

VALUTAZIONE DEI LIVELLI DEI METALLI PESANTI NEL SANGUE, NEL PLASMA SEMINALE E NEGLI SPERMATOZOI DI SOGGETTI IN ETA' FERTILE IN UN'AREA AD ELEVATO RISCHIO AMBIENTALE DELLA SICILIA SUD-ORIENTALE

Maria Altomare^{1,2}, Lucia O. Vicari^{1,3}, Maria Fiore⁴, Margherita Ferrante⁴, Rosita A. Condorelli¹, Sandro La Vignera¹, Fabio Garrone¹, Linda Iacoviello^{1,3}, Salvatore Zafarana¹, Salvatore Sciacca⁴, Rosario D'Agata¹, Aldo E. Calogero¹, Enzo Vicari¹

¹Sezione di Endocrinologia, Andrologia e Medicina Interna, Dipartimento di Medicina Interna e Patologie Sistemiche, ²Dottorato di Ricerca in Scienze Andrologiche e della Riproduzione Umana, ³Dottorato di Ricerca in Medicina Sperimentale Clinica e Fisiopatologia Cellulare, ⁴Dipartimento "G.F. Ingrassia" Igiene e Sanità Pubblica, Università di Catania

Introduzione

Il ruolo dei metalli pesanti quali "endocrine disruptors" (EDs) è stato ampiamente dimostrato. Nel corso di questi anni, numerosi studi *in vitro* ed *in vivo* hanno dimostrato l'effetto nocivo dei seguenti metalli pesanti Pb, Cd, Hg, As, Ni sulla salute riproduttiva maschile e/o sui parametri spermatici (1-13). L'esposizione a basse dosi è un fenomeno ubiquitario che si verifica in seguito alla contaminazione degli alimenti, delle acque e dell'aria. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare i livelli di Pb, Cd, Hg, As e di Ni nel sangue e nel seme in toto di soggetti residenti in un'area ad elevato rischio ambientale della Sicilia Sud-Orientale.

Materiali e metodi

Lo studio è stato condotto nell'area urbana di Melilli, facente parte del triangolo industriale Priolo-Augusta-Melilli nella Sicilia Orientale, dichiarato di "interesse nazionale" (Art. 1- L. 426/98), poiché situato in "un'area ad elevato rischio di crisi ambientale" (D.L. 30 Novembre 1990).

I soggetti residenti a Melilli, di età compresa tra 20 e 46 anni, sono stati invitati a partecipare senza alcun criterio di esclusione. Coloro che hanno acconsentito allo studio sono stati sottoposti a visita, prelievo ematico e raccolta di liquido seminale. Ai fini del presente studio, i seguenti parametri spermatici sono stati presi in esame: a) convenzionali (criteri WHO 1999): concentrazione, conta nemespermica totale, motilità progressiva e morfologia nemespermica; b) non convenzionali mediante citometria a flusso: potenziale di membrana mitocondriale, grado di compattazione della cromatina, esternalizzazione della fosfatidilserina e frammentazione del DNA.

Un'aliquota di campione seminale è stata utilizzata per la misurazione dei livelli di Pb, Cd, Hg, As, Ni, sia nel plasma seminale che negli spermatozoi. Gli stessi metalli sono stati valutati nel

sangue intero. La determinazione dei metalli è stata effettuata utilizzando la tecnica analitica spettrofotometria di massa (ICP-MS Elan DRC-e Perkin Elmer), previa digestione acida tramite mineralizzatore a microonde (Start-D Milestone), per quel che riguarda i campioni ematici, mentre con sola digestione acida per i campioni di plasma seminale e di spermatozoi. La determinazione del mercurio è stata effettuata mediante spettrofotometria in assorbimento atomico associata alla tecnica dei vapori freddi (AAAnalist 800, Perkin Elmer, e FIAS 100, Perkin Elmer). Per la valutazione dei metalli nel sangue sono stati assunti i seguenti valori di riferimento (14): Pb \leq 400 μ g/l; Cd \leq 5 μ g/l; Hg \leq 5 μ g/l; As 1-12 μ g/l; Ni 0.5-4 μ g/l.

Lo studio è stato approvato dal Comitato Etico dell’Azienda Ospedaliero-Universitaria “Policlinico-Vittorio Emanuele”, Catania, e i soggetti sono stati inclusi nello studio dopo aver fornito un consenso informato scritto.

Risultati

In totale sono stati reclutati 96 soggetti, con un’età media (\pm SEM) di 33.2 \pm 0.6 anni. Fra essi, 36 (37.5%) hanno dichiarato di essere fumatori, mentre 11 (11%) di assumere sostanze stupefacenti; 41 (42.7%) soggetti erano esposti per motivi professionali (polo industriale). I principali parametri spermatici convenzionali e non convenzionali ed il numero di soggetti in cui essi sono risultati alterati sono riportati nella Tab. 1.

Tabella 1. Parametri spermatici principali e numero di soggetti in cui essi sono risultati alterati.

Parametri convenzionali (WHO 1999)	Media\pmSEM	Mediana	Numero di soggetti con parametri alterati
Densità (mil/ml) (\geq 20)	94,8 \pm 6,1	94,5	11 (11,4%)
Spermatozoi totali (mil/eiaculato) (\geq 40)	286,2 \pm 18,9	305,2	7 (7,3%)
Motilità progressiva (%) (\geq 50)	29,8 \pm 1,6	30,0	80 (83,3%)
Forme normali (%) (\geq 30)	17,6 \pm 0,6	17,0	89 (92,7%)
Parametri non convenzionali			
Basso potenziale di membrana mitocondriale (%) (0-11.9)	23,9 \pm 2,7	12,8	46 (51,1%)
Compattazione della cromatina (%) (8.5-18.9)	19,2 \pm 0,7	17,7	38 (40,9%)
Esternalizzazione della fosfatidilserina (%) (0.7-10.7)	5,5 \pm 0,8	2,5	14 (15,0%)
Frammentazione del DNA (%) (0.1-4.6)	2,3 \pm 0,2	1,9	9 (10,0%)

Valori di riferimento in parentesi.

Sono state riscontrate concentrazioni ematiche elevate di Ni nel 69.8%, Hg nel 53.1%, As nel 20.8% e Cd nel 2.1%; 2 o più metalli sono risultati elevati nel 45.8% dei soggetti esaminati. Le concentrazioni dei metalli pesanti determinate nel plasma seminale, pur non disponendo di valori di riferimento in questa matrice biologica, si attestavano su concentrazioni più elevate (assumendo come valori-soglia quelli ematici accettati in letteratura) in una percentuale variabile di soggetti: in ordine decrescente, Ni che è risultato elevato in 38 casi (39.6%), Cd in 14 casi (14.6%), As in 6 (6.2%), Pb in 4 (4.2%) e Hg in 2 (2.1%).

La distribuzione, dal 50° percentile al valore massimo, delle concentrazioni dei singoli metalli per ogni comparto biologico (sangue, plasma seminale e spermatozoi) è riportata nella Tab. 2. I valori evidenziati in grigio esprimono concentrazioni di tossicità al di sopra del limite di

riferimento. In particolare, nel sangue Hg e Ni mostrano valori elevati già dai valori di mediana in poi, a differenza di quanto accade per Cd e As che mostrano livelli di tossicità solo come valore massimo (Cd) o di 95° percentile e valore massimo (As). Nel plasma seminale, il Ni mostra livelli elevati dai valori di 75° percentile in poi, a differenza di quanto accade per Cd e As che mostrano livelli di tossicità solo dal valore di 95° percentile in poi, e per il Pb che mostra livelli di tossicità solo come valore massimo essendo stati registrati solo in 1 caso. Negli spermatozoi, non hanno superato mai i livelli di riferimento.

Tabella 2. Distribuzione delle concentrazioni dei metalli pesanti nei vari compartimenti biologici esaminati.

	Mediana	75°	95°	Max
Piombo (Pb)				
Sangue	9.9	14.4	30.9	62.1
Plasma seminale	22.8	42.3	268.4	616.9
Spermatozoi	0.003	0.014	0.058	0.144
Cadmio (Cd)				
Sangue	0.2	0.5	1.6	23.8
Plasma seminale	1.2	2.5	17.1	32.2
Spermatozoi	0.0005	0.0005	0.0005	0.0005
Mercurio (Hg)				
Sangue	5.5	10.1	30.3	121.5
Plasma seminale	0.6	0.6	4.1	9.8
Spermatozoi	0.0005	0.0005	0.0105	0.0319
Arsenico (As)				
Sangue	7.6	10.9	90.3	129.3
Plasma seminale	2.8	5.3	12.4	59.8
Spermatozoi	0.0005	0.0063	0.0216	0.0751
Nichel (Ni)				
Sangue	12.2	22.6	116.2	491.0
Plasma seminale	1.3	8.5	21.3	35.7
Spermatozoi	0.0002	0.0002	0.022	0.15

In grigio, valori che superano i limiti soglia a livello ematico.

Conclusioni

Dall'analisi dei dati emerge che, nella popolazione in esame, vi è un'elevata percentuale di astenozoospermia e di anomalie morfologiche nemaspermiche. Inoltre, un'elevata percentuale di soggetti presenta alterazioni mitocondriali e della cromatina degli spermatozoi.

La presenza di concentrazioni di Pb e Cd più elevate nel plasma seminale rispetto a quelle ematiche, a differenza degli altri metalli pesanti esaminati, suggerisce una condizione di esposizione cumulativa a queste due sostanze. Tale osservazione, unitamente al riscontro di considerevoli percentuali di soggetti con elevati livelli di Ni e Cd nel plasma seminale, sottolinea l'importanza

dell'utilizzo di una matrice quale il plasma seminale per studiare la contaminazione da tossici ambientali.

Studi successivi mireranno a valutare l'impatto delle abitudini derivanti dallo stile di vita sui livelli dei metalli pesanti, e come questi ultimi si correlino con le alterazioni spermatiche osservate.

Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano la Fondazione Frisone e il Comune di Melilli per l'opera di sensibilizzazione e di promozione del progetto Ambiente e Salute, nell'ambito del quale è stato svolto questo studio. Lo studio è stato in parte supportato da un finanziamento della Fondazione Frisone (progetto "Ambiente e Salute").

Bibliografia

1. Benoff S *et al.* Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum Reprod Update* 2000;6:107-21.
2. Choy CM *et al.* Relationship between semen parameters and mercury concentrations in blood and in seminal fluid from subfertile males in Hong Kong. *Fertil Steril* 2002;78:426-8.
3. Dawson EB *et al.* Comparison of sperm viability with seminal plasma metal levels. *Biol Trace Elem Res* 1998;64:215-9.
4. De Rosa M *et al.* Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod* 2003;18:1055-61.
5. Jurasović J *et al.* Semen quality and reproductive endocrine function with regard to blood cadmium in Croatian male subjects. *Biometals* 2004;17:735-43.
6. Hernández-Ochoa I *et al.* Low lead environmental exposure alters semen quality and sperm chromatin condensation in northern Mexico. *Reprod Toxicol* 2005;20:221-8.
7. Meeker JD *et al.* Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant. *Environ Health Perspect* 2008;116:1473-9.
8. Pant N *et al.* Lead and cadmium concentration in the seminal plasma of men in the general population: correlation with sperm quality. *Reprod Toxicol* 2003;17:447-50.
9. Telisman S *et al.* Semen quality and reproductive endocrine function in relation to biomarkers of lead, cadmium, zinc and copper in men. *Environ Health Perspect* 2000;108:45-53.
10. Telisman S *et al.* Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environ Res* 2007;105:256-66.
11. Nordberg GF. Effects of long-term cadmium exposure on the seminal vesicles of mice. *J Reprod Fertil* 1975;45:165-7.
12. Xu DX *et al.* The associations among semen quality, oxidative DNA damage in human spermatozoa and concentrations of cadmium, lead and selenium in seminal plasma. *Mutation Res* 2003;534:155-63.

13. Danadevi K et al. Semen quality of Indian welders occupationally exposed to nickel and chromium. *Reprod Toxicol* 2003;17:451-6.
14. Italian Society of Reference Values. 4th National Congress. *G Ital Med Lav Ergon* 2003;25-113.