

Valutazione della potenza relativa delle nitrosammine

Frida Bushati

ASST Grande Ospedale Metropolitano Niguarda

Le *N*-nitrosammine, comunemente chiamate nitrosammine, sono composti a cui siamo esposti quotidianamente attraverso diverse fonti. Dal punto di vista chimico, le nitrosammine sono composti organici caratterizzati dalla presenza del gruppo $N=O$ legato all'atomo di azoto di un'ammina generalmente secondaria o terziaria.

Gli esseri umani sono esposti alle nitrosammine da fonti ambientali, nonché dalla sintesi endogena. Le nitrosammine e/o i loro precursori possono essere presenti in diversi prodotti di consumo come il fumo di tabacco, le carni lavorate, le verdure, le bevande alcoliche, i cosmetici e i medicinali. Le nitrosammine possono anche formarsi nel tratto gastrointestinale superiore se il cibo contiene precursori della nitrosammina, come nitrati o nitriti. Nell'ambiente fortemente acido dello stomaco, i nitriti

aggiunti al cibo o presenti in natura (o quelli che derivano dalla conversione dei nitrati) possono essere convertiti in acido nitroso (HNO_2), che a sua volta è in grado di dissociarsi e legarsi alle ammine (presenti in alimenti ricchi di proteine) dando origine alle nitrosammine.

Recentemente, la presenza di impurità di nitrosammine in alcuni medicinali è stato motivo di particolare preoccupazione. Questo ha portato a un richiamo di numerosi prodotti e ad una revisione dell'UE, che stabiliva nuovi rigorosi requisiti di produzione per questi medicinali.

L'attenzione verso queste sostanze è dovuta al fatto che alcune nitrosammine sono cancerogene. La loro cancerogenicità è stata descritta per la prima volta nel 1956, quando John Barnes and Peter Magee, due scienziati inglesi, dimostrarono che una di queste

sostanze, la dimetilnitrosammina (NDMA), provocava tumori del fegato nei ratti.

Della cancerogenicità delle nitrosammine si è discusso anche al 16° Congresso Internazionale di Tossicologia, tenutosi a Maastricht dal 18 al 21 settembre 2022, attraverso il poster “*Integrated Hazard Assessment of the Carcinogenic Potency of N-Nitroso Compounds*”. Il poster presentava i risultati di un progetto di tesi di laurea in SAXBI sulla valutazione della potenza cancerogena di 5 nitrosammine in relazione alle due nitrosammine più studiate, dietilnitrosammina (NDEA) e dimetilnitrosammina (NDMA). Quest’ultime vengono prese come punto di riferimento dalle Agenzie regolatorie per stabilire il livello massimo di assunzione tollerabile per diverse impurità di nitrosammine, alcune delle quali con differenze importanti di potenza cancerogena. In quest’ottica, in base a quanto indicato dall’ICH M7 (R1) si è provato a calcolare il limite di assunzione tollerabile delle nitrosammine in esame.

Inoltre, valutando la potenza relativa e analizzando i dati di mutagenicità e cancerogenicità, assieme alla valutazione *in silico* della similarità, si è cercato di valutare quanto NDMA e NDEA possano effettivamente essere un valido termine di riferimento per la maggior parte delle nitrosammine.

Dopo una prima ricerca e analisi dei dati di mutagenicità e cancerogenicità di decine di nitrosammine in PubChem, PubMed, CPDB e nelle pubblicazioni ivi contenute sono stati selezionati cinque composti: difenilnitrosammina (NDPhA), 2,2,2-trifluorodietilnitrosoammina

(3F-NDEA), dietanolnitrosoammina (NDELA), nitrosoefedrina (NEP) e nitrosoazetidina (NAZ). Naturalmente le molecole sono state selezionate considerando la robustezza degli studi in merito. In quanto alla potenza cancerogena invece, i TD50 sono stati presi dal *Carcinogenic Potency Database* (CPDB) e anche in questo caso tutti derivanti da studi robusti.

Per quanto riguarda l’approccio *in silico*, è stato fatto un tentativo con Toxtree-v3.1.0.1851. Come previsto, a causa del gruppo nitroso presente in tutte le nitrosammine, si sono verificati *structural alerts* per *Salmonella thyphimurium* mutagenicity e *Micronucleus chromosomal aberrations*. Sempre in riferimento all’approccio *in silico*, è stato effettuato un confronto di ciascuna delle cinque molecole con NDMA e NDEA calcolando la *Pairwise Similarity* basata sul coefficiente di Tanimoto utilizzando il software ChemTunes.ToxGPS. Il coefficiente di Tanimoto varia da 0 a 1, dove 1 ha la similarità maggiore.

Il passo successivo del lavoro è stato l’analisi dei dati raccolti. Le nitrosammine sono composti che per esercitare i loro effetti mutageni e cancerogeni richiedono attivazione metabolica. Soprattutto per le nitrosammine altamente mutagene e cancerogene questo avviene via alfa idrossilazione con formazione degli ioni diazonio che successivamente reagiscono con il DNA dei tessuti bersaglio. Durante l’analisi dei dati sono stati studiati i meccanismi di attivazione metabolica per la mutagenicità di ciascuna nitrosammina e le caratteristiche strutturali che influenzano la potenza. Esistono diverse caratteristiche che possono

determinare la potenza cancerogena tra cui, il grado di sostituzione del carbonio alfa, presenza di gruppi elettron-attrattori o gruppi β -idrossile, la solubilità del composto, le dimensioni e la forma, ma anche la lunghezza della catena.

Per valutare la potenza relativa delle nitrosammine sono stati utilizzati i TD50 raccolti. Sappiamo che minore è il TD50, maggiore è la potenza cancerogena. Assegnando 1, come grado di potenza cancerogena alla più potente (NDEA), è stato stabilito il grado relativo (potenza) di tutte le nitrosammine considerate: NDEA > NDMA > 3F-NDEA > NDELA > NAZ > NEP > NDPhA.

Si nota che la potenza relativa delle nitrosammine si estende su quattro ordini di grandezza. In tal senso, per quelle nitrosammine con sufficienti

robusti dati di cancerogenicità è possibile calcolare l'assunzione tollerabile secondo l'approccio raccomandato da ICH M7 (R1) che consiste nell'utilizzare il TD50, come punto di partenza. Ad esempio, per NDELA, che ha un TD50 di 3,17 mg per chilogrammo per peso corporeo al giorno, facendo un'estrapolazione lineare, risulta che la dose giornaliera totale per l'uomo è di 3,2 microgrammi al giorno. Questa risulta essere molte volte superiore alla dose raccomandata per NDEA e NDMA, spesso utilizzate per definire i limiti di altre nitrosammine. In conclusione, considerando l'analisi dei dati di mutagenicità, cancerogenicità e potenza cancerogena, è abbastanza ragionevole dedurre che NDEA e NDMA potrebbero non essere un valido termine di riferimento per la maggior parte delle N nitrosammine.

