

S. Negri¹, M. Ferrari², L. Maestri¹, S. Ghittori¹, M. Imbriani³

Cinetica di escrezione degli acidi fenilidrossietilmercapturici (PHEMAs), consumo di etanolo ed esposizione cronica a stirene: dati preliminari sull'uomo

¹ Laboratorio per lo Studio e il Monitoraggio dell'Esposizione a Inquinanti Aeriformi (LabS-MEIA), Fondazione Salvatore Maugeri I.R.C.C.S., Pavia, Italy

² Unità Operativa di Medicina Ambientale e Medicina Occupazionale, Fondazione Salvatore Maugeri I.R.C.C.S., Pavia

³ Dipartimento di Medicina Preventiva, Occupazionale e di Comunità, Università degli Studi di Pavia - Unità Operativa di Medicina Ambientale e Medicina Occupazionale, Fondazione Salvatore Maugeri I.R.C.C.S., Pavia

RIASSUNTO. Lo stirene (S) è un idrocarburo aromatico diffusamente utilizzato ed è causa di molteplici effetti avversi. Il metabolismo dello S nell'uomo è noto; oltre ai metaboliti maggiori (acido mandelico e fenilglicossilico), sono stati individuati metaboliti minori, gli acidi fenilidrossietilmercapturici (PHEMAs) [i regioisomeri N-acetil-S-(1-fenil-2-idrossietil)-L-cisteina (M1) ed N-acetil-S-(2-fenil-2-idrossietil)-L-cisteina (M2), ciascuno dei quali si trova in due forme isomere "R" ed "S"] che risultano potenzialmente utili per il monitoraggio biologico degli esposti. Uno studio pilota su un volontario esposto a S in condizioni controllate, in presenza e in assenza di una contemporanea somministrazione di etanolo, ha permesso di caratterizzare il profilo di escrezione dei PHEMAs e l'interferenza dell'etanolo su tale via metabolica. Sono stati poi presi in considerazione 9 lavoratori professionalmente esposti a S durante la settimana lavorativa, al fine di indagare un eventuale effetto dell'esposizione cronica sulla cinetica di escrezione dei PHEMAs. I risultati di questo studio preliminare confermano una elevata variabilità interindividuale del tasso di biotrasformazione dello S a PHEMAs e della cinetica di escrezione di questi metaboliti. Inoltre si sono riscontrati cambiamenti di entrambi i parametri durante la settimana, probabilmente in conseguenza della continua esposizione a S e ad altri solventi; questo dà origine ad una elevata variabilità intraindividuale. Sul piano pratico, i risultati indicano che, per intraprendere qualsiasi studio di correlazione fra genotipo e fenotipo, è necessario raccogliere i campioni biologici all'inizio della settimana lavorativa. Infine, i dati enfatizzano l'importanza di escludere una eventuale assunzione di etanolo (anche occasionale) se si attuano programmi di monitoraggio biologico basati sulla determinazione urinaria dei PHEMAs.

Parole chiave: stirene, PHEMAs, etanolo, cinetica.

ABSTRACT. www.gimle.fsm.it

EXCRETION KINETICS OF PHENYLHYDROXYETHYL MERCAPTURIC ACIDS (PHEMAs), ETHANOL CONSUMPTION, AND CHRONIC EXPOSURE TO STYRENE: PRELIMINARY DATA ON HUMANS. Styrene (S) is a widely used aromatic hydrocarbon, responsible for several adverse effects. In humans, the metabolism of S is well characterized: besides the major metabolites (mandelic and phenylglyoxylic acid), a minor metabolic pathway leads to phenylhydroxyethyl mercapturic acids (PHEMAs) [N-acetyl-S-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)-L-cysteine (M1) and N-acetyl-S-(2-phenyl-2-hydroxyethyl)-L-cysteine (M2)], that are potentially useful for biomonitoring purposes. A pilot study on a volunteer exposed under controlled conditions to S, with or without ethanol administration, allowed us to characterize the excretion profile of PHEMAs and the ethanol-induced interference on PHEMAs metabolic pathway. We further considered a group of 9 workers exposed to S during the working week to determine the confounding role of chronic exposure. Our results confirm the wide interindividual variability of both the biotransformation rate of S into PHEMAs and of the excretion rate of these metabolites. Moreover, both the above parameters changed during the working week, suggesting the existence of a large intraindividual variability as a consequence of the exposure to S and to other solvents. As a practical rule, the data indicate that it is necessary to collect samples at the beginning of the working week when studies on the correlation between genotype and phenotype are carried out. Finally, the results emphasize the importance of excluding an even extemporary ethanol assumption when practicing a biological monitoring programme based on the determination of urinary PHEMAs.

Key words: styrene, PHEMAs, ethanol, kinetics.

Introduzione

Lo stirene (S) è un idrocarburo aromatico ($C_6H_5CH=CH_2$) dotato di spiccata reattività chimica per la presenza di un doppio legame nel radicale vinilico: esso si combina facilmente con altre sostanze e tende anche a polimerizzare spontaneamente. Tali proprietà sono alla base del diffuso utilizzo industriale, in particolare nella produzione di polimeri, resine e plastiche rinforzate. Lo S, come altri solventi organici, comunemente si trova negli ambienti di lavoro allo stato liquido, ma, in virtù di una notevole volatilità, può facilmente penetrare nell'organismo dei soggetti professionalmente esposti, per via polmonare, attraverso l'inalazione di vapore (1). È ammessa la possibilità di esposizione per via cutanea (2, 3, 4) benché questa modalità di assorbimento appaia in genere poco importante (5).

L'esposizione acuta a dosi elevate comporta un effetto irritante a carico della congiuntiva, della cute e delle mucose delle alte vie aeree (6, 7, 8), inoltre è causa di alterazioni del sistema nervoso centrale (9, 10, 11) per effetto depressivo-inibitorio aspecifico che può manifestarsi con cefalea, vertigini, astenia, disorientamento, amnesia, sonnolenza. Benché appaia controverso il riconoscimento di un effetto persistente (12) e si trovino in letteratura dati contraddittori (12, 13, 14, 15), l'esposizione cronica a dosi relativamente basse è stata posta in correlazione con effetti neurotossici (obnubilamento, turbe dell'umore, anomalie EEG, diminuzione della velocità di conduzione nervosa, disfunzione del sistema neurovegetativo, rallentamento dei tempi di reazione, alterazione uditiva) (16, 17) e si ritiene che possa contribuire allo sviluppo di malattie croniche del sistema nervoso centrale (18). Le discromatopsie riscontrate in lavoratori esposti (19) sembrano rappresentare un effetto neurotossico precoce. Fra le alterazioni neuroendocrine indotte dallo S è stato individuato l'incremento dei livelli ematici di prolattina (20, 21, 22) con riduzione dei livelli tuberoinfundibolari di dopamina (23). In caso di esposizione a lungo termine a S si riconosce la possibilità di un effetto nefrotossico (24, 25) e studi recenti (26) hanno riscontrato anche l'aumentato rischio di miocardiopatia ischemica in lavoratori cronicamente esposti. Il fegato potrebbe costituire un altro organo bersaglio dell'azione tossica come è evidenziato dall'incremento dei livelli serici degli acidi biliari (27), della

bilirubina diretta e della fosfatasi alcalina (28) dopo esposizione occupazionale e dal riscontro di fibrosi perisinusoidale e infarcimento lipidico epatocitario in modelli sperimentali (29). La tossicità sulla funzione riproduttiva è stata studiata negli animali e nell'uomo. Benché diversi risultati pubblicati siano controversi e non conclusivi, appare tuttavia ragionevole ritenere che lo S non alteri la fertilità e che, a livelli di dose privi di tossicità per la madre, non causi modificazioni dello sviluppo (30). È stata fatta anche l'ipotesi di effetto cancerogeno (31), supportata dal riscontro di danno citogenetico nei linfociti di soggetti professionalmente esposti (32, 33) e dall'evidenza di un effetto mutageno e inducente del metabolita elettrofilo stirene 7,8-epossido (32, 34, 35, 36), ma l'evidenza di cancerogenicità resta limitata (32).

L'esposizione non occupazionale a S si ritiene che possa derivare dal traffico veicolare (37, 38), dal fumo di sigaretta (38, 39, 40, 41) o dall'ingestione di cibi contaminati (41, 42). In particolare, l'entità del rilascio di S da parte dei contenitori per alimenti in polistirene è proporzionale al contenuto di etanolo e di grassi e alla temperatura dell'alimento considerato (43). Anche l'inquinamento indoor può comportare una certa esposizione a S, probabilmente correlata all'emissione da parte di personal computers (44). È tuttavia dimostrato che, in tutte le situazioni sopra descritte, le concentrazioni di S risultano normalmente molto inferiori rispetto a quelle misurate in ambito lavorativo (37).

È in campo occupazionale che principalmente si realizza l'esposizione a S (37, 45) e il livello limite di esposizione per un turno lavorativo di otto ore è fissato attualmente a 20 ppm (46). In alcune operazioni industriali, come ad esempio la manifattura delle vetroresine nel settore nautico, in assenza di adeguate misure preventive primarie l'esposizione a S può essere molto elevata (centinaia di ppm) e risulta quindi particolarmente importante la valutazione periodica dei livelli espositivi mediante il monitoraggio ambientale e biologico.

Una volta che lo S è stato assorbito dall'organismo, esso viene eliminato in gran parte sotto forma di metaboliti urinari (oltre il 90%) (47), in minima parte viene escreto tal quale nelle urine e in altri liquidi biologici (48) e nelle feci (49), mentre per quote minori del 3% viene eliminato immutato per via respiratoria (50). Lo S penetrato nell'organismo viene inizialmente metabolizzato dal citocromo P450, soprattutto CYP2E1 e CYP2B6 (51, 52), in stirene 7,8-epossido (SO) (53), un intermedio elettrofilo presente nelle due forme enantiomeriche *R* e *S* (54). Questo composto è considerato responsabile di alcuni effetti tossici attribuiti allo S poiché è in grado di legarsi covalentemente alle macromolecole biologiche (55) e, in particolare, la forma *R*-SO sarebbe risultata più tossica e più mutagena rispetto alla forma *S*-SO in alcuni studi sperimentali (56, 57, 58); tuttavia, per interpretare nell'uomo gli aspetti stereochimici del metabolismo in relazione alla tossicità, i dati disponibili appaiono insufficienti (59). Il successivo processo di detossificazione dello SO comporta la sua idrolisi e trasformazione nel glicole corrispondente ad opera dell'enzima epossido-idrolasi, seguita dalla conversione definitiva in acido mandelico (MA), acido fenilgliosilico (PGA), acido benzoico e acido ippurico; MA e PGA sono i maggiori me-

taboliti urinari e vengono comunemente utilizzati per il monitoraggio biologico dell'esposizione a S (60).

Una seconda via metabolica, confermata sperimentalmente su animali trattati con S, porta all'eliminazione urinaria di quantità non trascurabili di acidi mercapturici specifici (61). Questa via consiste nella coniugazione di SO con il glutatione (GSH) e porta alla formazione di acidi fenilidrossietilmercapturici, precisamente N-acetil-S-(1-fenil-2-idrossietil)-L-cisteina (M1) e N-acetil-S-(2-fenil-2-idrossietil)-L-cisteina (M2), che sono i due maggiori acidi mercapturici rilevabili nelle urine di ratti esposti a S (62) e strettamente correlabili con i livelli espositivi (63).

Data la natura chirale dello SO, sia M1 che M2 sono presenti in due forme diastereoisomere: complessivamente, quindi, vengono escreti quattro acidi mercapturici, la cui nomenclatura completa, che tiene conto della loro effettiva configurazione stereochimica, è (*S,R*)-M1, (*R,R*)-M1, (*R,R*)-M2 e (*S,R*)-M2 [nel presente lavoro, per ragioni di semplicità, questi composti verranno indicati rispettivamente come M1-R, M1-S, M2-R e M2-S, in riferimento alla loro derivazione dallo stirene 7,8-epossido in forma *R* oppure *S*] (64). Un primo tentativo di individuare anche nell'uomo l'escrezione degli acidi mercapturici specifici per lo S è risultato fallimentare, evidenziando livelli del tasso di biotrasformazione nettamente inferiori (<1%) rispetto a quanto verificato nell'animale da esperimento (10%) (65). Successivamente, attraverso l'impiego di diversi e più sensibili metodi analitici (HPLC-FLD (66), LC/MS/MS (67)), si sono rilevate concentrazioni urinarie potenzialmente utili per il monitoraggio biologico degli esposti (68) e per la determinazione dei livelli di *background* nei non-esposti (69). L'escrezione degli acidi mercapturici M1 e M2 si è mostrata significativamente correlata con quella di MA e PGA e con i livelli ambientali di S (70). Le concentrazioni di acidi mercapturici escreti corrispondono a una quota dello S assorbito che, da un individuo all'altro, risulta molto variabile (tasso di biotrasformazione [TBT], valutato su urine raccolte alla fine di un turno di lavoro, compreso tra 0,02 e 0,34%) (68). La notevole variabilità inter-individuale della escrezione degli acidi mercapturici è stata messa in correlazione con la presenza di polimorfismi enzimatici, quindi con differenze a livello genotipico (71). In particolare risulta determinante il polimorfismo dell'enzima glutatione-transferasi GSTM1 (stati allelici M1+ e M1null), individuato come maggiore responsabile delle differenze metaboliche individuali nell'escrezione urinaria di M1 e M2 (72, 73, 74). La popolazione generale, a questo riguardo, risulterebbe costituita da due gruppi ("poor converters" e "high converters") in relazione alla capacità individuale di metabolizzare lo S in acidi mercapturici (68), con possibili conseguenze rilevanti per la valutazione del rischio di danno alla salute, specie da agenti genotossici (75).

È tuttavia necessario osservare che la variabilità inter-individuale di escrezione dei metaboliti urinari dello S può essere accentuata da fattori esogeni, come l'ingestione di etanolo con la dieta (76, 77), la coesposizione ad acetone (78, 79, 80, 81) o l'esposizione cronica allo S stesso (82). Questi fattori "ambientali" potrebbero esercitare un ruolo confondente, falsando la correlazione tra il *pattern* di escre-

zione urinaria degli acidi mercapturici (fenotipo) e l'assetto metabolico-enzimatico (genotipo) in ciascun individuo.

In particolare, riferendoci all'assunzione di etanolo, è nota l'interferenza sul metabolismo dei farmaci (83) e dei solventi (84, 85, 86). Mentre la biotrasformazione di questi composti può essere inibita dall'assunzione acuta di etanolo, un abituale consumo di etanolo comporta un incremento del loro metabolismo. Questi fenomeni sono correlati rispettivamente con l'inibizione e l'induzione dei sistemi enzimatici coinvolti nei processi metabolici. Se consideriamo lo S, l'assunzione di una dose (singola o frazionata (87)) di etanolo durante l'esposizione a vapori del solvente si è rivelata capace di incrementare i livelli ematici di stirene glicole e di ritardare l'escrezione urinaria di MA e PGA, indicando nell'ossidazione dello stirene glicole a MA, la tappa inibita dall'assunzione acuta di etanolo (88, 89). Diversamente, l'assunzione cronica di etanolo comporta un effetto di induzione sul CYP2E1 (90) e incrementa l'escrezione urinaria di MA, PGA e acidi mercapturici specifici nel ratto esposto a S, elevando il rapporto M1-R/S nelle urine, per probabile maggiore produzione del diastereoisomero M1-R (77). Uno studio recente condotto sull'uomo non ha tuttavia mostrato un significativo aumento dell'escrezione urinaria di metaboliti dello S in abituali consumatori di alcool professionalmente esposti (73). Non sono stati resi disponibili dati inerenti all'effetto dell'assunzione acuta di etanolo sulla escrezione urinaria degli acidi mercapturici specifici dello S nell'uomo. D'altra parte, prescindendo dall'aspetto particolare del ruolo confondente dell'etanolo, nella letteratura scientifica si riscontra una carenza di informazioni riguardanti la cinetica di escrezione di M1 e M2 e la conseguente ottimizzazione del tempo di raccolta dei campioni urinari per la pratica del monitoraggio biologico su lavoratori esposti a S.

Gli scopi di questo lavoro sono essenzialmente i seguenti:

- studiare la cinetica di escrezione degli acidi mercapturici derivati dallo S in seguito ad una singola esposizione di 8 ore su un soggetto volontario e valutare l'influenza della contemporanea assunzione di etanolo;
- confermare l'andamento della cinetica di escrezione in un gruppo di 9 soggetti professionalmente esposti al solvente in modo da evidenziare eventuali variabilità individuali e valutare, contemporaneamente, le modificazioni indotte dalla esposizione ripetuta alle sostanze presenti nell'ambiente di lavoro durante un'intera settimana lavorativa.

Materiali e metodi

Reattivi e materiale utilizzato

Gli standard dei mercapturati dello S sono stati sintetizzati su ordinazione dalla Alchemy S.r.l., Bologna; il grado di purezza dichiarato (verificato nel nostro laboratorio mediante analisi con HPLC-UV) era superiore al 90%. L'acilasi di rene di maiale utilizzata (EC 3.5.1.14, 3400 U/mg) è stata fornita dalla SERVA (Heidelberg, Germania), l'o-ftaldialdeide (OPA) e il β -metcaptoetanolo (MCE) dalla Sigma (Munich, Germania).

Il reattivo derivatizzante era costituito da 50 mg di OPA dissolti in 300 μ L di metanolo contenente lo 0,2% di MCE, ai quali venivano aggiunti 2 mL di tampone borato (pH 10); una volta filtrata, la miscela veniva conservata in aliquote separate a -20 °C e riportata a temperatura ambiente appena prima dell'uso.

I solventi utilizzati per le analisi cromatografiche (acqua, metanolo, acetonitrile) erano di grado HPLC, mentre tutti gli altri reagenti erano di grado analitico.

Gli ultrafiltri utilizzati (Centrisart I, cut-off 10,000) erano della Sartorius (Gottingen, Germania).

I campionatori passivi TK-200 sono stati prodotti dalla Zambelli, Italia.

Strumenti

La cabina di esposizione utilizzata per valutare la cinetica di escrezione in un soggetto volontario è stata costruita seguendo i criteri di un sistema aperto: è caratterizzata da un volume di 1,346 m³ e permette di ottenere flussi controllati e misurati secondo le necessità.

Per la determinazione dei valori ambientali di S aerodisperso è stato impiegato un gascromatografo HP 5880A collegato ad uno spettrometro di massa HP 5970A.

Per la determinazione dei PHEMAs urinari è stato utilizzato un sistema HPLC della Waters (Milford, MA, USA) modello 600E equipaggiato con una precolonna Waters Resolve C18 (per la preparazione dei campioni) o con una colonna Hypersil (Shandon, UK) 250 x 4,6 (ID) mm, 3 μ m (per l'analisi dei campioni purificati), mantenuta ad una temperatura di 35 °C all'interno di un fornetto termostatico. Al sistema HPLC erano abbinati un detector UV Waters 484 (utilizzato per la preparazione dei campioni e regolato sulla lunghezza d'onda di 225 nm), o un fluorimetro Jasco (Tokyo, Giappone) 820-FP (regolato sulle lunghezze d'onda di 330 nm [λ_{exc}] e 440nm [λ_{em}]). Il sistema era collegato ad un autocampionatore Waters Wisp 715, ad un raccogliore di frazioni Gilson 201 (Villiers-le-Bel, Francia) per la raccolta delle frazioni purificate dei campioni di urina, e ad un computer per l'acquisizione e l'elaborazione dei cromatogrammi mediante il programma Millennium 2.15.

Metodi analitici

Il dosaggio dello S e degli altri solventi aerodispersi, così come l'analisi dei PHEMAs urinari sono stati effettuati con metodi già descritti in dettaglio (48, 66) che vengono qui riassunti brevemente.

Per la determinazione dei livelli ambientali dei solventi, il carbone attivo dei dosimetri veniva desorbito con 5 mL di carbonio disolfuro per un'ora a temperatura ambiente, quindi 0,5 μ L del liquido desorbito erano iniettati direttamente nel sistema gas-cromatografico. Il selettore di massa era regolato sugli ioni specifici per ciascun solvente ricercato.

Per il dosaggio dei PHEMAs, l'urina veniva sottoposta a preventiva purificazione cromatografica; le frazioni purificate venivano successivamente sottoposte a deacetilazione enzimatica con acilasi porcina e a deproteinizzazione mediante ultrafiltrazione. Infine, 90 μ L di campione venivano derivatizzati con 10 μ L di reattivo OPA/MCE e iniettati in HPLC. Nelle condizioni utilizzate per l'analisi cromatografica era possibile dosare singolarmente gli isomeri

M1-S e M1-R, mentre M2-S e M2-R eluivano come unico picco cromatografico e venivano pertanto dosati come somma dei due isomeri (indicata come M2).

La creatinina urinaria è stata determinata con il metodo di Jaffé mediante un analizzatore automatico centrifugo.

Raccolta dei campioni

Tutti i campioni di urina raccolti sono stati immediatamente congelati a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e scongelati appena prima di effettuare il dosaggio degli acidi mercapturici.

A) Studio pilota su un soggetto esposto in condizioni sperimentali note

Un soggetto volontario sano è stato esposto dentro la cabina descritta precedentemente, in condizioni controllate, a vapori di S (20 mg/m^3) per 8 ore con e senza la contemporanea assunzione di etanolo (1mL di vodka x Kg peso corporeo, in 50 mL di succo di arancia). In entrambi gli esperimenti, le urine sono state raccolte prima dell'esposizione e durante le 36 ore successive all'inizio dell'esposizione.

B) Monitoraggio di una coorte di lavoratori esposti

Successivamente sono stati considerati nove soggetti che lavoravano in una ditta per la produzione di barche con chiglia in vetroresina; di questi, sei si occupavano della resinatura (direttamente esposti a S), due della "gomma" (mediamente esposti) e un altro era addetto alla rifinitura (scarsamente esposto). Le informazioni circa lo stato di salute, l'abitudine al fumo e il consumo di alcol sono state raccolte attraverso un questionario che è stato compilato durante una visita medica eseguita nell'ambito della normale attività di sorveglianza sanitaria. Tutti i lavoratori erano apparentemente in salute e il consumo giornaliero di alcol, riferito dagli stessi soggetti, risultava inferiore ai 50g.

Per ciascun soggetto sono stati determinati i livelli ambientali giornalieri (in due emiturni di 4 ore ciascuno) di S e di altri eventuali solventi aerodispersi, utilizzando dosimetri personali passivi (Zambelli) posizionati in zona respiratoria.

Le urine invece sono state raccolte nell'arco di 8 giorni: il lunedì a inizio turno (i.t., ore 8:00) e a fine turno (f.t., ore 17:00), il martedì i.t., il giovedì f.t., il venerdì i.t. e f.t. e infine il lunedì successivo i.t..

Lo schema di campionamento ha permesso di ottenere diverse informazioni:

1. la correlazione biologico/ambientale e i TBT dello S in PHEMAS dopo una singola esposizione, dal confronto tra i livelli urinari il lunedì f.t. e i livelli ambientali di S dello stesso giorno,
2. i TBT alla fine della settimana lavorativa (evidenziando eventuali cambiamenti rispetto ai valori rilevati il lunedì), dal confronto tra i livelli urinari di venerdì f.t. e i livelli ambientali di S dello stesso giorno,
3. i possibili fenomeni di persistenza dei PHEMAS nelle urine (evidenziando un eventuale ritorno alle concentrazioni basali), dal confronto fra i livelli urinari presenti nei campioni prelevati sempre all'inizio dei turni (lunedì, martedì, venerdì e lunedì successivo),

4. la cinetica di escrezione dei PHEMAS (in particolare il valore del $t_{1/2}$ dopo una singola esposizione), dai livelli urinari presenti il lunedì f.t. e il martedì i.t.,
5. la cinetica di escrezione dei PHEMAS dopo ripetute esposizioni (evidenziando eventuali variazioni intercorse rispetto ai valori rilevati il lunedì) in base ai dati raccolti il giovedì f.t. e venerdì i.t..

Analisi statistica

Tutte le elaborazioni statistiche sono state effettuate mediante software StatView.

Per il calcolo dei tassi di biotrasformazione a fine turno (TBT_{ft}) è stata utilizzata la seguente formula:

$$\text{TBT}_{\text{ft}} (\%) = C_u \times v_m \times 100 / (C_a \times R \times V_m)$$

dove

C_u = concentrazione urinaria dei PHEMAS;

C_a = concentrazione ambientale di stirene;

R = indice di ritenzione dello stirene (0,64);

v_m = flusso urinario medio;

V_m = ventilazione polmonare media.

Il tasso di biotrasformazione complessivo (TBT_{tot}) è stato calcolato rapportando la quantità di PHEMAS complessivamente escreta (Q_u) e la quantità totale di stirene inalata nel corso delle 8 ore di esposizione (Q_a):

$$\text{TBT}_{\text{tot}} (\%) = Q_u \times 100 / Q_a$$

Il valore di Q_a è pari a $C_a \times R \times V_m \times T$ (dove T = tempo di esposizione = 480 minuti)

Il valore di Q_u è stato calcolato determinando l'area sottesa dalla curva delle concentrazioni urinarie dei PHEMAS dal termine della esposizione fino a tempo infinito ($\text{AUC}_{t \rightarrow \infty}$), mediante la regola trapezoidale logaritmica, nell'ipotesi che l'escrezione di questi metaboliti segua un andamento esponenziale.

Il tempo di dimezzamento ($t_{1/2}$) è stato calcolato mediante la formula $t_{1/2} = -\ln(2) / k$, dove k è la costante di velocità di eliminazione, valutata in base alla formula $k = \ln(c_1/c_2) / (t_2 - t_1)$ [dove c_1 e c_2 sono le concentrazioni urinarie di PHEMAS riscontrate rispettivamente al tempo t_1 = fine turno e t_2 = inizio turno successivo].

In tutti i calcoli si è tenuto conto dei differenti pesi molecolari dello stirene e dei PHEMAS.

Risultati

A) Studio pilota su un soggetto esposto in condizioni sperimentali note (Tab. I).

Lo studio è stato condotto in assenza (prima fase) e in presenza (seconda fase) della contemporanea assunzione di etanolo.

Prima fase - La cinetica di escrezione dei PHEMAS, intesi come somma di tutti gli isomeri, era caratterizzata da un tempo di emivita di 9,7 ore. Il picco massimo di escrezione si è ottenuto dopo quattro ore dalla fine dell'esposizione e l'ultimo campione di urina (raccolto 28 ore dopo la fine dell'esposizione) conteneva ancora quantità dosabili di PHEMAS (Fig. 1). I singoli isomeri, confrontati fra loro, hanno mostrato comportamenti differenti.

Tabella I. Parametri fisiologici riscontrati in un volontario esposto a stirene con e senza contemporanea ingestione di alcol

	Isomero M1-S		Isomero M1-R		Isomero M2		PHEMAs totali		Somma M1-R + M1-S	
	solo stirene	stirene + salcool	solo stirene	stirene + alcool	solo stirene	stirene + alcool	solo stirene	stirene + alcool	solo stirene	stirene + alcool
$t_{1/2}$	15,4	38,7	8,8	10,1	7,0	9,9	9,7	17,7	13,3	26,5
TBT _{ft}	0,040	0,030	0,007	0,010	0,067	0,031	0,114	0,066	0,047	0,040
TBT _{tot}	0,110	0,191	0,011	0,018	0,085	0,055	0,205	0,264	0,121	0,209

Dall'analisi dei risultati si è osservato che il regioisomero maggiormente rappresentato subito dopo la fine dell'esposizione era M2, presente in quantità circa doppia rispetto alla somma delle due isoforme di M1 (rapporto M1/M2 pari a circa 0,53). Successivamente si è osservato un cambiamento del rapporto M1/M2 (Fig. 2a) fino alla sua inversione (M1/M2 = 2,25 nel campione prelevato 23 ore dopo il termine dell'esposizione), quindi verso la fine dell'eliminazione dei metaboliti il regioisomero prevalente diventava M1. Questi cambiamenti erano dovuti alla diversa cinetica di eliminazione dei differenti isomeri: M1 ha mostrato una curva di eliminazione piuttosto "piatta", dovuta a una cinetica di escrezione decisamente più lenta rispetto a M2 ($t_{1/2}$ = 13,3 ore e 7,0 ore, rispettivamente).

Inoltre, poiché anche le due isoforme di M1 (M1-S ed M1-R) erano caratterizzate da cinetiche di eliminazione differenti ($t_{1/2}$ = 15,4 ore e 8,8 ore, rispettivamente), si assisteva ad una modificazione nel tempo anche del rapporto M1-R/M1-S (Fig. 2b), che passava da un valore di 0,15 (subito dopo la fine dell'esposizione) ad un valore di circa 0,25 (dopo 16 ore dal termine dell'esposizione). I valori del tasso di biotrasformazione calcolato sul campione prelevato immediatamente dopo l'esposizione (TBT_{ft}), equivalente, quindi, ad un campione prelevato alla fine di un turno di lavoro di 8 ore, sono risultati in linea con quelli rilevati in precedenti lavori (Tab. I) (68). Avendo seguito l'e-

liminazione dei mercapturati nel tempo, è stato possibile calcolare anche il tasso completo di biotrasformazione (TBT_{tot}), inteso come il rapporto percentuale fra la quantità di mercapturati eliminata complessivamente e la quantità di S inalata durante le 8 ore di esposizione. I valori riscontrati per i PHEMAs totali e per ciascun isomero sono riportati in Tab. I.

Seconda fase - La cinetica di escrezione dei PHEMAs è risultata complessivamente più lenta, come evidenziato dall'aumento del tempo di emivita ($t_{1/2}$ = 17,7 ore). L'aumento di questo parametro è stato considerevole per M1 ($t_{1/2}$ = 26,5), in particolare per l'isoforma M1-S ($t_{1/2}$ = 38,7), e meno marcato per M2 ($t_{1/2}$ = 9,9). Come conseguenza, il rapporto M1/M2 si è invertito già dopo poche ore dalla fine dell'esposizione. In particolare, si sono riscontrati valori molto elevati del rapporto M1/M2 a 22 (3,3) a 31 (4,1) e a 36 ore (3,8) dall'inizio dell'esposizione (Fig. 2a): valori così alti non si sono mai riscontrati dopo l'esposizione a solo S. Un cambiamento, sia pure meno accentuato, si è potuto rilevare anche nel rapporto M1-R/M1-S (Fig. 2b).

Il valore del TBT_{ft} si è complessivamente dimezzato (passando da 0,114%, in seguito ad esposizione a solo S, a 0,066% dopo contemporanea ingestione di alcool), ma l'effetto non è stato omogeneo per tutti gli isomeri: la diminuzione è stata più evidente per M2 (da 0,067% a 0,031%), è stata più modesta per M1-S, mentre per l'isomero M1-R il TBT_{ft} risultava addirittura aumentato (Tab. I).

I valori del TBT_{tot} mostravano variazioni non direttamente confrontabili con quelle subite dal TBT_{ft}: complessivamente si notava un modesto aumento dell'efficienza di bioconversione dello S a PHEMAs in presenza di contemporanea ingestione di etanolo (il TBT_{tot} passa da 0,205% a 0,264%). Anche in questo caso, però, l'effetto è risultato diverso per ciascuna isoforma, con un aumento considerevole del TBT_{tot} per M1-S (da 0,110% a 0,191%) e M1-R (da 0,011% a 0,018%) ed una diminuzione sensibile per M2 (da 0,085% a 0,055%).

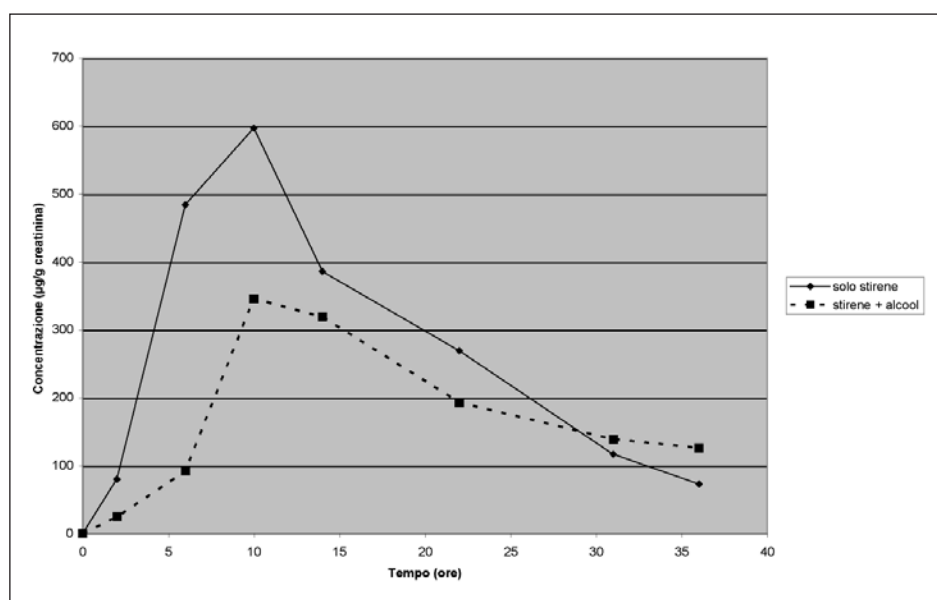


Figura 1. Andamento dell'escrezione urinaria dei mercapturati dello stirene in un volontario esposto a stirene con e senza contemporanea ingestione di alcool. Ulteriori dettagli dell'esperimento vengono forniti nel testo

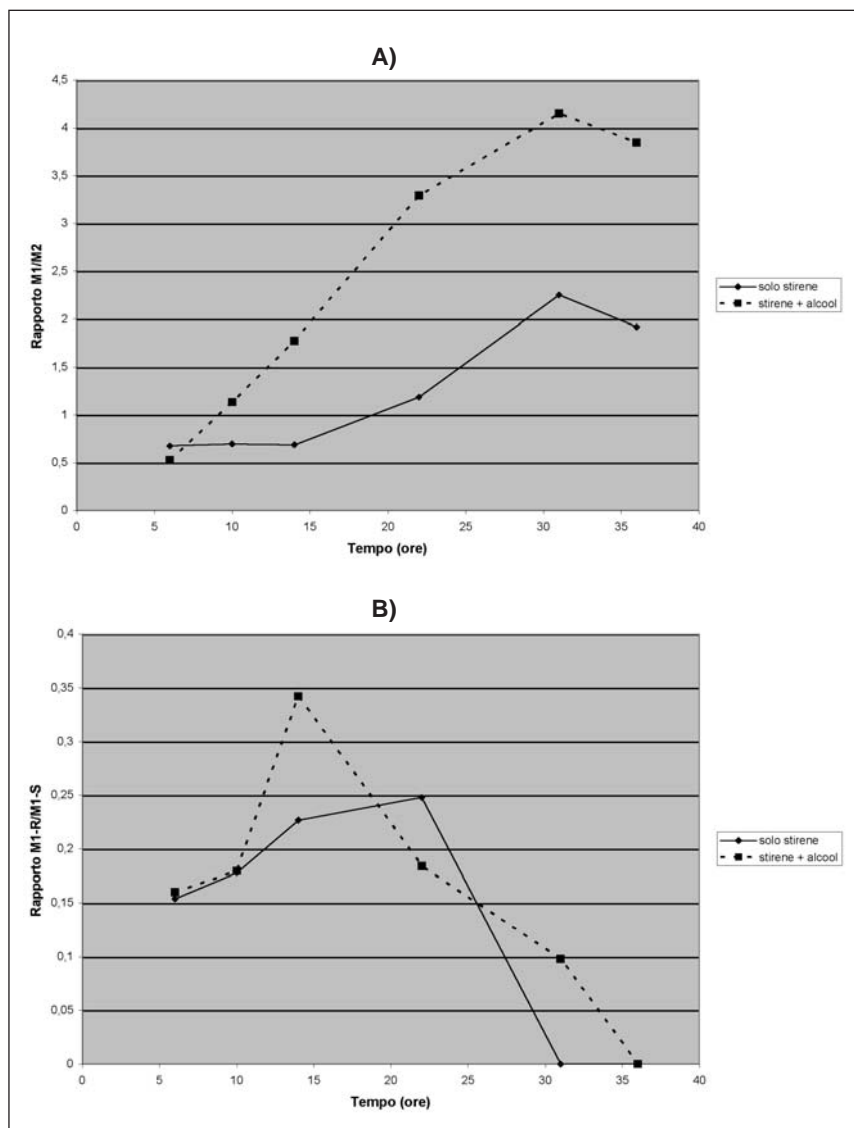


Figura 2. Cambiamento nel tempo dei rapporti fra le varie isoforme di mercapturati dello stirene, in un volontario esposto a stirene con e senza contemporanea ingestione di alcol. A) Rapporto fra i regioisomeri M1 e M2; B) Rapporto fra i diastereoisomeri di M1 (M1-S e M1-R)

B) Monitoraggio di una coorte di lavoratori esposti

I valori di concentrazione delle sostanze aerodisperse sono riportati in forma riassuntiva in Tab. II. Lo S è stato trovato in tutti i campionatori passivi e in tutti i giorni della settimana, in concentrazioni diverse a seconda della mansione di ciascun soggetto: il range di concentrazioni è risultato infatti molto ampio (da un minimo di 2,7 ad un massimo di circa 2500 mg/m³), tuttavia per ciascun lavoratore il grado di esposizione è risultato piuttosto costante nel corso della settimana. Oltre allo S, gli unici solventi trovati nei campionatori in concentrazioni dosabili erano toluene ed etilbenzene; i livelli ambientali di queste sostanze risultavano comunque molto inferiori rispetto a quelli dello S (Tab. II). I valori ambientali di S non risultavano correlati a quelli di toluene o di etilbenzene, mentre fra le concentrazioni di queste due ultime sostanze esisteva una stretta correlazione (r = 0,98).

I mercapturati dello S erano presenti in concentrazione dosabile in tutti i campioni (Tab. III). I valori biologici mo-

stravano correlazioni modeste con i livelli ambientali di S, i coefficienti di correlazione r essendo compresi fra 0,33 e 0,74 (quest'ultimo relativo all'isomero M2): questi dati sono comunque in linea con quanto riscontrato in precedenti studi. Le concentrazioni urinarie delle differenti forme isomere dei PHEMAS sono risultate fortemente correlate fra loro (valori di r compresi fra 0,87 e 0,97), anche questo un risultato atteso.

Il calcolo dei TBT_{ft} relativo alla biotrasformazione dello S in PHEMAS totali (0,005 - 0,28%), e nei singoli isomeri, sui 9 lavoratori all'inizio della settimana ha fornito dati in buon accordo con i risultati degli studi precedenti (Tab. IV) (68) e confermava l'estrema variabilità individuale di questo parametro fisiologico.

Una verifica importante è stata l'assenza di fenomeni di saturazione della capacità metabolica per livelli di esposizione elevati, un aspetto già segnalato in precedenza (68). La forma isomera presente in minore concentrazione risultava invariabilmente M1-R, il rapporto M1-S / M1-R essendo compreso fra 3,3 e 10,8. Le due forme regioisomere M1 (pari alla somma M1-S + M1-R) e M2 erano presenti mediamente in concentrazioni paragonabili, ma anche in questo caso era evidente una notevole variabilità interindividuale, infatti il rapporto M1/M2 era compreso fra 0,27 e 1,24 (in alcuni soggetti la forma prevalente risultava M1, in altri M2).

I valori di t_{1/2} (Tab. IV), relativi all'escrezione complessiva dei PHEMAS all'inizio della settimana, sono risultati compresi fra 4,6 e 13,5 ore, indicando una certa variabilità interindividuale anche per questo parametro. Come nel caso del soggetto esposto sperimentalmente a S, ciascun isomero ha mostrato una cinetica di escrezione differente: in particolare, la forma isomera più variabile è risultata M1-S (valori di t_{1/2} compresi fra 2,4 e 24,6).

I valori di TBT_{tot} (Tab. IV), sempre inferiori all'1%, sia per i singoli isomeri che per i PHEMAS totali, sono risultati variabili da un soggetto all'altro e fortemente correlati ai valori di TBT_{ft} (valori di r compresi fra 0,80, per M1-R, e 0,99 per M1-S).

Nessuna correlazione significativa è stata riscontrata fra i valori di t_{1/2} e di TBT_{ft} o di TBT_{tot} valutati all'inizio della settimana lavorativa.

Livelli misurabili di PHEMAS erano presenti anche nei campioni di i.t., sia il lunedì che negli altri giorni della settimana. In questi campioni si notava chiaramente un trend

Tabella II. Valori ambientali (mg/m³) dei solventi riscontrati nell'ambiente di lavoro

STIRENE	LUN	MAR	MER	GIO	VEN	media settimanale
media	869,7	860,3	1153,5	954,8	933,1	954,3
st.dev	728,0	947,5	941,2	887,7	715,9	809,4
mediana	982,8	417,2	1685,9	646,7	1000,0	981,6
min	3,1	8,4	10,5	6,8	2,7	6,7
max	1976,5	2391,9	2191,3	2505,8	1822,4	2034,7
TOLUENE	LUN	MAR	MER	GIO	VEN	media settimanale
media	19,3	12,4	8,6	8,3	4,0	10,5
st dev	28,6	16,8	6,0	8,4	1,9	11,9
mediana	9,4	4,4	4,8	4,2	3,7	4,6
min	2,9	1,6	3,5	2,3	1,5	3,3
max	91,8	52,1	19,9	27,6	8,0	39,4
ETILBENZENE	LUN	MAR	MER	GIO	VEN	media settimanale
media	6,8	4,6	1,5	2,2	0,0	3,0
st dev	15,6	9,6	2,9	4,4	0,0	6,4
mediana	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,0
min	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
max	46,6	27,1	6,7	11,5	0,0	18,4

all'aumento delle concentrazioni di tutti gli isomeri dei mercapturati durante la settimana lavorativa (Tab. III e Fig. 3), anche se le differenze di concentrazione media non risultavano statisticamente significative, a causa dell'estrema dispersione dei dati, come indicato dai valori elevati di deviazione standard (Tab. III) e dall'ampiezza delle barre di errore riportate nella Fig. 3. L'isomero che presentava mediamente un aumento di concentrazione maggiore il venerdì rispetto al lunedì era M1-S (+421%), che è risultata anche l'isoforma ad escrezione mediamente più lenta rispetto agli altri isomeri. Infine, i livelli di PHEMAs misurati il lunedì successivo a i.t. risultavano confrontabili a quelli dosati il lunedì precedente nelle stesse condizioni di raccolta.

I valori di $t_{1/2}$, TBT_{ft} e TBT_{tot} calcolati all'inizio e alla fine della settimana lavorativa sono riportati in Tab. IV.

In generale, per i PHEMAs totali si assisteva ad una diminuzione dei valori medi di $t_{1/2}$ (-3%), TBT_{ft} (-28%) e TBT_{tot} (-39%). Le variazioni medie erano quantitativamente modeste, ma in alcuni soggetti potevano essere anche rilevanti. Inoltre, i diversi isomeri dei PHEMAs mostravano comportamenti differenti: in particolare, al contrario di tutti gli altri isomeri, per M1-R si assisteva mediamente ad un aumento di tutti i parametri ($t_{1/2}$ = +4%; TBT_{ft} = +20%; TBT_{tot} = +41%). Comunque, anche per ciascuna isoforma era evidente una notevole variabilità individuale. Una conseguenza del diverso comportamento dei singoli isomeri era il cambiamento dei rapporti M1-R/M1-S (mediamente +3,8%, ma con variazioni individuali da -51,4% a +148,2%) e M1/M2 (mediamente +57,6%, con variazioni individuali da -40,1% a +318,0%) nei campioni raccolti a f.t. il venerdì, confrontati con i rispettivi campioni raccolti a f.t. il lunedì.

Questi stessi parametri sono risultati variare meno durante la settimana nei soggetti caratterizzati da un basso valore dei TBT e, analogamente, nei soggetti con cinetica di escrezione veloce i valori del $t_{1/2}$ rimanevano praticamente immutati durante la settimana. Tale comportamento era particolarmente significativo per l'isomero M1-S (Fig. 4).

Sono state riscontrate correlazioni significative ($p < 0,05$) fra variazione soggettiva della capacità metabolica (TBT_{ft}) per l'isomero M1-S ed il grado di esposizione individuale a S (concentrazione media settimanale). Correlazioni analoghe sono state riscontrate anche per l'isomero M1-R, mentre per l'isoforma M2 la correlazione non raggiungeva la significatività statistica. Al contrario, le variazioni di cinetica ($t_{1/2}$) sono risultate correlate in maniera significativa al grado di esposizione a S solamente per l'isomero M2 e non per le altre isoforme di PHEMAs.

I cambiamenti di cinetica per tutti gli isomeri (ma non i cambiamenti dei TBT dello S in mercapturati) sono risultati correlati in maniera significativa con le esposizioni settimanali medie a toluene ed etilbenzene.

Discussione

La dimostrazione che il sistema del glutatione è coinvolto nei processi di detossificazione dello S anche nell'uomo risale al 1996, con il rilevamento di concentrazioni misurabili di PHEMAs nelle urine di lavoratori esposti a S (66). Contemporaneamente venivano definite alcune caratteristiche fondamentali dell'escrezione di questi metaboliti nell'uomo (66 e 68); in sintesi: (i) la presenza di più forme isomere (indicate brevemente come M1-R, M1-S, M2-R e M2-S), dovute alla coniugazione del glutatione con due siti diversi di ciascuno dei due enantiomeri (R ed S) dello S ossido; (ii) la bassa percentuale di bioconversione (<1%) dello S in PHEMAs, calcolata su campioni prelevati alla fine di un turno lavorativo; (iii) la presenza di fenomeni di stereoselettività nei processi di biotrasformazione dello S negli acidi mercapturici, evidenziata dalle concentrazioni molto diverse di M1-R e M1-S, quest'ultima essendo la forma nettamente predominante; (iv) la notevole variabilità interindividuale nella efficienza di formazione di questi metaboliti e, di conseguenza, le modeste correlazioni riscontrabili fra i livelli urinari dei PHEMAs e il grado di esposizione a S.

Nonostante quest'ultima limitazione, è stato ipotizzato un uso dei PHEMAs come *biomarkers*, anche in considerazione della possibile azione tossica specifica sia dei PHEMAs stessi, sia degli addotti glutationici dello stirene 7,8-epossido da cui derivano (91,92).

Successivamente (72-74), la variabilità interindividuale nel TBT dello S in acidi mercapturici è stata messa in

Tabella III. Concentrazioni urinarie di PHEMAs ($\mu\text{g/g}$ creatinina) rilevate nei campioni prelevati da 9 lavoratori esposti a stirene durante la settimana

a) Isomero M1-S							
	LUN-iniz	LUN-fine	MAR-iniz	GIOV-fine	VEN-iniz	VEN-fine	LUN 2 - iniz
<i>media</i>	115,1	580,2	430,0	1349,0	599,2	695,1	120,9
<i>st.dev</i>	116,5	897,0	797,8	2661,4	1030,5	910,7	115,4
<i>mediana</i>	99,0	298,0	133,0	581,0	368,0	613,0	91,0
<i>min</i>	5,0	51,0	5,0	81,0	38,0	30,0	5,0
<i>max</i>	383,0	2884,0	2516,0	8377,0	3290,0	2993,0	374,0
b) Isomero M1-R							
	LUN-iniz	LUN-fine	MAR-iniz	GIOV-fine	VEN-iniz	VEN-fine	LUN 2 - iniz
<i>media</i>	18,9	77,0	28,2	95,4	34,2	84,0	21,3
<i>st.dev</i>	18,5	80,6	25,4	70,3	21,8	61,4	11,0
<i>mediana</i>	13,0	71,0	23,0	85,0	36,0	80,0	27,0
<i>min</i>	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	7,3	5,0
<i>max</i>	51,0	268,0	65,0	212,0	71,0	173,0	35,0
c) M1 tot (somma degli isomeri M1-S ed M1-R)							
	LUN-iniz	LUN-fine	MAR-iniz	GIOV-fine	VEN-iniz	VEN-fine	LUN 2 - iniz
<i>media</i>	134,0	657,2	458,2	1444,4	633,4	779,1	142,2
<i>st.dev</i>	122,0	975,6	814,6	2701,3	1046,7	957,4	120,8
<i>mediana</i>	121,0	377,0	169,0	706,0	413,0	707,0	120,0
<i>min</i>	10,0	56,0	10,0	92,0	43,0	37,3	10,0
<i>max</i>	401,0	3152,0	2579,0	8557,0	3361,0	3166,0	401,0
d) Isomero M2							
	LUN-iniz	LUN-fine	MAR-iniz	GIOV-fine	VEN-iniz	VEN-fine	LUN 2 - iniz
<i>media</i>	225,0	1126,3	435,0	1286,2	532,3	1032,3	206,4
<i>st.dev</i>	178,0	968,8	340,1	1106,4	419,8	760,0	176,6
<i>mediana</i>	169,0	1007,0	647,0	1250,0	717,0	1238,0	259,0
<i>min</i>	5,0	45,0	23,0	50,0	31,0	50,0	5,0
<i>max</i>	499,0	2974,0	834,0	3017,0	1048,0	1919,0	455,0
e) Totale PHEMAs (somma di tutti gli isomeri)							
	LUN-iniz	LUN-fine	MAR-iniz	GIOV-fine	VEN-iniz	VEN-fine	LUN 2 - iniz
<i>media</i>	359,0	1783,6	893,2	2730,7	1165,8	1811,5	348,7
<i>st.dev</i>	239,9	1885,3	1054,3	3567,5	1309,3	1586,1	267,3
<i>mediana</i>	331,0	1384,0	826,0	1956,0	1130,0	2095,0	467,0
<i>min</i>	77,0	101,0	67,0	142,0	74,0	87,3	15,0
<i>max</i>	729,0	6126,0	3413,0	11574,0	4243,0	5085,0	674,0

relazione con la presenza di polimorfismi a livello della famiglia di enzimi glutatione-S-transferasi (GST): in particolare il polimorfismo della GSTM1 (stati allelici M1+ e M1null) è stato individuato come maggiore responsabile delle differenze metaboliche individuali nell'escrezione urinaria di M1 e M2. Oltre alla presenza di questi polimorfismi, e quindi al genotipo della GST, anche variazioni nei livelli di espressione e di attività di altri enzimi implicati nel metabolismo dello S possono modificare l'efficienza di escrezione dei PHEMAs: è stato dimostrato che combinando l'effetto di genotipo e fenotipo è possibile spiegare circa il 77% della variazione nell'escrezione dei mercapturati dello S (93).

I lavori sopra ricordati hanno contribuito a chiarire alcuni aspetti importanti della via metabolica che porta alla formazione dei PHEMAs in vista di un loro possibile utilizzo come *biomarker* nei soggetti esposti a S. Rimangono tuttavia da elucidare altri aspetti, a nostro avviso non secondari; in particolare, non è ancora stata caratterizzata la cinetica di escrezione dei PHEMAs nell'uomo in seguito ad esposizione a S e l'eventuale influenza sulla formazione di questi metaboliti da parte di fattori esogeni. La caratterizzazione della cinetica di escrezione di un metabolita rappresenta un elemento di conoscenza fondamentale per valutare quale sia il momento più adatto per la raccolta dei campioni, in modo da ottenere la

Tabella IV. Valori dei parametri cinetici e di efficienza metabolica rilevati all'inizio e alla fine della settimana lavorativa in 9 soggetti esposti a stirene

		INIZIO SETTIMANA	FINE SETTIMANA	VARIAZIONE PERCENTUALE
a) Isomero M1-S				
$t_{1/2}$	<i>media</i>	14,1	9,8	-30
	<i>min</i>	2,4	6,8	-70
	<i>max</i>	24,6	13,7	186
TBT _{ff}	<i>media</i>	0,0176	0,0155	-12
	<i>min</i>	0,0010	0,0009	-28
	<i>max</i>	0,0891	0,0765	63
TBT _{tot}	<i>media</i>	0,0672	0,0284	-58
	<i>min</i>	0,0004	0,0011	-67
	<i>max</i>	0,3851	0,1629	157
b) Isomero M1-R				
$t_{1/2}$	<i>media</i>	8,2	8,5	4
	<i>min</i>	4,2	3,5	-66
	<i>max</i>	23,7	23,7	142
TBT _{ff}	<i>media</i>	0,0038	0,0046	20
	<i>min</i>	0,0001	0,0001	-34
	<i>max</i>	0,0268	0,0289	113
TBT _{tot}	<i>media</i>	0,0051	0,0071	41
	<i>min</i>	0,0001	0,0002	-28
	<i>max</i>	0,0218	0,0433	105
c) M1 tot (somma degli isomeri M1-S ed M1-R)				
$t_{1/2}$	<i>media</i>	12,4	9,5	-23
	<i>min</i>	2,8	7,3	-64
	<i>max</i>	20,4	12,9	172
TBT _{ff}	<i>media</i>	0,0215	0,0201	-7
	<i>min</i>	0,0012	0,0010	-27
	<i>max</i>	0,1159	0,1053	66
TBT _{tot}	<i>media</i>	0,0722	0,0355	-51
	<i>min</i>	0,0006	0,0013	-66
	<i>max</i>	0,4069	0,1812	133
d) Isomero M2				
$t_{1/2}$	<i>media</i>	7,8	8,7	12
	<i>min</i>	5,1	5,8	-17
	<i>max</i>	13,3	12,3	46
TBT _{ff}	<i>media</i>	0,0276	0,0153	-45
	<i>min</i>	0,0032	0,0029	-78
	<i>max</i>	0,1659	0,0709	56
TBT _{tot}	<i>media</i>	0,0314	0,0272	-13
	<i>min</i>	0,0038	0,0038	-71
	<i>max</i>	0,1559	0,1559	100
e) Totale PHEMAs (somma di tutti gli isomeri)				
$t_{1/2}$	<i>media</i>	9,1	8,9	-3
	<i>min</i>	4,6	6,9	-35
	<i>max</i>	13,5	11,0	62
TBT _{ff}	<i>media</i>	0,0491	0,0353	-28
	<i>min</i>	0,0045	0,0039	-50
	<i>max</i>	0,2818	0,1414	37
TBT _{tot}	<i>media</i>	0,1036	0,0627	-39
	<i>min</i>	0,0044	0,0051	-60
	<i>max</i>	0,5629	0,2604	21

massima concentrazione dell'analita e contemporaneamente la miglior correlazione tra i suoi livelli urinari ed il grado di esposizione allo xenobiotico da cui deriva. D'altra parte, lo studio dei fattori esogeni (dieta, abitudini voluttuarie, contemporanea esposizione ad altre sostanze tossiche) che possono influenzare l'escrezione dei biomarkers risulta estremamente importante per due ordini di motivi: da un lato è indispensabile per una corretta interpretazione dei dati biologici; d'altra parte, i fattori "ambientali" possono esercitare un ruolo confondente, falsando la correlazione tra il pattern di escrezione urinaria dei metaboliti (fenotipo) e l'assetto metabolico-enzimatico (genotipo) in ciascun individuo. La conoscenza dei fattori esogeni risulta quindi indispensabile quando si intendano condurre indagini di biomonitoraggio o studi di correlazione genotipo-fenotipo.

In letteratura abbondano gli esempi dell'influenza dei fattori esogeni sul metabolismo degli xenobiotici (83-86, 94) e, di conseguenza, sull'escrezione dei loro prodotti di biotrasformazione. In particolare, per quanto riguarda lo S, l'attenzione dei ricercatori si è soffermata sull'effetto dell'ingestione (acuta e cronica) di alcol etilico (76, 87-89), della contemporanea esposizione ad acetone (78-81) e dell'esposizione cronica allo S stesso (82); questi studi sono stati condotti sull'eliminazione urinaria dei metaboliti maggiori dello S (MA, PGA) e sui loro precursori (S glicole). L'unica ricerca che illustra l'effetto dell'esposizione subcronica a S e ad alcol sull'escrezione di mercapturati specifici è stata condotta sui ratti (77) ed i risultati non sono immediatamente trasferibili all'uomo, considerate le note differenze inter-specie nell'escrezione dei PHEMAs.

La presente ricerca è stata condotta allo scopo di raccogliere informazioni preliminari sulla cinetica di escrezione dei PHEMAs e sull'eventuale influenza di alcuni fattori esogeni (ingestione acuta di alcool, esposizione cronica a S e ad altri solventi presenti nei luoghi di lavoro) sulle modalità di eliminazione di questi metaboliti così da permettere, in futuro, di impostare correttamente studi più approfonditi su questo argomento.

In primo luogo, i risultati ottenuti da questo studio confermano gli aspetti rilevanti già osservati nelle ricerche precedenti. In particolare, si conferma che il sistema del glutatione rappresenta una via di detossificazione minore nei confronti dello S, infatti i valori dei TBT (sia TBT_{ff} sia TBT_{tot}) risultano sempre inferiori all'1%. Inoltre, anche nella coorte di lavoratori selezionati per questa ricerca si assiste ad una notevole variabilità di questi valori valutati all'inizio della settimana, quando presumibilmente l'influenza di alcuni possibili fattori esogeni (esposizione allo stesso S o ad altri solventi) era ridotta al minimo. Infatti, all'interno del gruppo selezionato è stato possibile identificare una maggioranza di soggetti (77%) con bassa efficienza di bioconversione (*poor converters*) ed una minoranza di individui caratterizzati da una capacità relativamente più alta (*high converters*): questa caratterizzazione poteva essere effettuata indifferentemente sulla base dei TBT_{ff} o dei TBT_{tot}, nel senso che soggetti classificabili come *poor converters* sulla base dei TBT_{ff} verrebbero classificati come tali anche sulla base dei

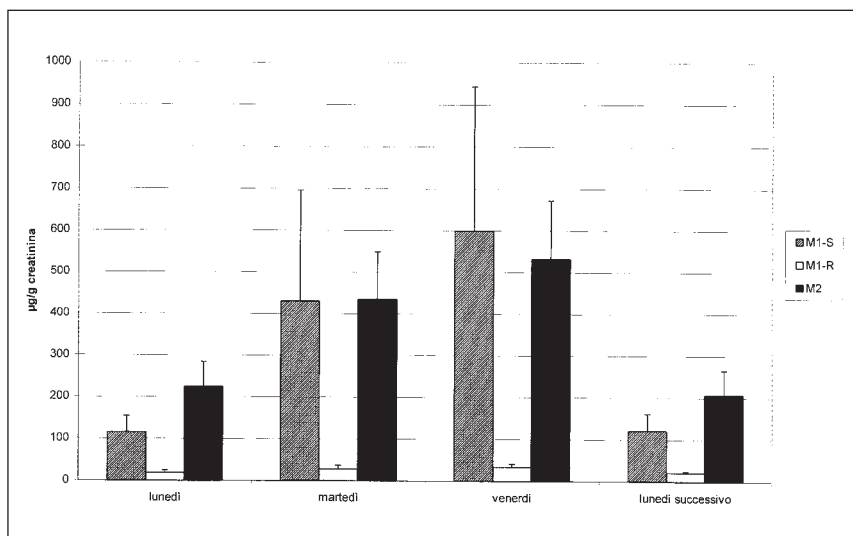


Figura 3. Livelli urinari di mercapturati dello stirene in campioni prelevati prima dei turni di lunedì, martedì, venerdì e del lunedì successivo. Le barre indicano l'errore standard

TBT_{tot} e viceversa (il coefficiente di correlazione fra TBT_{ft} e TBT_{tot}, misurati il lunedì, essendo 0,99). Da un punto di vista pratico, questo significa che il dosaggio di mercapturati su campioni estemporanei di urina (purché prelevati nel momento adatto) permette di classificare correttamente il soggetto per quanto riguarda la sua capacità di metabolizzare lo S in PHEMAs, senza dover ricorrere alla raccolta di urine per periodi prolungati di tempo (tipicamente 24 ore). Pur non avendo effettuato una genotipizzazione dei soggetti esaminati, sulla base delle esperienze precedenti (67, 72-74, 93) è possibile dedurre che i soggetti *poor converters* fossero caratterizzati da un genotipo GSTM1 nullo, e che gli *high converters* appartenessero al gruppo GSTM1+.

Lo studio pilota effettuato su un soggetto in condizioni sperimentali controllate ha permesso innanzi tutto di verificare che la curva di escrezione dei mercapturati dello S segue un andamento di tipo esponenziale, sia per i PHEMAs totali che per i singoli isomeri. Il valore del t_{1/2} relativo ai PHEMAs totali calcolato in questo soggetto (9,7 ore) è stato confermato dallo studio successivo condotto sul gruppo di lavoratori esposti a S, nei quali sono stati trovati valori pari a 9,1 ± 2,8 ore (media ± deviazione standard), con un minimo di 4,6 ed un massimo di 13,5 ore. Il valore medio di t_{1/2} risulta piuttosto elevato se paragonato a quello di altri metaboliti dello S (ad es. per MA è stato riportato un valore di 1,9 ore (95)), ma è paragonabile a quanto riscontrato per altri acidi mercapturici: ad es. per l'acido S-fenilmercapturico, metabolita del benzene, è stato calcolato un valore di t_{1/2} pari a 9,1 ± 3,8 ore (96).

In tutti i soggetti esaminati, i singoli isomeri dei PHEMAs hanno mostrato cinetiche di escrezione differenti, la forma ad eliminazione più lenta (e contemporaneamente più soggetta a variazioni individuali) essendo risultata M1-S (t_{1/2} medio pari a 14,1 ore, con un minimo di 2,4 ed un massimo di 24,6 ore).

Questi risultati danno origine a due conseguenze importanti sul piano pratico:

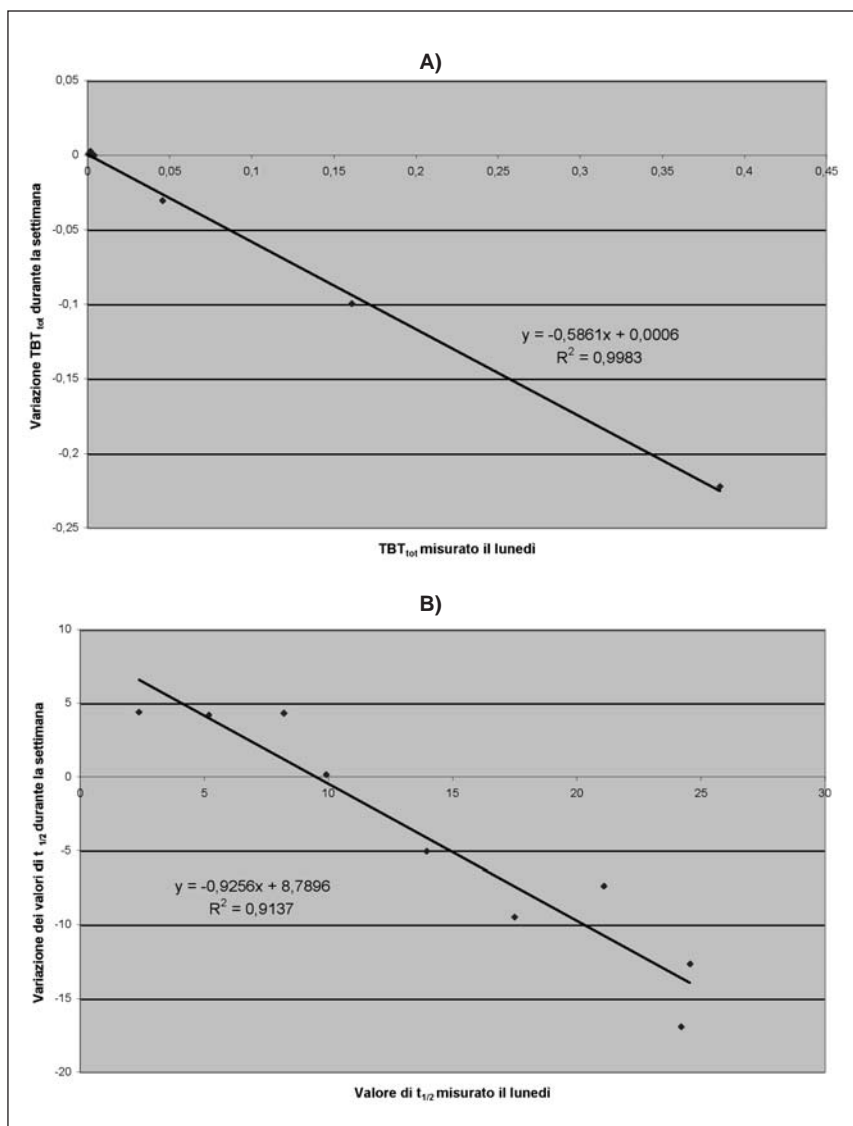


Figura 4. Correlazione fra i parametri fisiologici misurati in ciascun individuo all'inizio della settimana e la loro variazione al termine della settimana lavorativa. A) Capacità metabolica (TBT_{1st}); B) Cinetica di escrezione (valore di t_{1/2})

- il momento di campionamento è critico per valutare e confrontare correttamente i rapporti fra i singoli isomeri dei PHEMAs (il rapporto M1-R/M1-S, che fornisce una indicazione sulla stereoselettività delle reazioni che portano alla formazione dei mercapturati, ed il rapporto M1/M2, che ne valuta la regioselettività): come è facilmente deducibile, e verificato sperimentalmente dallo studio pilota sul volontario esposto a S (Fig. 2), a causa della diversa cinetica di eliminazione dei vari isomeri i rapporti cambiano anche radicalmente a seconda del momento in cui viene raccolto il campione, quindi, sulla base delle misurazioni effettuate su campioni prelevati in tempi diversi si potrebbero ricavare conclusioni errate o non confrontabili circa le caratteristiche di stereo- e regioselettività degli enzimi. In base alla curva di escrezione, il campione in cui i PHEMAs sono presenti in maggior concentrazione sarebbe quello raccolto dopo circa 4 ore dal termine dell'esposizione, ma per motivi pratici è ugualmente utile dosare i campioni prelevati alla fine del turno lavorativo, quindi immediatamente dopo la cessazione dell'esposizione;
- poiché alcuni soggetti presentano valori di $t_{1/2}$ piuttosto elevati, la completa eliminazione di questi metaboliti richiede un periodo di tempo maggiore delle 24 ore che intercorrono in genere fra una esposizione e la successiva; di conseguenza, nel caso di esposizioni ripetute, i livelli urinari di PHEMAs tendono ad aumentare nel corso della settimana: questo è stato verificato dosando i metaboliti nei campioni basali raccolti all'inizio del turno in diversi giorni della settimana (Fig. 3). A questo proposito è opportuno segnalare che anche nei campioni prelevati a i.t. il lunedì si osservano livelli misurabili di PHEMAs (pur se in concentrazioni molto ridotte rispetto a quelle riscontrate alla fine della settimana), quindi oltre 60 ore dopo l'ultima esposizione l'eliminazione di questi metaboliti non può considerarsi completamente conclusa in tutti i soggetti esposti. Tuttavia, l'effetto confondente della eliminazione residua di metaboliti dovuta alle esposizioni precedenti che si va a sommare al picco di eliminazione relativo all'ultima esposizione risulta senz'altro minore all'inizio della settimana rispetto ai campioni ottenuti in altri giorni: pertanto, da un punto di vista pratico questi risultati enfatizzano la necessità di effettuare le misure dei metaboliti (sia per il monitoraggio biologico, sia per studi sulle correlazioni genotipo-fenotipo o di altro genere) sui campioni prelevati il lunedì, in modo da minimizzare le interferenze dovute alle esposizioni precedenti. La possibilità di utilizzare i PHEMAs come *biomarker* di esposizione a medio termine per la valutazione della concentrazione media settimanale (sfruttando i fenomeni di lenta eliminazione urinaria) non è stata presa in considerazione nel presente studio, poiché per la verifica di questa ipotesi è necessario esaminare un elevato numero di soggetti; tuttavia, considerando le differenze di cinetica fra un individuo e l'altro, tale utilizzo appare problematico.

Dai risultati della presente ricerca, emerge un ruolo complesso dei fattori esogeni nel modificare l'eliminazione urinaria dei PHEMAs. L'effetto dell'ingestione acuta di alcool, studiato in condizioni sperimentali note e controllate, presenta differenti sfaccettature, a seconda del parametro e degli isomeri considerati. Un evidente effetto complessivo è stato l'allungamento dei tempi di escrezione dei PHEMAs totali, con una diminuzione del TBT misurato sui campioni di f.t., ma con un modesto aumento della percentuale di conversione totale dello S in acidi mercapturici: nei campioni prelevati al termine dell'esposizione le concentrazioni di PHEMAs risultano dimezzate dopo contemporanea ingestione di alcool, ma i livelli urinari nei campioni successivi tendono a mantenersi più elevati per un periodo di tempo maggiore. La temporanea diminuzione nella produzione di metaboliti in seguito ad ingestione acuta di alcol è un fenomeno già evidenziato per MA e PGA. In studi effettuati su soggetti volontari esposti a una dose di 50 ppm di S per 6 ore, dopo aver ingerito alcol a metà esposizione la concentrazione di S nel sangue aumentava, le concentrazioni di MA e PGA diminuivano, mentre la concentrazione dello stirene glicole aumentava drasticamente (88 e 89). L'escrezione urinaria dei metaboliti finali dello S, MA e PGA, era temporaneamente ridotta dalla presenza di etanolo in maniera dose-dipendente (88). Quindi, nel caso dello S, l'alcol etilico inibiva sia l'ossidazione dello S a livello microsomiale, sia la successiva trasformazione del metabolita intermedio stirene glicole. Il rallentamento di quest'ultima reazione era attribuibile alla presenza di etanolo che, riducendo la disponibilità di NAD⁺, alterava l'equilibrio NAD⁺/NADH (89). Nel caso dei PHEMAs, la temporanea diminuzione dei livelli urinari dopo ingestione di etanolo potrebbe essere dovuta alla minore formazione di stirene ossido in seguito ad inibizione della reazione di ossidazione microsomiale; inoltre è possibile anche una parziale diminuzione della stessa GST (97). Meno immediata è la spiegazione sul successivo riscontro di concentrazioni urinarie relativamente elevate di mercapturati. È stato dimostrato che la contemporanea somministrazione di alcol non aumenta significativamente la quota di S assorbita per inalazione e quindi la quantità totale di metaboliti escreti (87). Una possibile spiegazione della presenza di concentrazioni elevate di PHEMAs a distanza di alcune ore dal termine dell'esposizione potrebbe risiedere nel fatto che, permanendo il blocco parziale della via dell'epossido idrolasi causata dall'alcol, che produce un accumulo nel tempo di stirene ossido, si assista ad un maggiore coinvolgimento (e quindi una maggiore efficienza complessiva) del sistema del glutatione nella detossificazione dello stesso stirene ossido.

Il quadro risulta però più complesso e meno facilmente comprensibile se si esaminano i risultati dei singoli isomeri: gli effetti risultano infatti quantitativamente diversi per ciascun isomero. In particolare, in seguito ad ingestione di alcol si nota un aumento del 43% del TBT_{ft} per M1-R, diversamente dagli altri isomeri per i quali si ha una diminuzione di questo parametro. L'escrezione di M1-R viene associata prevalentemente alla coniugazione

del glutatione con l'enantiomero *R* dello stirene ossido: eventuali modifiche, indotte dall'etanolo, della quantità o della velocità di formazione di questo isomero da parte del CYP450 si rifletterebbero sulla efficienza di escrezione di M1-*R*. Inoltre, è noto che anche la via dell'epossido idrolasi dà origine a specie chirali a partire dallo stirene ossido: una inibizione selettiva della bioconversione di *R*-stirene ossido tramite la via dell'epossido idrolasi darebbe origine ad un maggior accumulo di questo enantiomero rispetto alla forma *S*. Infine, è anche possibile che l'effetto sia dovuto ad una azione diretta dell'etanolo nei confronti dell'enzima GST (97). Non avendo potuto dosare l'isomero M2-*R* (che deriva anch'esso prevalentemente da *R*-stirene ossido), non è possibile dedurre se l'etanolo dia origine complessivamente ad un picco più elevato di escrezione dei mercapturati che derivano dall'*R*-stirene ossido: poiché l'enantiomero *R* viene considerato più tossico rispetto alla forma *S*, questo risultato potrebbe avere una certa importanza dal punto di vista tossicologico.

Fra gli effetti indotti dall'ingestione acuta di alcol, si nota anche la diminuzione del TBT_{tot} per M2, mentre l'efficienza di bioconversione degli altri isomeri risulta quasi raddoppiata. Questo risultato può essere spiegato presupponendo un effetto selettivo dell'etanolo nei confronti dei diversi isoenzimi della GST, tale per cui la regioselettività complessiva ne risulti alterata. In ogni caso, è opportuno notare come la contemporanea ingestione di alcol possa alterare in maniera anche molto marcata il rapporto fra i vari isomeri dei PHEMAs: le conseguenze per gli studi di correlazione genotipo-fenotipo sono già state sottolineate in precedenza.

La presente ricerca non prevedeva la valutazione degli effetti dell'ingestione cronica di etanolo sulla escrezione di acidi mercapturici. A tale proposito, va ricordato che negli studi effettuati su ratti trattati con *S* ed etanolo subcronico si è evidenziato un incremento nell'escrezione di MA, PGA e PHEMAs. Inoltre si è osservato che somministrazioni ripetute di alcol portavano ad un aumento nel rapporto M1-*R*/M1-*S* nelle urine: questo era dovuto apparentemente all'aumentata produzione del diastereoisomero M1-*R* (77). Ricerche effettuate su lavoratori esposti a *S* (73) non hanno mostrato variazioni significative dell'escrezione urinaria di metaboliti in soggetti definiti abituali consumatori di alcol (≥ 5 bicchieri/settimana), tuttavia gli stessi Autori hanno osservato una tendenza all'aumento delle concentrazioni di tutti i *biomarker*, compresi gli acidi mercapturici. Considerando i risultati della presente ricerca, inerente all'esposizione acuta, e tenendo presente il risultato delle ricerche sull'esposizione cronica, sembra giustificato concludere che anche per quanto riguarda il dosaggio dei PHEMAs il ruolo dell'ingestione di alcol come fattore confondente non deve essere sottovalutato, sia durante l'esecuzione di attività di biomonitoraggio, sia in sede di programmazione di ricerche sulla correlazione genotipo-fenotipo.

Mentre lo studio degli effetti dell'etanolo è stato effettuato in esperimenti condotti in condizioni controllate, la valutazione degli effetti di altri possibili fattori esogeni di variabilità è stata fatta in maniera indiretta, pertanto

i risultati sono da considerare non conclusivi. In effetti, il quadro che emerge dal confronto dei valori assunti dai vari parametri di cinetica e di efficienza metabolica all'inizio e alla fine della settimana lavorativa risulta piuttosto complesso e decifrabile solo in parte, probabilmente perché oltre ai fattori presi in considerazione (esposizione cronica a *S* e coesposizione ad altri solventi), anche altre fonti (dietetiche, voluttuarie ed ambientali), non prese in considerazione in questo studio, hanno un'importanza non trascurabile nell'influenzare i risultati.

Il dato macroscopico più evidente è la estrema variabilità individuale delle modificazioni avvenute nel corso della settimana lavorativa. Se mediamente, infatti, i cambiamenti sono relativamente modesti (tanto per i valori di $t_{1/2}$ che per i valori di TBT_{ft} e di TBT_{tot}), in alcuni soggetti si osservano variazioni rilevanti. Questo significa che, oltre ad una variabilità interindividuale accentuata, l'escrezione di acidi mercapturici dopo esposizione a *S* presenta una notevole variabilità intraindividuale che vi si sovrappone. Da un punto di vista pratico, questo risultato enfatizza ancora una volta la necessità di effettuare l'attività di biomonitoraggio e gli studi di correlazione genotipo-fenotipo in condizioni il più possibile standardizzate, in modo da minimizzare gli effetti confondenti dovuti alla variabilità intraindividuale.

Fra i fattori esogeni presi in considerazione, l'esposizione cronica a *S* sembra essere responsabile, almeno in parte, dei cambiamenti di capacità metabolica, per il regioisomero M1 (nelle due forme M1-*R* e M1-*S*), e dei cambiamenti di cinetica, per l'isomero M2, avvenuti nel corso della settimana, la variazione di questi parametri essendo correlata significativamente al grado di esposizione (concentrazione media settimanale). Tali cambiamenti potrebbero trovare spiegazione nella più rapida trasformazione di *S* a stirene glicole riscontrata in lavoratori esposti cronicamente al solvente rispetto a soggetti non precedentemente esposti (82): l'esposizione cronica a *S*, facilitando i processi biotrasformativi che portano ai metaboliti maggiori MA e PGA, accentuerebbe l'efficacia della eliminazione dei PHEMAs. Il fatto che le modificazioni indotte dall'esposizione a *S* non siano omogenee per tutti gli isomeri dei PHEMAs non sorprende se si tiene in considerazione l'analogo risultato ottenuto con l'esposizione ad etanolo in condizioni controllate. Tuttavia la spiegazione meccanicistica di questi effetti appare per ora difficile.

Sorprendente appare poi l'apparente correlazione fra il grado di esposizione settimanale a toluene ed etilbenzene ed i cambiamenti di cinetica avvenuti per tutti gli isomeri dei PHEMAs. Effetti rilevanti di interferenze metaboliche dovute a coesposizione a solventi sono stati ripetutamente segnalati in letteratura, tuttavia non è chiaro come concentrazioni modeste quali quelle rilevate negli ambienti di lavoro da noi esaminati (livelli medi settimanali pari a 10,5 e 3 mg/m³ rispettivamente per toluene ed etilbenzene, con punte che non superano i 100 mg/m³) possano produrre modificazioni rilevanti sul metabolismo dello *S*. Se questo dato fosse confermato, l'uso dei PHEMAs come *biomarkers* di esposizione a *S* diverrebbe problematico.

Il riscontro di correlazioni significative fra i valori della capacità di bioconversione (TBT_{ft} o TBT_{tot}) calcolati in condizioni "basali" (il lunedì) e le variazioni di questi parametri durante la settimana, così come la correlazione fra i valori di $t_{1/2}$ e la loro variazione durante la settimana, sembrano indicare una componente genetica nella suscettibilità all'azione di modifica delle caratteristiche basali da parte dei fattori esogeni: in base ai risultati, gli individui *poor converters* sembrano meno sensibili, rispetto ai soggetti *high converters*, al cambiamento della capacità metabolica durante la settimana lavorativa, mentre i soggetti con escrezione veloce sarebbero caratterizzati da minore suscettibilità al cambiamento delle caratteristiche cinetiche. Le eventuali implicazioni tossicologiche di questi dati devono ancora essere chiarite.

Ringraziamenti

La ricerca è stata finanziata in parte dalla Comunità Europea (Progetto N. QLK4-CT-1999-01368).

Bibliografia

- Stewart RD, Dodd HC, Baretta ED, Schaffer AW. Human exposure to styrene vapor. *Arch Environ Health* 1968; 16(5): 656-62.
- Dutkiewicz T, Tyras H. Skin absorption of toluene, styrene, and xylene by man. *Br J Ind Med* 1968; 25 (3): 243.
- Berode M, Droz PO, Guillemin M. Human exposure to styrene. VI. Percutaneous absorption in human volunteers. *Int Arch Occup Environ Health* 1985; 55(4): 331-6.
- Wieczorek H. Evaluation of low exposure to styrene. II. Dermal absorption of styrene vapours in humans under experimental conditions. *Int Arch Occup Environ Health* 1985; 57(1): 71-5.
- Limasset JC, Simon P, Poirot P, Subra I, Grzebyk M. Estimation of the percutaneous absorption of styrene in an industrial situation. *Int Arch Occup Environ Health* 1999; 72(1): 46-51.
- Kohn AN. Ocular toxicity of styrene. *Am J Ophthalmol* 1978; 85(4): 569-70.
- Ohashi Y, Nakay Y, Ikeoka K, Koshimo H, Nakata J, Esaki Y, Horiguchi S, Teramoto K. Degeneration and regeneration of respiratory mucosa of rats after exposure to styrene. *J Appl Toxicol* 1986; 6(6): 405-12.
- Arnedo-Pena A, Bellido-Blasco J, Villamarin-Vazquez JL, Aranda-Mares JL, Font-Cardona N, Gobba F, Kogevinas M. Acute health effects after accidental exposure to styrene from drinking water in Spain. *Environ Health* 2003; 2(1): 6.
- Gamberale F, Hultengren M. Exposure to styrene. II. Psychological functions. *Work Environ Health* 1974; 11(2): 86-93.
- Cherry N, Waldron HA, Wells GG, Wilkinson Rt, Wilson HK, Jones S. An investigation of the acute behavioural effects of styrene on factory workers. *Br J Ind Med* 1980; 37(3): 234-40.
- Letz R, Mahoney FC, Hershman DL, Woskie S, Smith TJ. Neurobehavioural effects of acute styrene exposure in fiberglass boatbuilders. *Neurotoxicol Teratol* 1990; 12(6): 665-8.
- Rebert CS, Hall TA. The neuroepidemiology of styrene: a critical review of representative literature. *Crit Rev Toxicol* 1994; 24(S): 57-106.
- Triebig G, Schaller KH, Valentin H. Investigations on neurotoxicity of chemical substances at the workplace. VII. Longitudinal study with determination of nerve conduction velocities in persons occupationally exposed to styrene. *Int Arch Occup Environ Health* 1985; 56(3): 239-47.
- Triebig G, Lehl R, Weltle D, Schaller KH, Valentin H. Clinical and neurobehavioural study of the acute and chronic neurotoxicity of styrene. *Br J Ind Med* 1989; 46(11): 799-804.
- Seeber A, Blaszkewicz M, Golka K, Hallier E, Kiesswetter E, Schaefer M, Van Thriel C. Neurobehavioural effects of experimental exposures to low levels of styrene. *Toxicol Lett* 2004; 151(1): 183-92.
- Mutti A, Mazzucchi A, Rustichelli P, Frigeri G, Arfini G, Franchini I. Exposure-effect and exposure-response relationship between occupational exposure to styrene and neuropsychological functions. *Am J Ind Med* 1984; 5(4): 275-86.
- Pahwa R, Kalra J. A critical review of the neurotoxicity of styrene in humans. *Vet Hum Toxicol* 1993; 35(6): 516-20.
- Welp E, Kogevinas S, Andersen A, Bellander T, Biocca M, Coggon D, Esteve J, Gennaro V, Kolstad H, Lundberg I, Lynge E, Partanen T, Spence A, Boffetta P, Ferro G, Saracci R. Exposure to styrene and mortality from nervous system diseases and mental disorders". *Am J Epidemiol* 1996; 144(7): 623-33.
- Gobba F, Galassi C, Imbriani M, Ghittori S, Candela S, Cavalleri A. Acquired dyschromatopsia among styrene-exposed workers. *J Occup Med* 1991; 33(7):761-5
- Arfini G, Mutti A, Vescovi P, Ferroni C, Ferrari M, Giaroli C, Passeri M, Franchini I. Impaired dopaminergic modulation of pituitary secretion in workers occupationally exposed to styrene: further evidence from PRL response to TRH stimulation. *J Occup Med* 1987; 29(10): 826-30.
- Bergamaschi E, Smargiassi A, Mutti A, Cavazzini S, Vettori MV, Alinovi R, Franchini I, Mergler D. Peripheral markers of catecholaminergic dysfunction and symptoms of neurotoxicity among styrene-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 1997; 69(3): 209-14.
- Luderer U, Tornero-Velez R, Shav T, Rappaport S, Heyer N, Echeverria D. Temporal association between serum prolactin concentration and exposure to styrene. *Occup Environ Med* 2004; 61(4): 325-33.
- Mutti A, Vescovi PP, Falzoi M, Arfini G, Valenti G, Franchini I. Neuroendocrine effects of styrene on occupationally exposed workers. *Scand J Work Environ Health* 1984; 10(4): 225-8.
- Chakrabarti SK, Labelle L, Tuchweber B. Studies on the subchronic nephrotoxic potential of styrene in Sprague-Dawley rats. *Toxicology* 1987; 44(3): 355-65.
- Verplanke AJ, Herber RF. Effects on the kidney of occupational exposure to styrene. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71(1): 47-52.
- Matanoski GM, Tao XG. Styrene exposure and ischemic heart disease: a case-cohort study. *Am J Epidemiol* 2003; 158(10): 988-95.
- Edling C, Tagesson C. Raised serum bile acid concentrations after occupational exposure to styrene: a possible sign of hepatotoxicity?. *Br J Ind Med* 1984; 41(2): 257-9.
- Brodtkin CA, Moon JD, Camp J, Echeverria D, Redlich CA, Willson RA, Checkoway H. Serum hepatic biochemical activity in two populations of workers exposed to styrene. *Occup Environ Med* 2001; 58(2): 95-102.
- De Piceis Polver P, fenoglio C, Nano R, Coccini T, Bertone V, Vaccarone R, Gerzeli G. Styrene hepatotoxicity in rats treated by inhalation or intraperitoneally: a structural investigation. *Histol Histo-pathol* 2003; 18(1): 49-54.
- Brown NA, Lamb JC, Brown SM, Neal BH. A review of the developmental and reproductive toxicity of styrene. *Regul Toxicol Pharmacol* 2000; 32(3): 228-47.
- Vainio H, Paakkonen R, Ronnholm K, Raunio V, Pelkonen O. A study on mutagenic activity of styrene and styrene-oxide. *Scand J Work Environ Health* 1976; 2(3): 147-51.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 60. International Agency for research on Cancer, 1994, Lyon, France.
- Rappaport SM, Yager JW. A re-evaluation of the cytogenetic effects of styrene. *Mutat Res* 1996; 340(2-3):183-5.
- Ponomarev V, Cabral JR, Wahrendorf J, Galendo D. A carcinogenicity study of styrene-7,8-oxide in rats. *Cancer Lett.* 1984; 24(1): 95-101.
- Barale R. The genetic toxicology of styrene and styrene oxide. *Mutat Res* 1991; 257(2): 107-26.
- Norppa H, Sorsa M. Genetic toxicity of 1,3-butadiene and styrene. *IARC Sci Publ* 1993; 127: 185-93.

- 37) Miller RR, Newhook R, Poole A. Styrene production, use, and human exposure. *Crit Rev Toxicol* 1994; 24(S): 1-10.
- 38) Adgate JL, Eberlv LE, Stroebel C, Pellizzari ED, Sexton K. Personal Indoor, and Outdoor VOC Exposures in a Probability Sample of Children. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2004; 14(S1): 4-13.
- 39) Wallace L, Pellizzari E, Hartwell TD, Perritt R, Ziegenfus R. Exposures to benzene and other volatile compounds from active and passive smoking. *Arch Environ Health* 1987; 42(5): 272-9.
- 40) Miller SL, Branoff S, Nazaroff WW. Exposure to toxic air contaminants in environmental tobacco smoke: an assessment for California based on personal monitoring data. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 1998; 8(3): 287-311.
- 41) Tang W, Hemm I, Eisenbrand G. Estimation of human exposure to styrene and ethylbenzene. *Toxicology* 2000; 144(1-3): 39-50.
- 42) Murphy PG, MacDonald DA, Lickly TD. Styrene migration from general-purpose and high-impact polystyrene into food-simulating solvents. *Food Chem Toxicol* 1992; 30(3): 225-32.
- 43) Tawfik MS, Huyghebaert A. Polystyrene cups and containers: styrene migration. *Food Addit Contam* 1998; 15(5): 592-9.
- 44) Bako-Biro Z, Wargocki P, Weschler CJ, Fanger PO. Effects of pollution from personal computers on perceived air quality, SBS symptoms and productivity in offices. *Indoor Air* 2004; 14(3): 178-87.
- 45) World Health Organization. N°26: Styrene. WHO Environment Health Criteria Series. ISBN 92-4-154086-9. WHO, Geneva, Switzerland, 1983.
- 46) ACGIH. TLVs and BEIs. Thresholds limit values for chemical substances and physical agents. Biological Exposure Limits, American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Cincinnati, 1997.
- 47) National Institute for Occupational Safety and Health. Occupational Exposure to Styrene: Criteria for a recommended standard. Cincinnati, OH (DHHS83-119), 1983.
- 48) Pezzagno G, Ghittori S, Imbriani M, Capodaglio E. Urinary elimination of styrene in experimental and occupational exposure. *Scand J Work Environ Health* 1985; 11(5): 371-9.
- 49) Pekari K. Biological monitoring of benzene, toluene and styrene. Kuopio, Finland, Kuopio University printing office, 1994.
- 50) Fernandez JG, Caperos JR. Styrene exposure. An experimental study of pulmonary absorption and excretion. *Int Arch Occup Environ Health* 1977; 40(1): 1-12.
- 51) Nakajima T, Elovaara E, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Raunio H, Pelkonen O, Vainio H, Aoyama T. Styrene metabolism by cDNA-expressed human hepatic and pulmonary cytochromes P450. *Chem Res Toxicol* 1994; 7(6): 891-6.
- 52) Kim H, Wang RS, Elovaara E, Raunio H, Pelkonen O, Aoyama T, Vainio H, Nakajima T. Cytochrome P450 isozymes responsible for the metabolism of toluene and styrene in human liver microsomes. *Xenobiotica* 1997; 27(7): 657-65.
- 53) Leibman KC, Ortiz E. Oxidation of styrene in liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1969; 18(2): 552-4.
- 54) Watabe T, Ozawa N, Yoshikawa K. Stereochemistry in the oxidative metabolism of styrene by hepatic microsomes. *Biochem Pharmacol* 1981; 30(12): 1695-8.
- 55) Vodicka P, Hemminki K. Identification of alkylation products of styrene oxide in single- and double- stranded DNA. *Carcinogenesis* 1988; 9(9): 1657-60.
- 56) Pagano DA, Yagen B, Hernandez O, Bend JR, Zeiger E. Mutagenicity of (R) and (S) styrene 7,8-oxide and the intermediary mercapturic acid metabolites formed from styrene 7,8-oxide. *Environ Mutagen* 1982; 4(5): 575-84.
- 57) Seiler JP. Chirality-dependent DNA reactivity as the possible cause of the differential mutagenicity of the two components in an enantiomeric pair of epoxides. *Mutat Res* 1990; 245(3): 165-9.
- 58) Gadberry MG, DeNicola DB, Carlson GP. Pneumotoxicity and hepatotoxicity of styrene and styrene oxide. *J Toxicol Environ Health* 1996; 48(3): 273-94.
- 59) Linhart I. Stereochemistry of styrene biotransformation. *Drug Metab Rev* 2001; 33(3-4): 353-67.
- 60) Guillemin MP, Berode M. Biological monitoring of styrene. *Am Ind Hyg Assoc J* 1988; 49: 497-505.
- 61) Ryan AJ, Bend JR. The metabolism of styrene oxide in the isolated perfused rat liver. Identification and quantitation of major metabolites. *Drug Metab Dispos* 1977; 5(4): 363-7.
- 62) Seutter-Berlage F, Delbressine LP, Smeets FLM, Ketelaars HCJ. Identification of free sulfur-containing urinary metabolites of styrene in the rat. *Xenobiotica* 1978; 8(7): 413-18.
- 63) Truchon G, Gerin M, Brodew J. Urinary excretion of mandelic, phenylglyoxilic, and specific mercapturic acids in rats exposed repeatedly by inhalation to various concentrations of styrene vapours. *Can J Physiol Pharmacol* 1990; 68(5): 556-61.
- 64) Linhart I, Gut I, Smejkal J, Novak J. Biotransformation of styrene in mice. Stereochemical aspects. *Chem Res Toxicol* 2000; 13(1): 36-44.
- 65) Hallier E, Georgens HW, Karels H, GolKa K. A note on individual differences in the urinary excretion of optical enantiomers of styrene metabolites and styrene-derived mercapturic acids in humans. *Arch Toxicol* 1995; 69: 300-5.
- 66) Maestri L, Ghittori S, Imbriani M. Determination of urinary mercapturic acids of styrene in man by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996; 687(2): 387-94.
- 67) Manini P, Andreoli R, Bergamaschi R, De Palma G, Mutti A, Nielsen WMA. A new method for the analysis of styrene mercapturic acids by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2000; 14: 2055-60.
- 68) Ghittori S, Maestri L, Imbriani M, Capodaglio E, Cavalleri A. Urinary excretion of specific mercapturic acids in workers exposed to styrene. *Am J Ind Med* 1997; 31(5): 636-44.
- 69) 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(6): 433-6.
- 70) Maestri L, Mestad JJ, Imbriani M. Mercapturates and biologic monitoring: styrene. *G Ital Med Lav Ergon* 1999; 21(4): 334-40.
- 71) Rannug A, Alexandrie A-K, Persson I, Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphism of cytochromes P450 1A1, 2D6 and 2E1: regulation and toxicological significance. *J Occup Environ Med* 1995; 37: 25-36.
- 72) 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(10): 1393-400.
- 73) Haufroid V, Buchet JP, Gardinal S, Ghittori S, Imbriani M, Hirvonen A, Lison D. Importance of genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes for the interpretations of biomarkers of exposure to styrene. *Biomarkers* 2001; 6(3): 236-49.
- 74) Manini P, De Palma G, Mozzoni P, Andreoli R, Poli D, Bergamaschi E, Franchini I, Mutti A. GSTM1 polymorphism and styrene metabolism: insights from an acute accidental exposure. *Toxicol Lett* 2002; 134(1-3): 201-8.
- 75) Norppa H. Cytogenic biomarkers and genetic polymorphism. *Toxicol Lett* 2004; 149(1-3): 309-34.
- 76) Wilson HK, Robertson SM, Waldron HA, Gompertz D. Effect of alcohol on the kinetics of mandelic acid excretion in volunteers exposed to styrene vapour. *Br J Ind Med* 1983; 40(1): 75-80.
- 77) Coccini T, Maestri L, Robustelli della Cuna FS, Bin L, Costa LG, Manzo L. Urinary mercapturic acid diastereoisomers in rats subchronically exposed to styrene and ethanol. *Arch Toxicol* 1996; 70(11): 736-41.
- 78) Vainio H, Zitting A. Interaction of styrene and acetone with drug biotransformation enzymes in rat liver. *Scand J Work Environ Health* 1978; 4(S2): 47-52.
- 79) Marhuenda D, Prieto MJ, Periago JF, Marti J, Perbellini L, Cardona A. Biological monitoring of styrene exposure and possible interference of acetone co-exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1997; 69(6): 455-60.
- 80) Apostoli P, Alessandro G, Placidi G, Alessio L. Metabolic interferences in subjects occupationally exposed to binary styrene-acetone mixtures. *Int Arch Occup Environ Health* 1998; 71(7): 445-52.
- 81) Prieto MJ, Marhuenda D, Cardona A. Analysis of styrene and its metabolites in blood and urine of workers exposed to both styrene and acetone. *J Anal Toxicol* 2002; 26(1): 23-8.
- 82) Löf A, Lundgren E, Nordqvist MB. Kinetics of styrene in workers from a plastic industry after controlled exposure: a comparison with subjects not previously exposed. *Br J Ind Med* 1986; 43(8): 537-43.
- 83) Rubin E, Gang H, Misra PS, Lieber CS. Inhibition of drug metabolism by acute ethanol intoxication. *Am J Med* 1970; 49: 801-6.

- 84) Müller G, Spassowski M, Henschler D. Metabolism of trichloroethylene in man. III. Interaction of trichloroethylene and ethanol. *Arch Toxicol* 1975; 33: 173-89.
- 85) Riihimäki V, Laine A, Savolainen K, Sippel H. Acute solvent-ethanol interactions with special reference to xylene. *Scand J Work Environ Health* 1982; 8: 77-9.
- 86) Iregren A, Åkerstedt T, Olson BA, Gamberle F. Experimental exposure to toluene in combination with ethanol intake. *Scand J Work Environ Health* 1986; 12: 128-36.
- 87) Cerný S, Mráz J, Flek J, Tichý M. Effect of ethanol on the urinary excretion of mandelic and phenylglyoxylic acids after human exposure to styrene. *Int Arch Occup Environ Health* 1990; 62: 243-7.
- 88) Berode M, Droz PO, Bollat MA, Guillemin M. Effect of alcohol on the kinetics of styrene and its metabolites in volunteers and in workers. *Appl Ind Hyg* 1986; 1: 37-48.
- 89) Wilson HK, Robertson SM, Waldron HA, Gompertz D. Effect of alcohol on the kinetics of mandelic acid excretion in volunteers exposed to styrene vapour. *Br J Ind Med* 1983; 40: 75-80.
- 90) Lieber CS. Cytochrome P450E1: its physiological and pathological role. *Physiol Rev* 1997; 77(2): 517-44.
- 91) Zhang XX, Chakrabarti S, Malick AM, Richer CL. Cytogenotoxicity of N-acetyl-S-(1/2-phenyl-2-hydroxyethyl)-cysteine (NAPEC) in cultured human blood lymphocytes. *Mutat Res* 1993; 319: 121-7
- 92) Chakrabarti S, Malick AM. *In vivo* nephrotoxic action of an isomeric mixture of S-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)-glutathione and S-(2-phenyl-2-hydroxyethyl)-glutathione in Fisher-344 rats. *Toxicology* 1991; 67:15-27
- 93) Haufroid V, Jakubovsky M, Janasik B, Ligoocka D, Buchet JP, Bergamaschi E, Manini P, Mutti A, Ghittori S, Arand M, Hangen N, Oesch F, Hirvonen A, Lison D. Interest of genotyping and phenotyping of drug-metabolizing enzymes for the interpretation of biological monitoring of exposure to styrene. *Pharmacogenetics* 2002; 12(9): 691-702.
- 94) Imbriani M e Di Nucci A (eds.). Effetti della interazione tra etanolo e solventi. Quaderni di Medicina del Lavoro e Medicina Riabilitativa. Fondazione Clinica del Lavoro. PI-ME press. Pavia, 1991
- 95) Shi CY, Chua SC, Lee BL, Ong HY, Jeyaratnam J, and Ong CN. Kinetics of styrene urinary metabolites: a study in a low-level occupational exposure setting in Singapore. *Int Arch Occup Environ Health* 1994; 65: 319-23.
- 96) Boogaard PJ, van Sittert NJ. Biological monitoring of exposure to benzene: a comparison between S-phenylmercapturic acid, trans,trans-muconic acid, and phenol. *Occup Environ Med* 1995; 52:611-620
- 97) Yang CM, Carlson GP. Effects of ethanol on glutathione conjugation in rat liver and lung. *Biochem Pharmacol* 1991; 41(6-7): 923-29.

Richiesta estratti: Dott.ssa S. Negri - Fondazione S. Maugeri, IRCCS, Istituto di Pavia - Laboratorio per lo Studio e il Monitoraggio dell'Esposizione a Inquinanti Aeriformi (LabS-MEIA) - Via Ferrata 8 - Pavia, Italy - Tel. +39.0382.592345; Fax: +39.0382.592072; e-mail: snegri@fsm.it