

ALCUNI ASPETTI PROBLEMATICI NELLA VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI TOSSICI PER UOMO ED AMBIENTE

A.R. Bucchi

Istituto Superiore di Sanità

Roma

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni si è potuta constatare una maggiore attenzione di organismi nazionali ed internazionali ai problemi ambientali in genere ed, in particolare, ai riflessi negativi dei guasti ambientali sulla salute umana. L'iniziativa dell'OMS "Targets for health for all by the year 2000" che si prefigge per l'Europa del 2000 il traguardo della "salute per tutti", mediante la riduzione delle disuguaglianze sanitarie internazionali e nazionali ed il rafforzamento degli aspetti sanitari a vari livelli, è indubbiamente tra le più significative.

A questa iniziativa si collega la promozione da parte dell'OMS di una maggiore considerazione della componente "salute" nella valutazione di impatto ambientale dei progetti di sviluppo, in una prima fase, e successivamente l'estensione della valutazione sanitaria di impatto ambientale ai prodotti di consumo (giocattoli, cosmetici, prodotti detergenti, ecc.) ed alle politiche di sviluppo energetico, agricolo e di trasporto urbano (v. relazione nel presente rapporto di Stern, Girault).

Nel campo della valutazione di impatto ambientale di progetti di sviluppo industriale, questo fine può essere raggiunto solo attraverso una dettagliata analisi degli effetti sulla salute e sicurezza delle comunità umane coinvolte dal progetto. La valutazione del rischio tossicologico (inteso come prodotto di esposizione per effetti) è uno degli strumenti più importanti atti allo scopo.

Nell'analisi di un processo industriale, è infatti fondamentale avere una completa valutazione dei possibili rischi per la salute determinati, non solo da materie prime coinvolte, prodotti intermedi e finali, ma anche da impurità e residui presenti nei prodotti, sostanze indirettamente coinvolte nel processo, sostanze suscettibili di formarsi per processi di combustione, surriscaldamento o per eventi probabili. I dati tossicologici disponibili, od eventualmente prodotti su richiesta delle autorità competenti, risultano estremamente utili per una valutazione dei possibili rischi da esposizione professionale o ambientale, della possibile contaminazione di aria, acqua e cibo e talvolta possono rappresentare un utile strumento per la selezione di processi tecnologici alternativi che comportino un minor rischio per la salute.

Il recepimento della direttiva CEE 79/831 sulle nuove sostanze chimiche rappresenta certamente un passo importante per la prevenzione degli "effetti avversi" per uomo ed ambiente. Le tabelle 1, 2 e 3 riportano i test tossicologici ed ecotossicologici (a breve, medio e lungo termine) obbligatoriamente richiesti dalla direttiva comunitaria per livelli di produzione della sostanza (0, 1 e 2) corrispondenti rispettivamente a 1 t/anno, 100 t/anno o 500 t di produzione totale (facoltativi per 10 t/anno o 50 t di produzione totale) e 1000 t/anno o 5000 t di produzione totale.

I test tossicologici ed ecotossicologici riportati nelle tabelle rappresentano un'utile guida alla tossicità intrinseca di una sostanza e consentono l'identificazione di possibili modalità di azione sull'uomo e sull'ambiente.

Tabella 1. STUDI TOSSICOLOGICI PRESCRITTI DALLA DIRETTIVA CEE 79/831 AL LIVELLO 0 (1 t/anno)

STUDI TOSSICOLOGICI
Tossicità acuta su roditori (per almeno 2 vie di somministrazione scelte tra orale, inalatoria e cutanea) Irritazione cutanea su coniglio Irritazione oculare su coniglio Sensibilizzazione cutanea su cavia Tossicità subacuta (28 giorni) su roditori Mutagenicità (inclusi i test di pre-screening di cancerogenesi)
STUDI ECOTOSSICOLOGICI
Tossicità acuta su pesce Tossicità acuta su Daphnia Degradazione biotica ed abiotica (BOD e BOD/COD)

Tabella 2. STUDI TOSSICOLOGICI PRESCRITTI DALLA DIRETTIVA CEE 79/831 AL LIVELLO 1 (100 t/anno o 500 t di produzione totale)

STUDI TOSSICOLOGICI RICHIESTI IN AGGIUNTA A QUELLI DEL LIVELLO 0
Studi di fertilità su una generazione (1 specie e via di esposizione più appropriata) Teratogenicità su roditori (1 specie e via di somministrazione più appropriata) Tossicità subcronica e/o cronica su roditori (1 specie e via di somministrazione più appropriata) Mutagenicità (ulteriori studi inclusi i test per lo screening di cancerogenesi)
STUDI ECOTOSSICOLOGICI RICHIESTI IN AGGIUNTA A QUELLI DEL LIVELLO 0
Inibizione della crescita algale (su una specie) Tossicità prolungata (21 giorni) su Daphnia Magna Test su piante superiori Test su lombrichi Tossicità prolungata (14 giorni) su pesce Test di bioaccumulazione su pesce Studio di biodegradazione prolungata

Tabella 3. STUDI TOSSICOLOGICI PRESCRITTI DALLA DIRETTIVA CEE 79/831
AL LIVELLO 2 (1000 t/anno o 5000 t di produzione totale)

STUDI TOSSICOLOGICI RICHIESTI IN AGGIUNTA AL LIVELLO 1
Studi di tossicità cronica su roditori Studi di cancerogenesi Studi di fertilità su tre generazioni Studi di teratogenicità su specie non-roditori Studi di tossicità acuta e subacuta su una seconda specie Studi di tossicocinetica
STUDI ECOTOSSICOLOGICI RICHIESTI IN AGGIUNTA AL LIVELLO 1
Ulteriori studi di accumulo, degradazione e mobilità Studi di tossicità prolungata su pesce (inclusa la riproduzione) Ulteriori studi di tossicità (acuta e subacuta) su uccelli (se fattore di bioaccumulo > 100) Ulteriori studi su altri organismi Studi di adsorbimento-desorbimento (se sostanza non particolarmente degradabile)

Gli studi di tossicità acuta, ad esempio, sono rilevanti per la predizione di potenziali effetti su esseri umani esposti in modo accidentale a dosi quasi letali. I risultati di questi studi possono essere un utile strumento per definire procedure di pronto soccorso e/o efficaci terapie di intervento.

I test di tossicità a breve termine e medio termine sono validi strumenti nell'evidenziare effetti tossici più particolari, possibili effetti di tossicità cumulativa e la reversibilità degli effetti al cessare dell'esposizione. Scopo di questi test è l'identificazione di potenziali pericoli per l'uomo in seguito ad esposizioni di media durata (2-6 anni di esposizione umana rispettivamente per 28 - 90 giorni di esposizione della specie ratto).

I test di tossicità cronica assumono invece estrema importanza nello stabilire il possibile rischio umano, più in particolare il rischio cancerogeno, per esposizioni a lungo termine a basse dosi di contaminanti ambientali. In tale situazione, risulta chiaro che sostanze ad elevata persistenza ambientale o che si concentrano nella biosfera, e che possono quindi interessare larghi segmenti della popolazione, rappresentino una reale preoccupazione.

Relativamente poi ai possibili effetti tossici sull'ambiente conseguenti all'immissione/emissione di sostanze pericolose, i test ecotossicologici condotti su pesce, Daphnia o alcune specie algali, pur non essendo sufficientemente rappresentativi della composizione ambientale, possono contribuire in maniera consistente alla definizione dei possibili rischi per l'esistenza, lo sviluppo e la riproduzione degli ecosistemi coinvolti.

Tuttavia, ogni volta che si deve valutare il rischio tossicologico per uomo ed ambiente, esistono una serie di aspetti problematici che può essere utile evidenziare.

PREDITTIVITA' DEI MODELLI SPERIMENTALI

I modelli predittivi sperimentali, pur essendo un passo necessario per la valutazione della innocuità di una determinata sostanza per uomo, vita selvatica ed ecosistemi ambientali, presentano una serie di limitazioni. La predittività dei modelli sperimentali dipende molto spesso da una serie di fattori che riguardano gli individui esposti: caratteristiche genetiche, stato nutrizionale, condizioni di salute e circostanze ambientali di esposizione.

I test tossicologici riportati nelle Tabelle 1, 2 e 3 sono di norma condotti sulle specie animali più sensibili e caratterizzate da un metabolismo il più simile possibile all'uomo, su individui sani appartenenti a ceppi geneticamente omogenei e stabulati in controllate condizioni ambientali e di alimentazione. E' chiaro che esperimenti condotti in tale situazione abbiano un potere predittivo molto limitato nei confronti di particolari individui o gruppi a rischio presenti nella popolazione umana. Basti pensare agli individui geneticamente predisposti ad una maggiore suscettibilità ad agenti tossici o cancerogeni, alle persone sotto stress o trattate con farmaci immunosoppressori o semplicemente malate, ai bambini ed agli anziani normalmente presenti nella popolazione generale (tutte queste categorie vengono escluse dai possibili benefici derivanti da questo tipo di sperimentazione). Nel caso della sensibilizzazione cutanea si osserva invece una situazione opposta; numerose volte la cavia, animale estremamente sensibile, manifesta reazioni allergiche a sostanze che non hanno alcun potere allergenico per l'uomo (i falsi positivi non sono rari).

La scelta del modello sperimentale può essere condizionata, oltre che dalla analogia fisiologica con l'uomo, da fattori logistici quali stabulazione, approvvigionamento, capacità di riproduzione, velocità di accrescimento e sviluppo, possibilità di trattamento nelle condizioni sperimentali richieste e tempo di vita sufficientemente breve (2-3 anni massimo per i roditori) da consentire la facile osservazione dei possibili effetti conseguenti ad esposizioni sperimentali croniche, corrispondenti ad esposizioni croniche dell'uomo.

Recenti studi hanno evidenziato che per quanto riguarda la cancerogenesi sperimentale, i test condotti su animali da laboratorio concordano abbastanza bene con i risultati di studi epidemiologici, cioè che le sostanze caratterizzate da qualche evidenza epidemiologica per l'uomo, mostrano una sufficiente evidenza di cancerogenesi sugli animali da esperimento (Dybing, 1986) e che la maggior parte dei test di cancerogenesi è stata positivamente condotta sulle specie topo e ratto (83% e 61% dei 23 cancerogeni classificati dallo IARC nel gruppo 1 di rischio) (Bucchi et al., 1988a).

Molto spesso, poi, la valutazione sperimentale del rischio tossicologico riguarda la singola sostanza o composto, trascurando le possibili interazioni (effetti additivi, moltiplicatori e di potenziamento) che si possono presentare nella popolazione generale, normalmente esposta a cocktail di contaminanti. Tale molteplicità di esposizione ambientale

è anche responsabile dell'estrema difficoltà (in alcuni casi impossibilità) di definizione per la popolazione generale di un nesso causale tra esposizione ambientale ad una determinata sostanza o classe di sostanze ed effetti riscontrati nella popolazione.

VIE E LIVELLI DI ESPOSIZIONE

Da un punto di vista tossicologico la via di esposizione, o via di ingresso di contaminanti nell'organismo, è un fattore determinante nella manifestazione e modulazione degli effetti. E' infatti ben noto come una sostanza tossica testata per diverse vie di esposizione possa agire in modi estremamente diversi sull'organismo determinando, ad esempio, effetti locali, al sito di esposizione, o sistemici che si manifestano solo dopo assorbimento e distribuzione del tossico nell'organismo; in quest'ultimo caso gioca un ruolo fondamentale la velocità di assorbimento che può variare considerevolmente a seconda della via di esposizione (velocità di assorbimento decrescente per inalazione, via orale e cutanea). Il caso degli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) può rappresentare un utile esempio; i dati attualmente disponibili indicano che tali sostanze sono in grado di indurre tumori sperimentali per via cutanea, al sito di contatto, e per via inalatoria (tumori polmonari), mentre non sembrano interagire chiaramente con l'organismo se somministrati per via orale.

Anche se uno dei criteri generalmente adottati nella scelta della via di esposizione sperimentale fa riferimento alla possibile via di esposizione umana, variabili specifiche correlate alla via di esposizione, quali ad esempio la velocità di assorbimento, il possibile sito di azione, i processi di biotrasformazione e la suscettibilità di specie diverse in base alla via di esposizione dovrebbero essere considerate (WHO, 1978).

La conoscenza del tipo di biotrasformazione (detossificazione o tossificazione) di una sostanza chimica, prima che giunga a contatto di specifici siti di azione, è fondamentale per la previsione dei possibili effetti derivanti da varie vie di esposizione. E' ad esempio chiaro che piccole dosi orali od intraperitoneali di sostanze a tossicità primaria (o diretta), assorbite e trasportate attraverso la circolazione portale, possono essere agevolmente detossificate nel fegato, impedendo così il raggiungimento di concentrazioni dannose ai siti bersaglio, contrariamente a ciò che accade a livello di cute e polmoni dove le capacità di detossificazione sono invece piuttosto limitate.

Altro aspetto problematico è quello della dose o livello di esposizione; con tale termine in genere si intende la quantità di sostanza chimica somministrata (generalmente espressa per unità di peso corporeo); tuttavia nella maggioranza dei processi di assorbimento il trasporto attraverso membrana è incompleto e la dose assorbita e realmente efficace sul bersaglio (effective dose) rappresenta solo una frazione della dose somministrata (applied dose). Tuttavia quando il sito di azione tossica è situato o è

prossimo al sito di applicazione (ad es. danno cutaneo) la dose tissutale può essere stimata in modo abbastanza affidabile, mentre quando il sito è distante (es. cellula epatica) la stima di dosi tossicologicamente attive diviene meno affidabile.

Ad oggi, la stragrande maggioranza delle stime di rischio tossicologico sono basate sulla dose o livello di esposizione che ha lo svantaggio di non considerare sicure differenze metaboliche tra specie, possibili differenze nelle reazioni metaboliche ad alte e basse dosi, e di non differenziare tra composto iniziale e suoi metaboliti o combinazione di tossici.

La pressante esigenza di una stima della dose realmente efficace, della dose responsabile dell'effetto tossico sul bersaglio, spinge la moderna ricerca tossicologica verso una maggiore e puntuale conoscenza dei meccanismi di assorbimento, distribuzione, accumulo, biotrasformazione ed escrezione del composto originario e/o dei suoi metaboliti ed allo sviluppo ed introduzione nella stima quantitativa del rischio di dati metabolici, farmacocinetici e di legame macromolecolare che consentano, sulla base della comparazione dei processi fisiologici in specie diverse, una stima ottimale del rischio per l'uomo.

EFFETTO E RISPOSTA

Effetto e risposta sono due termini che molto spesso vengono utilizzati come sinonimi per indicare un cambiamento biologico in un individuo od una popolazione, associato ad una esposizione o dose. Più esattamente si indica col primo termine un cambiamento biologico mentre il termine risposta sta ad indicare la frazione della popolazione che manifesta un determinato effetto.

Problematico e controverso risulta, in quest'ambito, definire un effetto come avverso o non-avverso poichè alcune variazioni fisiologiche possono rimanere in un range di normalità e talvolta è molto difficile distinguere un cambiamento fisiologico da un danno funzionale e/o morfologico. Un range di "normalità" può in genere essere stabilito sulla base dei valori osservati in un gruppo di individui presumibilmente sani, espresso statisticamente dall'intervallo compreso nel 95% dei limiti di confidenza della media o, per i singoli individui, nel 95% dei limiti di tolleranza stabiliti con un certo grado di confidenza (WHO,1978). Se però guardiamo alla popolazione generale, composta da individui eterogenei a diversa suscettibilità (bambini, adulti, anziani e donne in stato di gravidanza) la possibilità di definire un range di normalità diviene molto problematica. Tuttavia la semplice analisi statistica dei dati ed il confronto col gruppo di controllo non è sufficiente da sola a stabilire la distinzione tra effetto avverso e non-avverso, ma necessita concomitanti considerazioni biologiche. Ad esempio un cambiamento biologico che, pur rimanendo all'interno del range di normalità, persista per un periodo considerevole al cessare dell'esposizione o che in condizioni di stress funzionale o biochimico vada al di là dei valori di normalità deve essere considerato come danno.

La differenziazione tra effetto avverso e non-avverso richiede quindi una considerevole conoscenza dei cambiamenti reversibili e delle sottili variazioni funzionali e/o lesioni patologiche che possono interferire col normale funzionamento dell'organismo e che possono influire sulle capacità di adattamento a possibili sollecitazioni addizionali (per es. lo stress). A titolo esemplificativo, una semplice ipertrofia epatica ed induzione di enzimi microsomiali va considerata come un semplice adattamento omeostatico mentre un minore accrescimento corporeo per la presenza di elevati livelli di contaminanti nel cibo o un diminuito consumo di cibo a causa della non palabilità del cibo sono dei normali processi fisiologici.

In tutto questo, non va sottovalutata la possibilità di non evidenziare il danno per problemi legati alla programmazione sperimentale, quali numero inadeguato di animali trattati o tempo di osservazione troppo limitato.

Altri due aspetti importantissimi da considerare nella valutazione del rischio per uomo ed ambiente sono la reversibilità ed irreversibilità degli effetti. Per definizione, gli effetti reversibili sono quelle deviazioni dalla normale struttura o funzione che, al cessare dell'esposizione, rientrano nel range di normalità; sono invece dette irreversibili quelle alterazioni che persistono o possono progredire anche al termine dell'esposizione, come nel caso dei tumori maligni, malformazioni, mutazioni nella prole di animali esposti, alcune malattie neurologiche croniche, cirrosi ed enfisema. Molto spesso, poi, la reversibilità può essere spesso funzione dell'esposizione, cioè reversibile se l'esposizione è di breve durata e/o a basse concentrazioni, irreversibile per elevate concentrazioni e/o per tempi di esposizione a più lunga durata.

Il grado di reversibilità può essere facilmente testato per via sperimentale prevedendo, nei test tossicologici a breve e medio termine, un gruppo sperimentale satellite, trattato con la dose massima di somministrazione e mantenuto per un certo periodo (15 giorni o più, a seconda dei casi) nelle condizioni sperimentali, con sospensione del trattamento, per verificare la regressione della patologia ed il ritorno alle condizioni di normalità.

RELAZIONI DOSE-EFFETTO, DOSE-RISPOSTA E SOGLIE DI TOSSICITA'

Uno degli scopi principali dei test tossicologici è la definizione della relazione dose-effetto o dose-risposta, cioè la relazione esistente tra dose e magnitudo di un effetto graduato su un individuo o una popolazione o tra la dose e la proporzione di individui di una popolazione che rispondono con un determinato effetto.

Nella programmazione sperimentale è necessario che la numerosità delle dosi e dei gruppi sperimentali sia scelta in funzione della significatività statistica dei risultati; un minimo di 4-5 dosi, ad esempio, può essere un buon punto di partenza per una minima stima quantitativa di rischio tossicologico. Condizione ideale, per una buona definizione

della relazione dose-risposta è che il numero delle dosi di trattamento sia maggiore nella regione delle basse dosi rispetto a quella delle alte e che la numerosità nei gruppi sperimentali sia più elevata alle basse dosi dove la frequenza di risposta attesa è più bassa.

Nell'analisi statistica dei dati è inoltre necessario puntare l'attenzione non solo sul confronto statistico a coppie tra dosi scalari di trattamento e gruppo di controllo, ma anche a tutto l'andamento ed alla significatività del trend sia per gli effetti irreversibili che per i reversibili. La caratterizzazione del tipo di relazione (lineare, sublineare o sopralineare, mediante procedure matematiche e statistiche) fornisce preziose informazioni sui possibili rischi in funzione della dose. E' chiaro che ciascuna relazione dose-risposta sarà caratteristica delle specifiche condizioni sperimentali in cui è stata determinata e che pur operando sulla stessa specie animale e stessa sostanza, una variazione delle condizioni sperimentali (p. es. distribuzione della dose nel tempo) può determinare variazioni nell'andamento della curva.

La soglia di tossicità è un concetto strettamente legato alla relazione dose-effetto e dose-risposta; inoltre è sempre opportuno distinguere tra soglia per l'individuo, per un limitato gruppo di individui o per la popolazione generale.

In genere i tossici (convenzionali e non) sono caratterizzati da una stretta dipendenza tra dose ed effetto o risposta, ed in linea di principio l'intensità di effetto o risposta diminuisce al decrescere della dose e, talvolta, la reazione biologica raggiunge lo zero (o la reazione del gruppo di controllo) prima che la dose sia uguale a zero; in altre parole al di sotto di un certo limite di esposizione o dose, cioè al di sotto della soglia, un tossico può non determinare alcun effetto o risposta.

L'esistenza di una soglia di effetto è molto dibattuta in campo scientifico; alcuni autori hanno ad esempio prodotto dati che dimostrano che piccole dosi di tossici ambientali possono non raggiungere il sito bersaglio grazie alla velocità di eliminazione o alla degradazione metabolica che risultano più efficaci ai piccoli dosaggi, oppure che l'esistenza di efficaci sistemi di riparo consente, seppure in caso di interazione tossico-recettore, la non comparsa di effetti tossici.

Nel caso di effetti tossici di tipo stocastico (neoplasie e mutazioni) si è invece assunto da parte di altri autori che una singola molecola che raggiunga il bersaglio sia sufficiente ad attivare un processo che può progressivamente condurre alla comparsa del danno anche se altri asseriscono che i cancerogeni e mutageni pur avendo speciali proprietà, riguardo a natura e caratteristiche del danno, sono soggetti alle stesse interazioni fisico-chimiche e biologiche che determinano la presenza di una dose soglia per le altre sostanze chimiche. Tuttavia le difficoltà insite nella determinazione di una soglia in una vasta popolazione di individui eterogenei e variamente suscettibili e l'impossibilità di dimostrare sperimentalmente livelli privi di effetto non devono essere ignorate; infatti, all'interno di un gruppo sperimentale, una dose può apparire priva di effetto per varie ragioni:

- perchè la dose è realmente al di sotto del no-effect-level (NEL) teorico;
- il numero di animali del gruppo in questione è troppo limitato, oppure
- il tempo di osservazione è troppo limitato (potrebbe essere questo il caso della mancata comparsa di tumori che generalmente richiedono, per manifestarsi, un lungo periodo di latenza).

Il concetto di soglia è quindi strettamente legato al no-effect-level (NEL) o meglio denominato no-observed-effect-level (NOEL), valore sperimentale statisticamente derivato, stimato con un intervallo di confidenza del 95% e quindi con una probabilità del 5% che il valore stimato possa essere un errore. Inoltre, nel caso in cui si voglia osservare su un gruppo di 100 animali un effetto tossico che si manifesti nell'1% dei casi, è bene tener presente che in più di 1/3 dei casi è possibile non osservare alcun effetto. Le cose si complicano ulteriormente quando lo stesso effetto compaia nel gruppo di controllo, allora le speranze di poterlo identificare in gruppi a limitata numerosità campionaria divengono sempre più remote.

Inoltre, è opportuno evidenziare come un NOEL a sé stante abbia in realtà un valore limitato e non risulti di per sé sufficiente alla definizione di una soglia di effetto qualora non sia accompagnato dal supporto della stima del lowest-observed-adverse-effect-level (LOAEL) (Federal Register, 1980), che consente di valutare fino a che punto il NOEL stimato sia vicino e rappresenti la soglia di effetto. Potrebbero infatti verificarsi casi in cui il NOEL stimato sia molto al di sotto della soglia di effetto (anche di qualche ordine di grandezza); in tale caso la presenza del LOAEL può dare utili indicazioni sulla reale soglia di effetto o altrimenti sulla scelta delle dosi nella programmazione di successive sperimentazioni.

E' chiaro che, parimenti a quanto avviene nella relazione dose-effetto o dose-risposta, il NOEL stimato sarà specifico delle determinate condizioni sperimentali che lo hanno prodotto; che la variazione di anche uno solo dei fattori sperimentali (specie, ceppo, tempo di esposizione, ecc.) determinerà una variazione più o meno consistente del NOEL e che all'interno della sperimentazione si dovrà analizzare un NOEL per ciascuna relazione dose-effetto considerata. La "safe dose" o dose corrispondente ad un rischio praticamente trascurabile per l'uomo dovrà quindi essere stabilita sulla base dell'analisi globale dei NOEL sperimentali, della tipologia e gravità del danno, e della sensibilità della specie. Tale processo di valutazione richiede normalmente il giudizio scientifico di esperti che consenta, a seguito di ampio dibattito, la distinzione tra effetti avversi e non, la definizione e la scelta di un NOEL di effetto per l'animale, che sarà successivamente utilizzato per la definizione di una dose "ragionevolmente protettiva" per la salute umana.

ESTRAPOLAZIONE ANIMALE-UOMO

L'estrapolazione dei dati sperimentali dall'animale all'uomo si scontra normalmente con due problemi principali:

- estrapolazione dei risultati dalle alte alle basse dosi
- estrapolazione interspecie animale-uomo.

Il primo tipo di estrapolazione è reso necessario dal fatto che gli studi sperimentali sono normalmente condotti con dosi sperimentali più elevate dei livelli ambientali e quindi con un'incidenza di danno superiore a quella accettabile nell'uomo (lo stesso problema si presenterebbe tuttavia anche quando si ricorresse, come punto di partenza, a dati di esposizioni accidentali umane o a dati epidemiologici), al fine di evidenziare una risposta positiva in gruppi sperimentali piuttosto limitati nella numerosità campionaria. Infatti, il numero di animali utilizzato negli esperimenti di tossicità è generalmente piccolo se paragonato alla dimensione della popolazione umana potenzialmente coinvolta.

L'estrapolazione interspecie è invece un passo determinato dalla possibilità di prevedere attraverso la sperimentazione animale i possibili effetti tossici sull'uomo grazie alla similarità anatomico-fisiologiche esistenti tra le specie mammifere. Le differenze di sensibilità tra uomo ed altre specie animali sono prevalentemente imputabili a differenze quantitative nelle risposte tossiche e solo eccezionalmente a differenze qualitative. Non sempre, però, l'animale è più sensibile dell'uomo; ad esempio, nel caso di atropina, morfina e nicotina, l'uomo è da 100 a 350 volte più sensibile delle specie animali. Relativamente alla sensibilità all'azione cancerogena di alcune sostanze, il topo presenta una maggiore sensibilità rispetto al ratto per cloruro di vinile monomero, percloroetilene e cloroformio, mentre il ratto è più sensibile del topo all'aflatossina.

Frequentemente è possibile riscontrare una diversa sensibilità in ceppi della stessa specie. La diversa sensibilità ai tossici di specie e ceppi diversi è determinata, essenzialmente, dal differente destino delle sostanze chimiche nell'organismo ed è imputabile a differenze quali-quantitative nei processi di biotrasformazione e nella diversa velocità di assorbimento, trasporto, distribuzione ed eliminazione dei tossici e, quindi, ad una diversa relazione tra dose diretta di esposizione e concentrazione al sito bersaglio.

Quanto sopra esposto fa comprendere quanto sia importante considerare le differenze metaboliche animale-uomo, relative ad una determinata sostanza, al momento della selezione del modello sperimentale; purtroppo, nel caso di nuove sostanze chimiche, l'assenza di informazioni metaboliche rappresenta un considerevole handicap.

L'intero processo di estrapolazione animale-uomo è indubbiamente affetto da un consistente livello di incertezza di ordine biologico e matematico-statistico; tuttavia è un utile strumento per la valutazione della tossicità delle sostanze prima della loro immissione nell'ambiente, del loro contatto con l'uomo e della produzione di possibili danni. Tale

incertezza colpisce indifferentemente sia le stime di rischio per tossici convenzionali (caratterizzati da soglia di tossicità e reversibilità di effetti), che si avvalgono dell'uso del NOEL e del fattore di sicurezza per stabilire una dose o livello di esposizione virtualmente sicura per l'uomo, che la valutazione di rischio per i tossici genotossici o cancerogeni (caratterizzati invece da irreversibilità degli effetti, assenza di soglia e lungo periodo di latenza) dove invece si ricorre all'uso di modelli matematici di estrapolazione a basse dosi e all'uso di fattori di conversione interspecie, per stimare il rischio associato a bassi livelli di esposizione o le dosi corrispondenti a determinati livelli di incremento di rischio (10^{-5} , 10^{-6} o 10^{-7}).

a) Estrapolazione per tossici convenzionali

Come già accennato in precedenza, i problemi principali risiedono nell'uso del NOEL e del fattore di sicurezza (FS). Nel paragrafo relativo alle soglie di tossicità si è già discusso ampiamente a proposito delle problematiche del NOEL, generalmente legate all'interpretazione di un effetto come avverso o non avverso, alla programmazione sperimentale ed alla significatività biologico-statistica dei dati. Il NOEL scelto per la definizione della dose accettabile o tollerabile sarà quello stimato sulla specie più sensibile, tuttavia quando non sia possibile stimare il NOEL dai dati sperimentali disponibili, si può ricorrere, in via provvisoria, all'uso del LOAEL ed all'applicazione di un fattore di sicurezza maggiore rispetto al previsto (in genere 1000). E' evidente che l'apporto di nuovi dati sperimentali o la stima di un NOEL a concentrazioni più basse, comporterà una rivalutazione, sulla base dei nuovi risultati, degli standard già stabiliti.

L'introduzione del FS, fattore arbitrario derivante da valutazioni complesse e talora soggettive, ha lo scopo di supplire alle incertezze di estrapolazione animale-uomo, in particolare a quelle legate al passaggio da un piccolo gruppo, geneticamente omogeneo di animali da laboratorio, ad un grande gruppo, altamente eterogeneo quale la popolazione umana, con individui geneticamente predisposti o con aumentata suscettibilità.

Pur essendo questa procedura di estrapolazione continuamente utilizzata a livello nazionale ed internazionale, per stabilire gli Acceptable Daily Intake (ADI), i Tolerable Daily Intake (TDI) ed i vari standard di qualità dell'aria, acqua e suolo, è piuttosto raro trovare una precisa linea guida sulla scelta dell'entità del FS. La scelta di tale valore dipende in genere da fattori quali:

- natura dell'effetto,
- dimensione e tipo della popolazione da proteggere,
- quantità e qualità dell'informazione tossicologica disponibile.

Invece, agenzie quali l'OMS (1978) e l'EPA (1980) (v. Tabella 4) hanno stabilito dei criteri di scelta del FS che possono rappresentare un utile punto di riferimento.

Tabella 4. CRITERI EPA PER LA SCELTA DEL FATTORE DI SICUREZZA (FS)
(Federal Register, 1980).

<p>FS = 10 - Validi risultati sperimentali da studi di ingestione sull'uomo ed assenza di cancerogenicità.</p> <p>FS = 100 - Non disponibilità di dati o insufficienti risultati sperimentali di ingestione umana (p. es. solo esposizione acuta), validi risultati di studi a lungo termine per via orale su animali da esperimento, o in assenza di studi umani, validi studi su una o più specie animali. Nessuna indicazione di cancerogenicità.</p> <p>FS = 1000 - Nessun dato umano di tossicità a lungo termine o acuta. Insufficienti risultati di sperimentazione animale con nessuna indicazione di cancerogenicità.</p>

b) Estrapolazione per agenti genotossici e cancerogeni

Nel caso di tali sostanze, la non accettabilità di una soglia di effetto impedisce l'uso del NOEL e del FS. Si ricorre pertanto all'uso dei modelli matematici per l'estrapolazione a basse dosi e ad un fattore di conversione nel passaggio animale-uomo che tenga conto di alcuni parametri biologici caratteristici di ciascuna specie.

Più che le caratteristiche dei singoli modelli matematici impiegati nell'estrapolazione a basse dosi, facilmente rintracciabili in letteratura (Federal Register, 1980, 1984; Food Safety Council, 1980), sembra opportuno menzionare alcuni problemi connessi a questa procedura.

Il processo di estrapolazione a basse dosi è caratterizzato da un significativo livello di incertezza, legato a diversi fattori:

- incertezza dei dati,
- limitatezza numerica dei campioni,
- incertezza nella selezione del modello ottimale,
- incertezza nel fitting del modello.

I primi due fattori e l'incertezza del fitting del modello sono direttamente correlati alla qualità del disegno sperimentale. Dell'importanza del disegno sperimentale (numero di animali e di gruppi sperimentali) si è già discusso a proposito delle relazioni dose-effetto e dose-risposta, tuttavia in quest'ambito è opportuno evidenziare come un carente disegno sperimentale possa condurre all'erronea o mancata identificazione di un trend (ad esempio identificazione di un trend lineare come sublineare) e di conseguenza alla possibile sottostima dei valori di rischio calcolati sulla base di quel trend. Uno studio teorico di simulazione, condotto per analizzare l'incertezza statistica dei metodi di estrapolazione a basse dosi (Lupi et al., 1986) ha inoltre evidenziato che un incremento del numero di dosi di trattamento può migliorare significativamente l'efficienza sperimentale rispetto al semplice incremento del numero di soggetti su pochi gruppi sperimentali.

L'incertezza nella selezione del modello ottimale rappresenta, poi, un punto cruciale: infatti l'assenza di un'opinione definitiva sui meccanismi di cancerogenesi rende difficile una selezione "a priori" di un modello matematico "vero" rappresentativo delle relazioni dose-risposta che si va ad analizzare. Esistono diversi modelli matematici, tutti basati su ragionevoli assunzioni teoriche e talvolta due o più modelli matematici, il cui adattamento ai punti sperimentali è ugualmente buono o non differente in modo statisticamente significativo, può condurre a stime di rischio a basse dosi significativamente diverse (le differenze possono raggiungere anche diversi ordini di grandezza) (Zapponi et al., 1986).

L'insieme di queste incertezze richiede necessariamente un approccio cautelativo alle stime del rischio cancerogeno (parimenti a quanto deve avvenire per i tossici convenzionali). Un considerevole numero di studi, condotti negli anni più recenti, hanno consentito un considerevole miglioramento delle procedure di estrapolazione a basse dosi e la definizione di adeguate procedure conservative per prevenire significative sottostime dei rischi valutati mediante estrapolazione a basse dosi. Il "Multistage linearizzato" (Federal Register, 1980), che ricorre all'uso del limite di confidenza superiore della componente lineare del modello Multistage (assunzione di un comportamento sempre lineare per basse dosi ed assenza di una soglia) è forse la procedura al momento più utilizzata.

Tuttavia, mentre tale procedura stima con sufficiente cautela il rischio da andamenti lineari o sublineari, risulta non idonea a descrivere andamenti curvilinei di tipo sopralineare. In questi casi, al decrescere della dose, il rischio decresce più lentamente di un andamento lineare, quindi una stima di rischio effettuata con un modello che può assumere solo andamenti lineari o sublineari porterebbe ad una sottostima del rischio, anche di diversi ordini di grandezza. In questo caso la semplice introduzione nel modello Multistage di una funzione della dose d ($f(d)$ - nel caso particolare della funzione di Michaelis-Menten) (Gehring et al., 1979; Anderson et al., 1980) che tenga conto dei possibili processi metabolici cui sottostà la sostanza (ad esempio fenomeni di attivazione metabolica per i cancerogeni secondari), determina un miglior adattamento ai dati sperimentali e quindi una migliore stima del rischio cancerogeno.

L'extrapolazione interspecie viene generalmente effettuata in termini di dose equivalente animale-uomo, riferita al peso corporeo o alla superficie corporea ($D_u = D_a \cdot P_u/P_a$ dove D_u e D_a sono le dosi a rischio per uomo ed animale, rispettivamente, e P_u e P_a il parametro umano e animale: peso o superficie corporea).

La riproducibilità delle stime di rischio è un altro problema cruciale; recenti studi di confronto di relazioni dose-risposta plurime relative a cloruro di vinile monomero, sodio saccarina e diclorometano, prodotte da sperimentatori diversi, hanno mostrato una elevata riproducibilità delle stime, non solo tra esperimenti, specie e ceppi diversi, ma anche nelle stime ottenute da relazioni dose-risposta di tumori di diversa gravità, in diversi organi bersaglio e su sessi diversi (i limiti di confidenza superiore della componente lineare K_1 erano praticamente confrontabili) (Zapponi e Bucchi, 1987, Zapponi et al., 1988).

Altro aspetto problematico è quello degli agenti promotori; grande è la discussione sulla presenza o meno di una soglia di effetto per queste sostanze. Studi recentemente condotti nel nostro Istituto su un certo numero di promotori sembrano indicare che mentre si può ipotizzare una soglia di effetto o risposta nella relazione dose-tempo di alcune di queste sostanze, ciò non sia ipotizzabile per la relazione dose-risposta in quanto miglioramenti del disegno sperimentale dei test di cancerogenesi rendono possibile l'identificazione della presenza di una seppur piccola componente lineare (Bucchi et al., 1988b). Inoltre, l'analisi comparata di trattamenti con solo promotore o iniziatore+promotore mostrano nel confronto delle relazioni dose-risposta (per lo stesso tipo di tumore) che non solo si verifica un innalzamento della frequenza di risposta, ma anche un totale cambiamento della forma della curva con passaggio, per la sodio saccarina, da un andamento sublineare (somministrazione di solo promotore) ad uno sopralineare (pretrattamento con iniziatore) (Zapponi et al., 1986; Bucchi et al., 1988b). In termini di rischio ciò vuol dire il ribaltamento del trend a basse dosi, con il passaggio da una situazione di lento incremento del rischio al crescere della dose, ad una di rapido incremento al crescere della dose con l'ipotesi di una azione selettiva del promotore su un pool di cellule già iniziate, fino ad una saturazione del fenomeno di promozione alle alte dosi. Se ricollegato alla normale situazione di esposizione della popolazione umana, tale quadro dovrebbe fare riflettere sulla incongruenza di dibattere l'ipotesi di una soglia di cancerogenicità per i promotori, quando invece questi sembrano esercitare una pressione selettiva su cellule già iniziate dell'organismo esposto a cocktail di cancerogeni ambientali, determinando andamenti rischio molto più pericolosi del semplice andamento lineare.

CONCLUSIONI

Risulta chiaro, da quanto analizzato e discusso, che la valutazione degli effetti tossici per uomo ed ambiente è un esercizio estremamente complesso, problematico ed affetto da considerevole livello di incertezza. Tuttavia un approccio cautelativo che, valutando tutti i possibili aspetti, giunga alla stima di una ipotesi conservativa che comprenda la maggior parte delle possibili situazioni reali (limite di confidenza del 95%), è indispensabile e sembra essere l'unica via ragionevole ed attuabile al momento.

E' chiaro che una migliore progettazione sperimentale, nuove conoscenze sulle differenze interspecie relative alle biotrasformazioni e alla tossicocinetica delle sostanze chimiche, l'integrazione di modelli sperimentali in vivo e in vitro, lo studio dei possibili meccanismi d'azione cancerogena e del legame al DNA, la considerazione di parametri farmacocinetici nelle stime di rischio cancerogeno e, non ultimo, lo studio delle possibili interazioni tra tossici sono elementi indispensabili alla riduzione delle incertezze biologico-statistiche che attualmente accompagnano il processo del risk assessment tossicologico.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON M. W. et al. (1980). - A general scheme for the incorporation of pharmacokinetics in low dose risk estimation for chemical carcinogenesis: example vinyl chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 154.
- BUCCHI A.R. et al. (1988a). Animal species and strains used to test chemical carcinogens: results of a preliminary study. *Biomed. Environ. Sci.* 1, 171-183.
- BUCCHI A.R. et al. (1988b). Dose-response relationships in rodents of promoter carcinogens: a tentative interpretation of some down-ward trends. *Biomed. Environ. Sci.* 1, 184-193.
- Direttiva CEE 79/831 (1979). Direttiva CEE sulle nuove sostanze chimiche.
- DYBING E. (1986). Predictability of human carcinogenicity from animal studies. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 6, 399.
- Federal Register (1980). EPA - Water quality criteria documents: availability. *U.S. Federal Register* 45 (231), 79318.
- GEHRING P.J. et al., (1979). Risk of angiosarcoma in workers exposed to Vinyl chloride as predicted from studies in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 49, 15.
- LUPI C. et al. (1986). Low-dose extrapolation and computer simulation in risk assessment procedures for carcinogenic compounds. In: *Physics in environmental and biomedical research*. Onori & Tabet eds. p. 477-480.
- STERN R. & E. GIROULT (1989). *Environmental & Health Impact Assessment for Consumer Products, Development Projects and Development Policies* (v. articolo 1 di questo lavoro).
- ZAPPONI G.A. et al., (1986). Procedures for quantitative risk assessment for environmental carcinogens: some critical considerations. In: *Environmental Quality and Ecosystem Stability*. Vol III A/B. Bar-Ilan University Press. Dubinsky & Steinberger Ed., 631-640.
- ZAPPONI G.A. & BUCCHI A.R. (1987). Diclorometano: analisi matematico-statistica del rischio cancerogeno legato a particolari usi della sostanza (caffè decaffeinato e lacche per capelli). *Rapporto ISTISAN 87/51*, pp.49.
- ZAPPONI et al. (1988). Reproducibility of low-dose extrapolation procedure: comparison of estimates obtained using different rodent species and strains. *Biomed. Envir. Sci.* 1, 160-170.
- WHO (1978). Principles and methods for evaluating toxicity of chemicals. Part 1. *Environmental Health Criteria* n. 6. Geneva.