

STUDIO DELLA TOSSICITÀ DEL VINILCICLOESENE

Banda I.¹ Poli D.² Goldoni M.¹ Alinovi R.¹ Pinelli S.¹ Mozzoni P.¹ Andreoli R.¹ Petyx M.³ Iavicoli S.³ Mutti A.¹

¹ *Medicina e Chirurgia, Università, Parma, Italia*

² *Dimeila - Sezione Cert, Inail, Parma, Italia*

³ *Dimeila, Inail, Monteporzio Catone, Italia*

Il vinilcicloesene (VCH) è un sottoprodotto della polimerizzazione del 1,3-butadiene, reazione che avviene ad alta temperatura e pressione (1). Viene classificato come possibile cancerogeno per l'uomo dalla IARC (2). L'ACGIH ha proposto un TLV-TWA pari a 0.1 ppm, mentre per il Butadiene il TLV è 2 ppm, nonostante sia classificato come cancerogeno certo per l'uomo. Il VCH non ha indicatori biologici di esposizione (BEI) noti, per cui la valutazione del rischio di esposizione dei lavoratori e la messa in atto di adeguati sistemi di prevenzione e protezione è difficile.

Lo scopo del presente studio è stato quello di (1) valutare i meccanismi di tossicità del VCH su modelli *in vitro* in relazione alla dose reale di esposizione rispetto alla dose nominale utilizzando diverse linee cellulari e (2) identificare possibili metaboliti di fase I e fase II.

Sono state utilizzate diverse linee cellulari: A459 (Cellule di adenoma alveolare umano), HepG2 (Cellule di epatocarcinoma umano), HL60 (Cellule di leucemia promielocitica umana), SK-N-MC (Cellule di neuroepitelioma umano), CHO-K1 (Cellule ovariche di criceto cinese). Sono stati valutati gli effetti sulla vitalità cellulare (saggio MTT) in seguito a esposizione di 24 ore a diverse concentrazioni di VCH. Per ogni curva di vitalità sono stati calcolati l'IC₅₀ e la Benchmark Dose (BMDL₁₀, estremo inferiore dell'intervallo di confidenza al 95% di IC₁₀). Sono stati inoltre valutati: (a) ciclo cellulare in citofluorimetria a flusso (colorazione con propidio ioduro); (b) espressione genica delle cicline coinvolte nelle prime fasi del ciclo cellulare mediante RT-PCR. Tramite analisi in gascromatografia spettrometria di massa (GC-MS) è stata misurata nel tempo la concentrazione reale a cui le cellule vengono esposte durante gli esperimenti *in vitro* e la concentrazione intracellulare dopo 24 ore di esposizione. Tramite GC/MS e LC-MS/MS sono stati infine identificati e quantificati i metaboliti di fase I e II.

Gli studi *in vitro* hanno evidenziato effetti più precoci sulla linea polmonare (BMDL₁₀ 0.9 mM, IC₅₀ 5.2 mM), e sulla linea leucemica (BMDL₁₀ 0.4 mM, IC₅₀ 4.8 mM), effetti più limitati sulla linea ovarica (BMDL₁₀ 5.2 mM, IC₅₀ >10 mM) e assenza di effetti sulla linea neuronale ed epatica (BMDL₁₀ e IC₅₀ >10 mM). Utilizzando delle concentrazioni corrispondenti a metà della IC₅₀, non si osservava morte cellulare né per apoptosi né per necrosi, ma solo un effetto a carico del ciclo cellulare. Il trattamento con il VCH causava un aumento del 15% delle cellule in fase G₀/G₁ e un calo del 50% di quelle in fase G₂/M, evidenziando un blocco nelle prime fasi del ciclo. Tali misure erano confermate dall'espressione genica delle cicline.

La misura temporale della dose reale nel medium cellulare evidenziava un calo drastico rispetto alla dose nominale a cui erano esposte le cellule indicando che il suo coefficiente di ripartizione medium cellulare/aria e/o la sua metabolizzazione incidono sulla quantità della sostanza in grado di entrare nelle cellule e sviluppare effetti citotossici (es. linea HEPG2: dose nominale VCH 5mM; dose reale VCH: 0,1 mM). Riguardo i metaboliti, circa lo 0,1% si trasformava in epossidi. Tuttavia, tali metaboliti risultavano di quasi 3 ordini di grandezza più tossici a livello cellulare rispetto al VCH.

In conclusione, lo studio ha mostrato un effetto di inibizione della proliferazione cellulare, confermato con le analisi del ciclo cellulare e dallo studio dell'espressione genica delle diverse cicline espresse nelle prime fasi del ciclo cellulare. Ulteriori studi verranno effettuati per valutare i possibili polimorfismi genetici che possano spiegare un'eventuale alterata regolazione dell'espressione dei geni implicati nei punti di controllo del ciclo cellulare.

Le analisi in GC/MS hanno evidenziato come la concentrazione reale sia significativamente inferiore rispetto a quella nominale, probabilmente a causa dell'evaporazione e/o assorbimento da parte delle cellule, mentre solo lo 0,1% si trasformava in epossidi. Tali epossidi, essendo risultati più tossici del VCH di almeno tre ordini di grandezza, rientrano in modo importante nella tossicità a VCH, nonostante le basse concentrazioni prodotte in situ.

Bibliografia:

- (1) Alimardanov KH. M., Velieva F. M., Dzhililova AA., and Ragimova NM., "Fundamental kinetic aspects and the mechanism of oxidative dehydrogenation of 4-vinylcyclohexene to give ethylbenzene and styrene", *Theoretical and experimental chemistry*, Vol. 49, 2013.
- (2) IARC. 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 60, some industrial chemicals, IARC, Lyon, 361–372.