analizzatore elettrochimico, con la tecnica del singolo respiro ad un flusso espiratorio di 50 ml/s ( $FE_{NO}50$ ). Il soggetto, dopo aver effettuato un'espirazione completa, esegue, attraverso il boccaglio monouso dotato di filtro, un'inspirazione massimale seguita da un'espirazione lenta a flusso costante con l'aiuto

di un segnale sonoro e visivo che varia con l'intensità del flusso, per circa 10 secondi. Il risultato della determinazione del FE<sub>NO</sub>50 è ottenuto dopo circa un minuto.

*Raccolta del CAE:* è stato utilizzato per la raccolta del CAE uno strumento portatile (TURBO-DECCS, ItalChill, Parma, Italia). La procedura di raccolta consiste nel far respirare il soggetto a volume corrente per circa 10-15 minuti, attraverso un boccaglio monouso dotato di valvola unidirezionale, connesso tramite un tubo in polietilene direttamente alla provetta in cui si forma il condensato posta nel sistema elettrico refrigerante, impostato ad una temperatura di -5°C. Una volta terminata la procedura di raccolta, la provetta in cui si raccoglie il CAE, viene estratta dallo strumento e conservata a -80°C in attesa di effettuare le determinazioni.

In tale matrice sono stati determinati, quali indicatori di stress ossidativo e flogosi, il perossido d'idrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), la malondialdeide (MDA) ed il 4-idrossi-nonenale (HNE), analizzati rispettivamente mediante fluorimetria e cromatografia liquida-spettrometria di massa *tandem* (LC-MS/MS).

## ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il Software GraphPad Prism 4.00 (San Diego, California, USA).

Il confronto tra gruppi è stato effettuato tramite test non parametrici (test di Mann-Whitney e test di Wilcoxon per dati appaiati), in quanto le variabili misurate presentavano una distribuzione non normale. L'analisi della correlazione fra variabili è stata effettuata con test di Spearman. Un valore di  $p < 0,05$  è stato assunto come statisticamente significativo.

## RISULTATI

Dalla valutazione del questionario a cui sono stati sottoposti i lavoratori, sia quelli valutati nella giornata di riposo nei nostri ambulatori che quelli esaminati sul posto di lavoro ad IT e FT, è emerso che la maggioranza di essi accusava sintomi duran-

te l'attività lavorativa riferibili ad irritazione delle vie aeree, variamente associati tra loro: 20 soggetti riferivano starnutazione, 13 rinite, 13 prurito nasale, 9 rinorrea, 9 tosse e 4 costrizione toracica; 3 soggetti erano affetti da asma.

Tutti i lavoratori effettuano, a seconda delle necessità, le diverse fasi lavorative caratteristiche del settore (lavaggio, decolorazione, tintura, permanente, stiratura, pettinatura o acconciatura) lavorando in media 41,4 ore/settimana.

La maggior parte dei lavoratori riferiva un peggioramento della sintomatologia respiratoria in concomitanza dell'utilizzo di particolari sostanze ed allo svolgimento di particolari mansioni; 15 addetti associavano il manifestarsi della sintomatologia alla preparazione e utilizzo di decoloranti (misccele contenenti H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, persolfati ed ammoniaca), 3 soggetti collegavano i disturbi alla preparazione e utilizzo di tinture (formate prevalentemente da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, parafe-nilendiamina, *para*-toluendiammina, *para*-amminofenolo, resorcinolo ed ammoniaca) mentre 5 soggetti associavano i sintomi all'utilizzo di entrambi i prodotti. L'insorgenza della sintomatologia era avvertita dopo alcuni minuti dal utilizzo dei prodotti.

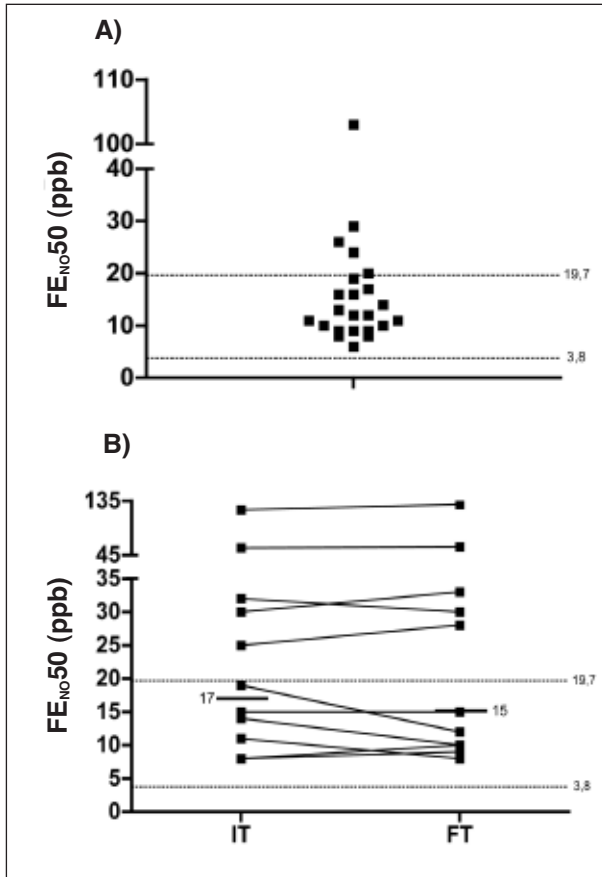
Altri sintomi erano relativi ad irritazione oculare (9 soggetti riferivano prurito e 5 lacrimazione e rossore) associata per lo più a starnutazione, irritazione cutanea (6 lavoratori riferivano eczema alle mani) e disturbi muscoloscheletrici (21 soggetti).

La valutazione della funzionalità respiratoria, attraverso l'esecuzione dell'esame spirometrico, ha permesso di riscontrare la presenza in un soggetto di broncopneumopatia cronica ostruttiva di grado lieve (VEMS/CVF: 69%; VEMS>80%), mentre tutti gli altri lavoratori hanno presentato valori spirometrici nella norma.

Dalle indagini effettuate su sangue periferico in tutti i lavoratori coinvolti nello studio, si sono riscontrati livelli di IgE totali superiori alla norma in 9 soggetti, tutti con sintomatologia rinitica; solo 6 soggetti presentavano IgE specifiche per inalanti positive e di questi, 2 soggetti presentavano un numero di eosinofili oltre il limite superiore di norma (400/ $\mu$ L).

La maggior parte dei lavoratori del Gruppo 1 ha mostrato livelli di FE<sub>NO</sub>50 entro i valori di riferimento proposti recentemente dal nostro gruppo di

ricerca in soggetti sani (19), mentre 5 soggetti hanno presentato livelli maggiori (figura 1A). Tra i lavoratori del Gruppo 2, non si sono osservate variazioni significative nei livelli di  $FE_{NO50}$  tra IT e FT (figura 1B); 5 soggetti presentavano livelli di  $FE_{NO50}$  superiori al limite di riferimento.



**Figura 1** - A) Frazione di ossido nitrico esalata ad un flusso di 50 ml/s ( $FE_{NO50}$ ) nei lavoratori esaminati nella giornata di riposo ( $n=23$ ). B) Frazione di ossido nitrico esalata ad un flusso di 50 ml/s ( $FE_{NO50}$ ) misurata nei lavoratori esaminati ad inizio turno (IT) e fine turno (FT), ( $n=12$ ). In figura 1B sono rappresentati anche i valori del 50° percentile. Sia in A) che in B) le linee tratteggiate rappresentano il 5° e il 95° percentile recentemente proposto in soggetti sani (19)

**Figure 1** - A) Fractional exhaled nitric oxide ( $FE_{NO50}$ ) in hairdressers evaluated during the rest day ( $n=23$ ). B) Fractional exhaled nitric oxide ( $FE_{NO50}$ ) in hairdressers evaluated at the beginning of the shift and at the end of the shift ( $n=12$ ); the solid line represents the median value. The dotted lines in both figures represent the 5<sup>th</sup> and the 95<sup>th</sup> percentile recently proposed in healthy subjects (19)

Tra gli indicatori di stress ossidativo e flogosi valutati nel CAE (tabella 2),  $H_2O_2$  e HNE sono risultati significativamente maggiori nei lavoratori del Gruppo 1 rispetto ai controlli, mentre non si è osservata una differenza significativa tra i livelli di MDA.

Gli stessi risultati sono stati ottenuti confrontando i livelli di tali indicatori nel CAE dei lavoratori del Gruppo 2 raccolto ad IT rispetto ai controlli ( $H_2O_2$ : 0,11 [0,03-0,28]  $\mu M$  vs 0,05 [0,02-0,09]  $\mu M$ ,  $p=0,03$ ; HNE: 1,14 [0,96-1,25] nM vs 0,61 [0,49-0,78] nM,  $p=0,0001$ ; MDA: 4,12 [3,46-5,16] nM vs 3,87 [3,56-4,98] nM,  $p=0,9$ ).

Non è stata riscontrata nessuna differenza significativa tra i campioni di CAE dei lavoratori del Gruppo 1 rispetto a quelli di IT del Gruppo 2, per ciascuno degli indicatori considerati.

Nei campioni di CAE raccolti a FT rispetto ai campioni di IT, si è riscontrato un incremento significativo di  $H_2O_2$  (figura 2) e MDA (figura 3) mentre l'HNE non ha mostrato variazioni significative (figura 4).

Non si sono riscontrate correlazioni significative tra gli indicatori determinati nel CAE.

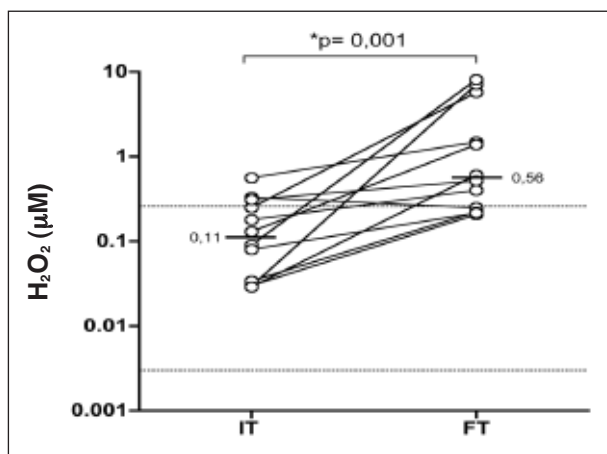
Si è osservata una correlazione positiva tra i livelli delle IgE totali e i livelli di  $FE_{NO50}$  valutando i risultati ottenuti dai lavoratori del Gruppo 1 e quelli di IT del Gruppo 2 (figura 5;  $r=0,37$ ;  $p=0,027$ ).

**Tabella 2** - Indicatori determinati nel condensato dell'aria espirata (CAE), nei controlli e nei lavoratori esaminati nella giornata di riposo, a circa 38 ore di distanza dalla cessata esposizione (Gruppo 1); i dati sono espressi come mediana [25°-75° percentile]

**Table 2** - Biomarkers in exhaled breath condensate between controls and workers evaluated during the rest day (Group 1); data are expressed as median and [interquartile range]

Indicatori nel CAE	Controlli	Gruppo 1	Significatività
$H_2O_2$ ( $\mu M$ )	0,05 [0,02-0,09]	0,16 [0,05-0,19]	$p<0,001$
MDA (nM)	3,87 [3,56-4,98]	4,06 [2,50-5,39]	NS
HNE (nM)	0,61 [0,49-0,78]	0,94 [0,82-1,22]	$p<0,001$

Legenda:  $H_2O_2$ : perossido d'idrogeno; MDA: malondialdeide; HNE: 4-idrossi-nonenale; NS: non significativo

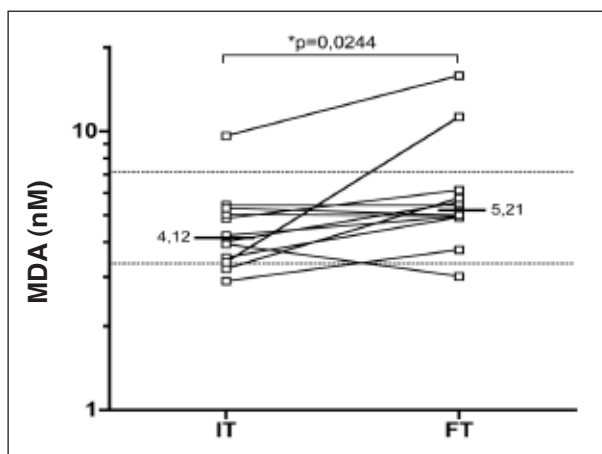


**Figura 2** - Livelli di perossido d'idrogeno ( $H_2O_2$ ) misurati nel condensato dell'aria esalata (CAE) dei lavoratori valutati ad inizio (IT) e fine turno (FT), ( $n=12$ ), rappresentati in scala logaritmica. Le linee e i numeri rappresentano i valori mediani; le linee tratteggiate rappresentano i valori di  $H_2O_2$  minimo e massimo determinati nel CAE del gruppo di controllo

*Figure 2 - Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in exhaled breath condensate (expressed in  $\log_{10}$  scale) of workers evaluated at the beginning of the shift and at the end of the shift, ( $n=12$ ). The solid line represents the median value; the dotted lines represent minimum and maximum values among control group*

Suddividendo i risultati delle determinazioni delle IgE totali e del  $FE_{NO50}$  in base al superamento o meno dei limiti superiori di norma, si sono osservati quattro distinti scenari (figura 5, riquadri a, b, c, d). Nel primo (a), i lavoratori (4 soggetti) che hanno presentato livelli di IgE nella norma ma livelli di  $FE_{NO50}$  superiore al limite di riferimento; nel secondo (b), caratterizzato da normali valori di IgE e  $FE_{NO50}$ , la maggior parte dei lavoratori (22 soggetti); nel terzo (c) quelli con livelli di IgE e  $FE_{NO50}$  superiori alla norma (6 soggetti), che avevano anche, con una sola eccezione, IgE specifiche per inalanti positive e nel quarto (d) i lavoratori (3 soggetti) con alti livelli di IgE ma normali valori di  $FE_{NO50}$  tra i quali solo in un caso si è riscontrata la presenza di IgE specifiche per inalanti.

Valutando la distribuzione dei dati all'interno di ciascuna delle tipologie descritte, solo per i lavoratori con livelli elevati sia di IgE che di  $FE_{NO50}$  si è riscontrata una correlazione positiva prossima alla



**Figura 3** - Livelli di malondialdeide (MDA) misurati nel condensato dell'aria esalata (CAE) dei lavoratori valutati ad inizio (IT) e fine turno (FT), ( $n=12$ ) rappresentati in scala logaritmica. Le linee e i numeri rappresentano i valori mediani; le linee tratteggiate rappresentano i valori di MDA minimo e massimo determinati nel CAE del gruppo di controllo

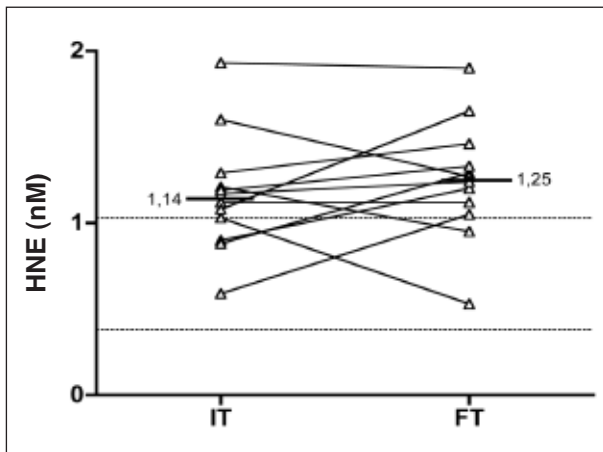
*Figure 3 - Malondialdehyde (MDA) in exhaled breath condensate (expressed in  $\log_{10}$  scale) of workers evaluated at the beginning of the shift and at the end of the shift, ( $n=12$ ). The solid line represents the median value; the dotted lines represent minimum and maximum values among control group*

significatività statistica ( $r=0,8$ ;  $p=0,058$ ), nonostante la scarsa numerosità dei campioni.

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nello svolgimento delle varie attività gli addetti del settore acconciatura sono esposti a numerose sostanze chimiche contenute nei formulati, sia per via inalatoria che cutanea. Sebbene le principali patologie manifestate in genere dagli addetti del settore acconciatura riguardino l'apparato respiratorio e la cute, in questo studio, oltre ai disturbi respiratori, le patologie più comuni sono risultate essere i disturbi muscolo-scheletrici mentre solo una minoranza accusava patologie cutanee, verosimilmente grazie al corretto utilizzo dei dispositivi di protezione individuale.

Le mansioni associate all'insorgenza e/o al peggioramento dei disturbi respiratori da parte dei la-



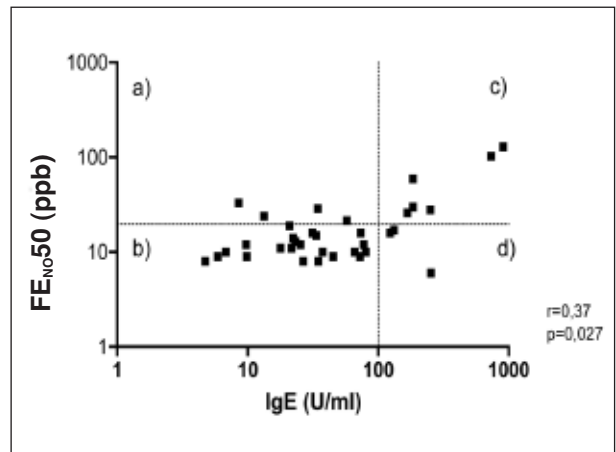
**Figura 4** - Livelli di 4-idrossi-nonenale (HNE) misurati nel condensato dell'aria esalata (CAE) dei lavoratori valutati ad inizio (IT) e fine turno (FT), (n=12). Le linee e i numeri rappresentano i valori mediani; le linee tratteggiate rappresentano i valori di HNE minimo e massimo determinati nel CAE del gruppo di controllo

*Figure 4* - 4-hydroxynonenal (HNE) in exhaled breath condensate of workers evaluated at the beginning of the shift and at the end of the shift, (n=12). The solid line represents the median value; the dotted lines represent minimum and maximum values among control group.

voratori, sono risultate essere i trattamenti decoloranti e coloranti.

La valutazione di indicatori di flogosi e stress ossidativo nel CAE dei lavoratori ha portato al riscontro di livelli significativamente maggiori di  $H_2O_2$  e HNE rispetto al gruppo di controllo, in assenza di alterazioni della funzionalità respiratoria, come documentato dai parametri spirometrici. Tali riscontri, nel gruppo di lavoratori valutati nella giornata di riposo, oltre 38 ore di distanza dal termine dell'attività lavorativa, indicherebbe la presenza di modificazioni iniziali di ordine biochimico che permangono anche a diverse ore di distanza dalla cessata esposizione alle sostanze presenti in questo comparto lavorativo, ma che non sono in grado di determinare variazioni della funzionalità respiratoria.

La preparazione e l'applicazione dei prodotti utilizzati durante l'attività lavorativa sarebbe in grado di determinare variazioni significative di alcuni degli indicatori esaminati nel CAE, come mostrato dall'incremento significativo di  $H_2O_2$  e



**Figura 5** - Correlazione tra i livelli di IgE totali e i livelli di ossido nitrico esalato ad un flusso espiratorio di 50 ml/s ( $FE_{NO50}$ ), dei lavoratori valutati a riposo (n=23) e di quelli valutati ad inizio turno (n=12). Le linee tratteggiate rappresentano i livelli superiori di norma per IgE (100 U/ml) e  $FE_{NO50}$  (19,7 ppb) e distinguono 4 riquadri: a), b), c), d)

*Figure 5* - Correlation between total serum IgE and fractional exhaled nitric oxide ( $FE_{NO50}$ ) observed in workers evaluated during the rest day (n=23) and at the beginning of the shift (n=12). Dotted lines represent the upper limits for IgE (100 U/ml) and  $FE_{NO50}$  (19,7 ppb) that distinguish 4 panels: a), b), c), d).

MDA nei campioni di FT rispetto quelli di IT, ma non variazioni del  $FE_{NO50}$ .

Non si sono osservate differenze significative del  $FE_{NO50}$  nella maggior parte dei lavoratori rispetto ai limiti di riferimento, sia negli addetti valutati durante la giornata di riposo che nei lavoratori valutati ad IT e a FT.

Tali riscontri potrebbero essere spiegati ipotizzando che le sostanze utilizzate in questo comparto lavorativo inducano un danno prevalentemente di tipo irritativo, responsabile della sintomatologia, a cui si assocerebbe un modesto danno flogistico.

Le iniziali alterazioni riscontrate, anche se prettamente di carattere biochimico e non ancora associate ad alterazioni funzionali, confermerebbero l'esistenza di una "lesività" a carico dell'apparato respiratorio da parte delle sostanze utilizzate in questo comparto lavorativo.

Tale dato supporta l'importanza di sottoporre a sorveglianza sanitaria i lavoratori di questo comparto, sia per verificare l'assenza di controindicazioni al lavoro al quale i soggetti sono destinati, che

per controllare, nel tempo, lo stato di salute del lavoratore e confermare o meno l' idoneità a svolgere la mansione specifica.

Il riscontro di una correlazione positiva tra i livelli di IgE e i livelli di FE<sub>NO</sub>50 renderebbe conto dell' influenza della componente allergica dell' infiammazione delle vie aeree su tale indicatore. Alcuni lavoratori (figura 5, riquadri a e d) hanno però mostrato un andamento discordante, alti livelli di IgE e normali valori di FE<sub>NO</sub>50 e viceversa. La presenza di elevati livelli di IgE in assenza di IgE specifiche per inalanti potrebbe essere causata da patologie extrapolmonari (allergie alimentari, parassitosi intestinali, connettiviti) nel qual caso non si verificherebbe un incremento del FE<sub>NO</sub>50. Una flogosi delle alte vie respiratorie o dei seni paranasali, di natura non allergica, può causare un aumento del FE<sub>NO</sub>50 con IgE totali nella norma.

Tra tutti i lavoratori esaminati, alcuni soggetti di entrambi i gruppi (10 soggetti) hanno presentato valori di FE<sub>NO</sub>50 superiori al limite di riferimento; di questi, 5 lavoratori avevano IgE elevate e tali dati concordano con la correlazione positiva riscontrata tra questi parametri e 7 soggetti un' anamnesi familiare positiva per patologie allergiche.

Il riscontro di alti livelli di FE<sub>NO</sub>50 è spesso associato alla presenza di atopìa (7, 18) e alcuni autori hanno accertato che il FE<sub>NO</sub>50 in soggetti atopici con asma, rinite, asma e rinite risulti più elevato rispetto a soggetti con le stesse patologie ma non atopici (6).

Dai risultati ottenuti indagando, tramite metodiche non invasive, un ristretto gruppo di addetti del settore acconciature, si è riscontrata nel CAE la presenza di livelli significativamente maggiori di alcuni indicatori di stress ossidativo rispetto a soggetti non occupazionalmente esposti, in assenza di alterazioni della funzionalità respiratoria. Sia nei lavoratori esaminati nella giornata di riposo, a diverse ore di distanza dall' ultima esposizione, che nei parrucchieri valutati ad IT, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HNE sono risultati significativamente più elevati rispetto ai controlli; nel gruppo di lavoratori indagato all' inizio ed alla fine di una stessa giornata lavorativa, si è riscontrato un incremento significativo di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA nei campioni di FT rispetto a quelli di IT.

Gli indicatori di stress ossidativo, possono essere utili parametri per la valutazione di precoci altera-

zioni biochimiche a carico delle vie respiratorie, superando i limiti dei tradizionali test spirometrici che evidenziano alterazioni tardive e spesso irreversibili.

Maggiori informazioni potranno essere ottenute ampliando la casistica e monitorando i lavoratori sia a riposo che nel corso della settimana lavorativa per valutare le modificazioni degli indicatori durante il manifestarsi della sintomatologia ed effettuando il monitoraggio ambientale in modo da poter valutare le relazioni esistenti tra le concentrazioni ambientali delle sostanze a cui i lavoratori sono esposti e gli indicatori biologici determinati nel CAE.

NO POTENTIAL CONFLICT OF INTEREST RELEVANT TO THIS ARTICLE WAS REPORTED

## BIBLIOGRAFIA

1. AMERICAN THORACIC SOCIETY: Standardization of spirometry, 1994 update. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; *152*: 1107-1113
2. CORRADI M, RUBINSTEIN I, ANDREOLI R, et al: Aldehydes in exhaled breath condensate of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; *167*: 1380-1386
3. CRIPPA M, TORRI D, FOGLIATA L, et al: Applicazione di un programma di educazione sanitaria in un campione di apprendisti acconciatori. *Med Lav* 2007; *98*: 48-54
4. EFFROS RM, SU J, CASABURI R, et al: Utility of exhaled breath condensates in chronic obstructive pulmonary disease: a critical review. *Curr Opin Pulm Med* 2005; *11*: 135-139
5. FERRARI M, MOSCATO G, IMBRIANI M: Allergic cutaneous diseases in hairdressers. *Med Lav* 2005; *96*: 102-118
6. GRATZIOU CH, LIGNOS M, DASSIOU M, et al: Influence of atopy on exhaled nitric oxide in patients with stable asthma and rhinitis. *Eur Respir J* 1999; *14*: 897-901
7. HO LP, WOOD FT, ROBSON A, et al: Atopy influences exhaled nitric oxide levels in adult asthmatics. *Chest* 2000; *118*: 1327-1331
8. HORVAT I, HUNT J, BARNES PJ: Exhaled breath condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 2005; *26*: 523-548
9. IORIZZO M, PARENTE G, VINCENZI C, et al: Allergic contact dermatitis in hairdressers: frequency and source of sensitisation. *Eur J Dermatol*. 2002; *12*: 179-182

10. KHUMALO NP, JESSOP S, EHRLICH R: Prevalence of cutaneous adverse effects of hairdressing: a systematic review. *Arch Dermatol* 2006; *142*: 377-383
11. LEINO T, TAMMILEHTO L, LUUKKONEN R, et al: Self reported respiratory symptoms and diseases among hairdressers. *Occup Environ Med* 1997; *54*: 452-455
12. LEINO T, TAMMILEHTO L, PAAKKULAINEN H, et al: Occurrence of Asthma and Chronic Bronchitis Among Female Hairdressers. *J Occup Environ Med* 1997; *39*: 534-539
13. MACCHIONI P, KOTOPULOS C, TALINI D, et al: *Med Lav*, 1999; *90*: 776-785
14. MOSCATO G, GALDI E: Asthma and hairdressers. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2006; *6*: 91-95
15. MOSCATO G, PIGNATTI P, YACOB MR, et al: Occupational asthma and occupational rhinitis in hairdressers. *Chest* 2005; *128*: 3590-3598
16. MOUNIER-GEYSSANT E, OURY V, MOUCHOT L, et al: Exposure of hairdressing apprentices to airborne hazardous substances. *Environ Health* 2006; *5*: 23
17. MUNOZ X, CRUZ MJ, ORRIOLS R, et al: Occupational asthma due to persulfate salts: diagnosis and followup. *Chest* 2001; *123*: 2124-2129
18. OLIN AC, ROSENGREN A, THELLE DS, et al: Height, age, and atopy are associated with fraction of exhaled nitric oxide in a large adult general population sample. *Chest* 2006; *130*: 1319-1325
19. OLIVIERI M, TALAMINI G, CORRADI M, et al: Reference values for exhaled nitric oxide (reveno) study. *Respir Res* 2006; *7*: 94
20. PAYNE DNR: Nitric oxide in allergic airway inflammation. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2003; *3*: 133-137
21. PSATHAKIS K, MERMIGKIS D, PAPTAEODOROU G, et al: Exhaled markers of oxidative stress in idiopathic fibrosis. *Eur J Clin Invest* 2006; *36*: 362-367
22. RICCIARDOLO FLM, STERK PJ, GASTON B, et al: Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; *8*: 731-765
23. SHAHID SK, KHARITONOV SA, WILSON NM, et al: Exhaled 8-isoprostane in childhood asthma. *Respir Res* 2005; *6*: 79
24. TAYLOR DR: Nitric oxide as a clinical guide for asthma management. *J Allergy Clin Immunol* 2006; *117*( 2): 259-262
25. ZEIDLER MR, KLEERUP EC, TASHKIN DP: Exhaled nitric oxide in the assessment of asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2003; *10*: 31-36

## **9. APPENDICE**

Nel corso del triennio di Dottorato sono stata coautrice anche dei seguenti lavori:

1. Mozzoni P, De Palma G, Scotti E, Andreoli R, Folesani G, Manini P, Apostoli P, Mutti A. Espressione dell'eme ossigenasi-1 in un gruppo di lavoratori di un'acciaieria. *G Ital Med Lav Ergon*, 2005; 27: 322-325.
2. Poli D, Manini P, Andreoli R, Franchini I, Mutti A. Determination of dichloromethane, trichloroethylene and perchloroethylene in urine samples by headspace solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005; 820: 95-102.
3. Leporati A, Catellani D, Suman M, Andreoli R, Manini P, Niessen WMA. Application of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method to the analysis of water-soluble vitamins in Italian pasta. *Anal Chim Acta* 2005; 531: 87-95.
4. Manini P, Andreoli R, Mutti A. Application of liquid chromatography-mass spectrometry to biomonitoring of exposure to industrial chemicals. *Toxicol Lett*, 2006; 162: 202-210.
5. Fiaccadori E, Maggiore U, Rotelli C, Giacosa R, Parenti E, Picetti E, Manini P, Andreoli R, Cabassi A. Does hemodialysis significantly affect serum linezolid concentrations in critically ill patients with renal failure? A pilot investigation. *Nephrol Dial Transplant*, 2006; 21: 1402-1406.
6. Niessen WMA, Manini P, Andreoli R. Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-Mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 2006, 25, 881-99.

## **Ringraziamenti**

Vorrei ringraziare le persone che hanno partecipato attivamente e in varie modalità alla riuscita di questo lavoro di Tesi:

il Prof. Antonio Mutti, Coordinatore del Corso di Dottorato e Responsabile del Laboratorio di Tossicologia Industriale;

il Prof. Innocente Franchini, Direttore del Dipartimento di Clinica Medica, Nefrologia e Scienze della Prevenzione e i colleghi e amici di Medicina del Lavoro;

il Prof. Pavel Vodicka dell'Istituto di Medicina Sperimentale di Praga, Repubblica Ceca;

il Prof. Stefano Sforza del Dipartimento di Chimica Organica e Industriale.

Un ringraziamento particolare va alla Dott.ssa Paola Manini e al Dr. Giuseppe De Palma, per la passione per la ricerca, il sostegno e la collaborazione che continuamente mi hanno offerto in tutti questi anni.

Roberta Andreoli