

**Nanoparticelle prodotte nei processi di combustione:
caratterizzazione chimica e valutazione della
genotossicità**

Autori: Simonelli Angela, Miraglia Nadia, Sannolo Nicola

**Affiliazione: Seconda Università di Napoli – Dip.to di Medicina
Sperimentale – Sezione di Medicina del Lavoro, Igiene e
Tossicologia Industriale**

Ricerca finanziata da:



Dipartimento di Igiene del Lavoro

11 giugno 2008

Elaborato finale circa l'attività di ricerca svolta nell'ambito dell'Area tematica n.9 "Identificazione e misura dei rischi e degli effetti di agenti chimici, fisici e biologici": codice 02/B/DIL/05, "Nanoparticelle prodotte nei processi di combustione: caratterizzazione chimica e valutazione della genotossicità".

OBIETTIVO DELLA RICERCA

La combustione di motori diesel e benzina genera numerose particelle carboniose tra cui particelle con diametro inferiore a 5 nm (NOC) in grado di depositarsi nei polmoni e successivamente migrare in tutti gli organi.

Visto il potenziale rischio per la salute in seguito ad esposizione al materiale nanoparticellare, il progetto di ricerca, di durata annuale, è stato incentrato su due obiettivi principali:

- 1) la valutazione della mutagenicità del materiale nanoparticellare mediante Test di Ames condotti su ceppi di *Salmonella Typhimurium*;
- 2) la valutazione delle proprietà elettrofiliche di campioni acquosi contenenti NOC, esaminando in vitro la capacità dei NOC di interagire con siti nucleofili presenti in molecole biologiche.

ATTIVITÀ SVOLTA

Introduzione

La combustione di carburanti ricchi di idrocarburi dà luogo ad un'ampia varietà di particelle carboniose che differiscono in natura e dimensioni; in particolare, nanoparticelle di carbonio organico (NOC) e fuliggine sono state rilevate nei gas di scarico di motori diesel e a benzina, suggerendone una presenza ubiquitaria, soprattutto in aree urbane, a seguito del traffico autoveicolare. L'esposizione professionale a tali particelle riguarda principalmente il settore dei trasporti e, in linea generale, tutte le attività che comportino esposizione ad emissioni autoveicolari.

Studi epidemiologici hanno mostrato una relazione causale dose-effetto a seguito di esposizione a particolato; tuttavia, al variare delle dimensioni delle particelle e delle caratteristiche chimico-fisiche tipiche di ciascuna classe di particelle variano i meccanismi

di diffusione nell'aria, di penetrazione, assorbimento e distribuzione all'interno dell'organismo: ad esempio, particelle con diametro inferiore ai 20 nm diffondono attraverso l'organismo agli organi extra-polmonari, mentre particelle di dimensioni maggiori si depositano prevalentemente lungo il tratto respiratorio [1-11]. Risulta quindi indispensabile indagare il potenziale rischio per la salute rispetto a ciascuna singola classe di particelle. Infatti, mentre in letteratura si ritrovano numerose informazioni riguardanti gli effetti sulla salute connesse con l'esposizione a particelle di dimensioni micrometriche, pochi dati sono invece disponibili circa la composizione chimica (e quindi la reattività) della nanoparticelle da combustione e circa gli effetti tossicologici sull'uomo.

In quest'ambito, l'attività di ricerca qui riportata è stata, quindi, focalizzata sul potenziale rischio dovuto all'esposizione a particelle caratterizzate da un diametro inferiore ai cinque nanometri, denominate NOC.

A tale scopo il materiale nanoparticellare è stato raccolto collegando ad un apposito sistema di campionamento i gas di scarico di veicoli alimentati a gasolio e a benzina, collocati su un telaio dinamometrico a carico costante (50-75 km/hr). Il sistema di campionamento è costituito da tubi a lunghezza e diametro variabili, raffreddati ad acqua, che consentono: a) la condensazione e la raccolta dei prodotti di combustione in ambiente acquoso; b) la diluizione (1:10, con aria purificata mediante filtri HEPA) dell'esausto gassoso e la misurazione *in situ* dello spettro UV-visibile. La concentrazione del carbonio organico totale (TOC) dei campioni acquosi è stata misurata mediante un TOC Analyzer (Shimadzu TOC-5000 A).

I campioni acquosi contenenti NOC, raccolti dagli scarichi di motori a diesel e benzina, sono stati sottoposti ad analisi per poter valutare sia la loro mutagenicità sia la loro capacità di interagire con molecole biologiche, quali proteine e peptidi.

1) Valutazione della mutagenicità del materiale nanoparticellare mediante test di Ames condotti su ceppi di *Salmonella Typhimurium*.

La mutagenicità di nanoparticelle presenti nei gas di scarico può essere verificata mediante Test di Ames condotti utilizzando vari ceppi di *Salmonella Typhimurium*, come ad esempio, TA98 e TA100. Questi ceppi recano ognuno un diverso tipo di mutazione nell'operone che codifica per la biosintesi dell'istidina, per cui i batteri sono incapaci di

sintetizzare tale amminoacido. L'utilizzo di due ceppi differenti di *Salmonella Typhimurium* permette di evidenziare diversi tipi di danni genetici a livello di una o poche coppie di basi nel DNA (mutazioni puntiformi); in particolare il ceppo TA98 rileva mutazioni per inserzione o delezione di basi, mentre il ceppo TA100 rileva mutazioni per sostituzione di basi [12]. Per distinguere, inoltre, le sostanze che per esercitare la loro azione mutagenica devono essere metabolizzate (promutageni) da quelle che possono agire sul DNA direttamente (mutageni diretti), i test su *Salmonella Typhimurium* possono essere condotti con e senza attivazione metabolica esogena, adoperando, ad esempio, la frazione microsomiale epatica di ratto "S9" (ottenuta mediante stimolazione dell'attività degli enzimi epatici del ratto), in grado di metabolizzare il materiale particellare.

Test di Ames: metodi

Sono stati utilizzati campioni acquosi a concentrazione nota di NOC pari a 600 ppm e 400 ppm, provenienti rispettivamente da motori diesel e a benzina. I campioni sono stati progressivamente diluiti 1:2, ottenendo per ciascun esausto, cinque campioni a concentrazione decrescente.

Due diversi ceppi di *Salmonella Typhimurium*, il TA98 (hisD3052, rfa, uvrB, pKM101) e il TA100 (hisG46, rfa, uvrB, pKM101) sono stati adoperati per effettuare i test di mutagenicità. Una prima serie di test (senza attivazione metabolica) ha previsto l'aggiunta di 500 µl dei campioni acquosi di NOC in ciascuna piastra (plate, pl). Una seconda serie di test è stata effettuata incorporando nelle piastre, oltre al campione di NOC, anche 2 mg di frazione microsomiale epatica da ratto, S9, liofilizzata. In entrambi i casi sono stati effettuati controlli negativi (piastre contenenti unicamente i ceppi di *Salmonella*) e positivi. I controlli positivi sono stati condotti aggiungendo: in assenza di S9, sodioazide (2 µg/pl) e 2-nitrofluorene (1 µg/pl) per i ceppi TA100 e TA98, rispettivamente; in presenza di S9, cyclofosfamide (5000 µg/pl) e 2-aminoanthracene (1 µg/pl), per i ceppi TA100 e TA98, rispettivamente.

In maniera del tutto analoga a quanto sopra riportato sono stati effettuati test di mutagenicità su campioni acquosi di NOC a concentrazione maggiore: esausti di motori diesel e a benzina con concentrazioni di NOC pari a 2800 e 1450 ppm sono stati progressivamente diluiti 1:2 per tre volte e, quindi, incorporati in piastra.

Le piastre sono state incubate a 37°C, per 72 ore, al buio. Il numero di revertenti per piatto è stato misurato adoperando un *colony counter* Cardinal, Perceptive Instruments, Suffolk, UK.

I test di Ames sono stati eseguiti effettuando tre repliche indipendenti su ciascun campione.

Risultati

In Tabella 1 è riportata la risposta (valore medio del numero di revertenti per piastra, revertant/plate, revert/pl), ottenuta dal Test di Ames per entrambi i ceppi TA98 e TA100, in presenza ed in assenza di S9, in base alle quantità di campione nanoparticellare ($\mu\text{g/pl}$) incorporate in piastra.

Tabella 1: Test di Ames effettuati su ceppi di *Salmonella Typhimurium*, TA98 e TA100, con e senza attivazione metabolica mediante S9, su campioni acquosi di esausti da motori diesel e a benzina, con concentrazioni di NOC comprese nei range: 3.75-60 $\mu\text{g/pl}$ e 2.5-40 $\mu\text{g/pl}$, rispettivamente.

TA 98				N° identificativo del campione	TA 100			
Diesel		Benzina			Diesel		Benzina	
Dose $\mu\text{g/pl}$	Risposta Revert/pl	Dose $\mu\text{g/pl}$	Risposta Revert/pl	Senza S9	Dose $\mu\text{g/pl}$	Risposta Revert/pl	Dose $\mu\text{g/pl}$	Risposta Revert/pl
60	42	40	39		1	60	179	40
30	29	20	36	2	30	171	20	160
15	36	10	37	3	15	183	10	167
7.5	36	5	37	4	7.5	174	5	159
3.75	30	2.5	33	5	3.75	175	2.5	161
0	37	0	37	controllo	0	162	0	162
Dose $\mu\text{g/pl}$	Risposta Revert/pl	Dose $\mu\text{g/pl}$	Risposta Revert/pl	Con S9	Dose $\mu\text{g/pl}$	Risposta Revert/pl	Dose $\mu\text{g/pl}$	Risposta Revert/pl
60	275	40	282		1	60	202	40
30	259	20	269	2	30	187	20	238
15	300	10	261	3	15	220	10	222
7.5	281	5	241	4	7.5	220	5	214
3.75	235	2.5	238	5	3.75	207	2.5	211
0	86	0	86	controllo	0	183	0	183

I risultati relativi ai controlli positivi non sono stati riportati in quanto tali controlli vengono effettuati unicamente per verificare l'effettivo funzionamento del sistema.

I controlli negativi consistono in campioni contenenti unicamente il ceppo batterico, senza l'aggiunta di alcun agente mutageno, pertanto vengono adoperati per misurare la crescita delle colonie dovuta a batteri che riacquistano spontaneamente la capacità di sintetizzare istidina (retromutazione spontanea). I controlli negativi vengono, inoltre, adoperati per valutare la mutagenicità dell'agente indagato, applicando il *criterio del raddoppio*: una sostanza è considerata mutagena quando il rapporto di mutagenicità fra i revertenti indotti ed il numero dei revertenti spontanei del controllo negativo risulta ≥ 2 [13].

L'analisi, inoltre, dell'andamento della crescita dei revertenti in funzione della dose di agente mutageno incorporato in piastra fornisce indicazioni circa il potere mutageno della sostanza stessa. Infatti, qualora i risultati relativi ad un singolo campione non rispecchiassero il criterio del raddoppio, questo potrebbe significare non che la sostanza non è effettivamente mutagena, ma semplicemente che non sono state addizionate quantità di agente mutageno sufficienti ad esercitare l'effetto.

Secondo il *criterio del raddoppio*, solo i campioni testati sul ceppo TA98 (provenienti sia da motori diesel sia da motori a benzina) e solo a seguito di attivazione metabolica sono risultati mutageni; tuttavia, in base a quanto detto, prima di poter affermare che, negli altri casi, l'agente indagato non fosse mutageno, è stato necessario valutare l'andamento delle risposte al Test di Ames in funzione dei livelli di concentrazione di NOC incubati. Di conseguenza, per ciascuna serie di test effettuati, sono state costruite curve dose/risposta, riportando sull'asse delle ascisse i μg di campione incorporati in piastra e su quella delle ordinate il numero dei revertenti per piastra. La mutagenicità di un composto è stata determinata considerando solo il tratto lineare delle curve dose/risposta, al fine di eliminare l'interferenza dovuta all'eventuale presenza di un effetto tossico o altri effetti inibenti la proliferazione batterica e l'attività mutagena del campione.

E' stata realizzata una regressione lineare dei revertenti in funzione delle concentrazioni dei campioni, calcolando la correlazione lineare (R^2), i coefficienti angolari

(maggiore è il coefficiente angolare, maggiore è il potere mutageno della sostanza indagata) e di correlazione e la relativa significatività.

Per i ceppi di *Salmonella* TA98 in presenza di S9, i campioni di NOC provenienti da motori diesel e a benzina hanno confermato il risultato positivo precedentemente ottenuto; in particolare, le risposte al Test di Ames per gli esausti da benzina hanno presentato una buona correlazione lineare rispetto alle dosi di incubazione, con una significatività dei coefficienti pari a 0.01.

In assenza di S9, per i ceppi di *Salmonella* TA98 e TA100, i campioni di NOC provenienti sia da motori diesel sia da quelli a benzina non sono risultati mutageni, presentando, inoltre, una scarsa correlazione lineare.

Per i ceppi di *Salmonella* TA100 con attivazione metabolica mediante S9, i campioni da benzina, pur non risultando mutageni con il metodo del raddoppio, hanno presentato una correlazione lineare significativa con un R^2 pari a 0.9989. I campioni da motori diesel, invece non hanno mostrato mutagenicità.

I risultati illustrati finora sono sufficienti ad affermare la non mutagenicità dell'agente indagato solo nel range di concentrazione investigato; ciononostante, come precedentemente spiegato, dal momento che in alcuni casi è stata riscontrata una correlazione lineare tra numero di revertenti e dosi di incubazione, è stato ipotizzato che analoghi campioni di esausto, ma contenenti NOC a concentrazioni più alte, potessero risultare mutageni.

Il test di Ames, pertanto, è stato ripetuto per campioni di NOC provenienti sia da motori diesel che a benzina, partendo da soluzioni madri con concentrazioni nominali, rispettivamente, di 2800 ppm e 1450 ppm, progressivamente diluite 1:2, ottenendo tre campioni a concentrazioni decrescenti. In Tabella 2 sono riportati i risultati ottenuti.

Tabella2: Test di Ames effettuati su ceppi di *Salmonella Typhimurium*, TA98 e TA100, con e senza attivazione metabolica mediante S9, su campioni acquosi di esausti da motori diesel e a benzina, con concentrazioni di NOC comprese nei range: 70-280 µg/pl e 36.25-145 µg/pl, rispettivamente.

TA 98				N. identificativo del campione	TA 100			
Diesel		Benzina			Diesel		Benzina	
Dose µg/pl	Risposta Revert/pl	Dose µg/pl	Risposta Revert/pl	Senza S9	Dose µg/pl	Risposta Revert/pl	Dose µg/pl	Risposta Revert/pl
280	64	145	154	1	280	325	145	391
140	89	72.5	94	2	140	319	72.5	285
70	58	36.25	67	3	70	255	36.25	259
0	37	0	37	controllo	0	189	0	189
Dose µg/pl	Risposta Revert/pl	Dose µg/pl	Risposta Revert/pl	Con S9	Dose µg/pl	Risposta Revert/pl	Dose µg/pl	Risposta Revert/pl
280	165	145	197	1	280	207	145	254
140	134	72.5	146	2	140	173	72.5	149
70	134	36.25	131	3	70	147	36.25	134
0	54	0	54	controllo	0	252	0	252

Per i ceppi di *Salmonella* TA98 in presenza di S9, i campioni di NOC (da diesel e benzina) sono risultati positivi e hanno presentato buona correlazione lineare, confermando i risultati ottenuti a concentrazioni più basse, inoltre i campioni di benzina, anche in assenza di S9, sono risultati mutageni, dando buona e significativa correlazione lineare.

Per i ceppi di *Salmonella* TA100, gli esausti di benzina incubati senza S9, pur non risultando mutageni con il metodo del raddoppio, sono risultati linearmente correlati; inoltre, in particolare nel caso del campione da benzina a maggiore concentrazione, è stata riscontrata mutagenicità anche con il metodo del raddoppio.

Gli esausti da motori diesel, incubati con il ceppo TA100 in assenza di S9, hanno confermato i risultati ottenuti testando i campioni a concentrazioni più basse (correlazione lineare crescente e significativa ma senza rispettare il *criterio del raddoppio*).

Sia gli esausti a concentrazione elevata provenienti da motori diesel sia quelli da motori a benzina, quando incubati in presenza di S9, hanno fornito risposte minori rispetto al campione di controllo, indice di un effetto tossico per i batteri, indipendente dalla mutagenicità o meno dell'agente incubato.

Di seguito si riporta uno schema riassuntivo (Tabella 3) circa la mutagenicità dei campioni di NOC indagati.

Tabella 3: Schema riassuntivo dell'azione mutagenica di NOC contenuti in esausti da motori diesel e a benzina, analizzati mediante Test di Ames, incubando diverse concentrazioni di NOC con ceppi di *Salmonella Typhimurium* TA98 e TA100, con e senza attivazione metabolica.

Range di concentrazione (in µg/pl*) di NOC contenuti in esausti da motori diesel o benzina	TA98 con S9	TA98 senza S9	TA100 con S9	TA100 senza S9
Benzina [NOC] = 2.5-40	mutageno	non mutageno	probabilmente mutageno	non mutageno
Benzina [NOC] = 36.25-145	mutageno	mutageno	tossico	probabilmente mutageno
Diesel [NOC] = 3.75-60	mutageno	non mutageno	non mutageno	non mutageno
Diesel [NOC] = 70-280	mutageno	probabilmente mutageno	tossico	probabilmente mutageno

* µg/pl, quantità di materiale nanoparticellare per piastra di incubazione

2) Valutazione delle proprietà elettrofiliche di campioni acquosi contenenti NOC, esaminando *in vitro* la capacità dei NOC di interagire con siti nucleofili presenti in molecole biologiche

Una sostanza chimica o naturale, estranea all'organismo (xenobiotico), a contatto con esso subisce quattro processi fondamentali: assorbimento, distribuzione, biotrasformazione ed eliminazione; relativamente alla fase di biotrasformazione lo xenobiotico può essere metabolizzato con la formazione di metaboliti attivi che, a loro volta, sono distribuiti nell'organismo. In seguito, la sostanza e/o i suoi metaboliti possono reagire con macromolecole cellulari (DNA e proteine) dando luogo alla formazione di addotti.

Tali modificazioni alterano la funzionalità della macromolecola coinvolta, determinando, a seconda dei casi, la tossicità dello xenobiotico. Con il termine "tossicità"

si ingloba qualsiasi alterazione funzionale, da un'irritazione delle vie respiratorie fino al processo multifasico della cancerogenesi.

Le modificazioni a carico del DNA possono andare incontro ad una serie di meccanismi di riparazione che, talvolta, risultano inadeguati o insufficienti, provocando lesioni cellulari permanenti (alterazione della capacità di replicazione del DNA, sviluppo di mutazioni, ecc).

La misura degli addotti, formati dalla specie elettrofila di uno xenobiotico con i siti nucleofili del DNA, rappresenterebbe, quindi, un efficiente metodo di indagine circa le proprietà tossicologiche delle molecole indagate. Il monitoraggio diretto degli addotti al DNA, tuttavia, non è facilmente realizzabile poiché comporta diverse problematiche connesse con l'individuazione del sito bersaglio, non conosciuto a priori, e con la necessità di prelievi biotici per reperire il materiale biologico. L'elevato turnover delle molecole di DNA, inoltre, fa sì che la concentrazione degli addotti al DNA risulti indicativa soltanto di esposizioni avvenute in tempi piuttosto recenti.

I problemi analitici legati all'analisi diretta degli addotti al DNA, hanno determinato l'esigenza di ricercare metodi alternativi, tesi all'individuazione e quantificazione di addotti altrettanto rappresentativi ma di più facile utilizzo.

Dal momento che, in linea teorica, il sito elettrofilo reattivo di uno xenobiotico può legarsi con qualsiasi sito nucleofilo presente nell'organismo, contemporaneamente agli addotti con il DNA, è altamente plausibile anche la formazione di addotti proteici. In base a tale ipotesi e in considerazione che a) gli amminoacidi modificati nelle proteine sono più facilmente determinabili delle corrispondenti modificazioni sul DNA, b) le proteine, ed in particolare l'emoglobina, sono facilmente accessibili ed in quantità maggiori rispetto al DNA, il gruppo di Ehrenberg [14] in Stoccolma propose, nel 1976, di utilizzare gli addotti emoglobinici per il monitoraggio indiretto degli addotti al DNA e per la valutazione del rischio genotossico connesso con l'esposizione a sostanze xenobiotiche. Questo gruppo di ricerca, inoltre, è stato in grado di dimostrare per diversi xenobiotici, sia agenti alchilanti diretti, sia sostanze richiedenti un'attivazione metabolica, che esiste un rapporto costante tra la formazione di addotti al DNA e quella all'emoglobina, in un ampio intervallo di dosi di xenobiotico.

Gli addotti emoglobinici appaiono dunque un valido surrogato degli addotti al DNA; l'emoglobina, a differenza di altre proteine, risulta particolarmente adatta per la

dosimetria di sostanze genotossiche, dato che: a) è presente in gran quantità nell'organismo, b) è facilmente accessibile mediante un normale prelievo venoso, c) il tempo di vita media (di 120 giorni nell'uomo) e la mancanza di meccanismi di riparo permettono di accumulare gli eventuali addotti e di rilevarne la presenza anche nel caso in cui l'analisi fosse effettuata in tempi relativamente lontani dall'esposizione [15 -18].

Studio dell'interazione dei NOC con siti nucleofili

La reattività delle nanoparticelle è stata investigata utilizzando un approccio teso ad identificare gli agenti elettrofili presenti nel materiale campionato, in grado di interagire con i siti nucleofili di macromolecole biologiche, quali l'emoglobina.

Dato l'elevato numero di siti nucleofili presenti nell'emoglobina e data la complessità dei NOC, assieme alle scarse conoscenze circa la loro esatta composizione e struttura chimica, l'approccio preliminare della ricerca ha previsto l'identificazione di eventuali componenti elettrofili contenuti nei NOC, usando, come matrici proteiche, dei peptidi modello che contenessero residui amminoacidici con siti nucleofili specifici ed altamente reattivi.

Sono stati scelti quattro peptidi modello -Angiotensina I, Coxsackie B3 Virus Epitope, Alloferon 1 e un Peptide sintetico con Cisteina N-terminale- le cui sequenze amminoacidiche triletterali, assieme al peso molecolare (PM), sono riportate di seguito. Tali peptidi sono stati scelti in quanto contengono residui di cisteina e di istidina, oltre al gruppo N-terminale, i quali rappresentano siti nucleofili particolarmente reattivi [19, 20].

Angiotensina I

H₂NAsp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-LeuCOOH

PM=1296.5 Da

Coxsackie B3 Virus Epitope

H₂NGly-Pro-Val-Glu-Ile-Asp-Ala-Ile-Thr-Ala-Ala-Ile-Gly-Arg-Val-Ala-CysCOOH

PM=1542.78 Da

Alloferon 1

H₂NHis-Gly-Val-Ser-Gly-His-Gly-Val-His-GlyCOOH

PM=1265.31Da

Peptide sintetico con Cisteina N-terminale

H₂NCys-Asp-Pro-Gly-Tyr-Ile-Gly-Ser-ArgCOOH

PM=967.07 Da

Preparazione dei campioni

Sono state preparate soluzioni *stock* acquose dei quattro peptidi a concentrazione di 1 µg/µl. Le soluzioni *stock* sono state diluite con una soluzione di acido formico 0.1%, ottenendo soluzioni a concentrazione nominale di 25 ng/µl, adoperate per la caratterizzazione, mediante cromatografia/spettrometria di massa, dei quattro peptidi.

La caratterizzazione degli addotti ha previsto incubazioni *in vitro* di ogni peptide con i campioni provenienti dalla combustione di motori diesel e benzina, a concentrazione nominale di NOC rispettivamente pari a 850 ppm e 550 ppm. Sono stati incubati 5 µl della soluzione acquosa di peptide a 1 µg/µl con 540 µl di ogni campione di NOC; le incubazioni sono state condotte sotto agitazione, per 18 h a 37°C, per mimare la temperatura corporea. Le soluzioni incubate sono state liofilizzate e, successivamente, sciolte in una soluzione 0.1% di acido formico, allo scopo di ottenere campioni con concentrazioni nominali di peptide identiche a quelle delle soluzioni adoperate per la caratterizzazione dei peptidi (25 ng/µl). In tal modo, è possibile comparare direttamente i profili cromatografici derivanti dalle analisi di soluzioni di peptide condotte in presenza ed in assenza di NOC, senza dover procedere alla quantificazione delle sostanze eluite.

Analisi dei campioni mediante LC/ESI/MS

Le miscele di incubazione sono state analizzate mediante Cromatografia Liquida accoppiata a Spettrometria di Massa a Ionizzazione Electrospray (LC/ESI/MS). Le analisi LC/ESI/MS sono state condotte con un sistema modulare HPLC serie 1100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA) ed uno spettrometro di massa a trappola ionica LCQTM_{DECA} (ThermoQuest, Finnigan, San Jose, CA, USA) dotato di una sorgente ionica electrospray e gestito dal programma Xcalibur (versione 1.1, ThermoQuest).

Per la separazione cromatografica è stata utilizzata una colonna Jupiter (Phenomenex, USA) C₁₈ (250 mm x 2.0 mm, 5 µm, 300 Å); i tamponi utilizzati sono stati:

- Tampone A: 0.1% acido formico in acqua;
- Tampone B: 0.1% acido formico in metanolo.

Il processo cromatografico è stato caratterizzato da un gradiente lineare del tampone B, dal 5% al 70% in 95 minuti. L'effluente (ad un flusso di 0.2 ml/min) è stato connesso direttamente alla sorgente electrospray, riscaldando il capillare ad una temperatura di 300°C.

Gli spettri di massa electrospray sono stati acquisiti in modalità di acquisizione *full scan*, nell'intervallo 50-2000 m/z, al fine di caratterizzare ed identificare eventuali peptidi modificati dall'agente elettrofilo mediante la misura dell'incremento di peso molecolare, rispetto al peptide non modificato.

Caratterizzazione LC/ESI/MS dei peptidi modello e dei campioni acquosi di NOC

La caratterizzazione dei quattro peptidi modello è stata eseguita analizzando soluzioni 25 ng/µl dei peptidi modello, mediante LC/ESI/MS, in modalità di acquisizione *full scan*; in Figura 1 Figura 2 sono riportati, rispettivamente, i profili cromatografici e gli spettri di massa *full scan* ottenuti.

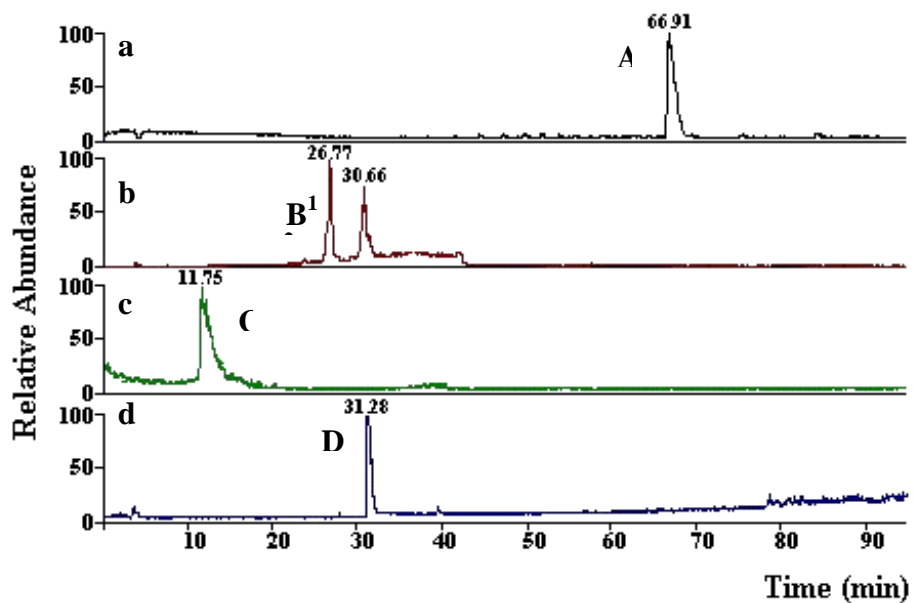


Figura 1: Analisi LC/ESI/MS di soluzioni acquose dei peptidi modello. Profili cromatografici di: a) Angiotensina I; b) Coxsackie B3 Virus Epitope; c) Alloferon 1; d) Peptide sintetico con Cisteina N-terminale.

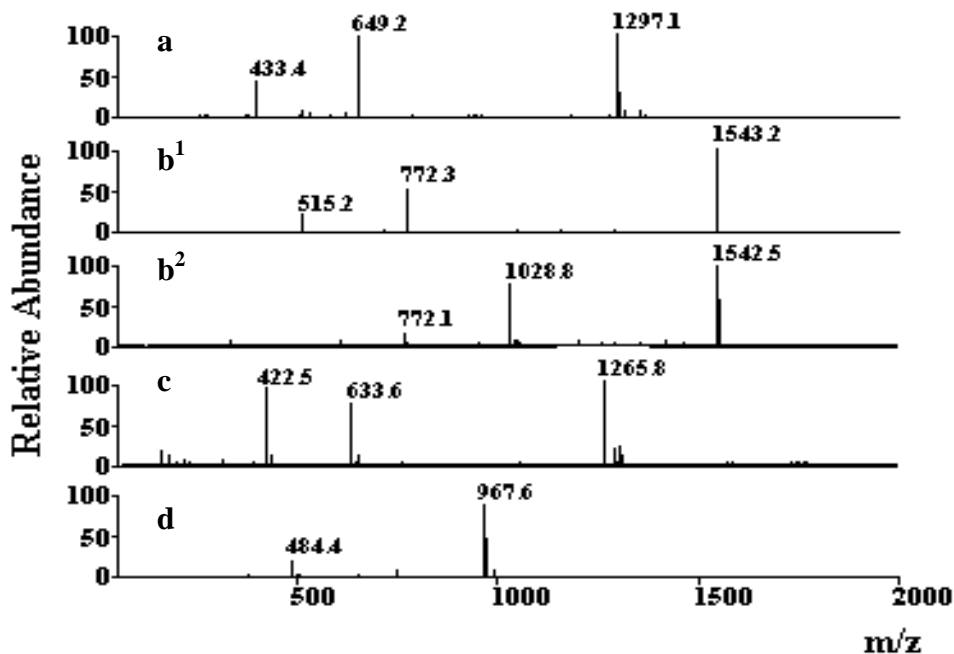


Figura 2: Spettri di massa *full scan* dei picchi cromatografici riportati in Figura 1: a) A; b¹) B¹; b²) B²; c) C; d) D.

L'Angiotensina I analizzata mediante LC/MS eluisce ad un tempo di ritenzione (tr) di 66.91 min (Figura 1a); dallo spettro di massa ottenuto (Figura 2a) si osserva la presenza di tre segnali a valori di m/z pari a 1297.1, 649.2, 433.4, corrispondenti, rispettivamente, allo ione quasi molecolare $[M+H]^+$, allo ione $[M+2H]^{2+}$ ed allo ione $[M+3H]^{3+}$.

L'analisi LC/ESI/MS del peptide Coxsackie B3 Virus Epitope ha mostrato due picchi cromatografici, B¹ e B² (Figura 1b). B¹ eluisce ad un tr di 26.77 min, e lo spettro di massa corrispondente (Figura 2b¹) evidenzia la presenza di tre segnali a valori di m/z di 1543.2 (ione quasi molecolare), 772.3 ($[M+2H]^{2+}$) e 515.2 ($[M+3H]^{3+}$). Il secondo picco cromatografico eluisce a 30.66 min, presentando uno spettro di massa (Figura 2b²) anch'esso con tre segnali a valori di m/z pari a 1542.5, 1028.8, 772.1, corrispondenti, rispettivamente, a ioni con doppia, tripla e quadrupla carica, e attribuibili ad un dimero del peptide Coxsackie, avente peso molecolare pari a 3085.56 Da. La presenza del dimero è presumibilmente dovuta alla formazione di un ponte disolfuro tra i residui di cisteina, in posizione carbossiterminale, del peptide.

L'Alloferon 1 eluisce ad un tr di 11.75 min (Figura 1c); il corrispondente spettro di massa (Figura 2c) presenta tre segnali a valori di m/z: 1265.8 ($[M+H]^+$), 633.6 ($[M+2H]^{2+}$) e 422.5 ($[M+3H]^{3+}$).

Il Peptide con cisteina N-terminale eluisce a 31.28 min (Figura 1d) e lo spettro di massa corrispondente (Figura 2d) presenta, al contrario degli altri peptidi modello analizzati, solo due segnali, a valori di m/z di 967.6 ($[M+H]^+$) e 484.4 ($[M+2H]^{2+}$).

Le analisi LC/ESI/MS dei campioni di NOC provenienti dalla combustione di motori diesel e a benzina (Figura 3) hanno mostrato un andamento cromatografico simile, caratterizzato da una serie di picchi cromatografici che eluiscono a circa cinque minuti di distanza l'uno dall'altro e corrispondono a sostanze con pesi molecolari progressivamente crescenti all'aumentare del tempo di ritenzione. Come esempio, in Figura 4 sono riportati gli spettri di massa *full scan* di due picchi cromatografici adiacenti, A e B (precedentemente mostrati in Figura 3a). Gli spettri di massa mettono in evidenza che: 1) ogni picco cromatografico contiene più sostanze (M₁ ed M₂, per il picco cromatografico A; M₃ ed M₄, per B); 2) sostanze presenti in picchi adiacenti mostrano un incremento di massa di 44 Da (M₃-M₁ = M₄-M₂ = 44).

Gli spettri di massa di tutti i picchi, presenti nei profili cromatografici degli esausti provenienti sia da motori diesel sia da quelli a benzina, hanno mostrato le stesse caratteristiche di sopra riportate, suggerendo la presenza di sostanze di natura analoga.

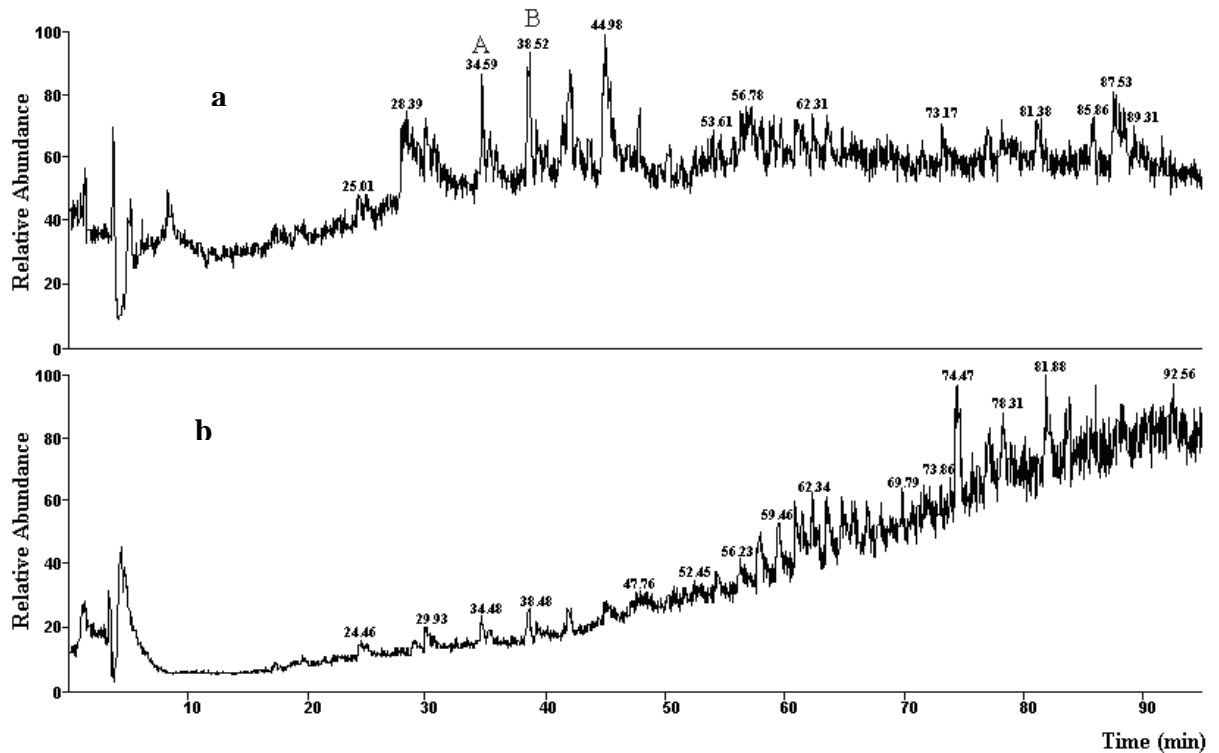


Figura 3: Profili cromatografici relativi all'analisi LC/ESI/MS di soluzioni acquose di NOC provenienti dalla combustione di motori: a) diesel; b) benzina.

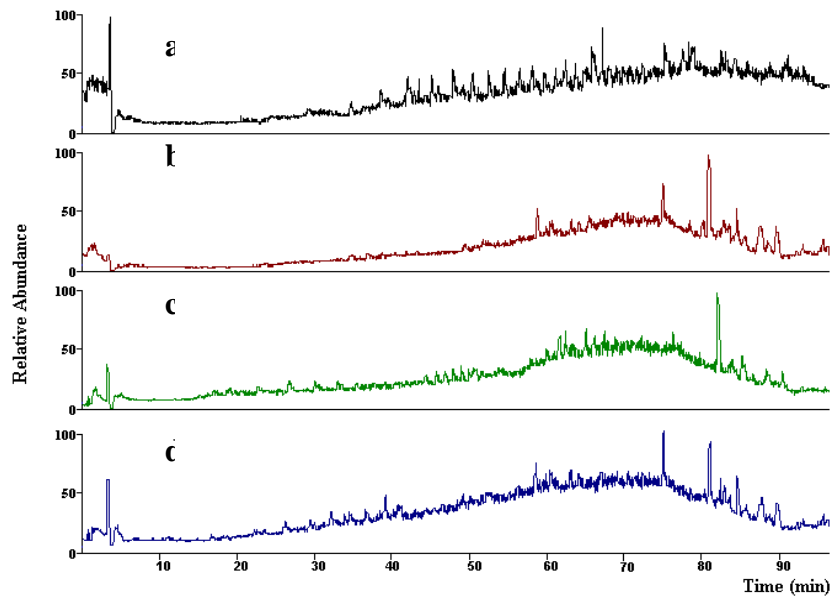


Figura 5: Analisi LC/ESI/MS. Profili cromatografici delle miscele di incubazione del campione di NOC dell'esausto di motori diesel con: a) Angiotensina I; b) Cocksackie B3 Virus Epitope; c) Alloferon 1; d) Peptide sintetico con Cisteina N-terminale.

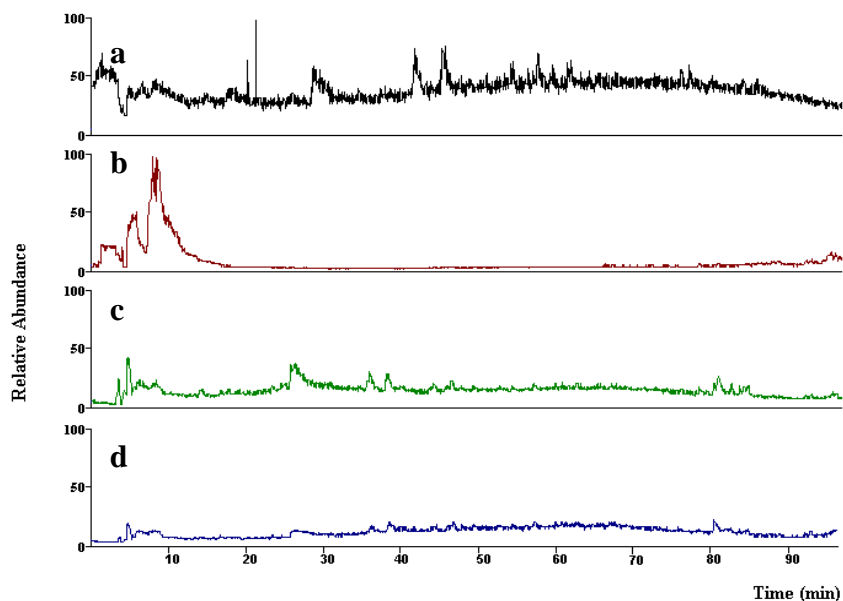


Figura 5: Analisi LC/ESI/MS. Profili cromatografici delle miscele di incubazione del campione di NOC dell'esausto di motori a benzina con: a) Angiotensina I; b) Coxsackie B3 Virus Epitope; c) Alloferon 1; d) Peptide sintetico con Cisteina N-terminale.

Ogni picco cromatografico rappresenta un composto eluito, che può essere identificato mediante l'interpretazione dello spettro di massa relativo. Eventuali alchilazioni del composto in esame comportano uno specifico incremento del peso molecolare dell'analita, pari al peso molecolare del gruppo modificante; pertanto, l'analisi ESI/MS in modalità di acquisizione *full scan* permette la determinazione del numero di molecole di agente alchilante eventualmente legate al peptide.

L'interazione dei NOC con il gruppo nucleofilo N-terminale è stata investigata mediante l'incubazione tra i campioni di NOC (diesel e benzina) con l'Angiotensina I; in entrambi i casi il picco cromatografico relativo al peptide scompare. L'assenza del segnale dell'Angiotensina I sta ad indicare che il peptide modello ha effettivamente interagito con il campione di NOC, ciononostante, il profilo cromatografico dei campioni incubati è

alquanto simile a quello dei campioni di NOC analizzati senza incubazione con alcun peptide. L'unica differenza si riscontra a tempi di ritenzione superiori a 60 minuti, in quanto sono presenti una serie di picchi non ben risolti, a cui corrispondono segnali con pesi molecolari più alti rispetto a quelli che potrebbero essere ipotizzati in caso di formazione di un addotto tra le particelle NOC ed il peptide esaminato. Questi segnali, pertanto, non possono essere attribuiti a un semplice addotto covalente.

L'incubazione dei campioni NOC provenienti dall'esausto di motori diesel e benzina con gli altri peptidi è stata eseguita per verificare le possibili interazioni delle particelle NOC non solo con il gruppo N-terminale, ma anche con i residui amminoacidici di cisteina e di istidina. Anche in questo caso, è stato osservato: 1) la scomparsa dei segnali relativi ai peptidi non modificati; 2) la comparsa di molte sostanze ad alto peso molecolare; 3) la parziale scomparsa, in molti casi, dei picchi cromatografici corrispondenti alle particelle di NOC.

La scomparsa dalle miscele di incubazione dei peptidi ha dimostrato chiaramente l'alta reattività delle particelle NOC. L'interazione NOC-peptide non porta, molto probabilmente, alla formazione di un unico addotto covalente; infatti, ogni peptide potrebbe interagire con ognuna delle numerose sostanze che compongono i NOC, formando un elevato numero di addotti, ognuno presente in piccole quantità difficilmente rivelabili.

Le analisi LC/ESI/MS hanno mostrato, inoltre, non solo la scomparsa dei segnali relativi ai peptidi e alle particelle NOC, ma anche la comparsa di un numero di picchi coeluenti e non ben risolti a tempi di ritenzione più alti. Queste sostanze hanno elevati pesi molecolari e pertanto non è stato possibile identificarli; essi potrebbero derivare da interazioni multiple tra due o più gruppi funzionali contenuti in ogni peptide con le particelle NOC, dando un gran numero di addotti intra- o inter- molecolari ad alto peso molecolare.

In ogni caso, è evidente che le interazioni peptide-NOC sono causa di un incremento significativo in termini di dimensioni del materiale campionato; ciononostante, allo stato attuale delle conoscenze, non è possibile stabilire se tale aumento dimensionale sia dovuto alla formazione di legami chimici o ad interazioni di natura fisica.

Conclusioni

Gli esperimenti condotti hanno evidenziato che i gas di scarico di motori alimentati a gasolio o a benzina contengono una frazione particellare con diametro inferiore ai 4 nm che mostra, in diversi casi, mutagenicità ed elevata reattività delle particelle. I risultati ottenuti evidenziano quindi la necessità di condurre ulteriori indagini in questa direzione al fine di stabilire l'esatta composizione del materiale organico e di individuare un adeguato biomarcatore in grado di rilevare l'esposizione ad emissioni autoveicolari.

BIBLIOGRAFIA

- [1] L.A. Sgro, G. Basile, A.C. Barone, A. D'Anna, P. Minutolo, A. Borghese, A. D'Alessio, *Chemosphere*, **2003**, 51/10, 1079-1090.
- [2] B.M. Vaglieco, S.S. Merola, A. D'Anna, A. D'Alessio, *J. Quantit. Spectr. Rad. Transfer*, **2002**, 73, 443-450.
- [3] A. Borghese, S.S. Merola, *Proc. Combust. Inst.*, **1998**, 27, 2101-2109.
- [4] A. D'Anna, A. Violi, A. D'Alessio, A.F. Sarofim, *Comb. Flame*, **2001**, 127, 1995-2003.
- [5] H.E. Wichmann, C. Spix, T. Tuch, G. Wölke, A. Peters, J. Heinrich, W.G. Kreyling, J. Heyder. *Health Effects Institute*. Cambridge, MA. **2000**.
- [6] D.W. Dockery, C.A. Pope, X. Xu, J.D. Spengler, J.H. Ware, M.E. Fay, B.G. Ferris, F.E. Speizer, *New England J. Med.*, **1993**, 329, 1753-1759.
- [7] C.A. Pope, M.J. Thun, M.M. Namboodiri, D.W. Dockery, J.S. Evans, F.E. Speizer, C.W. Heath, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **1995**, 151, 669-674.
- [8] P. Michelozzi, F. Forastiere, D. Fusco, C.A. Perucci, B. Ostro, C. Ancona, G. Pallotti, *Occupat. Environ. Med.*, **1998**, 55(9), 605-610.

- [9] T. Osunsanya, G. Prescott, A. Seaton, *Occup. Environ. Med.*, **2000**, 58, 154-159.
- [10] G. Oberdörster, Z. Sharp, W. Kreyling, C. Cox, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, *Inhal. Toxicol.*, **2004**, 16(6-7), 437- 445.
- [11] G. Oberdorster, M. Utell, *Env. Health Persp.*, **2002**, 110(8), A440-441.
- [12] J. Seagrave, J.D. McDonald, A.P. Gigliotti, K.J. Nikula, S.K. Seilkop, M. Gurevich, J.L. Mauderly, *Toxicol. Sci.*, **2002**, 70(2), 212-226.
- [13] KL Chu, KM Patel, AH Lin, RE Tarone, MS Linhart, VC, *Mutation Research*, **1981**, 85, 119-132.
- [14] S. Ostermann-Golkar, L. Ehrenberg, D. Segerback, I. Halstrom, *Mutat. Res.*, **1976**, 34, 1-10.
- [15] H.G. Neumann, *Arch. Toxicol.*, **1984**, 54, 1-6.
- [16] N. Miraglia, G. Pòcsfalvi, P. Ferranti, A. Basile, N. Sannolo, A. Acampora, L. Soleo, F. Palmieri, S. Caira, B. De Giulio, A. Malorni, *J. Mass Spectrom.*, **2001**, 36(1), 47-57.
- [17] A. Basile, P. Ferranti, G. Pòcsfalvi, N. Miraglia, L. Soleo, L. Ambrosi, N. Sannolo, A. Malorni, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2001**, 15, 527-540.
- [18] C.J. Calleman, L. Ehrenberg, B. Jansson, S. Ostermann-Golkar, K. Stevenson, C.A. Wachtmeister, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **1978** 2, 427-442.
- [19] V. Carbone, A. Salzano, P. Pucci, I. Fiume, G. Pocsfalvi, N. Sannolo, G. Di Landa, A. Malorni, *J. Pept. Res.*, **1997**, 49(6), 586-595.

- [20] P. Ferranti, V. Carbone, N. Sannolo, I. Fiume, A. Milone, M. Ruoppolo, M. Gallo, A. Malorni, *Carcinogenesis*, **1992**, 13, 1397-1401.