



Il monitoraggio biologico per la valutazione dell'esposizione occupazionale ad agenti di rischio

Giovanna Tranfo Ph.D.

giovanna.tranfo@gmail.com

Dottore in Chimica

Specialista in Biochimica Clinica

Ordine dei Chimici e dei Fisici di Roma

Direttivo AIDII 2024 – 2027

Chair del Comitato Scientifico per la Tossicologia Occupazionale SCOT-ICOH

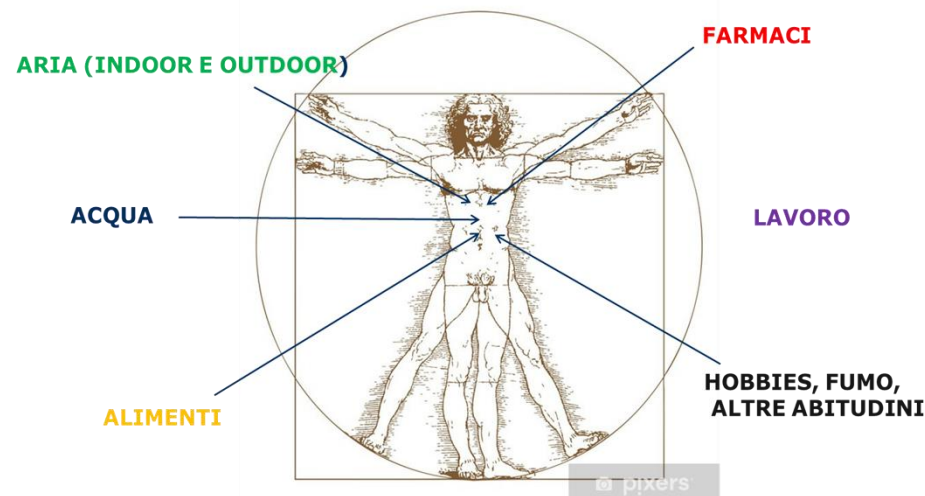


Monitoraggio Biologico

Il **monitoraggio Biologico** valuta se e in che misura agenti di rischio sono entrati in contatto con il corpo umano, fornisce informazioni integrate su tutte le esposizioni ambientali e occupazionali e aiuta ad identificare potenziali rischi per la salute.

Il **monitoraggio Biologico** è la misura di indicatori di esposizione:

1. **Indicatori di dose**
2. **Indicatori di effetto**
3. **Indicatori di suscettibilità**



Biomarkers di dose

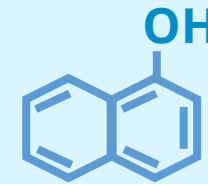
I biomarcatori di dose consentono la valutazione dell'esposizione sistemica a una sostanza chimica in base alla sua misurazione in una matrice biologica

Biomarkers di esposizione/dose interna

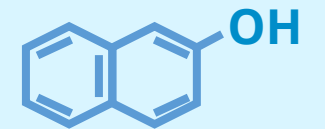
Sostanze chimiche o loro metaboliti



1-OHP



1-Naftol



2-Naftol

1-OHP - 1-idrossipirene urinario (1-OHP) è un biomcatore ampiamente utilizzato come indicatore dell'esposizione agli idrocarburi aromatici policiclici (PAH)

L'1-naftolo è un metabolita dell'insetticida carbarile mentre sia l'isomero 1- che il 2-isomeri sono metaboliti del naftalene

Biomarkers di effetto

I biomarcatori di effetto riflettono cambiamenti quantificabili nei parametri biochimici, fisiologici o di altro tipo dell'organismo che si verificano a seguito dell'esposizione.

Idealmente, un biomarcatore di effetto dovrebbe riflettere cambiamenti **precoci e reversibili** nell'organismo.

Effetti precoci

Citogenetica (aberrazioni cromosomiche, micronuclei)

Mutazioni/polimorfismi

Genetica (alterazioni dell'espressione genica, regolazione della trascrizione, mutazioni delle cellule somatiche)

Epigenetica (metilazione del DNA, modificazioni istoniche, miRNA)

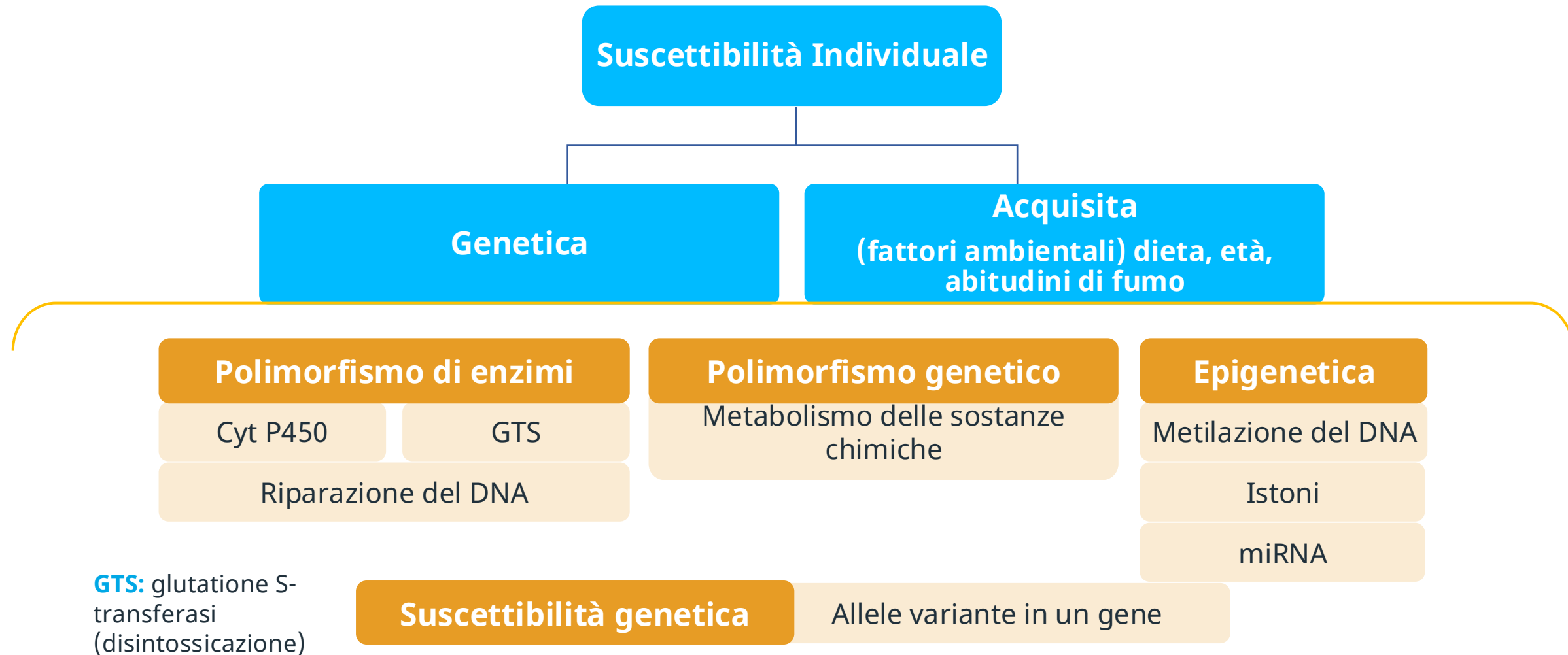
Alterazioni strutturali o funzionali

Mutazioni/polimorfismi

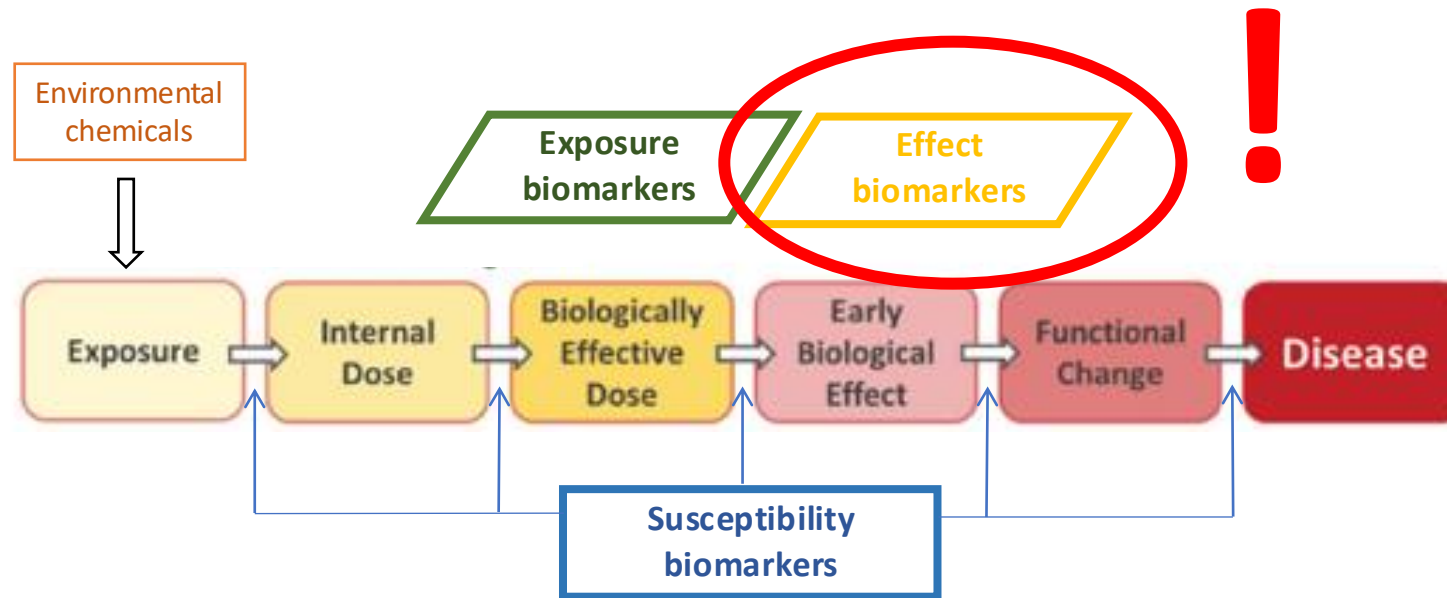
Alterazioni enzimatiche

Parametri clinici

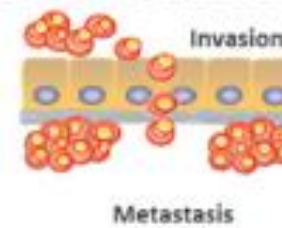
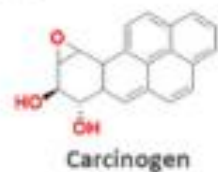
Biomarkers di suscettibilità



IL PARADIGMA DELL'ESPOSIZIONE

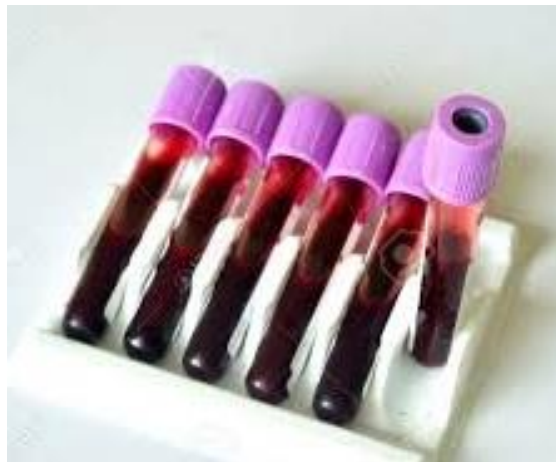


Example Paradigm for Cancer



Valutazione dell'esposizione **sistemica complessiva** alle sostanze chimiche mediante la misurazione di sostanze chimiche,metaboliti o altri indicatori in diverse matrici quali

sangue



urine



Aria espirata



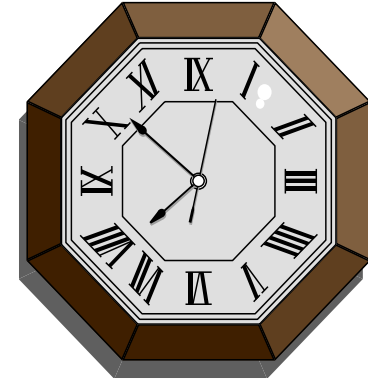
CARATTERISTICHE DI UN INDICATORE BIOLOGICO DI ESPOSIZIONE

Il tempo di campionamento che viene stabilito in base a quanto tempo l'indicatore rimane nell'organismo, cioè in relazione con l'emivita.

La matrice cioè il materiale biologico nel quale deve essere determinato: fa parte della definizione stessa dell'indicatore, es: cromuria, piombemia, benzene nell'aria espirata.

Il significato: indicatori che vanno determinati dopo tempi brevi
rispecchiano l'esposizione recente,
Indicatori che si accumulano danno informazioni sull'esposizione
complessiva

Tempo di campionamento



Dato che la concentrazione di alcuni indicatori può cambiare rapidamente, il **tempo di raccolta dei campioni** è molto importante e deve essere rispettato e registrato accuratamente

Tempo di campionamento	Raccolta raccomandata
Prima del turno	16 ore dopo la fine dell'esposizione
Durante il turno	In qualsiasi momento dopo 2 ore di esposizione
Fine turno	Appena possibile dopo la fine dell'esposizione
Fine settimana lavorativa	Dopo 4 /5 giorni consecutivi di esposizione
Discrezionale o non critico	In qualsiasi momento

STRATEGIE PER IL MONITORAGGIO BIOLOGICO

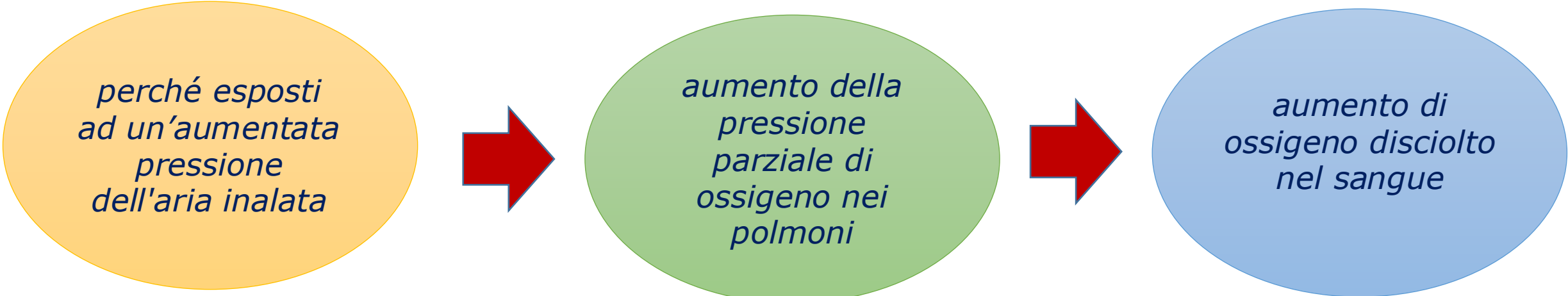
- 1. La scelta dell'indicatore** (dose, effetto, matrice, tempo ecc.) è funzione del tipo di informazione che si cerca
- 1. La matrice urina** è preferibile a quella ematica per la minore invasività del prelievo. *La maggior parte degli IBE da determinare nelle urine vengono espressi in rapporto alla concentrazione di creatinina urinaria. Campioni di urina molto diluiti o concentrati non sono idonei per il monitoraggio.*
- 2. Le tecniche** devono essere dotate di **alta sensibilità** per la ricerca **in tracce** .
- 3. I metodi di analisi devono essere validati** per permettere di interpretare confrontare i risultati con valori limite e di riferimento

Il monitoraggio biologico è lo strumento d'elezione **indispensabile** per conoscere realmente le dosi di sostanze pericolose a cui un lavoratore è stato esposto:

- per sostanze assorbibili attraverso la pelle
- uso di dispositivi di protezione delle vie respiratorie
- per valutare esposizioni pregresse in caso di incidente
- per il registro dell'esposizione a cancerogeni



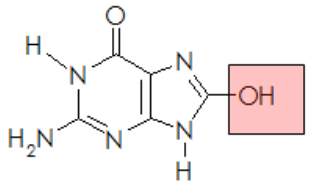
Nei subacquei che utilizzano autorespiratori (Scuba) è stato ipotizzato lo **stress ossidativo**



**numerose reazioni
a livello tissutale e
cellulare**



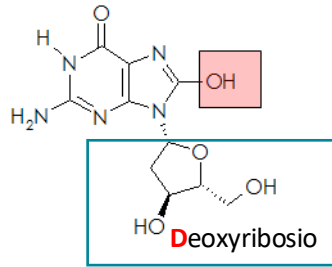
BIOMARCATORI di EFFETTO OSSIDATIVO



8-oxoGuanina

DNA and RNA

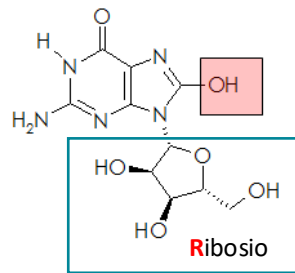
La guanina subisce facilmente un attacco ossidativo, in quanto è la base con il più basso potenziale di ossidazione e l'ossidazione si verifica in posizione 8, con separazione o meno della porzione di zucchero.



8-oxodeossi Guanosina

DNA

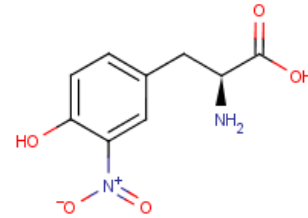
Il biomarcatore più spesso studiato per il danno ossidativo al DNA, originato dai diversi meccanismi di riparazione e / o turnover degli acidi nucleici



8-oxoGuanosina

RNA

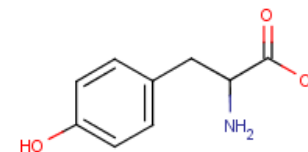
Derivato extracellulare della guanosina ossidata, non esistono meccanismi di riparazione, solo turnover



3-Nitro-L-Tirosina

Proteine

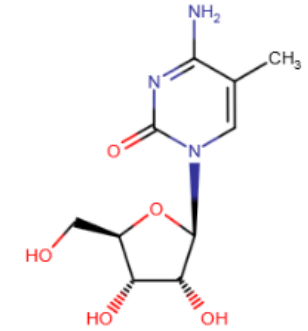
Si forma a seguito di una reazione con monossido di azoto (NO) o anione perossinitrito (NO₃)



L- Tirosina

Amminoacidi

Il suo prodotto di ossidazione è un marker di danno da radicali diretti a proteine / amminoacidi



5-MetilCitidina

RNA

Nucleoside modificato derivato da 5-metilcitosina

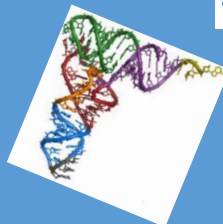
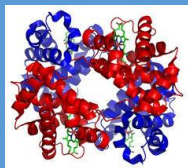
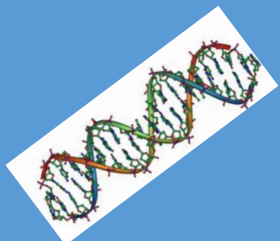
STRESS OSSIDATIVO

Lo stress ossidativo è uno squilibrio tra la produzione di ROS (specie reattive dell'ossigeno) e la capacità del sistema biologico di riparare i danni.

Alterazioni del normale stato redox può danneggiare



LIPIDI, DNA, RNA, PROTEINE

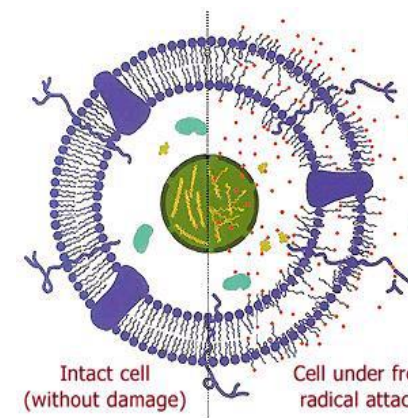


ROS possono essere prodotti da

❖ **Farmaci**



❖ **Inquinamento**



❖ **Metabolismo ed esercizio fisico**



❖ **Fumo ed Alcool**



Acidi nucleici

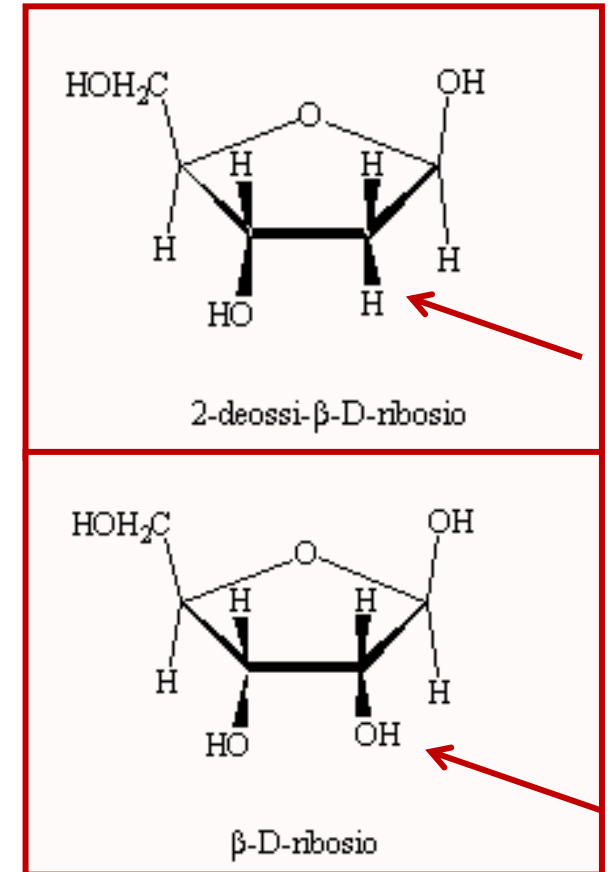
Il DNA e l'RNA sono due macromolecole di struttura simile.

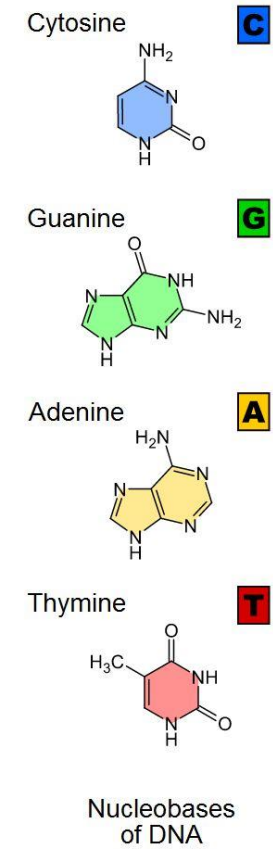
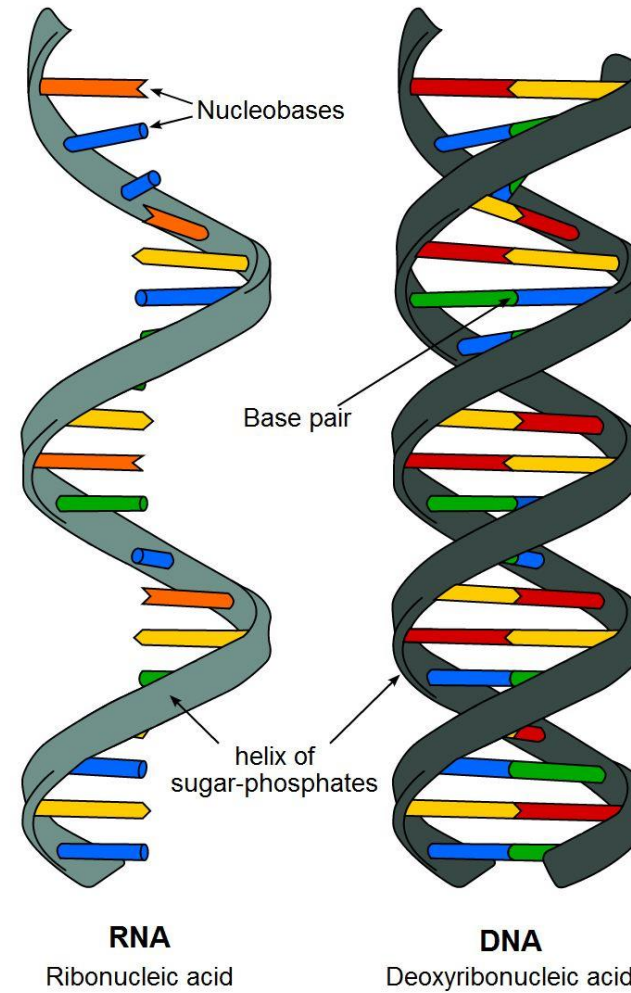
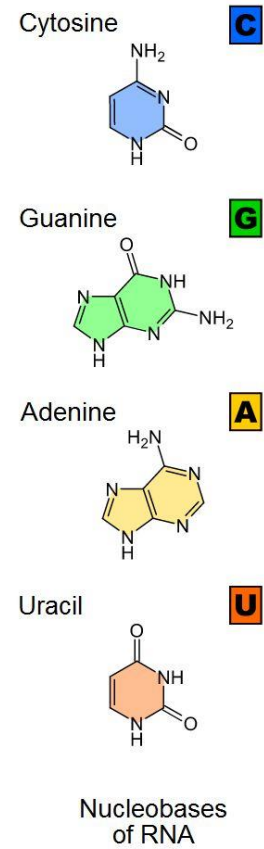
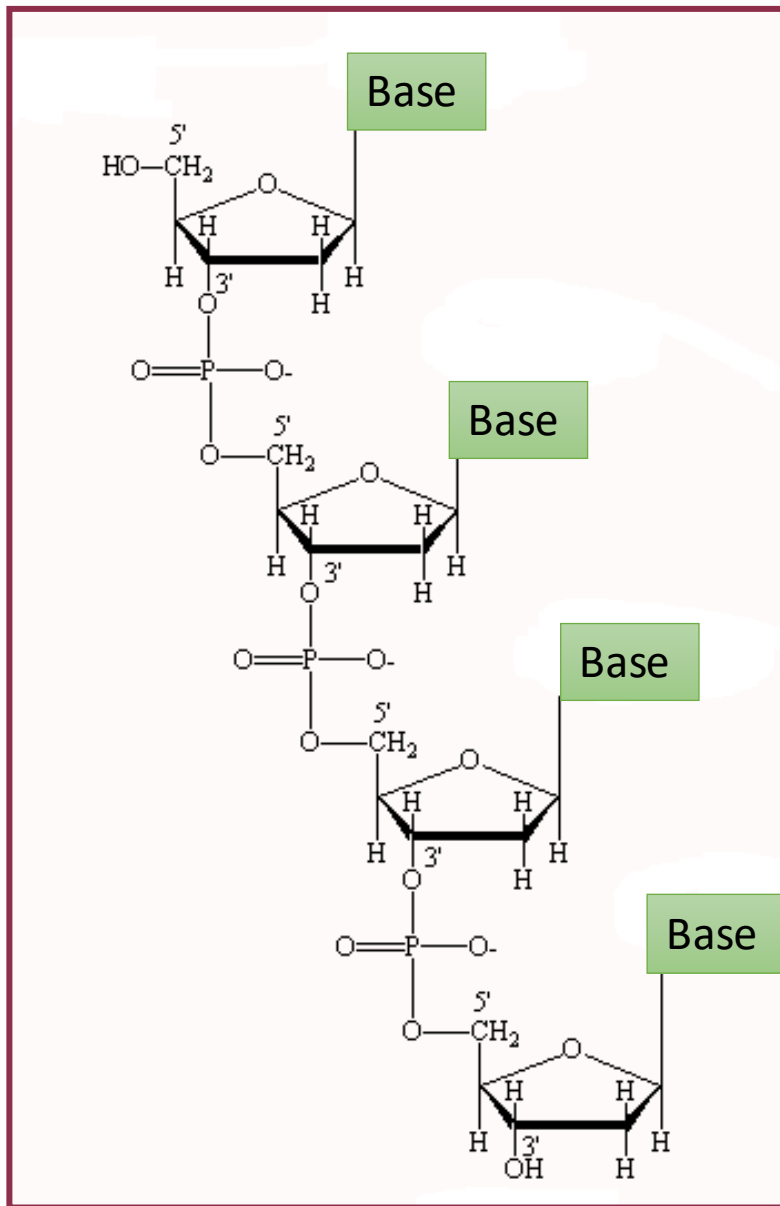
Filamento composto da un grandissimo numero di monomeri detti **nucleotidi**
un nucleotide è formato da un **nucleoside**

Basi		Nucleoside
Pirimidiniche	Puriniche	Base + Zucchero
Citosina DNA/RNA	Guanina DNA/RNA	Nucleotide
Timina DNA	Adenina DNA/RNA	Base + Zucchero + gruppo fosfato
Uracile RNA		

Nel DNA lo zucchero è il **deossiribosio**

Nell'RNA lo zucchero è il **ribosio**





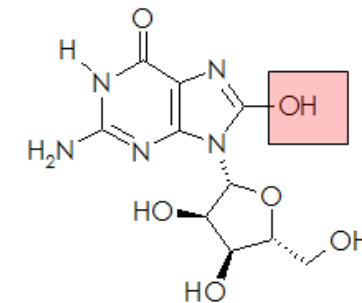
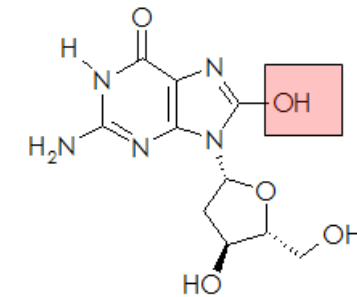
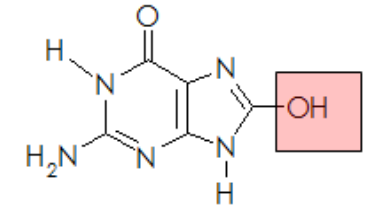
Acidi nucleici

	DNA	RNA
NOME	Acido deossiribonucleico	Acido Ribonucleico
FUNZIONE	1) DNA replica e memorizza le informazioni genetiche. 2) DNA è una molecola più stabile dell'RNA. 3) DNA si trova nel nucleo, e una piccola quantità è presente anche nei mitocondri	1) RNA converte le informazioni genetiche contenute nel DNA. 2) RNA è più reattivo del DNA 3) RNA è più soggetto ad attacchi da parte di enzimi. 4) RNA si forma nel nucleolo e nel citoplasma a seconda del tipo di RNA formato
STRUTTURA	DNA consiste di due filamenti, disposti a doppia elica.	L'RNA ha solo un filamento, costituito da nucleotidi come il DNA. I filamenti di RNA sono più corti dei filamenti di DNA.
ZUCCHERO	Lo zucchero nel DNA è desossiribosio, con un gruppo ossidrilico in meno rispetto al ribosio dell' RNA.	Lo zucchero nell'RNA è il ribosio
APPAIAMENTO BASI	Adenina e Timina (A-T) Citosina e Guanina (C-G)	Adenina e Uracile (A-U) Citosina e Guanina (C-G)

Danno al DNA e/o RNA

La base più suscettibile all'ossidazione è **la guanina**, poiché ha un basso potenziale redox, e la lesione più comune è l'ossidazione che avviene principalmente in posizione 8, con formazione di:

- ❖ **8-idrossiguanina (8-oxoGua)**, che rispecchia un danno ossidativo subito o dal **DNA** o dall'**RNA**
- ❖ **8-idrossi-2'deossiguanosina (8-oxo-dGuo)**, specifica di un danno ossidativo della guanina contenuta **nel DNA**.
- ❖ **8-idrossiguanosina (8-oxo-Guo)**, specifica di un danno ossidativo subito dalla guanina contenuta **nell'RNA**



Il DNA è l'unica molecola che viene riparata



- ❑ Riparazione diretta del danno
- ❑ **Riparazione per escissione(Excision Repair, BER) in cui la base o le basi danneggiate vengono rimosse e sostituite attraverso la nuova sintesi di DNA.**
- ❑ Riparazione per escissione di nucleotidi (Nucleotide Excision Repair, NER)
- ❑ Riparazione di appaiamenti sbagliati Mismatch repair (MMR)

I meccanismi di riparazione utilizzano enzimi specializzati

RNA

L'RNA è più vulnerabile allo stress ossidativo rispetto al DNA, perché:

- è a singolo filamento, le basi sono facilmente accessibili a ROS, perché meno protette dal legame con l'idrogeno
- ha un'associazione minore con proteine e ha un'estesa distribuzione sub-cellulare
- Non ha sistemi di riparazione

Il monitoraggio biologico

✓ **Matrice: Urina** prelevata al mattino in contenitori sterili, suddivisa in aliquote congelate a -20°C fino al momento dell'analisi.
Analisi in HPLC-MS/MS



✓ **BIOMARCATORI:**

8oxoGua, 8-oxodGuo e 8-oxoGuo

✓ **NORMALIZZAZIONE:** i risultati sono espressi in rapporto con la concentrazione della **CREATININA urinaria:** test colorimetrico (metodo Jaffè-UV/Vis 490 nm), quale fattore di normalizzazione per il diverso grado di diluizione dei campioni di urina (g/L o mmoli/L)



TECNICHE ANALITICHE e MATRICI BIOLOGICHE



HPLC/ECD



GC/MS



HPLC-MS/MS



ELISA

- ◆ Urina ◆ Siero ◆ Plasma
- ◆ Saliva ◆ Tessuto
- ◆ EBC (condensato dell'aria esalata)

SVANTAGGI

HPLC/ECD

- Tempo lungo di analisi.
- Possibili Interferenze

Kit ELISA

- Reazioni con diversi analiti
- Variabilità
- Mancanza di specificità

VANTAGGI

LC-MS/MS

- Buona Selettività
- Buona Sensibilità



Con o senza step di derivatizzazione

ANALISI MEDIANTE HPLC-MS/MS

HPLC: Cromatografia liquida ad alte prestazioni

- ❑ Fase mobile liquida
- ❑ Fase stazionaria impaccata in una colonna costituita da particelle porose.
- ❑ Il flusso dell'eluente è ottenuto esercitando una pressione relativamente elevata mediante apposite pompe.



HPLC

Series 200 LC (PerkinElmer)



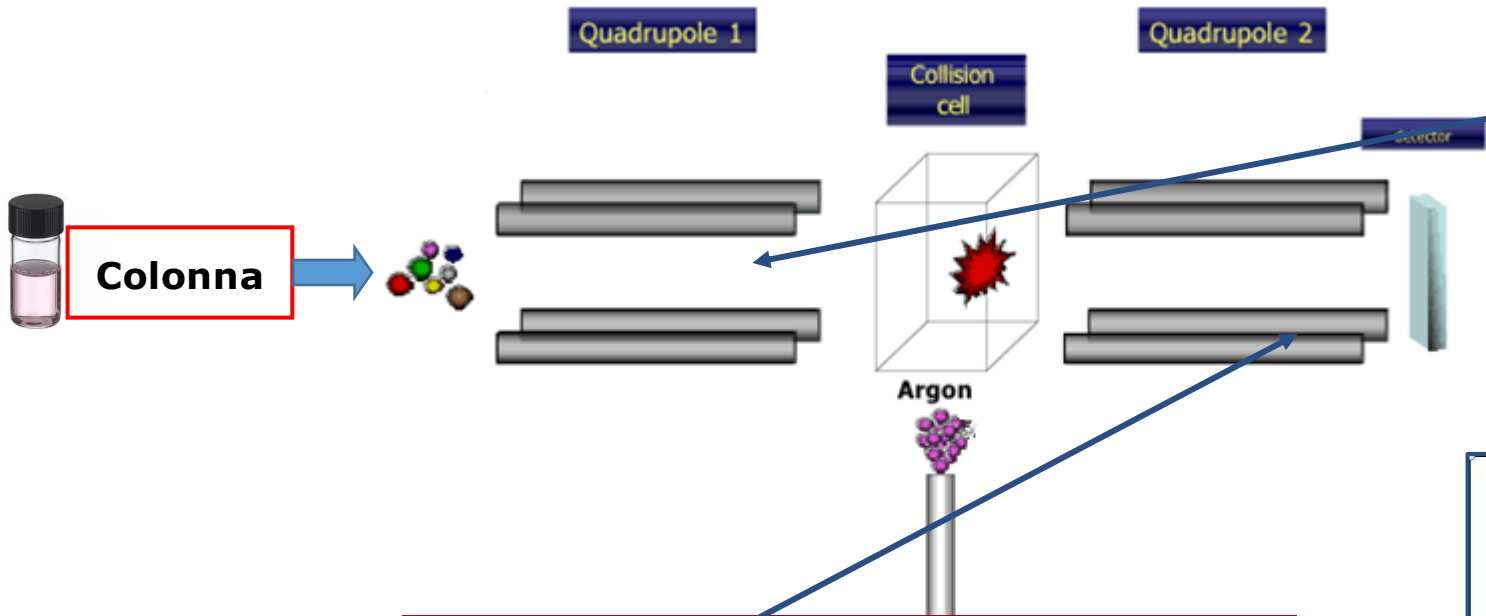
AB/Sciex API 4000 triple-quadrupole

Grandezze

- **Selettività** di un sistema cromatografico è la capacità di eluire sostanze diverse in tempi diversi. Dipende dalla temperatura e dalla natura delle due fasi.
- **Efficienza** è capacità di eluire una sostanza in una banda stretta

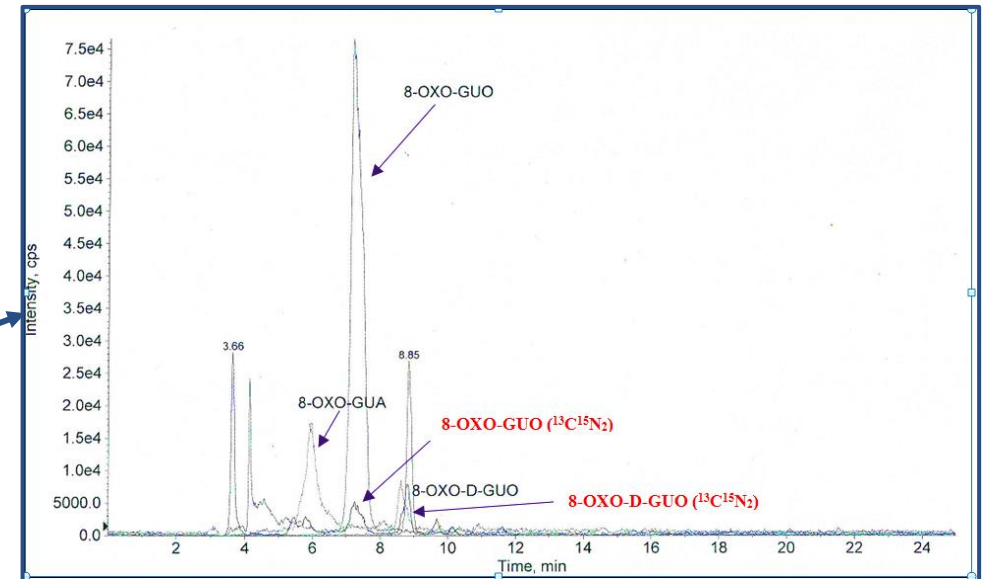


RIVELATORE MS/MS: Lo spettrometro di massa è uno strumento che produce ioni e li separa in fase gassosa in base al loro rapporto massa/carica (m/z).



Le molecole del campione separate dal **primo filtro** non vengono rivelate all'uscita dai quadrupoli ma entrano in un **secondo quadrupolo** nel quale sono indotte ad una nuova frammentazione.

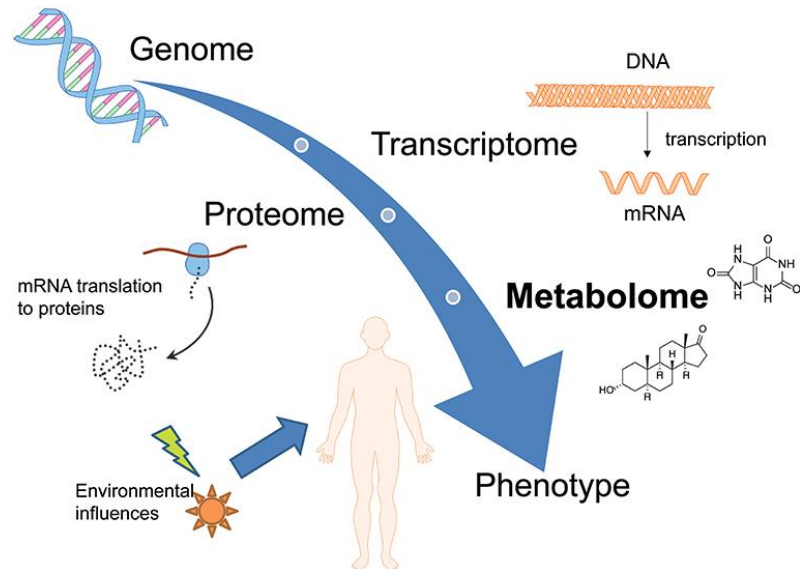
Il **secondo quadrupolo** effettua la separazione e la rivelazione degli ioni frammento prescelti con la tecnica detta rispettivamente **SRM** " (selected reaction monitoring)



Metabolomica NMR

La «**Metabolomica**» è un campo analitico che consente di rilevare un gran numero di piccole molecole in fluidi o tessuti corporei fornendo un profilo completo dei metaboliti a basso peso molecolare presenti in un campione, generando uno spettro caratteristico attraverso la Spettroscopia NMR.

Le fluttuazioni dei metaboliti riflettono la risposta dell'organismo a farmaci, dieta, stile di vita, ambiente, stimoli e modulazioni genetiche



Meccanismi che possono portare alla malattia

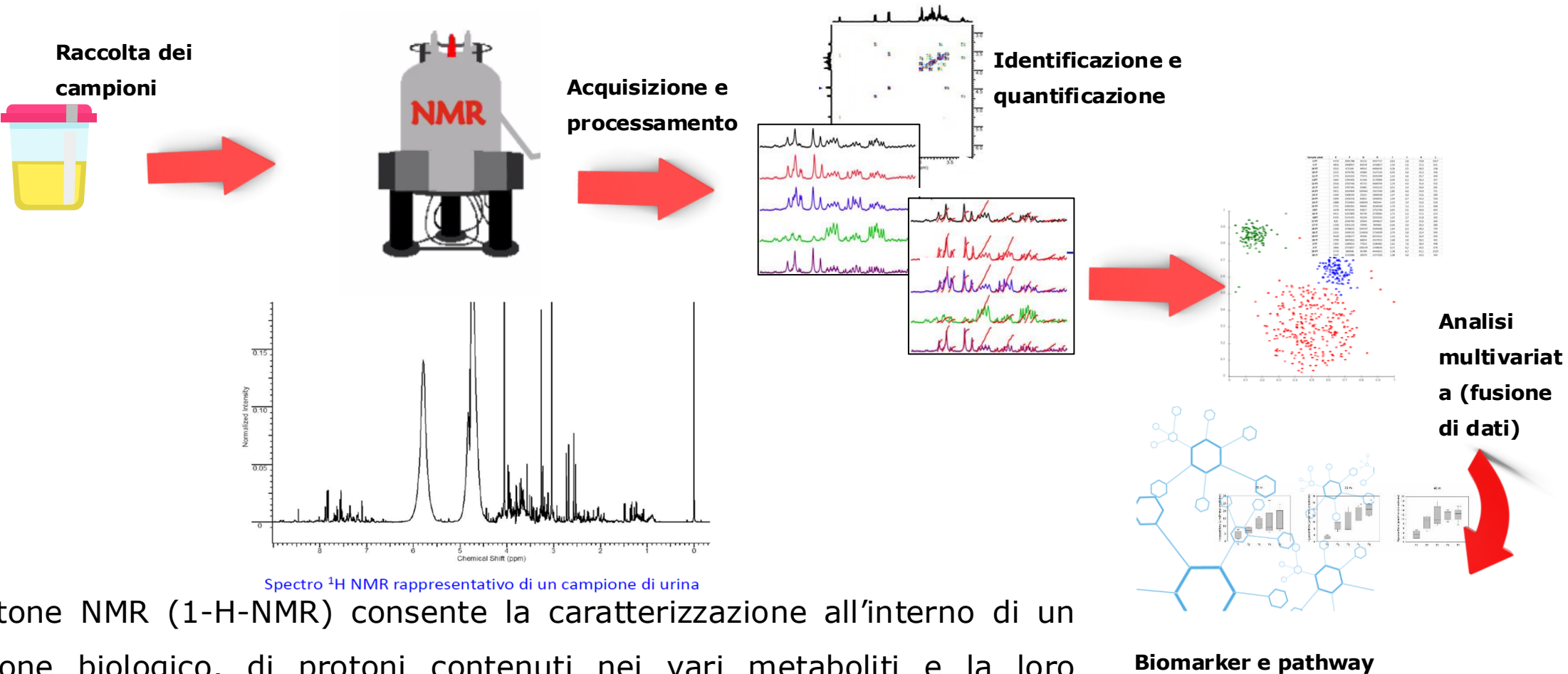


Esposizione a bassi livelli di xenobiotici



Panoramica completa degli effetti dell'esposizione

Flusso di un'Analisi Metabolomica basata su NMR



Il protone NMR (1-H-NMR) consente la caratterizzazione all'interno di un campione biologico, di protoni contenuti nei vari metaboliti e la loro rappresentazione in uno spettro.

Giovanna Tranfo ^{a,*}
Enrico Marchetti ^a,
Daniela Pigni ^a,
Alfredo Miccheli ^e,
Mariangela Spagnoli ^a,
Fabio Sciubba ^b,
Giorgia Conta ^b,
Alberta Tomassini ^c,
Luigi Fattorini ^d

Toxicology Letters 328 (2020) 28–34



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/toxlet



Targeted and untargeted metabolomics applied to occupational exposure to hyperbaric atmosphere

Giovanna Tranfo ^{a,*}, Enrico Marchetti ^a, Daniela Pigni ^a, Alfredo Miccheli ^e, Mariangela Spagnoli ^a, Fabio Sciubba ^b, Giorgia Conta ^b, Alberta Tomassini ^c, Luigi Fattorini ^d

^a INAIL, Department of Occupational Medicine, Epidemiology and Hygiene, Monte Porzio Catone, Rome Italy

^b Department of Chemistry, Sapienza University of Rome, Italy

^c Department of Biology and Biotechnology Charles Darwin, NMR Based Metabolomics Laboratory, Sapienza University of Rome, Italy

^d Department of Physiology and Pharmacology "Vittorio Erspamer", Sapienza University of Rome, Italy

^e Department of Environmental Biology, NMR Based Metabolomics Laboratory, Sapienza University of Rome, Rome Italy

ARTICLE INFO

Keywords:

occupational exposure
hyperbaric atmosphere
DNA and RNA damage
metabolomics
HPLC-MS/MS, NMR

ABSTRACT

Occupational exposure to hyperbaric atmosphere occurs in workers who carry out their activity in environments where breathing air pressure is at least 10% higher than pressure at sea level, and operations can be divided in Dry or Wet activities. The increased air pressure implies the formation of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), consumption of antioxidants and reduction of antioxidant enzyme activity, causing lipid peroxidation, DNA and RNA damage. The present study was aimed to establish the relation between hyperbaric exposure and metabolic changes due to ROS unbalance, by means of the determination of urinary biomarkers of oxidatively generated damage to DNA and RNA during a controlled diving session. The investigated biomarkers were 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua), 8-oxo-7,8-dihydroguanosine (8-oxoGuo), and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxodGuo).

The experimental session involved six experienced divers subjected to 3 atmospheres absolute for 30 minutes



^a INAIL, Department of Occupational Medicine, Epidemiology and Hygiene, Monte Porzio Catone, Rome Italy

^b Department of Chemistry, Sapienza University of Rome, Italy

^c Department of Biology and Biotechnology Charles Darwin, NMR Based Metabolomics Laboratory, Sapienza University of Rome, Italy

^d Department of Physiology and Pharmacology "Vittorio Erspamer", Sapienza University of Rome, Italy

^e Department of Environmental Biology, NMR Based Metabolomics Laboratory, Sapienza University of Rome, Rome Italy

Enrico Marchetti¹
Mariangela Spagnoli¹
Giovanna Tranfo¹
Flavia Buonauro²
Fabio Sciubba^{3,4}
Ottavia Giampaoli^{3,4}
Alfredo Miccheli^{3,4}
Alessandro Pinto⁵
Nazzareno De Angelis⁶
Luigi Fattorini⁷









International Journal of
*Environmental Research
and Public Health*



Article

Hyperbaric Exposure of Scuba Divers Affects the Urinary Excretion of Nucleic Acid Oxidation Products and Hypoxanthine

Enrico Marchetti ¹, Daniela Pigni ¹, Mariangela Spagnoli ¹, Giovanna Tranfo ^{1,*}, Flavia Buonauro ², Fabio Sciubba ^{3,4}, Ottavia Giampaoli ^{3,4}, Alfredo Miccheli ^{3,4}, Alessandro Pinto ⁵, Nazzareno De Angelis ⁶ and Luigi Fattorini ⁷

¹ INAIL – DiMEILA (Dipartimento Medicina, Epidemiologia, Igiene del Lavoro ed Ambientale) Monte Porzio Catone, Roma;

² Dipartimento di Chimica- Università la Sapienza (Roma)

³ NMR-Laboratorio di Metabolomica NMR Based (NMLab), Università la Sapienza (Roma)

⁴ Dipartimento di Biologia Ambientale, Università la Sapienza (Roma)

⁵ Dipartimento di Medicina Sperimentale -Università la Sapienza (Roma)

⁶ Unità di Ricerca Settore Subacqueo della Federazione Italiana Ambiente e Sport (FISA Sub)

⁷ Dipartimento di Fisiologia e Farmacologia "Vittorio Erspamer" , Università la Sapienza (Roma)

Grazie!



Giovanna.tranfo@gmail.com