

Variazioni giornaliere dell'escrezione degli acidi mercapturici ed influenza dell'età nel ratto

A. BUNGARO, F. GIOFFRÉ, L. POZZOBON, E. RIZZI, A. TREVISAN^a

RIASSUNTO: È stata valutata l'escrezione urinaria giornaliera degli acidi mercapturici in ratti albini maschi di età differente (da 2 a 4 mesi). Sono state effettuate due raccolte di urina di 12 ore ciascuna, la prima durante il periodo di luce (ore 8-20), la seconda durante il periodo di buio (ore 20-8). Durante il periodo di luce è stata evidenziata una escrezione significativamente più elevata ($p < 0.005$) di tali metaboliti. È stata inoltre osservata una significativa correlazione negativa tra la concentrazione urinaria degli acidi mercapturici e l'età dell'animale, migliore durante il periodo di luce ($r = -0.821$), rispetto al periodo di buio ($r = -0.680$). (A. BUNGARO, F. GIOFFRÉ, L. POZZOBON, E. RIZZI, A. TREVISAN. Variazioni giornaliere dell'escrezione degli acidi mercapturici ed influenza dell'età nel ratto. *Progr Med Lab* 1987;3:219-221).

PAROLE CHIAVE: Acidi mercapturici · Variazione giornaliera · Età

ABSTRACT: Urinary diurnal excretion of the mercapturic acids was evaluated in Albino male rats of different age. Two samples of urines were collected long a period of 12 hours each, the former during the light period (8 am-8 pm), the latter during the dark period (8 pm-8 am). A significant higher excretion of the mercapturic acids during the light period was observed ($p < 0.005$). A significant negative correlation between urinary mercapturic acids excretion and age of the rats was shown, better during the light period ($r = -0.821$) than the dark period ($r = -0.680$). (A. BUNGARO, F. GIOFFRÉ, L. POZZOBON, E. RIZZI, A. TREVISAN. Diurnal variation of the mercapturic acids excretion and age dependence in the rat. *Progr Med Lab* 1987;3:219-221).

KEY WORDS: Mercapturic acids · Diurnal variation · Age

Introduzione

Gli acidi mercapturici (o tioeteri) sono prodotti di escrezione della coniugazione di sostanze reattive elettrofile come gli epossidi con gruppi nucleofili del glutatione per mezzo di transferasi specifiche. L'escrezione degli acidi mercapturici è correlata all'assorbimento da parte dell'organismo di sostanze reattive (cosiddette alchilanti), principalmente di natura chimica^{1,6}, ma anche alimentare⁷. È stata inoltre dimostrata una significativa correlazione tra il fumo di tabacco (n. sigarette/die) e l'escrezione urinaria di tali metaboliti⁸. La valutazione della concentrazione dei tioeteri nell'urina è stata proposta come integrante la batteria di test per il monitoraggio biologico delle sostanze mutagene e/o cancerogene.

Nell'uomo ne è stata dimostrata una notevole variazione intra ed interindividuale⁹, imputabile verosimilmente alla dieta e/o a fattori ambientali extraprofessionali (fumo, in particolare).

Nel corso di studi sperimentali sul metabolismo di alcune sostanze tossiche, abbiamo osservato nel ratto variazioni giornaliere della concentrazione urinaria degli acidi mercapturici; è stato inoltre osservato come l'età dell'animale ne influenzi la concentrazione urinaria. Nel presente lavoro abbiamo voluto pertanto evidenziare le variazioni giornaliere dell'escrezione urinaria degli acidi mercapturici ed il comportamento di tale metabolita in rapporto all'età.

Materiali e Metodi

20 ratti maschi, albini, Wistar (S. Morini, S. Polo d'Enza, RE), del peso variante da 230 a 405 g (età compresa tra 2 e 4 mesi), sono stati stabulati individualmente in gabbie metaboliche (S. Morini) per 24 ore, mantenuti a dieta standard (Nuova Zoofarm, Padova), abbeverati ad libitum e con ritmo luce/buio di 12 ore. Le urine sono state raccolte in contenitori

^a Istituto di Medicina del Lavoro, Università degli Studi, Padova

Corrispondenza a: Dr. A. Trevisan, Istituto di Medicina del Lavoro, Università degli Studi, via Facciolati 71, 35127 Padova

Lavoro giunto in Redazione il 15-01-1987

immersi in un bagno di ghiaccio e ai quali era stata preventivamente aggiunta una punta di spatola di acido L-ascorbico come antiossidante. I campioni sono stati raccolti ogni 12 ore e gli acidi mercapturici sono stati immediatamente dosati col metodo di Sperduto et al.¹⁰ da noi modificato¹¹. Tale metodo determina la concentrazione dei gruppi -SH mediante la reazione colorimetrica di Ellman¹². Il coefficiente di variazione nel nostro laboratorio è di $\pm 3\%$.

I valori ottenuti sono stati corretti per la concentrazione della creatinina, determinata con Kit commerciale (Boehringer, Mannheim, FRG) ed espressi in mmol di -SH/mmol di creatinina.

Le determinazioni spettrofotometriche sono state effettuate con uno spettrofotometro Perkin-Elmer modello 550 (Norwalk, Conn., USA).

L'analisi statistica è stata eseguita col test t per dati appaiati e col calcolo del coefficiente di correlazione lineare "r".

Risultati

In Tabella I sono riportati i valori medi della concentrazione urinaria degli acidi mercapturici determinati nel campione del periodo ore 8-20 ed in quello del periodo ore 20-8. È evidente una escrezione urinaria significativamente maggiore di coniugati cisteinici ($p < 0.005$) nel periodo 8-20.

Tab. I - Variazione giornaliera dell'escrezione degli acidi mercapturici con le urine.

Ore	N. animali	mmol-SH/mmol creatinina	p
8-20	20	0.27 \pm 0.09	< 0.005
20-8	20	0.22 \pm 0.04	

La Figura 1 presenta la correlazione tra l'escrezione urinaria di acidi mercapturici e l'età dell'animale (valutata mediante il peso) nei due periodi di prelievo considerati. La stretta correlazione esistente tra invecchiamento e riduzione dell'escrezione urinaria degli acidi mercapturici è messa in evidenza dal buon coefficiente di correlazione lineare "r". Tale correlazione è migliore nel periodo 8-20 ($r = -0.821$) rispetto al periodo 20-8 ($r = -0.680$).

Discussione

Beck et al.¹³ dimostrano l'esistenza di un ritmo circadiano del glutathione ridotto nel fegato di ratti e topi; la concentrazione epatica del glutathione era più

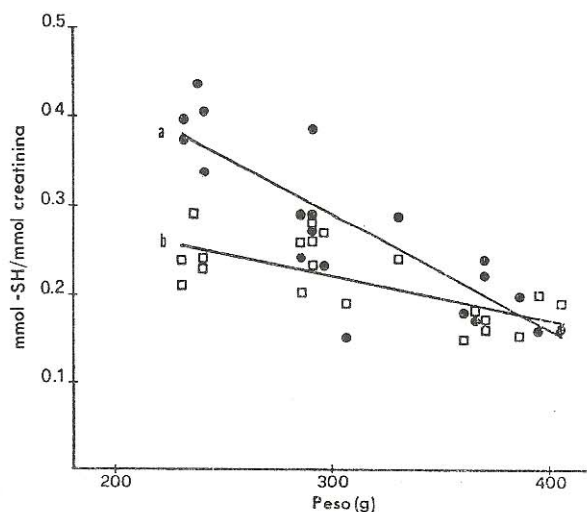


Fig. 1 - Correlazione tra l'età (valutata mediante il peso) e l'escrezione urinaria di acidi mercapturici nel ratto: a) ● ore 8-20 ($y = -0.0013x + 0.68$; $r = -0.821$; $p < 0.001$); b) □ ore 20-8 ($y = -0.0005x + 0.37$; $r = -0.680$; $p < 0.001$).

elevata la notte (ore 4) e al mattino presto (ore 8) e più bassa nel tardo pomeriggio (ore 20), con un massimo di variazione del 25-30%. Ciò appare verosimilmente in rapporto al fatto che i ratti assumono più cibo durante la notte che non durante il giorno e l'importanza del ruolo dell'alimentazione è dimostrato dal fatto che, in condizioni di digiuno per 1-2 giorni, il livello del glutathione ridotto epatico può ridursi del 50-70%^{14,16}.

I nostri risultati dimostrano che l'escrezione urinaria degli acidi mercapturici, i quali necessitano del glutathione ridotto per formarsi durante il processo di coniugazione, segue un ritmo circadiano apparentemente opposto a quello del glutathione ridotto epatico. Tali risultati tengono però conto di un periodo di 12 ore, con inizio della prima raccolta (ore 8) nel momento della massima concentrazione epatica del glutathione ridotto disponibile per la coniugazione e della seconda (ore 20) in quello di minima concentrazione. Considerando il tempo necessario al compiersi dell'intero processo metabolico (circa 9 ore nel ratto), appare verosimile un opposto andamento tra concentrazione del glutathione ridotto nel fegato ed acidi mercapturici nelle urine.

È noto che generalmente la capacità metabolica epatica diminuisce con l'età. I nostri risultati dimostrano che l'escrezione urinaria degli acidi mercapturici va incontro ad una significativa riduzione con l'età. La correlazione tra riduzione di metaboliti coniugati e aumento dell'età appare particolarmente stretta. Ciò fa ritenere una correlata riduzione della capacità coniugativa del sistema GSH-glutation-S-transferasi.

Conclusioni

Quanto rilevato appare, in ipotesi, di notevole interesse data l'importanza che riveste tale fase metabolica nella detossificazione delle sostanze alchilanti, suggerendo una maggior suscettibilità dei soggetti più anziani all'azione mutagena e/o cancerogena di tali sostanze che largamente sono rappresentate, oltre che nell'ambiente di lavoro, anche nell'atmosfera e negli alimenti.

Bibliografia

1. van Doorn R, Bos RP, Brouns RME, Leijdekkers Ch-M, Henderson PTh. Effect of toluene and xylenes on liver glutathione and their urinary excretion as mercapturic acids in the rat. *Arch Toxicol* 1980;43:293-304.
2. van Doorn R, Borm PJA, Leijdekkers Ch-M, Henderson PTh, Reuvers J, van Bergen TJ. Detection and identification of S-methylcysteine in urine of workers exposed to methyl chloride. *Int Arch Occup Environ Health* 1980;46:99-109.
3. Kilpikari I. Correlation of urinary thioethers with chemical exposure in a rubber plant. *Br J Ind Med* 1981;38:98-100.
4. Lafuente A, Mallol J. Thioethers in urine during occupational exposure to tetrachloroethylene. *Br J Ind Med* 1986;43:68-9.
5. Scutter-Berlage F, van Dorp HL, Kosse HGJ, Henderson PTh. Urinary mercapturic acid excretion as a biological parameter of exposure to alkylating agents. *Int Arch Occup Environ Health* 1977;39:45-51.
6. Vainio H, Savolainen H, Kilpikari I. Urinary thioether of employers of a chemical plant. *Br J Ind Med* 1978;35:232-4.
7. Aringer L, Hogstedt C, Svensson E, Lidums V, Wranke R. Evaluation of some factors affecting determination of thioethers in urine. *Int Sem on Methods of Monitoring Human Exposure to Carcinogenic and Mutagenic Agents*, Espoo, Finland. 12th-15th Dec 1983.
8. van Doorn R, Bos RP, Leijdekkers Ch-M, Wagenaas-Zegers MAP, Theuws JLG, Henderson PTh. Thioethers concentration and mutagenicity of urine from cigarette smokers. *Int Arch Occup Environ Health* 1979;43:159-66.
9. Trevisan A, Sarto F, Raimondi M. Rilievi critici sul monitoraggio biologico dell'esposizione ad agenti alchilanti mediante i tioeteri urinari. *Atti 48° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale*, Pavia 18-21 Settembre 1985:1295-9.
10. Sperduto B, Gianello G, La Bua R, et al. Tioeteri urinari in lavoratori di una fabbrica di pneumatici. Prime risultanze analitiche. *Atti 46° Congresso Nazionale della Società Italiana di Medicina del Lavoro e Igiene Industriale, Acireale (CT) - Noto (SR) 28 Settembre-1 Ottobre 1983:589-602.*
11. Rizzi E, Pozzobon L, Gioffré F, Bungaro A, Trevisan A. Influenza del pH dopo idrolisi alcalina nella determinazione colorimetrica dei tioeteri urinari. *Progr Med Lab* (in stampa).
12. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* 1959;82:70-7.
13. Beck LV, Rieks VP, Duncan B. Diurnal variation in mouse and rat liver sulfhydryl. *Proc Soc Exp Biol Med* 1959;97:229-31.
14. Leaf G, Neuberger A. The effect of diet on the glutathione content of the liver. *Biochem J* 1947;41:280-7.
15. Maruyama E, Kojima J, Higashi T, Sakamoto Y. Effect of diet on liver glutathione and glutathione reductase. *J Biochem* 1968;63:398-9.
16. Tateishi N, Higashi T, Shinya S, Naruse A, Sakamoto Y. Studies on the regulation of glutathione level in rat liver. *J Biochem* 1974;75:93-103.