

A. Basso¹, G. Elia², M.T. Petrozzi¹, R. Zefferino³

Valutazione degli indici di stress ossidativo in addetti alla distribuzione del carburante

¹ DMIMP - Sez. Medicina del Lavoro - Università di Bari

² Fondazione "Salvatore Maugeri" IRCCS - Centro di Igiene Ambientale - Bari

³ Cattedra di Medicina del Lavoro - Facoltà di Medicina e Chirurgia - Università di Foggia

RIASSUNTO. INTRODUZIONE. Scopo del presente studio è quello di verificare la ricorrenza di uno stress ossidativo in una mansione lavorativa come quella degli addetti alla distribuzione del carburante. Per ciò che riguarda i lavoratori addetti alla distribuzione di carburante, valutando la letteratura, si può osservare che i risultati sono controversi, in quanto alcuni hanno dimostrato un'umentata incidenza di leucemia negli addetti alla distribuzione di carburante contenente benzene, mentre altri autori hanno escluso tale associazione, vi sono anche segnalazioni di carcinomi della mucosa nasale, carcinomi del faringe, laringe e polmonari. Il nostro studio vuole in particolare valutare se l'esposizione alle benzine, quale si realizza negli addetti alla distribuzione di carburante, altera la bilancia ossidativa dell'individuo, nel senso di ridurre gli indici di difesa antiossidante e/o di aumentare gli indici di danno ossidativo.

MATERIALI E METODI. Il campione da noi studiato è costituito da 44 soggetti esposti all'inalazione del carburante; i soggetti di controllo sono 29. In ogni soggetto sono stati dosati a livello ematico: il Glutazione (GSH) totale e ridotto, le proteine sulfidriliche (PSH), la Vitamina E e la Vitamina C tra gli indici di riserva antiossidante; invece, tra gli indici di danno ossidativo sono stati dosati il Glutazione Ossidato (GSSG), la Malondialdeide (MDA) e le proteine ossidate (OX-PROT). È stato anche determinato il Beta carotene per le note attività antiossidanti. L'analisi statistica si è avvalsa del test t di Student per il confronto delle medie, mentre si è utilizzato il test del Chi Quadro per valutare la significatività statistica delle differenze numeriche nei gruppi ricavati mediante le variabili categoriche (indice redox). L'analisi della varianza (Anova) ha permesso di valutare il peso di fattori confondenti come l'età, il fumo di sigaretta e l'abitudine al consumo di sostanze alcoliche.

RISULTATI. La popolazione lavorativa è costituita da 44 soggetti esposti che hanno un'età media di 36,6 anni, il gruppo di controllo, costituito da 29 soggetti, mostra un'età media di poco più alta 38,00. È stato evidenziato che il glutazione ridotto, la vitamina E e il Beta Carotene risultano ridotti negli esposti e che tale riduzione risulta statisticamente significativa ($p < 0,01$). Riguardo agli indici di danno ossidativo, si evidenzia che la concentrazione di malondialdeide è più alta negli esposti, ma tale variazione è ai limiti della significatività statistica ($p = 0,0547$). L'analisi della varianza, infine, ha escluso che l'abitudine al fumo di sigaretta e l'abitudine al consumo di bevande alcoliche abbiano agito come fattore confondente in quanto tali caratteristiche risultano distribuite in maniera omogenea nei controlli e negli esposti.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI. La valutazione critica dei nostri dati ci permette di affermare che Glutazione ridotto, Vitamina E e Beta Carotene potrebbero rappresentare un parametro utilizzabile per evidenziare una riduzione delle difese antiossidanti. Tra gli indici di danno ossidativo invece, solo la malondialdeide sembra essere un parametro affidabile nell'indicare un'esposizione professionale a sostanze ossidanti. L'indice di redox, parametro sintetico che permette di valutare

la presenza di una situazione di stress ossidativo, è certamente ben utilizzabile per tali studi. Riteniamo che tale studio abbia come limite la numerosità dei controlli che appare inferiore rispetto a quella degli esposti. Fatte queste valutazioni riteniamo utile nel futuro proseguire nei nostri studi e auspichiamo che, in caso di conferma di tali risultati, la determinazione dello stress ossidativo possa entrare a far parte delle tecniche diagnostiche utilizzabili dal medico competente per controllare meglio la salute nei luoghi di lavoro, specie in mansioni come quelle da noi studiate per le quali la letteratura non evidenzia dati certi e che abbisognano certamente di maggiore attenzione.

Parole chiave: carburanti, indice redox, glutazione.

ABSTRACT. www.gimle.fsm.it

OXIDATIVE STRESS IN STATION SERVICE WORKERS. INTRODUCTION. The aim of this study is to identify an oxidative stress in service station workers. Previous studies verified an increased incidence of leukemia and myeloma, however other authors haven't verified it. There are reports of nasal, pharyngeal, laryngeal, and lung cancer in service station workers. Our study wants to evaluate the oxidative balance in the fuel workers.

MATERIAL AND METHODS. We studied 44 subjects with gasoline exposure and 29 control subjects. We determined the blood concentrations of Glutathione reduced and oxidized, Protein sulfhydrylic (PSH) Vitamine E, Vitamine C, Malondialdehyde, Protein oxidized (OX-PROT) and β carotene. The t test was performed to analyze the differences between the means, the Chi square was used to evaluate the statistical significance of associations between variable categorical (redox index). The Anova test excluded the confusing effect of age, smoke and alcohol habit.

RESULTS. The mean age of the workers was 36,6 years, instead the control group was 38. In the workers Glutathione reduced, Vit. E and Beta carotene were lower than in the control subjects, this difference was statistically significant ($p < 0,01$). The Malondialdehyde concentration was higher in the workers higher than in the control group, but this difference wasn't statistically significant.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS. Our data demonstrated Glutathione, Vit. E, and Beta carotene are useful to verify a reduction of the antioxidant activity. The only marker of the presence of oxidative injury that correlated to work exposure was the malondialdehyde. The redox index was surest marker. The limit of our study is the number of control group, it was little and lower than workers. Conclusively we believe it's useful to continue our studies and, if our results are going to be confirmed, we retain that stress oxidative determination would be verified in occupational medicine using these markers, especially to study exposure of the fuel workers who were investigated less and, in our opinion, would receive more attention.

Key words: fuel, redox index, glutathione.

Introduzione

Scopo del presente studio è quello di verificare la ricorrenza di uno stress ossidativo in una mansione lavorativa come quella degli addetti alla distribuzione del carburante. Tra i carburanti, che danno luogo ad una vasta e variegata esposizione, abbiamo concentrato la nostra attenzione sugli addetti alla distribuzione di benzina verde e di diesel. Si ritiene che tali benzine contengano circa 500 idrocarburi in parte saturi ed in parte insaturi costituiti da catene carboniose da 3 a 12 atomi di carbonio (1).

È ben noto che la eliminazione del piombo, utilizzato come antidetonante, ha determinato una maggiore pericolosità dell'esposizione professionale e ambientale in quanto è stato sostituito con una sostanza come il benzene noto per la sua azione leucemogena.

Si ritiene, generalizzando, che le benzine contengano il 62% di alcani, il 7% di alcheni e, per il 31% siano costituite da idrocarburi aromatici, alcool ed eteri. Da uno studio pubblicato recentemente (2) risulta che la distribuzione di alcani e isoprenoidi emessi dalle auto con marmitta catalitica è la stessa di quella presente nel combustibile, mentre in caso di marmitta non catalitica i fumi emessi mostrano una differente composizione, rispetto al combustibile. Ciò renderebbe quindi paragonabile, per le suddette sostanze, l'esposizione lavorativa negli addetti al traffico veicolare e negli addetti al rifornimento di carburante. Alcuni ritengono che l'esposizione a carburanti durante il rifornimento sia trascurabile, pur tuttavia i dati di letteratura non sono completi e appaiono contrastanti; si calcola che durante il rifornimento la concentrazione degli idrocarburi totali sia variabile nella misura da 20 a 200 ppm (1).

Esistono dati sperimentali che evidenziano un effetto mutageno dei carburanti sui batteri. L'instillazione endotracheale nei ratti della frazione organica semivolatile e del particolato emesso dai motori diesel (nei ratti) ha indotto flogosi e variazioni della funzione macrofagica (3). Altri autori (4) hanno dimostrato, in un modello in vitro costituito da neuroni di ratto, che alcuni additivi ossigenati agirebbero come antagonisti competitivi del GABA. Per ciò che riguarda l'uomo vi sono segnalazioni di tumori renali ed epatici (5-8).

Nelle benzine vi sono inoltre additivi ossigenati come MTBE (Metil-terziario-butil-etero); a questi vanno aggiunti etanolo e metanolo. L'MTBE dà luogo a tumori sesso specifici, nel senso che in ratti femmine ha dato luogo ad adenomi epatici, nel maschio a tumori renali. L'Environmental Protection Agency (EPA) lo ha classificato come possibile cancerogeno per l'uomo (9).

Per ciò che concerne il benzene, noto costituente delle benzine verdi, è noto che esso è attivato a livello delle ossidasi microsomiali in un composto altamente tossico che è l'eossido, il quale è fornito di una potente attività cancerogena. La ossidazione del benzene dà luogo ad un'aumentata produzione di radicali liberi (10). Weisel et Al (11) dimostrarono che la via metabolica di apertura dell'anello benzenico risulta molto più

attiva in caso di basse esposizioni, rispetto alle alte esposizioni e conclusero che quindi non era possibile estrapolare i dati derivanti dalle alte esposizioni alle basse esposizioni. Per ciò che riguarda i lavoratori addetti alla distribuzione di carburante, valutando la letteratura, si può osservare che i risultati sono controversi, in quanto alcuni hanno dimostrato un'aumentata incidenza di leucemia negli addetti alla distribuzione di carburante contenente benzene, mentre altri autori hanno escluso tale associazione (12-14), vi sono anche segnalazioni di carcinomi della mucosa nasale, carcinomi del faringe, laringe e polmonari (15).

Tra i costituenti delle benzine sono da ricordare toluene e xilene, due idrocarburi aromatici dei quali sono noti gli effetti tossici a carico del rene, cuore e SNC. La IARC li classifica come non cancerogeni per l'uomo.

La mancata congruità degli studi negli addetti alla distribuzione del carburante probabilmente deriva dalla estrema diversità delle benzine nei vari Stati e dal fatto che non è ben definita l'esposizione professionale. I rischi ritenuti omogenei sono in realtà eterogenei e ciò inficia la rappresentatività e la riproducibilità campionaria.

Il nostro studio vuole in particolare valutare se l'esposizione alle benzine, quale si realizza negli addetti alla distribuzione di carburante, altera la bilancia ossidativa dell'individuo, nel senso di ridurre gli indici di difesa antiossidante e/o di aumentare gli indici di danno ossidativo.

Materiali e metodi

Il campione da noi studiato è costituito da 44 soggetti esposti all'inalazione del carburante; i soggetti di controllo sono 29.

A tutti è stato somministrato un questionario, onde derivarne informazioni sull'attività lavorativa, le abitudini voluttuarie, l'utilizzo di farmaci e la presenza di eventuali patologie croniche.

Tra i lavoratori sono stati considerati sia i gestori che i dipendenti. Le stazioni di servizio sono situate sia in aree urbane che in aree extraurbane.

In ogni soggetto sono stati dosati a livello ematico: il Glutazione (GSH) totale e ridotto, le proteine sulfidriliche (PSH), la Vitamina E e la Vitamina C tra gli indici di riserva antiossidante; invece, tra gli indici di danno ossidativo sono stati dosati il Glutazione Ossidato (GSSG), la Malondialdeide (MDA) e le proteine ossidate (OX-PROT). È stato anche determinato il Beta carotene per le note attività antiossidanti.

Allo scopo di classificare l'entità dell'eventuale stress ossidativo i soggetti sono stati classificati in base alle concentrazioni degli analiti (Tabella I) in maniera tale da ottenere attraverso la valutazione sintetica dei singoli parametri un indice che è stato denominato indice redox.

Sono quindi state definite tre classi A, B e C dove la A è costituita da soggetti con bilancio ossido-riduttivo ottimale, la classe B identifica dei soggetti a rischio di ossidazione, la classe C, invece, indica la presenza di uno stress ossidativo di grado severo.

Tabella I. Metodo utilizzato per la valutazione del bilancio ossido riduttivo: una volta calcolato il punteggio totale secondo la tabella, il soggetto viene classificato secondo lo schema successivo

ANALITA	PUNTEGGIO		
	1	2	3
GSH	3.6-5.5	2.6-3.5	0.5-2.5
PSH	81-120	41-80	0-40
VIT E	40-11	10.-6	5-0
VIT C	20-60	19-.10	1-.9
GSSG	<=0.5	0,6-1	>1
MDA	<=1	1.1-2	>2
OXPROT	<=3	4-.6	>6

INDICE REDOX	CLASSE
7-9	A
10-13	B
>= 14	C

Classe A= Bilancio ossido-riduttivo ottimale.
Classe B= Stato ossido riduttivo a rischio di ossidazione
Classe C= Situazione di stress ossidativo di grado severo.

Gli analiti sono stati determinati con metodiche standard (16-21). L'analisi statistica si è avvalsa del test t di Student per il confronto delle medie, mentre si è utilizzato il test del Chi Quadro per valutare la significatività statistica delle differenze numeriche nei gruppi ricavati mediante le variabili categoriche (indice redox). L'analisi della varianza (Anova) ha permesso di valutare il peso di fattori confondenti come l'età, il fumo di sigaretta e l'abitudine al consumo di sostanze alcoliche.

Risultati

La popolazione lavorativa è costituita da 44 soggetti esposti che hanno un'età media di 36,6 anni, il gruppo di controllo, costituito da 29 soggetti, mostra un'età media di poco più alta 38,00. In tabella II è possibile verificare gli indici di tendenza centrale e di dispersione dell'età delle 2 popolazioni in studio. Riguardo all'abitudine al fumo possiamo valutare dalla tabella III che negli esposti fuma il 43%, mentre nei controlli fuma il 37%. Riguardo all'abitudine al consumo di bevande alcoliche si evidenzia che tra gli esposti fa uso di bevande alcoliche l'88%, mentre tra i controlli il 72% (Tab. III).

Nella figura 1 valutiamo il comportamento delle medie degli indici di riserva antiossidante, onde facilitare la

Tabella II. Indici di tendenza centrale e di dispersione dell'età nelle popolazioni in studio

INDICE	ESPOSTI	CONTROLLI
MEDIA	36,61	38,00
MEDIANA	34,00	38,00
D.S.	10,40	8,88

Tabella III. Frequenza delle abitudini voluttuarie nelle popolazioni in studio

ABITUDINE	ESPOSTI	CONTROLLI
ALCOL SI	39 (88%)	21 (72%)
ALCOL NO	5 (12%)	8 (28%)

ABITUDINE	ESPOSTI	CONTROLLI
FUMATORI	19 (43%)	11 (37%)
NON FUMATORI	25 (57%)	18 (63%)

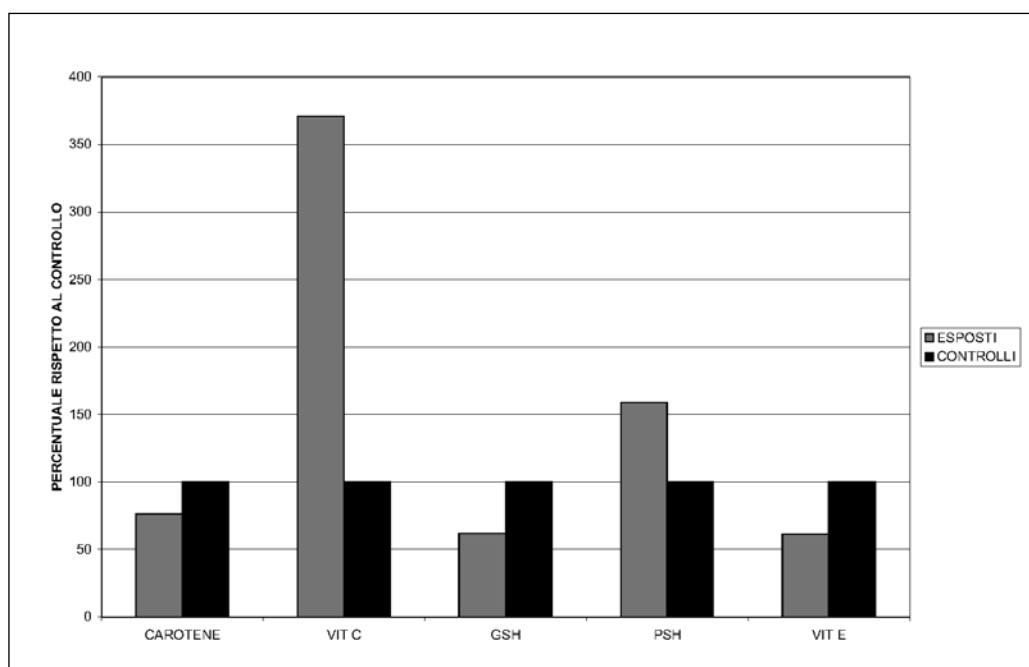


Figura 1. Valori percentuali rispetto al controllo delle medie degli indici di riserva antiossidante nei due gruppi

lettura dei grafici abbiamo indicato i valori come percentuale rispetto al controllo. Dall'esame della figura 1 si evidenzia che il glutatone ridotto, la vitamina E e il Beta Carotene risultano ridotti negli esposti, tale riduzione risulta statisticamente significativa ($p < 0,01$). La variazione riscontrata nella concentrazione delle proteine sulfidriliche non è statisticamente significativa.

Riguardo alla vitamina C i nostri dati mostrano un comportamento paradossale, nel senso che essa risulta aumentata negli esposti e tale aumento è statisticamente significativo. Possiamo ipotizzare che nella concentrazione di quest'ultima potrebbero interferire anche abitudini dietetiche o utilizzo di integratori dietetici o farmaci non ben indagati nel nostro studio.

Riguardo agli indici di danno ossidativo, dall'esame della figura 2 si evidenzia che la concentrazione di malondialdeide è più alta negli esposti, ma tale variazione è ai limiti della significatività statistica ($p=0,0547$). Il glutatone ossidato non risulta alterato in maniera statisticamente significativa, mentre le proteine ossidate risultano più alte nei controlli e tale differenza appare statisticamente significativa ($p < 0,01$).

La valutazione degli indici di redox (Fig. 3) ha permesso di evidenziare un'associazione statisticamente significativa ($p < 0,01$) tra esposizione professionale e alterazione di tale indice che, come già detto, rappresenta un indice affidabile nella valutazione della condizione di stress ossidativo.

L'analisi della varianza, infine, ha escluso che l'abitudine al fumo di sigaretta e l'abitudine al consumo di bevande alcoliche abbiano agito come fattore confondente in quanto tali caratteristiche risultano distribuite in maniera omogenea nei controlli e negli esposti.

Discussione e conclusioni

La valutazione critica dei nostri dati ci permette di affermare che Glutazione ridotto, Vitamina E e Beta Carotene potrebbero rappresentare un parametro utilizzabile per evidenziare una riduzione delle difese antiossidanti. Tra gli indici di danno ossidativo invece, solo la malondialdeide sembra essere un parametro affidabile nell'indicare un'e-

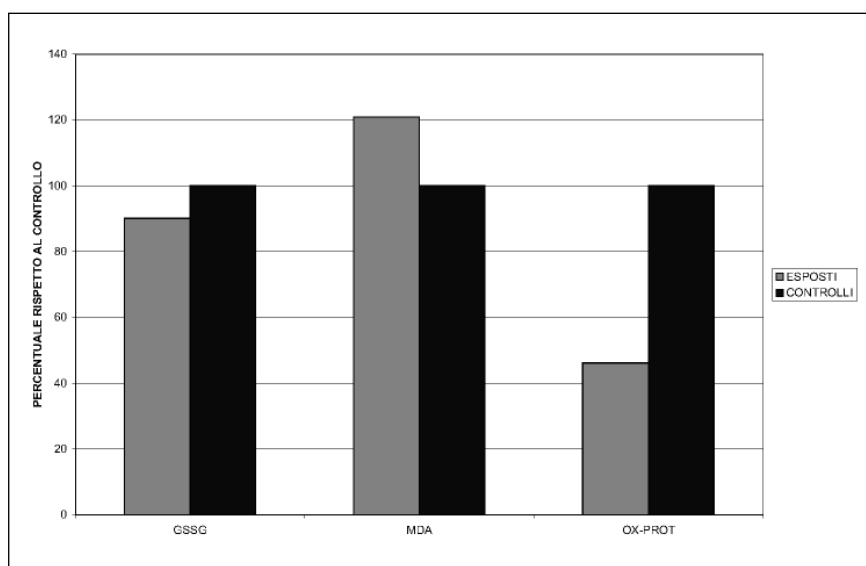


Figura 2. Valori percentuali rispetto al controllo delle medie degli indici di danno ossidativo nei due gruppi

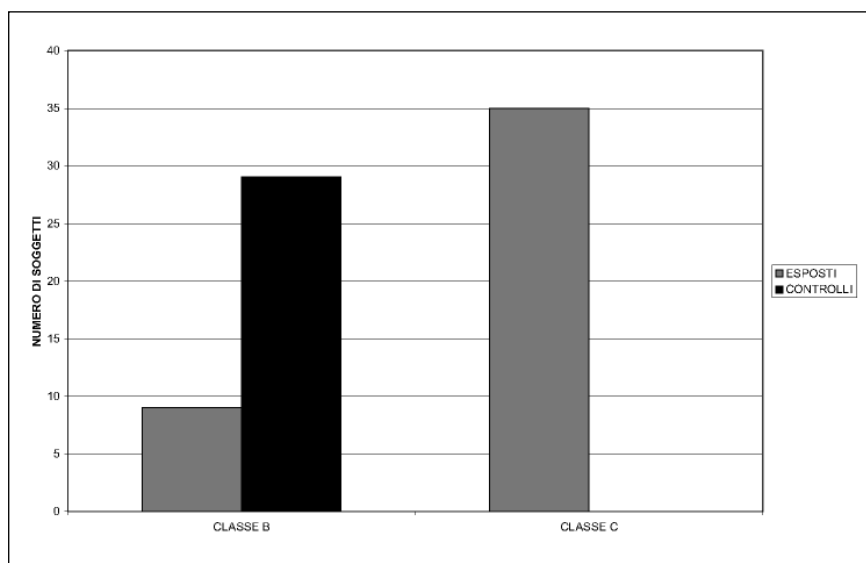


Figura 3. Distribuzione dei soggetti in studio nelle classi individuate in base all'indice redox

sposizione professionale a sostanze ossidanti. L'indice di redox, parametro sintetico che permette di valutare la presenza di una situazione di stress ossidativo, è certamente ben utilizzabile per tali studi.

In conclusione il nostro studio può essere valutato come uno studio pilota, inteso solo a esplorare in via preliminare la problematica dello stress ossidativo in ambito professionale, problematica che appare complessa e che abbisogna senz'altro di studi più approfonditi. Riteniamo che tale studio abbia come limite la numerosità dei controlli che appare inferiore rispetto a quella degli esposti. La ragione di ciò è da ricercare nel fatto che dai controlli che erano all'origine 110, abbiamo ritenuto utile escludere i soggetti affetti da diabete ed epatopatie che potevano interferire negativamente nella valutazione dei risultati.

Fatte queste valutazioni riteniamo utile nel futuro proseguire nei nostri studi e auspichiamo che, in caso di conferma di tali risultati, la determinazione dello stress ossidativo possa entrare a far parte delle tecniche diagnostiche utilizzabili dal medico competente per controllare meglio la salute nei luoghi di lavoro, specie in mansioni come quelle da noi studiate per le quali la letteratura non evidenzia dati certi e che abbisognano certamente di maggiore attenzione.

Bibliografia

- 1) Caprino L, Togna GI. Potential health effects of gasoline and its constituents: a review of Current Literature (1990-1997) on toxicological data. *Environmental Health Perspectives* 1998; 106: 115-125.
- 2) Schauer JJ, Kleeman MJ, Cass GR, Simoneit BR. Measurement of emission from air pollution sources. 5. C1-C32 organic compounds from gasoline-powered motor vehicles. *Environ Sci Technol* 2002; 36(6): 1169-1180.
- 3) Seagrave J, McDonald JD, Gigliotti AP, Nikula KJ, Seilkop SK, Gurevich M, Mauderly JL. Mutagenicity and in vivo toxicity of combined particulate and semivolatile organic fractions of gasoline and diesel engine emissions. *Toxicol Sci* 2002; 70(2): 212-226.
- 4) Martin JV, Bilgin NM, Iba M. Influence of oxygenated fuel additives and their metabolites on the binding of a convulsant ligand of the gamma-aminobutyric acid (A) (GABA (A)) receptor in rat brain membrane preparations. *Toxicol Lett* 2002; 129(3): 219-226.
- 5) Mellemgard A, Engholm G, McLaughlin JK, Olsen JH. Occupational risk factors for renal-cell carcinoma in Denmark. *Scand J Work Environ Health* 1994; 20(3): 160-165.
- 6) Raabe GK. Review of the carcinogenic potential of gasoline. *Environ Health Perspect* 1993; 101(suppl 6): 35-38.
- 7) Standeven AM, Wolf DC, Goldsvorthy TL. Interactive effects of unleaded gasoline and estrogen on liver tumor promotion in female B6C3F1 mice. *Cancer Res* 1994; 54: 1198-1204.
- 8) Standeven AM, Wolf DC, Goldsvorthy TL. Investigation of anti-strogenicity as a mechanism of female mouse liver tumor induction by unleaded gasoline CIIT Activities 1994; 14: 1-6.
- 9) U.S. EPA. Assessment of potential health risks of gasoline oxygenated with methyl tertiary butyl ether (MTBE). EPA 1993; 600/R-93/206. Washington, DC: Environmental Protection Agency.
- 10) Subrahmanyam VV, Ross D, Eastmond DA, Smith MT. Potential role of free radicals in benzene-induced myelotoxicity and leukaemia. *Free Radical Biol Med* 1991; 11: 495-515.
- 11) Weisel C, Yu R, Roy A, Georgopoulos P. Biomarkers of environmental benzene exposure. *Environ Health Perspect* 1996; 104 (suppl. 6): 1141-1146.
- 12) Enterline PE. Review of new evidence regarding the relationship of gasoline exposure to kidney cancer and leukaemia. *Environ Health Perspect* 1993; 101 (suppl. 6): 101-103.
- 13) Schnatter AR, Katz AM, Nicolich MJ, Theriault G. A retrospective mortality study among Canadian petroleum marketing and distribution workers. *Environ Health Perspect* 1993; 101 (suppl. 6): 85-99.
- 14) Wong O, Harris F, Smith TJ. Health effects of gasoline exposure. II. Mortality patterns of distribution workers in the United States. *Environ Health Perspect* 1993; 101 (suppl 6): 63-76; 15) Lyng E, Andersen A, Nilsson R, Barlow L, Pukkala E, Nordlinder R, Boffetta P, Grandjean P, Heikkila P, Horte LG. Risk of cancer and exposure to gasoline vapors. *Am J Epidemiol* 1997; 145: 449-458.
- 16) Tietz F. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem*, 1969; 27: 502-522.
- 17) Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*, 1959; 82: 70-77.
- 18) Hatam LJ, Kayden HJ. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of tocopherol in plasma and cellular elements of the blood. *J Lipid Res*, 1979; 20: 639-645.
- 19) Bhuyan KC, Bhuyan DK. Regulation of hydrogen peroxide in eye humors: effect of 3-amino-1H-1,2,4 triazole on catalase and glutathione peroxidase of rabbit eye. *Biochim Biophys Acta*, 1977; 479: 641-665.
- 20) Levine RL, Garland D, Oliver CN. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Method Enzymol*, 1990; 186: 464-478.
- 21) Grattagliano I et al. Oxidation of circulating proteins in alcoholics: role of acetaldehyde. *J Hepatol*, 1996; 24: 1-9.

Richiesta estratti: Roberto Zefferino *Cattedra di Medicina del Lavoro - Facoltà di Medicina e Chirurgia OO.RR. - Viale Luigi Pinto - 71100 Foggia, Italy - E-Mail rozeffer@tin.it*