

Relazioni tra il livello di rischio coronarico quale espresso da una selezione di 36 fattori ed il rischio di altre condizioni morbose

A. MENOTTI e S. CONTI

Laboratorio di Epidemiologia e Biostatistica, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Riassunto. - Trentasei fattori di rischio coronarico o condizioni supposte tali sono stati valutati con analisi univariata e multivariata allo scopo di selezionare un numero minimo di essi capaci di predire, nel modo migliore, la comparsa di una cardiopatia coronarica fatale nel pool di due popolazioni rurali Italiane costituite da 1712 uomini di età iniziale compresa fra 40 e 59 anni e seguiti per 15 anni. Alla fine con l'impiego della funzione logistica multipla 13 fattori hanno corrisposto ai requisiti richiesti anche se solo i primi 8 di questi hanno dimostrato di essere realmente predittivi. Essi sono l'età, lo stato civile, la colesterolemia, il fumo di sigarette, la pressione arteriosa, alcune alterazioni dell'elettrocardiogramma, il rapporto statura seduta/statura in piedi, l'arco senile, il rapporto spalle/bacino, la bronchite cronica, l'ulcera peptica, il numero dei figli e l'uso di diete « speciali ». Dopo aver suddiviso la popolazione studiata in 10 classi equinumeriche di rischio coronarico stimato (decili) sulla base dei valori dei 13 fattori principali, è stata analizzata la distribuzione, in tali classi, dei casi osservati di cardiopatia coronarica fatale, di accidenti cerebrovascolari fatali e di tumori fatali ed i casi di morte per tutte le cause. La discriminazione tra casi e non casi di cardiopatia coronarica è risultata soddisfacente come in altre analisi precedentemente condotte sullo stesso materiale. La distribuzione delle altre cause di morte suggerisce che trovarsi a basso rischio coronarico coincide col trovarsi a basso rischio anche per altri tipi di patologia e viceversa.

Summary (The relationships between the level of coronary risk and the risk of other morbid conditions). - Thirtysix coronary risk factors or conditions supposed to play a similar role have been evaluated by univariate and multivariate analyses, the purpose being that of selecting a minimal subset of them having the highest possible predicting power for the occurrence of a fatal coronary heart disease in the pool of two rural Italian samples of 1712 men aged 40-59 at entry examination and followed-up for 15 years. Eventually with the use of the multiple logistic function, thirteen factors met the requirements although only the first 8 of them showed to carry a real predictive power. They were age, marriage status, serum cholesterol, smoking habits, blood pressure, some electrocardiographic abnormalities, the ratio sitting height/standing height, arcus senilis, the shoulder/pelvis ratio, chronic bronchitis, peptic ulcer, the number of children and the use of "special diets". The discrimination between cases and non-cases of coronary heart disease proved to be satisfactory as in previous analyses conducted on the same material.

After having classified the studied population into deciles of estimated coronary risk on the basis of the risk function provided by the 13 selected factors, fatal cases of strokes, cancer and all deaths were distributed in such decile classes. Their distribution suggested that to be at a lower coronary risk implies a protection also against the risk of other morbid fatal conditions and viceversa.

Il concetto di rischio coronarico è acquisito ormai da alcuni lustri ed è legato a numerose indagini epidemiologiche longitudinali condotte in molti paesi sulla incidenza della cardiopatia coronarica (CC) e sui fattori di rischio che sono ad essa correlati. Alla identificazione di singoli fattori caratterizzati da maggiore o minore potere predittivo si è aggiunta la possibilità di definire il rischio globale legato alla contemporanea considerazione di più fattori di rischio in modelli di analisi multivariata del rischio stesso [1-17]. Con tali procedure è possibile realizzare una discreta discriminazione tra casi e non casi di malattia e le prospettive future sono quelle di pervenire, con il miglioramento delle prestazioni dei modelli matematici e con l'aggiunta di nuovi fattori di grande potenziale predittivo, ad una predizione meno probabilistica e più deterministica della malattia.

La separazione più accentuata tra casi e non casi sulla base dei livelli dei fattori di rischio può fornire anche indicazioni sempre più valide sulle prospettive della prevenzione suggerendo a quale livello dei fattori è auspicabile collocarsi per sperare nella esenzione o immunità dalla malattia.

Non v'è dubbio tuttavia che, per lo meno quando si considerano situazioni biologiche estreme, si possono identificare casi in cui una forte predisposizione per una condizione morbosa si associa o coincide con una sostanziale immunità verso un'altra e viceversa. Un esempio banale, tra quanti possono essere fatti, può essere l'assenza di aterosclerosi in popolazioni denutrite che è bilanciata da una particolare suscettibilità per certe malattie infettive.

La questione ha una duplice rilevanza: da un lato è utile sapere in via teorica fino a che punto esiste una competizione tra condizioni morbose (o cause di morte) diverse; dall'altro un chiarimento di questo concetto può indirizzare in modo più mirato ed equilibrato gli interventi diretti a modificare i fattori di rischio della

CC, evitando che, in questi casi, nel perseguire l'obiettivo di prevenire una malattia non si finisca per favorire l'insorgenza di un'altra [18].

Il problema è di fatto molto complicato perché si dovrebbe tenere conto sia dei casi in cui per lunghi periodi di tempo un individuo è esposto, p.e., a bassi livelli di « rischio coronarico », sia dei casi in cui tali livelli vengono raggiunti a seguito di modificazioni indotte a partire da livelli diversi (usualmente più elevati) [19-25]. Un approccio relativamente semplice e preliminare alla esplorazione di questo problema è quello esposto in questa sede. Di fatto ci siamo limitati a chiederci se suddividendo una popolazione in classi diverse e crescenti di rischio coronarico globale accertato, fosse possibile identificare un eccesso di rischio per altre condizioni nei sottogruppi « naturalmente » più protetti contro la CC.

MATERIALI E METODI.

Per questa analisi sono stati utilizzati i dati relativi alle due popolazioni rurali italiane studiate nel Seven Countries Study, costituite da un totale di 1.712 uomini di età iniziale compresa tra 40 e 59 anni, rappresentanti il 98,5 % di campioni demografici definiti nelle aree di Crevalcore (Emilia) e Montegiorgio (Marche) e seguiti, dopo un esame iniziale, per 15 anni.

Negli anni '50, l'epidemiologia delle malattie cardiovascolari pose due quesiti fondamentali all'attenzione di coloro che studiavano la cardiopatia coronarica. Si trattava di stabilire:

1) se fossero reali le differenze di mortalità, prevalenza ed incidenza per cardiopatia coronarica tra popolazioni diverse, differenze suggerite in modo incompleto ed incerto dai dati della mortalità ufficiale e dai dati ospedalieri;

2) se alcune caratteristiche misurabili in individui e in popolazioni ancora sane fossero capaci di spiegare, almeno in parte, le differenze — se mai fossero reali — tra individui e tra popolazioni (supposti fattori di rischio).

Il « Seven Countries Study » è una delle imprese epidemiologiche su scala internazionale che ha tentato di dare risposta a tali quesiti impegnandosi in una indagine longitudinale condotta su quasi 13.000 soggetti di sesso maschile e di età compresa tra i 40 e i 59 anni, reclutati in 16 campioni di popolazione di 7 diversi paesi in tre continenti.

Dopo una fase preliminare dedicata alla messa a punto di procedure relative a metodi e tecniche di misura, a valutazione dei dati e a condurre studi pilota per esplorare le possibilità locali di ottenere collaborazione e partecipazione, lo studio vero e proprio cominciò nel 1957. L'arruolamento delle varie popolazioni proseguì fino al 1964 ed il successivo follow-up, al termine di 10 anni fu concluso, per tutte le popolazioni nel 1974.

Gruppi di ricercatori italiani, facenti capo inizialmente al Centro per le Malattie Cardiovascolari degli Ospedali Riuniti di Roma e all'Istituto di Fisiologia Umana dell'Università di Napoli e poi anche all'Istituto di Scienza dell'Alimentazione dell'Università di Perugia, hanno contribuito allo studio sia per le atti-

vità riguardanti i campioni italiani, sia per quelle a livello internazionale.

Nell'analisi finale sui 10 anni di follow-up e nel follow-up successivo a tale scadenza (ora vicino ai 20 anni) la responsabilità dell'indagine, per quanto riguarda le aree italiane, è progressivamente passata all'Istituto cui appartengono gli Autori di questo articolo.

La maggior parte delle informazioni sui dati internazionali del « Seven Countries Study » sono reperibili in monografie e in articoli pubblicati in altri paesi, mentre altri rapporti sull'esperienza parziale relativa alle aree italiane sono stati pubblicati sia in Italia che altrove [3, 4, 7, 8, 13, 14, 16, 17, 26].

In questa sede viene riconsiderata l'esperienza relativa alle due aree rurali italiane, in termini di predizione della cardiopatia coronarica (CC), in 15 anni, in funzione di alcuni fattori di rischio, tralasciando di proposito le questioni che coinvolgono i quesiti cui si è tentato di rispondere con i confronti internazionali.

Per la struttura generale dello studio, le misure dei fattori di rischio all'esame iniziale, le procedure del follow-up ed altri dettagli, si rimanda altrove [3, 4, 7, 8, 14, 16, 17, 26].

Qui peraltro si ricorda che originariamente le aree rurali italiane del « Seven Countries Study » erano 3: Nicotera (CZ), area rurale in Calabria (Italia Meridionale), il cui campione fu arruolato nel 1957; Crevalcore (CR), area rurale in Emilia (Italia Settentrionale) il cui campione fu arruolato nel 1960; Montegiorgio (MO), area rurale delle Marche (Italia Centrale) il cui campione fu arruolato nel 1960.

I tre campioni rurali comprendevano tutti i soggetti di età tra i 40 e i 59 anni nati e residenti nei rispettivi comuni, o nati altrove ma residenti nel comune da almeno 5 anni (a Crevalcore peraltro è stata esclusa una piccola zona periferica dell'area comunale).

Tali campioni rurali avevano la loro controparte internazionale nelle molte aree rurali di altri paesi. Dopo l'esame iniziale il campione di Nicotera fu abbandonato per difficoltà organizzative.

In effetti fu possibile dimostrare che, in base ai dati raccolti all'esame iniziale, la popolazione di Nicotera era assai simile alle popolazioni rurali studiate parallelamente in Grecia e in Dalmazia, per cui le ulteriori informazioni ottenute da tale campione calabrese non sarebbero state verosimilmente diverse da quelle in effetti ottenute da altri campioni mediterranei.

Nel corso dei 15 anni dello studio furono svolte varie attività. L'esame iniziale prevedeva la rilevazione delle generalità, di alcune informazioni sulle abitudini di vita, di una serie di misure antropometriche; la somministrazione di un questionario clinico standard; l'esecuzione di un esame obiettivo guidato; la misurazione della pressione arteriosa; l'esecuzione di un prelievo di sangue per la determinazione della colesterolemia; un esame di urine con determinazione semiquantitativa di proteine, glucosio e sangue; l'esecuzione di un elettrocardiogramma a riposo e dopo sforzo standard. Oltre a ciò venivano eseguite una serie di indagini dietetiche, con varie modalità e in differenti stagioni, per caratterizzare la dieta abituale delle popolazioni in questione.

Esami identici venivano ripetuti in coincidenza del 5° e del 10° anniversario dell'esame iniziale. Ad essi

venivano aggiunte, di volta in volta, altre indagini strumentali o di altro tipo condotte su sottocampioni.

Tutte le metodiche erano standardizzate e per quanto possibile le procedure venivano centralizzate (in particolare la determinazione della colesterolemia, la lettura dell'elettrocardiogramma secondo il Codice del Minnesota, l'applicazione di criteri e conclusioni diagnostiche). Per dettagli su questi aspetti metodologici si rimanda altrove [3, 4, 26].

Nei periodi intervallari tra gli esami quinquennali venivano eseguite visite periodiche nelle aree in que-

Tabella 2. - *Soluzione della funzione logistica multipla che predice la mortalità per cardiopatia coronarica con 26 fattori di rischio. n = 1480; casi = 63.*

FATTORE	Coefficiente	Test t
Età	0,0993	3,07
Colesterolemia	0,0100	2,94
Pressione arteriosa media	0,0252	2,59
Fumo	0,1230	2,48
Attività fisica lavorativa	— 0,0798	— 0,38
Indice di massa corporea	— 0,0247	— 0,30
Volume espiratorio max 3/4 sec. ..	— 0,0198	— 0,35
Capacità vitale	— 0,0254	— 0,50
Rapp. statura seduta/statura in piedi ..	0,2207	2,26
Indice lateralità/linearità	0,0053	0,06
Spessore pliche cutanee	— 0,0111	— 0,52
Frequenza cardiaca	0,0062	0,57
Mortalità precoce paterna	— 0,1382	— 0,61
Mortalità precoce materna	0,0142	0,07
Rapporto spalle/bacino	— 3,4006	— 1,84
Stato civile	1,0931	2,74
Circonferenza del braccio	0,0003	0,03
Numero di figli	0,0917	1,14
Proteinuria	— 0,0852	— 0,22
Dieta « speciale »	— 0,4663	— 1,04
Elettrocardiogramma alterato	0,7699	2,29
Bronchite cronica	0,3151	1,07
Diabete	0,3326	0,49
Ulcera peptica	0,4682	1,13
Calvizie	— 0,2218	— 0,70
Arco senile	0,6306	2,04
Costante	— 20,1292	— 3,11

Casi attesi e osservati in decili di rischio stimato

DECILE	Attesi	Osservati	% osservati
1	0,46	0	0,0
2	0,88	1	1,59
3	1,30	2	3,17
4	1,85	1	1,59
5	2,63	2	3,17
6	3,60	4	6,35
7	5,02	10	15,87
8	7,54	5	7,94
9	11,79	12	19,05
10	27,94	26	41,27

Likelihood ratio statistics della soluzione = 89,66.

Casi osservati nel decile 10 = 41,27 %.

Casi osservati nei decili 9 e 10 = 60,32 %.

Casi osservati nei decili 8, 9 e 10 = 68,26 %.

Casi osservati nei decili 6, 7, 8, 9 e 10 = 90,5 %.

Momento di primo ordine della distribuzione dei casi osservati in decili di rischio = 0,83.

Coefficiente di correlazione lineare tra casi attesi ed osservati in decili di rischio stimato = 0,97.

Tabella 1. - *Elenco dei 36 fattori di rischio esplorati e risultato delle successive selezioni.*

A	B	C	D
1. Arco senile	8	8	7
2. Attività fisica lavorativa	20	—	—
3. Bronchite cronica	12	10	10
4. Calvizie	14	—	—
5. Capacità vitale	18	—	—
6. Circonferenza del braccio	26	—	—
7. Colecistopatia	—	—	—
8. Colesterolemia	2	3	2
9. Diabete	19	—	—
10. Dieta speciale	13	13	13
11. Elettrocardiogramma alterato	6	6	5
12. Età	1	1	1
13. Familiarità per ACV	—	—	—
14. Familiarità per altre cardiopatie	—	—	—
15. Familiarità per diabete	—	—	—
16. Familiarità per infarto	—	—	—
17. Familiarità per iperten. arter.	—	—	—
18. Numero di figli	10	12	11
19. Frequenza cardiaca	16	—	—
20. Fumo	5	4	4
21. Indice lateralità/linearità	25	—	—
22. Indice di massa corporea	22	—	—
23. Mortalità precoce materna	24	—	—
24. Mortalità precoce paterna	15	—	—
25. Nefropatia	—	—	—
26. Spessore pliche cutanee	17	—	—
27. Pressione diastolica media	4	5	6
28. Pressione sistolica	—	—	—
29. Proteinuria	23	—	—
30. Rapporto spalle/bacino	9	9	9
31. Rapporto statura seduta/statura in piedi	7	7	8
32. Stato civile	3	2	3
33. Tireopatia	—	—	—
34. Ulcera peptica	11	11	12
35. Volume espiratorio max 3/4 sec.	21	—	—
36. Xantelasma	—	—	—

Nelle colonne A, B, C, sono indicati i fattori selezionati in tre tappe successive e con diverse modalità (vedi testo).

I numeri delle colonne B e C indicano le posizioni in graduatoria, ottenute con procedure diverse, riguardanti il potere predittivo dei fattori selezionati.

Nella colonna D è indicato l'ordine di ingresso nell'equazione dei 13 fattori utilizzando la tecnica step-wise retrograda.

stione per raccogliere informazioni sulla morbosità intercorrente per malattie cardiovascolari e sulla mortalità. I dati sulla morbosità — rilevati presso ospedali e medici, quando possibile completati con l'esame diretto dei pazienti — erano messi a disposizione di chi era destinato ad eseguire le conclusioni diagnostiche agli anniversari quinquennali. Informazioni sulla mortalità, ottenute dalle anagrafi locali venivano trasformate in cause di morte tramite un complesso procedimento di raccolta ed analisi di informazioni presso tutti i possibili testimoni dell'evento; esso prevedeva, tra l'altro, l'impiego di criteri e giudici indipendenti dalla causa ufficiale che veniva sostanzialmente trascurata. I motivi per non considerare la causa ufficiale sono ampiamente giustificati [26].

Gli eventi considerati in questa analisi sono costituiti dalla mortalità in 15 anni per un certo numero di raggruppamenti di cause di morte. Contrariamente ai criteri seguiti in occasione di altre analisi di questo tipo eseguite su questo stesso materiale, si è tentato di considerare, in questa occasione, il maggior numero di possibili fattori di rischio e comunque di caratteristiche che possano associarsi o meno con il rischio coronarico, allo scopo di non lasciare inesplorato alcun aspetto tra tutti quelli disponibili. In tal modo una prima parte dell'analisi è stata dedicata ad una sistematica selezione dei fattori di rischio più predittivi per la CC.

In questa fase sono stati adottati i criteri che verranno sotto elencati, utilizzando, tra l'altro, la funzione logistica multipla. Anche per questo ultimo aspetto tecnico si rimanda altrove [2-6, 9-17].

Qui si rammenta solo che l'equazione $y = (1 + \exp - \alpha - \sum \beta_i x_i)^{-1}$, risolta con il metodo di Walker-Duncan [10], permette di stimare le probabilità di un evento (y = malattia in questo caso) in funzione di più fattori misurati prima della sua comparsa (x_i = fattori di rischio), per ognuno dei quali viene calcolato un coefficiente moltiplicativo (β_i). α è una costante da calcolare per ogni « soluzione ».

SELEZIONE DEI FATTORI PIÙ PREDITTIVI.

Un elenco dei 36 fattori teoricamente disponibili è fornito dalla prima colonna a sinistra della Tab. 1. Per le definizioni e le unità di misura, si rimanda all'appendice.

È stata quindi operata una prima selezione per poter successivamente impiegare, nell'analisi multivariata, un numero di fattori compatibile con le prestazioni del programma disponibile per risolvere la funzione logistica multipla. Ciò ha portato a scegliere quelli indicati nella colonna A della Tab. 1. Il criterio adottato è stato quello di accettare tutti i fattori caratterizzati da grandezze di tipo quantitativo continuo e di accettare, tra gli altri (grandezze di tipo qualitativo o discreto o categorico) sono quelli che ad un'analisi preliminare di tipo unifattoriale, presentavano un numero di « casi », nelle classi categoriche disponibili, tale da consentire ragionevolmente un'analisi multivariata (in pratica almeno 5 per classe). Un caso particolare è stato quello delle due pressioni arteriose (sistolica e diastolica) che sono state cumulate nella « pressione arteriosa media » (diastolica + (sistolica - diastolica)/3), al fine di evitare la nota competizione

che si realizza nella funzione logistica multipla fra queste due grandezze altamente correlate tra di loro (usualmente circa 0,7 di coefficiente di correlazione lineare). In tale modo si è passati da 36 a 26 fattori.

La seconda tappa è consistita nell'introdurre nella funzione logistica multipla i fattori in questione per stimare i 63 casi di cardiopatia coronarica fatale verificatisi in 15 anni nei 1480 soggetti che erano esenti da malattie cardiovascolari di qualsiasi tipo, all'esame

Tabella 3. — Soluzione della funzione logistica multipla che predice la mortalità per cardiopatia coronarica con 13 fattori di rischio. $n = 1480$; casi = 63.

FATTORE	Coefficiente	Test t
Età	0,1059	3,44
Colesterolemia	0,0093	2,92
Pressione arteriosa media	0,0244	2,77
Fumo	0,1362	2,82
Rapporto statura seduta/statura in piedi	0,2086	2,31
Rapporto spalle/bacino	— 3,0427	— 1,75
Stato civile	1,1669	3,00
Numero figli	0,0895	1,12
Diera « speciale »	— 0,3883	— 0,89
Elettrocardiogramma alterato	0,8015	2,43
Bronchite cronica	0,3815	1,35
Ulcera peptica	0,4619	1,14
Arco senile	0,6832	2,26
Costante	— 21,6459	— 3,78

Casi attesi e osservati in decili di rischio stimato

DECILE	Attesi	Osservati	% osservati
1	0,59	0	0,0
2	0,93	1	1,59
3	1,40	1	1,59
4	1,97	2	3,17
5	2,76	1	1,59
6	3,84	5	7,94
7	5,11	7	11,11
8	7,51	13	20,63
9	11,88	7	11,11
10	27,11	26	41,27

Likelihood ratio statistics della soluzione = 85,62.

Casi osservati nel decile 10 = 41,27 %.

Casi osservati nei decili 9 e 10 = 52,38 %.

Casi osservati nei decili 8, 9 e 10 = 73,01 %.

Casi osservati nei decili 6, 7, 8, 9 e 10 = 92,1 %.

Momento di primo ordine nella distribuzione dei casi osservati in decili di rischio = 0,83.

Coefficiente di correlazione lineare tra casi attesi ed osservati in decili di rischio stimato = 0,95.

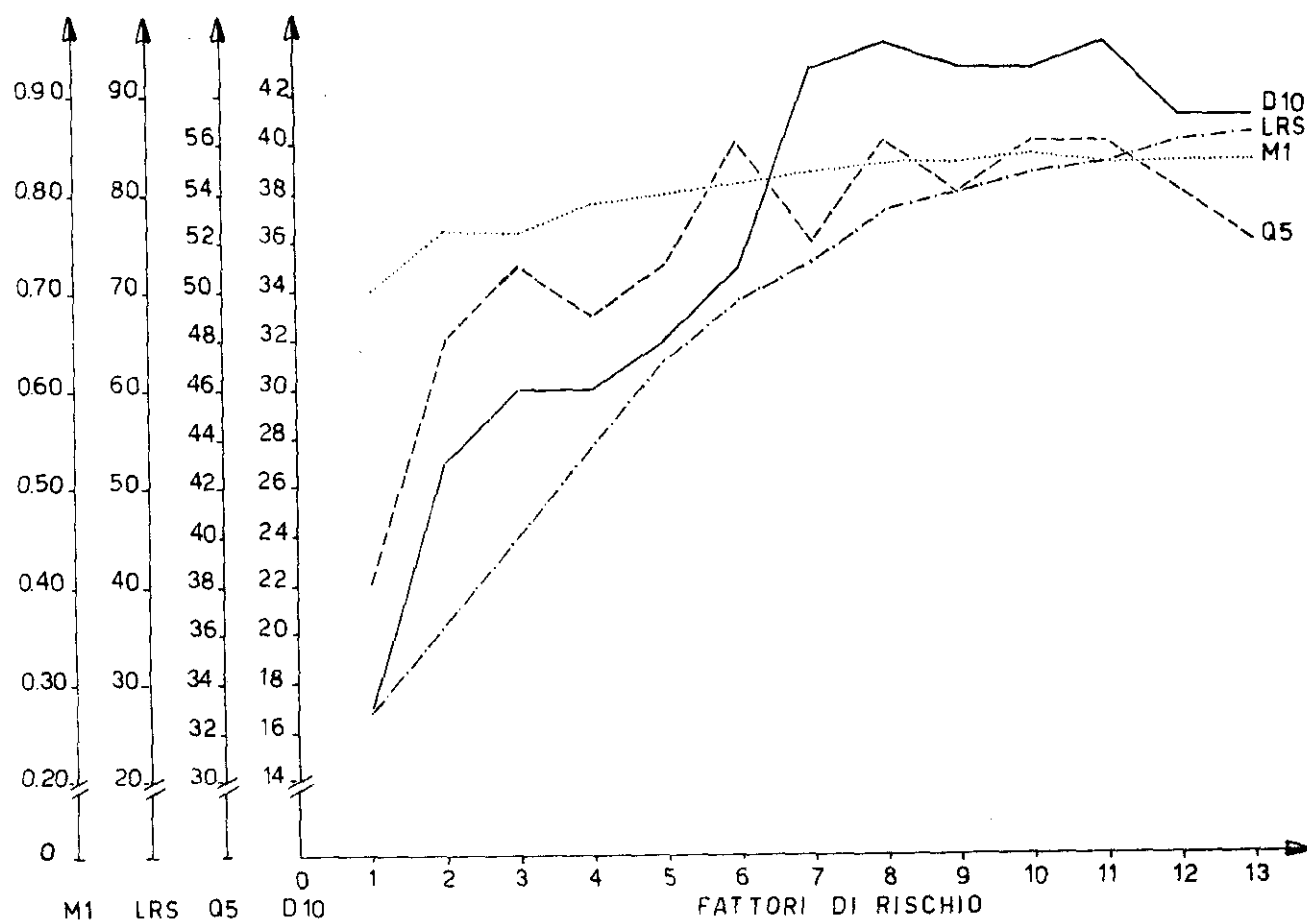


FIG. 1. - Predizione dei casi di morte per cardiopatia coronarica con la tecnica « step-wise retrograda » applicata alla funzione logistica multipla, partendo da 13 fattori di rischio. Andamento di 4 indicatori di discriminazione in funzione di soluzioni che contengono di volta in volta il fattore indicato in ascissa assieme a tutti quelli che si trovano alla sua sinistra. I fattori sono numerati come da colonna D della Tab. 1. M1 = momento 1° ordine della distribuzione dei casi osservati in decili di rischio stimato; LRS: likelihood ratio statistics; Q5 = proporzione di casi osservati nel quintile superiore della distribuzione di rischio stimato; D10 = proporzione di casi osservati nel decile superiore della distribuzione di rischio stimato.

iniziale (e che disponevano di tutte le 36 misure iniziali). Sono stati pertanto esclusi anche i soggetti che presentavano alterazioni isolate dell'elettrocardiogramma a riposo che potessero far ipotizzare una cardiopatia coronarica (o di altro tipo) asintomatica. La soluzione della funzione logistica multipla con i relativi coefficienti è riportata nella Tab. 2. L'ordine gerarchico del potere predittivo dei 26 fattori, secondo il test t sul coefficiente, è quello indicato nella colonna A della Tab. 1. Sono stati quindi selezionati i fattori che presentavano valori di t di Student del coefficiente pari o superiore a 1 (p di circa 0,3). Tale scelta è stata arbitraria e dettata solo dall'intenzione di selezionare un numero limitato di fattori che fornissero un minimo contributo alla predizione. In tal modo ne sono stati ulteriormente selezionati 13 che sono quelli elencati nella colonna C della Tab. 1. È stata quindi calcolata una « soluzione » della funzione logistica multipla con i 13 fattori in questione, che è riportata nella Tab. 3. L'ordine gerarchico dei 13 fattori secondo il test t sui coefficienti è riportato nella colonna C della stessa Tab. 1.

Dai valori di t risulta che i coefficienti di età, stato civile, colesterolemia, fumo, pressione arteriosa, di certe alterazioni elettrocardiografiche, del rapporto

statura seduta/statura in piedi e dell'arco senile sono statisticamente diversi da zero, mentre tutti gli altri non lo sono. Tuttavia anche in questa soluzione nessuno dei coefficienti ha un valore di t inferiore ad 1, eccetto la « dieta speciale ».

Un'ultima verifica diretta a valutare la graduatoria del potere predittivo dei vari fattori è stata eseguita applicando alla soluzione con 13 fattori la tecnica « step-wise retrograda », messa a punto a suo tempo da questo gruppo e che permette di identificare un livello di « saturazione » nel grado di discriminazione fornito da un certo sotto-insieme di fattori [14]. L'ordine di ingresso dei fattori in tale procedura è indicato nella colonna D della Tab. 1, confermando più o meno la graduatoria della colonna C.

Se vengono assunti come indicatori di discriminazione il « likelihood ratio statistics » (LRS), la proporzione di casi osservati nel decimo decile di rischio stimato (D10), la proporzione di casi osservati nel quinto quintile di rischio stimato (Q5) e il momento di primo ordine della distribuzione dei casi osservati in decili di rischio stimato (M1) e se viene posto uguale a 100 % il livello di discriminazione ottenuto con 13 fattori, si nota, dalla Fig. 1, che il 90 % di tale livello viene raggiunto con otto, dodici, due e due fattori a seconda

Tabella 4. - Valori medi dei fattori di rischio nelle classi decili di rischio stimato con la soluzione della funzione logistica a 13 fattori. Per le unità di misura vedi appendice.

Decile	ETA	COL	PAL	FUMO	RSSSP	RSB	SC	NF	DS	ECG	BC	UP	AS
1	44,36	174,34	95,70	1,74	53,01	1,39	0,01	1,72	0,22	0,01	0,12	0,05	0,01
2	45,80	186,68	99,15	3,13	53,30	1,38	0,01	1,84	0,15	0,01	0,13	0,07	0,01
3	47,42	190,22	101,45	3,80	52,97	1,38	0,03	2,13	0,15	0,03	0,18	0,14	0,02
4	48,32	191,51	99,92	4,24	53,34	1,36	0,07	2,01	0,14	0,09	0,25	0,09	0,04
5	49,78	199,95	102,92	4,31	53,22	1,36	0,05	2,14	0,15	0,06	0,34	0,12	0,09
6	50,36	201,86	103,45	5,05	53,43	1,36	0,07	2,35	0,13	0,11	0,34	0,10	0,13
7	51,42	210,35	105,88	5,12	53,26	1,36	0,07	2,38	0,11	0,13	0,38	0,10	0,14
8	52,29	214,06	108,10	5,61	53,43	1,34	0,10	2,09	0,09	0,09	0,39	0,11	0,24
9	52,97	220,32	111,32	5,73	53,61	1,34	0,17	2,22	0,13	0,23	0,46	0,14	0,25
10	54,39	227,46	115,89	5,84	53,79	1,32	0,22	2,64	0,09	0,38	0,49	0,17	0,49

Legenda: ETA = età; COL = colesterolemia; PAM = pressione arteriosa media; FUMO = fumo; RSSSP = rapporto statura seduta/statura in piedi; RSB = rapporto spalle/bacino; SC = stato civile; NF = numero figli; DS = dieta « speciale »; ECG = elettrocardiogramma alterato; BC = bronchite cronica; UP = ulcera peptica; AS = arco senile.

dei quattro indicatori in ordine considerati rispettivamente. La discriminazione tra casi e non casi risulta soddisfacente, ma di non molto migliore di quanto osservato in precedenti soluzioni che non avevano esplorato tutti i 36 fattori disponibili (16-17). Tuttavia le quote di « casi » collocati nel 10 %, nel 20 %, nel 30 % e nel 50 % della graduatoria di rischio stimato sono 41 %, 52 %, 73 % e 92 %.

Le corrispondenti quote nella soluzione a 26 fattori erano 41 %, 60 %, 68 % e 90 %.

RISCHIO CORONARICO VS RISCHIO DI ALTRE CONDIZIONI MORBOSE.

Per valutare questo problema è stata quindi adottata la soluzione della funzione logistica multipla a 13 fattori sopra riportata ed il rischio coronarico, stimato sulla base della concorrenza dei 13 fattori, è stato calcolato per tutti i soggetti in esame, disposto in ordine crescente dal minimo al massimo e tale graduatoria è stata divisa in 10 classi equinumeriche (decili). In tali classi di rischio stimato sono stati quindi identificati non solo i « casi » di CC, ma anche quelli di accidenti cerebrovascolari fatali, di tumore maligno fatale e di morti per tutte le cause osservati nello stesso periodo di tempo. La scelta degli accidenti cerebrovascolari e dei tumori maligni non è causale, perché essi, assieme alla cardiopatia coronarica rappresentano le cause di morte più comuni in queste popolazioni. Il risultato di tale operazione è rappresentato nella Fig. 2, dove è riportata anche la spezzata relativa alla cardiopatia coronarica. Un incremento nel numero di casi osservati, spostandosi dal 1° al 10° decile di rischio coronarico, è osservabile non solo per la cardiopatia coronarica, come v'era da aspettarsi, ma anche per tutte le altre cause di morte qui considerate (accidenti

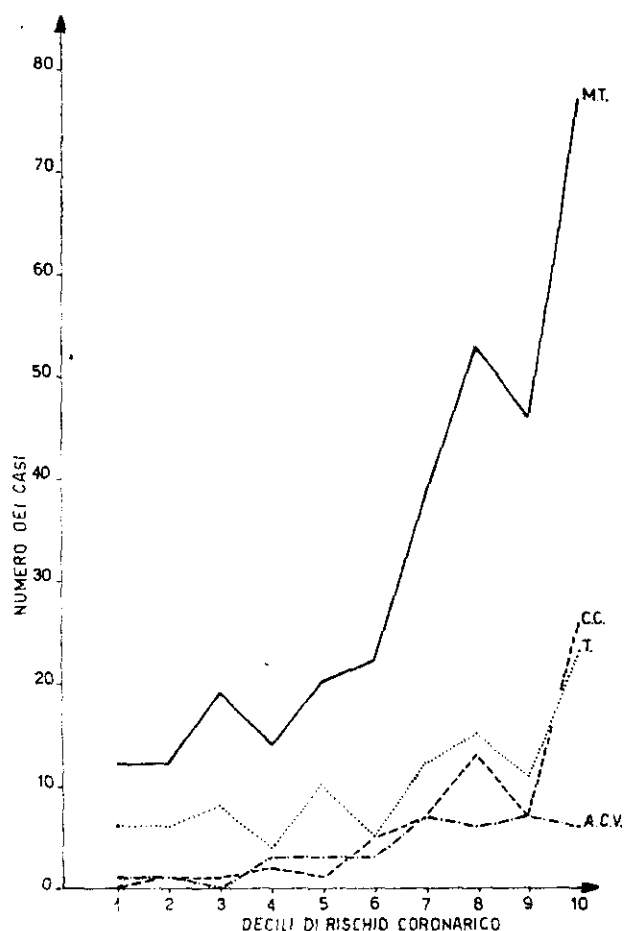


FIG. 2. - Distribuzione di casi osservati in decili di rischio coronarico stimato con 13 fattori di rischio, per quattro categorie di patologia fatale: M.T. = mortalità totale; C.C. = cardiopatia coronarica; T. = tumori maligni; A.C.V. = accidenti cerebrovascolari.

cerebrovascolari, tumori maligni e tutte le cause di morte). L'ipotesi zero, testata con il χ^2 in base alla quale la distribuzione dei casi nelle classi decili di rischio sia equinumerica, è respinta con $p < 0,001$ per tutte le cause e i tumori, con $p < 0,01$ per la cardiopatia coronarica, mentre il p per gli accidenti cerebrovascolari è compreso tra 0,05 e 0,1. Ciò significa che, per lo meno adottando questa tecnica, non è possibile affermare che chi si trova — naturalmente — a basso rischio coronarico sia altrettanto naturalmente esposto ad un eccesso di rischio per altre importanti cause di morte o per tutte le cause. Per avere un'idea delle caratteristiche dei soggetti appartenenti alle varie classi di rischio sono riportati i valori medi dei vari fattori per ogni decile di rischio coronarico stimato (Tab. 4). Tutti i fattori presentano valori medi sostanzialmente crescenti dal decile 1 al decile 10 (ad eccezione dell'attività fisica, del rapporto spalle/bacino e della dieta «speciale» che, avendo un coefficiente negativo, presentano un decremento nello stessosenso).

Sembra quindi emergere abbastanza chiaramente il concetto in base al quale trovarsi a basso rischio coronarico sia una condizione desiderabile anche per limitare le probabilità di andare incontro ad altre importanti condizioni morbose ad evenienza precoce e viceversa.

COMMENTO.

I risultati dell'analisi qui eseguita permettono di fare due considerazioni:

a) l'estensione dell'analisi alla ricerca di fattori di rischio della cardiopatia coronarica, al di fuori di quelli più o meno considerati universali, permette di migliorare di quote marginali il potere predittivo della funzione di rischio multivariata, anche se in questo caso sono stati identificati per la prima volta, in questo materiale, fattori come l'arco senile, lo stato civile e, in forma subordinata, l'ulcera peptica, la bronchite cronica, la «dieta speciale», il rapporto spalle/bacino e il numero di figli. Nel caso dello stato civile risulta che gli «instabili» (celibi, separati, vedovi) sono più esposti al rischio di ammalarsi degli «stabili» (sposati). Scarsa rilevanza ha dimostrato, ai fini della predizione, la presenza, all'esame iniziale, di altre malattie come le tireopatie, le nefropatie e le colecistopatie. Complessivamente il grado di discriminazione ottenuto dopo aver vagliato 36 fattori non è molto superiore a quello ottenuto p.e. nell'analisi, a 10 anni di follow-up, con 7-11 fattori [16]. Peraltro sia la soluzione a 13 che quella a 26 fattori permettono di collocare oltre il 90 % dei nuovi casi nel 50 % superiore della graduatoria di rischio. È chiaro tuttavia che dagli studi avviati molti anni fa diventa sempre più difficile estrarre informazioni per migliorare il livello di predizione e identificare, in specie, nuovi fattori che siano in grado di cambiare la forma della curva di saturazione della discriminazione (Fig. 1);

b) questi risultati contraddicono quelli di alcuni altri studi nei quali — soprattutto in termini di analisi univariata ed in relazione alla colesterolemia — sembra emergere un eccesso di rischio per «altre cause morbose non cardiovascolari» o per «tumori» nei sottogruppi di soggetti a basso rischio [18-24]. Nel

nostro caso, invece, trovarsi a basso rischio coronarico sembra essere sostanzialmente desiderabile anche ai fini di essere protetti contro l'occorrenza di altre condizioni.

Quella impiegata in questo articolo è solo una delle tecniche utilizzabili per affrontare questo problema ed un approccio più sofisticato è in corso di studio da parte del nostro gruppo di ricerca. È importante, tuttavia, che già preliminarmente risulti scarsamente fondata l'ipotesi, in base alla quale trovarsi a basso rischio coronarico rappresenti un rischio potenziale di andare incontro ad altre condizioni morbose fatali.

APPENDICE

UNITÀ DI MISURA DEI FATTORI DI RISCHIO CONSIDERATI NELL'ANALISI.

Arco senile: 0 = assente; 1 = presente.

Attività fisica lavorativa: 1 = sedentaria; 2 = moderata; 3 = pesante, in base a questionario e confronto con tipo di lavoro dichiarato.

Bronchite cronica: 0 = assente; 1 = presente, in base a criteri clinici facenti parte del protocollo dello studio.

Calvizie: codice da 1 a 4 a seconda del grado.

Capacità vitale: indice espresso in dl di aria/statura in m.

Circonferenza del braccio: in cm e mm al braccio ds in sede equidistante da acromion ed olecranon.

Colecistopatia: 0 = assente; 1 = presente, in base a criteri clinici facenti parte del protocollo dello studio.

Colesterolemia: in mg/dl, metodo di Abel-Kendall modificato da Anderson e Keys.

Diabete: 0 = assente; 1 = presente, in base a presenza di storia clinica di diabete che richiede impiego di farmaci specifici o di glicosuria casuale.

Dieta speciale: 0 = assente; 1 = presente, in base alla affermazione del soggetto di seguire una dieta per scopi terapeutici.

Elettrocardiogramma alterato: 0 = non alterato; 1 = alterato in base alla presenza di una qualsiasi delle seguenti alterazioni secondo il Codice del Minnesota: alterazioni minori di T (5,3); blocchi di branca incompleti (7,3 e 7,6); extrasistolia a riposo (8,1); qualsiasi alterazione dopo sforzo in soggetti esenti a riposo di: ST (11,1-2-3); T (12,1-2-3); conduzione AV (13,1-2); conduzione intraventricolare (14,1-2); extrasistoli (15,1).

Età: in anni arrotondati all'anniversario più vicino.

Familiarità per accidenti cerebrovascolari: 0 = assente; 1 = presente.

Familiarità per altre cardiopatie: 0 = assente; 1 = presente.

Familiarità per diabete: 0 = assente; 1 = presente.

Familiarità per infarto: 0 = assente; 1 = presente.

Familiarità per ipertensione arteriosa: 0 = assente; 1 = presente.

Numero dei figli: numero dei nati vivi.

Frequenza cardiaca: in battiti/minute dedotta da ECG a riposo.

Fumo: numero medio di sigarette fumate al giorno.

Indice lateralità/linearità: (diametro biacromiale + diametro bicrestale in cm/statura in cm) $\times$ 100.

Indice di massa corporea: peso in kg/statura in (m)².

Mortalità precoce materna: 1 = vivo o deceduto per causa violenta; 2 = deceduto per malattia infettiva prima di 65 a. o per altre cause dopo i 65 a.; 3 = deceduto per altra causa prima di 65 a.

Mortalità precoce paterna: come per mortalità precoce materna.

Nefropatia: 0 = assente; 1 = presente, in base a criteri clinici facenti parte del protocollo dello studio.

Spessore pliche cutanee: somma di due pliche in mm, tricipitale e sottoscapolare ds.

Pressione arteriosa media: in mm Hg; diastolica + (1/3 sistolica meno diastolica). Media di due misure in posizione supina al termine di un esame obiettivo. Approssimazione di 2 in 2 mm. Diastolica: V fase di Korotkoff.

Proteinuria: 0 = assente; 1 = presente, con metodo semiquantitativo.

Rapporto spalle/bacino: in cm e mm su diametri biacromiale e bicefale.

Rapporto statura seduta/statura in piedi: (statura seduta in cm/statura in piedi in cm) $\times$ 100.

Stato civile: 0 = sposato; 1 = celibe, o separato, o vedovo o altro.

Tireopatie: 0 = assente; 1 = presente, in base a criteri clinici facenti parte del protocollo dello studio.

Ulcera peptica: 0 = assente; 1 = presente, in base a criteri clinici facenti parte del protocollo dello studio.

Volume espiratorio massimo in 3/4 sec: indice espresso in litri di aria in 3/4 sec/statura in m.

Xantelasma: 0 = assente; 1 = presente.

Parte del lavoro presentato in questo articolo è stata finanziata dal Contributo 81.00460,04 del CNR, in base all'accordo di collaborazione scientifica Italia-Stati Uniti d'America, esistente tra il Consiglio Nazionale delle Ricerche e la National Science Foundation degli USA.

Ricevuto il 6 maggio 1981.

Accettato il 20 settembre 1981.

BIBLIOGRAFIA

- SHURTLEFF, D. 1974. Some characteristics related to the incidence of cardiovascular disease and death. Framingham Study, 18 year follow-up, Section 13, Department of Health, Education and Welfare, Publication (NIH) Bethesda Md, 74-599.
- POOLING PROJECT RESEARCH GROUP. 1978: Relationship of blood pressure, serum cholesterol, smoking habits, relative weight and ECG abnormalities to incidence of major coronary events: final report of the Pooling Project. *J. Chron. Dis.* **31**: 201.
- Coronary Heart Disease in Seven Countries. A. Keys (Ed.), 1970: *Circulation*, **41**, suppl. I.
- SEVEN COUNTRIES. A multivariate analysis of coronary heart disease and death. A. Keys *et al.* (Eds.), 1980. Harvard University Press, Cambridge Mass. and London England, p. 381.
- WILHELMSEN, L., WEDEL, H. & TIBBLIN, G. 1973. Multivariate analysis of risk factors for coronary heart disease. *Circulation*. **48**: 950.
- DUCIMETIERE, P., RICHARD, J. L., CAMBIEN, F., RAKOTOVAO, R. & CLAUDE, J. R. 1980. Coronary heart disease in middle-aged frenchmen. Comparison between Paris Prospective Study, Seven Countries Study and Pooling Project. *Lancet*, **I**, 1346.
- PUDDU, V. & MENOTTI, A. 1969. An Italian study of ischaemic heart disease. *Acta Cardiol.* **24**: 558.
- MENOTTI, A. & PUDDU, V. 1973. Epidemiology of coronary heart disease. A 10 year study in two Italian rural population groups. **28**: 66.
- TRUETT, J., CORNFELD, J. & KANNEL, W. 1967. A multivariate analysis of coronary heart disease in Framingham. *J. Chron. Dis.* **20**: 511.
- WALKER, S. & DUNCAN, D. B. 1967. Estimation of the probability of an event as a function of several independent variables. *Biometrika*. **54**: 167.
- GOLDBOURT, U., MEDALIE, J. H. & NEUFELD, H. N. 1975. Clinical myocardial infarction on a five-year period. III. A multivariate analysis of incidence. The Israel ischaemic heart disease study. *J. Chron. Dis.* **28**: 217.
- KEYS, A., TAYLOR, H. L., BLACKBURN, H., BROZEK, J., ANDERSON, J. T. & SIMONSON, E. 1971. Mortality and coronary heart disease among men studied for twenty-three years. *Arch. Int. Med.* **128**: 201.
- KEYS, A., ARAYANIS, C., BLACKBURN, H., VAN BUCHEM, F. S. P., BUZINA, R., DJORDJEVIC, B. S., FIDANZA, F., KARVONEN, M. J., MENOTTI, A., PUDDU, V. & TAYLOR, H. 1972. Probability of middle-age men developing coronary heart disease in five years. *Circulation*. **45**: 815.
- MENOTTI, A., CAPOCACCIA, R., CONTI, S., FARCHI, G., MARIOTTI, S., VERDECCHIA, A., KEYS, A. & PUNSAR, S. 1977. Identifying subsets of major risk factors in multivariate estimation of coronary risk. *J. Chron. Dis.* **30**: 557.
- GORDON, T., KANNEL, W. B. & HALPERIN, M. 1979. Predictability of coronary heart disease. *J. Chron. Dis.* **32**: 427.
- MENOTTI, A., CONTI, S., CORRADINI, P., GIAMPAOLI, S., RUMI, A. & SIGNORETTI, P. 1980. Incidenza e predizione della cardiopatia coronarica nelle aree italiane del Seven Countries Study. *G. Ital. Cardiol.* **10**: 792.
- MENOTTI, A., CONTI, S., GIAMPAOLI, S., MARIOTTI, S. & SIGNORETTI, P. 1980. Coronary risk factors predicting coronary and other causes of death in fifteen years. *Acta Cardiol.* **35**: 2, 107.
- NIH, 1980. Cholesterol and non-cardiovascular mortality. *JAMA*. **244**: 25.
- BEAGLEHOLE, R., FOULKES, M. A., PRIOR, I. A. *et al.* 1980. Cholesterol and mortality in New Zealand Maoris. *Br. Med. J.* **1**: 285.
- KARK, J. D., SMITH, A. H. & HAMES, C. G. 1980, in stampa (citato da n. 18). The relationship of serum cholesterol to the incidence of cancer in Evans County. Georgia.
- KEYS, A. 1980. Alpha-lipoprotein (HDL) cholesterol in the serum and the risk of coronary heart disease and death. *Lancet* **II**, 603.
- ROSE, G. & SHIPLEY, M. J. 1980. Plasma lipids and mortality: a source of error. *Lancet* **I**, 523.
- A cooperative trial in the primary prevention of ischaemic heart disease using clofibrate. Report from the Committee of Principal Investigators. 1978. *Brit. Heart J.* **40**: 1069.
- DAYTON, S., PEARCE, M. L., HASHIMOTO *et al.* 1969. A controlled clinical trial of a diet high in unsaturated fat in preventing complications of atherosclerosis. *Circulation*. **39**, suppl. 2.
- TURPEINEN, O., KARVONEN, M. J., PEKKARINEN, M. & *al.* 1979. Dietary prevention of coronary heart disease: the Finnish Mental Hospital Study. *Int. J. Epidemiol.* **8**: 99.
- MENOTTI, A., CONTI, S., SIGNORETTI, P. & GIAMPAOLI, S. 1979. Considerazioni critiche su alcuni metodi e procedure impiegati in epidemiologia cardiovascolare. *Epidemiologia e Prevenzione*. **8**: 53.

Predeterminazione del livello equivalente di rumore da misure dei contributi energetici per singolo evento

M. COSA (a) e M. NICOLI (b)

(a) *Cattedra di Igiene Edilizia Facoltà di Architettura Università di Pescara;*

(b) *Laboratorio di Igiene del Territorio, Istituto Superiore di Sanità Roma.*

Riassunto. — Nella genesi del rumore urbano il traffico stradale costituisce il fattore più importante e più diffuso di disturbo.

Allo scopo di poter predeterminare il livello continuo equivalente di rumore da traffico anche in sede di programmazione urbanistica o di interventi di regolazione della circolazione veicolare, sono state messe a punto varie procedure analitiche, essenzialmente basate su formule sperimentali di regressione o sulla valutazione del livello di rumorosità in base alla commisurazione dei contributi energetici per singolo evento sonoro, che si verificano in un prefissato intervallo di tempo.

Adottando quest'ultima metodica, viene proposto dagli AA. un criterio di predeterminazione basato sulla scelta di opportune classi omogenee di veicoli, sulla identificazione dei corrispondenti valori di SEL (Single Event Level), relativi a ciascuna categoria di veicoli precedentemente definita, e sulla applicazione degli opportuni fattori di correzione legati alle caratteristiche geometriche e morfologiche del sito di misura.

Sono stati altresì confrontati i valori del livello sonoro equivalente, misurato sperimentalmente in alcune strade di Roma, con i valori calcolati analiticamente sia attraverso formule di regressione che attraverso il criterio dei contributi da singoli eventi. È stata dimostrata la maggiore attendibilità del secondo metodo di valutazione, specialmente se integrato da fattori specifici di correzione relativi alle caratteristiche geometrico-morfologiche del luogo di misura.

Nel testo sono da ultimo forniti elementi di calcolo per la predeterminazione degli indici compositi di inquinamento acustico (CAL), riferiti all'intero arco delle 24 ore.

Summary (Noise Exposure Prediction from Single Event Level Measurements). — *The Single Event Level measurement is an usefulness procedure for describing both the individual sources and the overall environment noise due to a number of different types of events.*

In this study an analysis for traffic noise forecast has been carried out classifying vehicles in five categories: passenger cars, light trucks, heavy trucks, motorcycles and motorbikes.

Results of analytical calculation of Equivalent Continuous Sound Level on the basis of Single Events have been compared with experimental data measured with a Precision Integrating Sound Level Meter.

INTRODUZIONE.

Negli ultimi anni Organismi di carattere internazionale e nazionale hanno intrapreso una ben definita politica per la lotta contro il rumore, riconoscendo che negli agglomerati urbani e soprattutto in quelli con più elevato tasso di concentrazione della popolazione, sono stati raggiunti livelli di rumorosità inaccettabili ai fini della protezione della salute pubblica e del benessere individuale.

L'OMS ha recentemente accertato (1980) che non si verificano significativi effetti di disturbo sulla comunità fintanto che il livello equivalente diurno (EQLD) nell'ambiente esterno non supera i 55 dBA e quello notturno (EQLN) non oltrepassa i 45 dBA [1].

Nel maggio 1980 la Organizzazione per la Cooperazione e lo Sviluppo Economico ha indetto una conferenza sulle politiche di lotta contro il rumore, nel cui documento conclusivo viene individuato, come obiettivo da raggiungere, un EQLD di 60-65 dBA, misurato sulla facciata esterna delle abitazioni ed un EQLN di 50-55 dBA, egualmente misurato in facciata [2].

Identici limiti ottimali di rumorosità ambientale erano già stati indicati dalla Commissione delle Comunità Europee nel 1975 [3].

I criteri per la valutazione del rumore in rapporto alle reazioni delle collettività esposte, raccomandati dalla ISO, comportano la adozione di limiti che orientativamente possono essere calcolati attorno a valori di 55-65 dBA espressi come EQLD [4].

La legge n. 833/78, sulla istituzione del Servizio Sanitario Nazionale, estende anche alle emissioni sonore il campo di intervento per assicurare la uniformità delle condizioni di salute sul territorio dello Stato Italiano. Per tale finalità dovranno essere emanate norme specifiche per la cui elaborazione è stato costituito, presso il Consiglio Superiore di Sanità, un gruppo ad hoc di esperti.

Negli Stati Uniti, già nel 1974, l'Environmental Protection Agency ha indicato i limiti di rumorosità ambientale compatibili con la protezione della salute pubblica e con il mantenimento delle condizioni di benessere, limiti che sono praticamente sovrapposti a quelli precisati dall'OMS [5].

Il rumore da traffico stradale costituisce il fattore di maggior disturbo per le popolazioni urbane e si ritiene che la sua incidenza tenderà progressivamente ad aumentare nel prossimo futuro almeno per quello che riguarda le proiezioni valutative effettuate sino all'anno 2000. Ricerche eseguite per l'OCDE, relative ad inchieste effettuate a Chicago, Londra, Parigi, New York e Nizza, hanno infatti dimostrato che, mediamente, il 63 % dei soggetti sottoposti ad intervista sono concretamente disturbati dal rumore del traffico stradale [2, 6].

Numerose indagini realizzate in diverse città europee ed extraeuropee hanno messo in evidenza situazioni di inquinamento acustico urbano che denunciano netti superamenti dei limiti di tollerabilità precedentemente ricordati [7, 8].

In particolare, una indagine eseguita a Roma nel 1978 ha fornito, per alcune zone del nucleo urbano, valori medi di EQLD pari a 75,9 dBA, e di EQLN pari a 66,6 dBA; nelle stesse località l'indice di inquinamento acustico giorno-notte (DNL) è stato di 76,4 dBA [9].

Nella Fig. 1 sono riportati i valori presunti della percentuale di popolazione disturbata ed i relativi « gradi di protesta », stimati da Kryter in relazione ai livelli di rumorosità rilevabili nelle aree esterne o all'interno di edifici [10].

Nella stessa figura è riportato il DNL medio misurato a Roma, in rapporto con i corrispondenti valori del grado di protesta prevedibile e della percentuale di popolazione disturbata.

Al fine di poter effettuare efficaci interventi di protezione attiva e passiva atti a contenere il livello di inquinamento acustico nelle aree urbane, è indispensabile poter disporre di attendibili strumenti analitici di calcolo per la predeterminazione del livello di rumore da traffico veicolare in condizioni ambientali differenti ed in presenza di flussi di traffico di diversa entità ed a composizione variabile.

In armonia con gli orientamenti adottati dalla ISO, dall'OCDE, dalla CEE e dal Gruppo di Lavoro per la definizione dei mezzi e delle unità di misura relative alla identificazione dei limiti di rumorosità ammissibili,

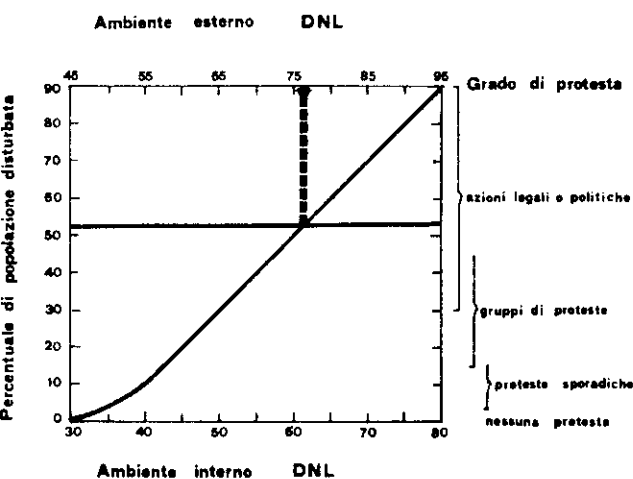


FIG. 1. - Curva continua: relazione fra l'indice DNL, i relativi gradi di protesta (ordinata a destra) e le percentuali di popolazione disturbata, (ordinata a sinistra). Linea tratteggiata: indice DNL medio misurato a Roma e relativi gradi di protesta o percentuali di popolazione disturbata.

sibili, istituito presso la Commissione di Esperti per i problemi del rumore del Ministero della Sanità, si è ritenuto opportuno prendere in considerazione in modo particolare i metodi di previsione relativi alla determinazione del livello equivalente continuo di rumore (EQL).

Sono state pertanto esaminate varie metodiche di calcolo basate sia su formule di regressione che sulla integrazione dei contributi energetici derivanti dai singoli eventi sonori [11, 12].

PROCEDIMENTI ANALITICI DI PREDETERMINAZIONE DEL LIVELLO DI RUMORE DA TRAFFICO VEICOLARE.

I procedimenti analitici di predeterminazione dei livelli di rumore generati dal traffico stradale, si incentrano essenzialmente su due criteri di calcolo. Nel primo criterio rientrano quelle procedure che si basano sulla correlazione tra il livello di rumore prevedibile ed alcuni parametri caratterizzanti il traffico veicolare (veicoli/ora, composizione del traffico, velocità media) nonché le particolarità geometrico-morfologiche del sito di osservazione (rapporto fra larghezza della strada ed altezza dei fabbricati, pendenza e condizioni del fondo stradale). Nel secondo criterio sono comprese quelle procedure che consentono la valutazione del livello di rumore attraverso la commisurazione del suo contenuto energetico totale, espresso come sommatoria dei contributi derivanti dai singoli eventi sonori che si sono verificati nell'intervallo di tempo preso in considerazione.

I procedimenti relativi al primo criterio di calcolo, che sono stati presi in considerazione nella presente indagine, sono quelli basati sulla formula di Griffiths e Langdon e su quella di Burgess [13, 14].

Analiticamente la formula di Griffiths e Langdon ha la seguente espressione:

$$EQL = L50 + 0,018 (L10 - L90)^2 \text{ dBA} \quad (1)$$

La formula di Burgess è invece caratterizzata dalla espressione che di seguito si riporta:

$$EQL = 55,5 + 10,2 \log F + 0,3 p - 19,3 \log ddBA \quad (2)$$

dove:

F rappresenta il flusso orario veicolare;

p è la percentuale di veicoli pesanti;

d è la distanza in metri tra il centro della carreggiata laterale ed il punto di osservazione posto sul ciglio della carreggiata stessa.

Nella (1) i livelli statistici cumulativi (L10, L50, L90) sono stati calcolati utilizzando formule di correlazione ricavate sperimentalmente da Benedetto e Spagnolo attraverso una indagine eseguita a Torino nel 1976 [15].

Analiticamente questi livelli statistici cumulativi sono espressi nelle seguenti forme:

$$L10 = 61 + 8,4 \log F + 0,15 p - 11,5 \log ddBA \quad (3)$$

$$L50 = 44,8 + 10,8 \log F + 0,12 p - 9,6 \log ddBA \quad (4)$$

$$L90 = 39,1 + 10,5 \log F + 0,06 p - 9,3 \log ddBA \quad (5)$$

Nelle (3), (4) e (5) F, d e p assumono lo stesso significato che nella (2).

Giova rilevare che tra le varie formulazioni proposte da altri Autori per il calcolo dei livelli statistici cumulativi si è preferito utilizzare quelle di Benedetto e Spagnolo perché meglio rispondenti alle caratteristiche ambientali e del traffico delle città italiane [7, 11].

Il secondo criterio di predeterminazione dell'EQL, che come già accennato, si basa sulla commisurazione del contributo energetico dei singoli eventi sonori che si verificano in un intervallo di tempo T, utilizza come elemento di calcolo il SEL (Single Event Level).

Come è noto, il SEL rappresenta il livello di un segnale continuo della durata di un secondo che possiede lo stesso contenuto energetico dell'evento sonoro considerato [16].

Analiticamente il SEL si esprime nella seguente forma:

$$SEL = 10 \log \frac{1}{T_{ref}} \int_{-\infty}^{\infty} 10^{0,1 AL} dt \text{ dBA} \quad (6)$$

dove: AL è il livello di rumore ponderato nella scala A.

Tenendo conto del fatto che il tempo di riferimento T_{ref} viene assunto convenzionalmente pari ad 1 secondo e che praticamente l'intervallo di tempo di integrazione viene contenuto nel campo $t_1 - t_2$, nell'ambito del quale si verifica un decremento di 10 dBA rispetto al livello di picco (ALmax), la (6) si modifica in:

$$SEL = 10 \log \int_{t_1}^{t_2} 10^{0,1 AL} dt \text{ dBA} \quad (7)$$

Nella Fig. 2 è riportato il caso di un evento sonoro, quale potrebbe essere ad esempio quello determinato

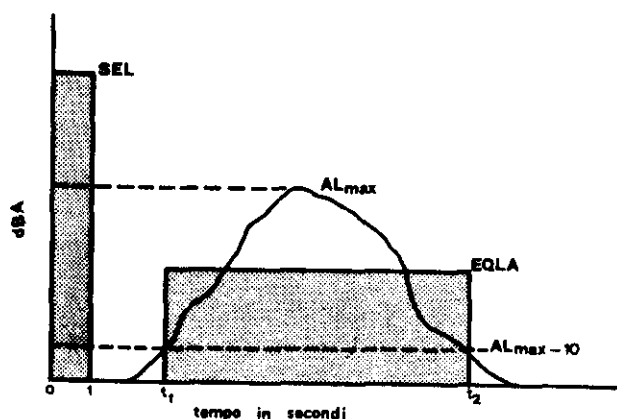


FIG. 2. - Raffronto tra i valori in EQL ed in SEL di un evento sonoro [12].

dal passaggio di un veicolo. L'intervallo $t_1 - t_2$ è quello che corrisponde ad un decremento di 10 dBA rispetto al livello di picco (ALmax); l'EQL ed il SEL sono stati calcolati e riportati graficamente in figura in rapporto al suddetto intervallo $t_1 - t_2$ [12].

Se in un intervallo di tempo T si verificano n eventi, ciascuno dei quali possiede un livello energetico SEL_i , il livello sonoro equivalente, relativo a detto intervallo T, è espresso da:

$$EQL = 10 \log \frac{1}{T} \sum_{i=1}^n 10^{0,1 SEL_i} \text{ dBA} \quad (8)$$

Se poi ciascun evento possiede lo stesso valore di SEL, il livello sonoro equivalente per n eventi che si verificano nell'intervallo T è espresso da:

$$EQL = 10 \log \frac{1}{T} n 10^{0,1 SEL} \text{ dBA} \quad (9)$$

Confrontando i due gruppi di metodiche di calcolo, si è giunti a risultati tra loro comparabili; i metodi di calcolo basati sulla integrazione dei contributi energetici relativi al singolo evento, tuttavia, oltre che sufficientemente attendibili, sono risultati particolarmente maneggevoli nella formulazione di ipotesi previsionali, qualora si voglia intervenire sul volume, sulla composizione e sulla velocità del traffico veicolare, mentre utilizzando particolari fattori di correzione, è ugualmente possibile, come sarà precisato in seguito, tener conto di determinate variabili ambientali [17].

RISULTATI DELLE INDAGINI SPERIMENTALI.

Qualora si voglia utilizzare a fini previsionali il criterio di calcolo basato sul SEL, è necessario tener presente che i valori dei livelli di esposizione al rumore, commisurati attraverso il contenuto energetico di singoli eventi, rilevati sperimentalmente, sono funzioni, oltre che delle caratteristiche della sorgente emittente, anche delle particolarità geometriche e morfologiche del sito di misura.

È pertanto desiderabile suddividere in gruppi omogenei le differenti sorgenti mobili prese in esame ed è preferibile utilizzare valori di SEL sperimentalmente determinati nell'ambito territoriale entro il quale si intendono utilizzare le formule di predeterminazione, allo scopo di poter operare su condizioni ambientali e su un parco veicolare meglio confrontabili.

Sulla base delle precedenti considerazioni, sono state effettuate a Roma determinazioni di livelli di rumorosità per singolo evento in curva di ponderazione A, riferite a cinque categorie di mezzi di trasporto: autoveicoli, veicoli industriali leggeri, veicoli industriali pesanti, motociclette e ciclomotori. Le rilevazioni, eseguite su oltre duemilacinquecento campioni, sono state comunque proseguite sino alla stabilizzazione dei valori statistici ottenuti; esse sono state effettuate su undici strade urbane chiuse, limitate cioè da edifici su ambedue i lati e caratterizzate da un rapporto L/H' compreso fra 0,5 e 2,0 (essendo L la distanza fra gli edifici frontistanti ed H' l'altezza dell'edificio più basso, rilevata in corrispondenza del punto di misura) e su dieci strade aperte (prive cioè di edifici frontistanti o con distacchi maggiori del doppio dell'altezza dell'edificio più basso).

La velocità media dei veicoli presi in considerazione è stata valutata attorno ai 50 km/h. Tutte le rilevazioni sono state eseguite utilizzando un fonometro integratore Brüel e Kjaer 2218, con microfono posto a m 1,50 dal suolo ed in corrispondenza del ciglio della strada, volto verso la corrente di traffico e ad una distanza non inferiore a m 1,50 da ostacoli verticali riflettenti.

La distribuzione statistica dei valori di SEL rilevati compare negli istogrammi riportati nelle Fig. 3, 4, 5, 6 e 7, nelle quali è evidenziabile uno spostamento verso destra (livelli più elevati del SEL) del diagramma, pas-

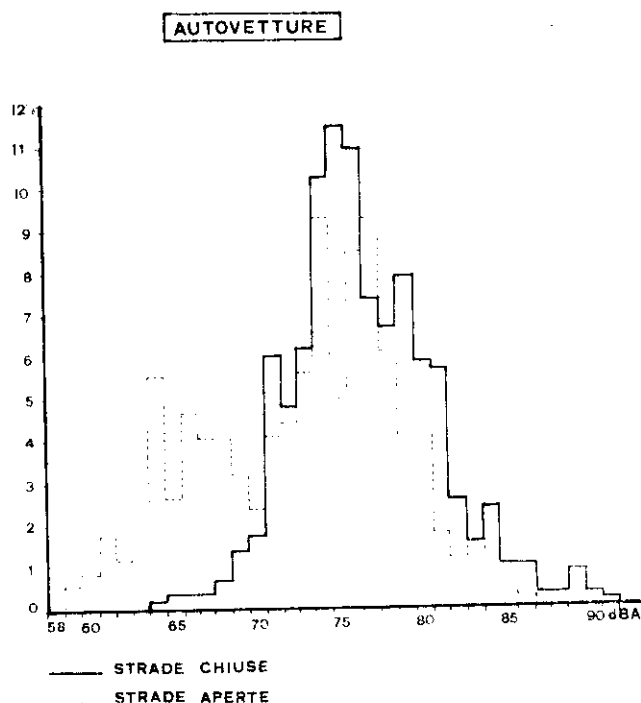


FIG. 3. - Istogramma della distribuzione statistica percentuale delle classi di livello sonoro per singolo evento (SEL).

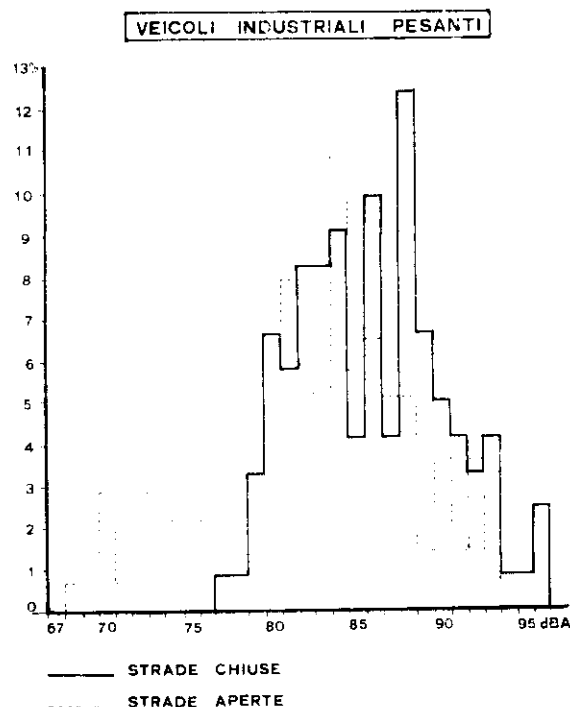


FIG. 5. - Istogramma della distribuzione statistica percentuale delle classi di livello sonoro per singolo evento (SEL).

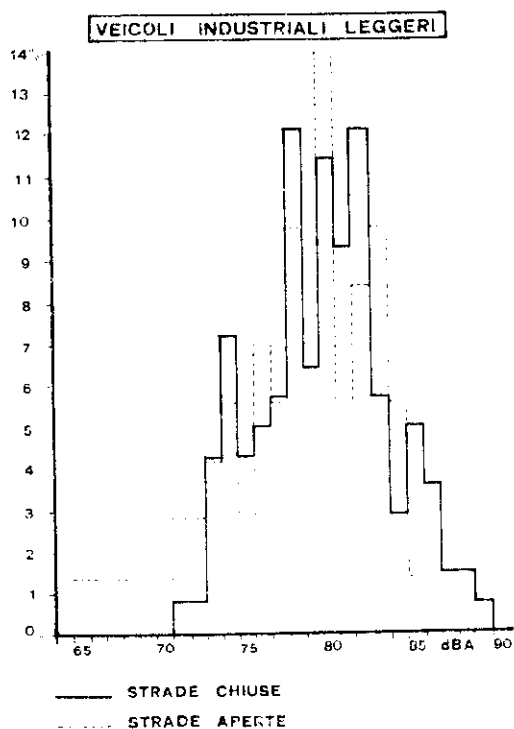


FIG. 4. - Istogramma della distribuzione statistica percentuale delle classi di livello sonoro per singolo evento (SEL).

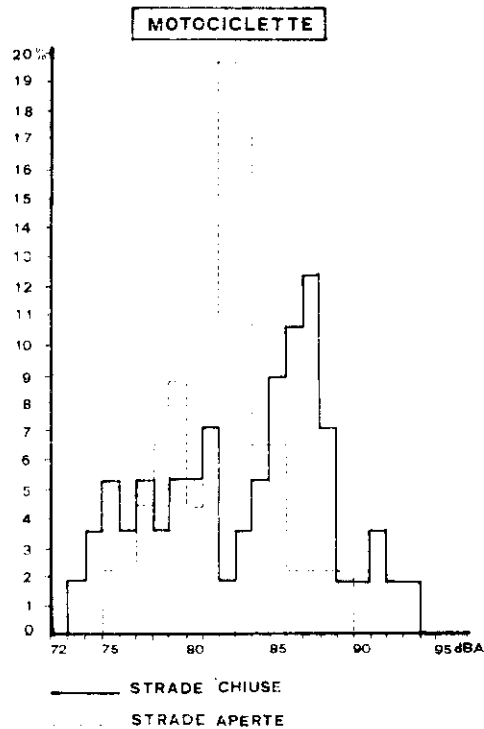


FIG. 6. - Istogramma della distribuzione statistica percentuale delle classi di livello sonoro per singolo evento (SEL).

sando dai tracciati relativi alle strade chiuse a quelli riferiti a strade aperte. Questo spostamento risulta maggiormente evidenziato per le motociclette e per i veicoli industriali pesanti.

L'andamento generale degli istogrammi, calcolati sui rilevamenti effettuati a Roma, è confrontabile con quello degli istogrammi ottenuti da Rocco a seguito dei rilevamenti eseguiti a Firenze nel 1979; i livelli di

SEL misurati a Roma, tuttavia, tendono ad essere lievemente più bassi di quelli riscontrati a Firenze, fatto questo che potrebbe anche essere correlato con le specifiche particolarità morfologiche dei siti di misura o con le differenti caratteristiche o la diversa composizione del parco veicolare preso in esame [16, 18].

I valori di SEL, mediati per ciascuna categoria di veicoli e riferiti alle strade chiuse (con rapporto L/H'

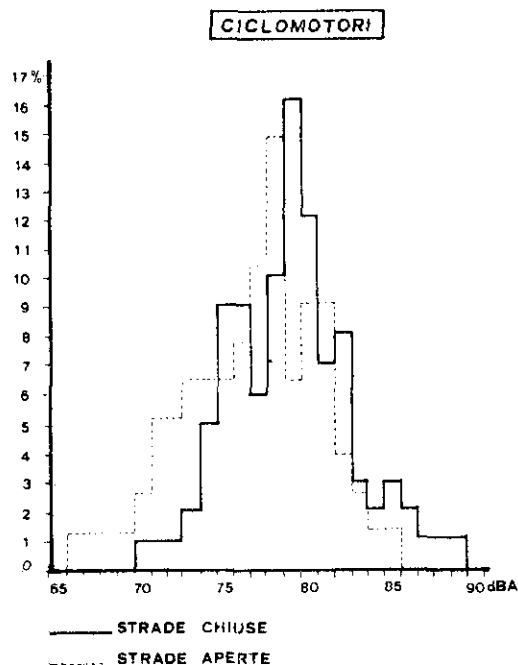


FIG. 7. - Istogramma della distribuzione statistica percentuale delle classi di livello sonoro per singolo evento (SEL).

compreso fra 0,5 e 2,0) ed a quelle aperte (prive di edifici limitanti o con rapporto $L/H' > 2,0$), sono riportati nella Tab. 1. I suddetti valori sono stati arrotondati a 0,5 dB, essendo stato constatato sperimentalmente che un maggior grado di approssimazione non ha influenza determinante ai fini della attendibilità dei risultati analitici.

Tabella 1. - Valori mediati di SEL (A) per singole categorie di veicoli.

TIPO DI STRADA	Auto-veicoli	Veicoli industriali leggeri	Veicoli industriali pesanti	Motocicli	Ciclomotori
Strade chiuse ..	76,5	80,0	86,0	84,5	78,5
Strade aperte ..	76,0	79,5	84,5	82,0	77,5

Partendo da presupposti di suddivisione dei veicoli in cinque categorie omogenee relativamente alle emissioni acustiche e sulla base dei corrispondenti valori mediati di SEL, è possibile calcolare i valori dell'EQL derivante dal contributo sonoro di differenti categorie di veicoli, attraverso la formula:

$$EQL = 10 \log \frac{1}{T} \sum_{i=1}^n n_i 10^{0,1 SEL_i} \text{ dBA} \quad (10)$$

dove:

si rappresenta il numero di veicoli della medesima categoria che passano davanti al punto di osservazione durante il periodo di tempo considerato T (espresso in secondi).

Utilizzando i valori mediati di SEL misurati a Roma e riportati nella Tab. 1, la (10) si esplicita nelle due

forme seguenti, qualora venga riferita a misure di livello equivalente orario di rumore (EQLh):

$$EQLh = 10 \log (n_1 10^{7,65} + n_2 10^{8,00} + n_3 10^{8,60} + n_4 10^{8,45} + n_5 10^{7,95}) - 35,6 \text{ dBA} \quad (11)$$

per strade chiuse (con L/H' compreso fra 0,5 e 2,0);

$$EQLh = 10 \log (n_1 10^{7,60} + n_2 10^{7,95} + n_3 10^{8,45} + n_4 10^{8,20} + n_5 10^{7,75}) - 35,6 \text{ dBA} \quad (12)$$

per strade aperte o con $L/H' > 2$.

Nella (11) e nella (12) n_1 , n_2 , n_3 , n_4 ed n_5 rappresentano il numero di veicoli/ora riferito alle cinque categorie considerate in Tab. 1 (rispettivamente n_1 = autoveicoli, n_2 = veicoli industriali leggeri, n_3 = veicoli industriali pesanti, n_4 = motocicli ed n_5 = ciclomotori).

Effettuando gli sviluppi matematici delle formule (11) e (12), si ottengono le seguenti espressioni:

per strade chiuse:

$$EQLh = 10 \log (n_1 4,467 + n_2 10 + n_3 39,811 + n_4 28,184 + n_5 7,079) + 34,4 \text{ dBA} \quad (13)$$

per strade aperte:

$$EQLh = 10 \log (n_1 3,981 + n_2 8,913 + n_3 28,184 + n_4 15,849 + n_5 5,623) + 34,4 \text{ dBA} \quad (14)$$

CONFRONTO TRA RISULTATI DA FORMULE PREVISIONALI E VALORI OTTENUTI CON MISURE STRUMENTALI.

Ai fini della valutazione della affidabilità offerta dai procedimenti di predeterminazione del rumore da traffico veicolare, è stato effettuato un confronto fra i valori teorici calcolati attraverso varie procedure analitiche ed i corrispondenti valori sperimentali rilevati utilizzando un analizzatore in tempo reale Brüel & Kjaer 2131 A, connesso con un minicalcolatore B & K 7504, predisposto con un programma per l'analisi statistica del fenomeno acustico e collegato con una scrivente B & K 6401.

Le procedure analitiche prese in considerazione sono essenzialmente riconducibili a formule di regressione o ad espressioni basate sulla commisurazione dei contributi energetici per singolo evento.

In particolare i metodi riferibili al primo gruppo consistono nella utilizzazione delle citate formule di Griffiths e Langdon (1) e di Burgess (2). Per il criterio di calcolo basato sul contributo dei singoli eventi, sono stati seguiti due procedimenti: il primo è quello proposto dagli AA., riportato nelle formule (11) e (12) e riferito a cinque categorie di veicoli; il secondo è quello proposto da Rocco, riferito a tre categorie di veicoli e basato per il calcolo dell'EQL sulla espressione (10) nella quale i valori del SEL vengono valutati come segue:

per veicoli leggeri (motocicli e ciclomotori):

$$SEL = 79,2 - 6,7 \log L/H \text{ dBA (per } L/H \leq 1,5) \quad (15)$$

per veicoli medi (autovetture):

$$SEL = 77 - 5,7 \log L/H \text{ dBA (per } L/H \leq 1,5) \quad (16)$$

per veicoli pesanti (veicoli industriali leggeri e veicoli industriali pesanti):

$$SEL = 87,3 - 6,9 \log L/H \text{ dBA (per } L/H \leq 2,5) \quad (17)$$

Per valori di L/H superiori ai limiti sopra indicati, il valore del SEL è rispettivamente di 79,2 dBA per i veicoli leggeri, di 77 dBA per i veicoli medi e di 87,3 dBA per i veicoli pesanti [16].

Il confronto fra i valori calcolati attraverso le formule di predeterminazione e quelli misurati attraverso rilevamenti strumentali è sinteticamente effettuato nelle tabelle 2 e 3, relative rispettivamente a strade chiuse ed a strade aperte. Nelle tabelle suddette le colonne 1, 2, 3 e 4 si riferiscono rispettivamente ai valori di EQL calcolati secondo le formule proposte da Cosa e Nicoli, da Rocco, da Burgess e da Griffiths e Langdon, mentre la colonna 5 riporta il valore di EQL misurato strumentalmente. Nelle ultime quattro colonne (5-1), (5-2), (5-3), (5-4), sono indicate le differenze tra EQL misurato ed EQL calcolato secondo i criteri utilizzati per ottenere i valori delle colonne 1, 2, 3 e 4.

Si precisa che nella Tab. 2 il valore di EQL per Via 4 Novembre, calcolato secondo i criteri della colonna 1, tiene conto di un incremento di 1 dBA per la correzione relativa alla pendenza stradale ($i = 3\%$), mentre nella Tab. 3 il valore di EQL per Via Prene-

stina, calcolato secondo i criteri della colonna 1, è incrementato di 3 dBA, essendo stata effettuata una correzione relativa alla velocità media di percorrenza dei veicoli ($v_m \simeq 80$ km/h). I richiamati criteri di correzione saranno più dettagliatamente illustrati nella parte conclusiva della presente pubblicazione.

Esaminando in dettaglio i dati riportati nelle ultime quattro colonne delle Tabelle 2 e 3, si può constatare la maggiore affidabilità dei metodi basati sulla commisurazione fra valori di SEL e numero dei corrispondenti eventi sonori verificatisi nella unità di tempo presa in considerazione (Cosa e Nicoli, Rocco) rispetto a quelli che utilizzano formule di regressione (Burgess, Griffiths e Langdon).

Il primo gruppo di sistemi di predeterminazione fornisce risultati con errore ≤ 1 dBA nel 40% ~ dei casi e ≤ 3 dBA nell'88% ~ dei casi, mentre il secondo gruppo di metodi consente di ottenere risultati con errore ≤ 1 dBA solo nel 25% ~ e con errore ≤ 3 dBA solo nel 62% ~ delle calcolazioni.

La meno affidabile delle metodiche prese in esame appare quella di Burgess (23,8% di errori > 4 dBA

Tabella 2. - Confronto tra EQL calcolato ed EQL misurato in 11 strade chiuse di Roma.

S T R A D A	$\frac{L}{H}$	N. veicoli/ ora	EQL calcolato				EQL misurato	Differenza EQL misurato meno EQL calcolato			
			(1)	(2)	(3)	(4)		(5-1)	(5-2)	(5-3)	(5-4)
Via Candia	0,90	2.238	76,1	77,7	73,4	75,0	75,2	-0,9	-2,5	+1,8	+0,2
Via Nazionale	1,70	1.182	74,6	75,3	73,6	74,9	77,6	+3,0	+2,3	+4,0	+2,7
Via Cavour	1,40	2.472	77,1	77,9	76,4	77,7	77,5	+0,4	-0,4	+1,1	-0,2
Via del Corso	1,20	651	72,4	73,3	70,5	72,1	73,9	+1,5	+0,6	+3,4	+1,8
Via Acqua Bullicante	1,70	2.223	75,9	77,1	76,0	77,3	74,6	-1,3	-2,5	-1,4	-2,7
Via del Tritone	0,90	1.818	77,2	79,1	75,1	76,5	79,7	+2,5	+0,6	+4,6	+3,2
Via del Babuino	0,80	657	71,5	74,2	73,0	73,5	73,6	+2,1	-0,6	+0,6	-0,1
Corso Vittorio Emanuele	0,90	1.404	76,2	78,0	74,7	75,8	78,8	+2,6	+0,8	+4,1	+3,0
Via Ceneda	0,90	303	67,6	69,4	65,2	67,8	66,4	-1,2	-3,0	+1,2	-1,4
Via XX Settembre	0,90	2.010	75,6	76,6	76,2	77,3	75,8	+0,2	-0,8	-0,4	-1,5
Via 4 Novembre ($i = 3\%$)	1,20	3.678	80,0	79,6	75,7	78,1	79,6	-0,4	0,0	+3,9	+1,5

Tabella 3. - Confronto tra EQL calcolato ed EQL misurato in 10 strade aperte di Roma.

S T R A D A	$\frac{L}{H}$	N. veicoli/ ora	EQL calcolato				EQL misurato	Differenza EQL misurato meno EQL calcolato			
			(1)	(2)	(3)	(4)		(5-1)	(5-2)	(5-3)	(5-4)
Via Baccelli	—	1.440	73,3	75,2	74,1	75,6	73,9	+0,6	-1,3	-0,2	-1,7
Via delle Tre Fontane	—	1.338	74,0	76,3	72,9	74,8	73,6	-0,4	-2,7	+0,7	-1,2
Via Prenestina km 17,6 ($v_m = 80$ km/h)	—	315	71,6	71,3	76,3	74,3	73,2	+1,6	+1,9	-3,1	-1,1
Via S. Paolo del Brasile	—	627	71,6	73,5	71,2	72,5	73,4	+1,8	-0,1	+2,2	+0,9
Via dei Gordiani	—	687	70,4	73,0	68,8	71,3	71,7	+1,3	-1,3	+2,9	+0,4
Via Mantegna	—	1.212	73,0	75,2	77,1	77,1	73,0	0,0	-2,2	-4,1	-4,1
Via Pico della Mirandola	—	825	71,7	74,8	70,2	72,4	70,8	-0,9	-4,0	+0,6	-1,6
Via Fiorentini	—	1.146	74,5	76,5	61,9	68,4	73,3	-1,2	-3,2	+11,4	+4,9
Via P. Togliatti	—	636	70,4	73,7	61,5	67,1	73,8	+3,4	+0,1	+12,3	+6,7
Via Gallia	2,3	1.815	75,3	76,1	72,1	74,8	71,1	-4,2	-5,0	-1,0	-3,7

con massimi rilevati sino a 12,3 dBA, 57,2 % di errori ≤ 3 dBA); i criteri di calcolo di Cosa e Nicoli, di Rocco e di Griffiths e Langdon consentono invece rispettivamente di ottenere previsioni con errore ≤ 3 dBA rispettivamente nel 90,5 %, nell'85,7 % e nel 66,7 % dei casi, mentre errori superiori a 4 dBA si verificano nel 4,8 % dei casi per i primi due metodi (errore massimo rilevato 4,2 dBA per il primo e rispettivamente 5,0 dBA per il secondo dei metodi suddetti) e nel 14,3 % dei casi per la metodica di Griffiths e Langdon (errore massimo rilevato 6,7 dBA).

Nella Tab. 4 sono riportati gli scarti medi (m) tra i valori misurati ed i valori calcolati, assieme con le corrispondenti deviazioni standard (σ) in relazione ai quattro procedimenti di predeterminazione analizzati. I dati della tabella suddetta confermano le considerazioni già fatte in merito alla attendibilità delle procedure esaminate.

Tabella 4. - Confronto tra gli scarti medi (m) e le corrispondenti deviazioni standard (σ).

TIPO DI STRADA	Scarto medio (m) deviaz. standard (σ)	Procedimenti di predeterminazione			
		Cosa e Nicoli	Rocco	Burgess	Griffiths e Langdon
Strade chiuse (n. 11)	m	0,77	-0,50	2,08	0,61
	σ	1,62	1,63	2,04	1,99
Strade aperte (n. 10)	m	0,20	-1,78	2,17	-0,05
	σ	2,08	2,07	5,53	3,47
Strade chiuse + strade aperte (n. 21)	m	0,50	-1,11	2,12	0,30
	σ	1,83	1,92	3,98	2,74

UTILIZZAZIONE DEL CRITERIO DEL SEL PER IL CALCOLO DEGLI INDICI COMPOSITI DI INQUINAMENTO ACUSTICO.

È noto che la valutazione del grado di inquinamento acustico presente in una determinata zona può essere effettuata attraverso indici che commisurano la esposizione ai rumori durante l'intero arco delle 24 ore. Questi indici, ordinariamente denominati CAL (Composite Annoyance Levels), sono rappresentati dal « Livello Equivalente continuo di rumore per 24 ore » (EQL24), dal « Day-Night Level » (DNL), dal « Hourly Noise Equivalent Level » (HNEL 24) e dal « Community Noise Equivalent Level » (CNEL) [7, 11].

Gli indici suddetti possono essere calcolati partendo dai valori di SEL riferiti alle singole categorie di veicoli, attraverso le seguenti espressioni:

$$EQL24 = 10 \log \left(\sum_{i=1}^n n_{24i} 10^{0,1 SEL_i} \right) - 49,4 \text{ dBA}; \quad (18)$$

$$DNL = 10 \log \left(\sum_{i=1}^n n_{(d+e)i} 10^{0,1 SEL_i} + \sum_{i=1}^n n_{ni} 10^{0,1 (SEL_i+10)} \right) - 49,4 \text{ dBA}; \quad (19)$$

$$HNEL24 = 10 \log \left(\sum_{i=1}^n n_{di} 10^{0,1 SEL_i} + \sum_{i=1}^n n_{ei} 10^{0,1 (SEL_i+5)} + \sum_{i=1}^n n_{ni} 10^{0,1 (SEL_i+10)} \right) - 49,4 \text{ dBA}; \quad (20)$$

$$CNEL = 10 \log \left(\sum_{i=1}^n n_{di} 10^{0,1 SEL_i} + \sum_{i=1}^n n_{ei} 10^{0,1 (SEL_i+3)} + \sum_{i=1}^n n_{ni} 10^{0,1 (SEL_i+10)} \right) - 49,4 \text{ dBA} \quad (21)$$

dove:

n_{24i} , n_{di} , n_{ei} ed n_{ni} rappresentano rispettivamente il numero di veicoli (per ciascuna categoria) transitanti davanti al punto di misura rispettivamente durante tutto l'arco delle 24 ore o nelle ore diurne (7-19), serali (19-22) o notturne (22-7) e SEL_i si identifica con il contributo energetico per singolo evento, riferito a ciascuna categoria di veicoli ed analiticamente definito attraverso la (7).

I metodi di predeterminazione basati sulla valutazione dei contributi energetici per singolo evento, offrono fra l'altro il vantaggio di poter valutare le variazioni di rumorosità che si determinano modificando la percentuale delle differenti componenti veicolari nell'insieme dei flussi di traffico (ad es. soppressione o riduzione del transito di autoveicoli industriali pesanti) o intervenendo direttamente sulle sorgenti di emissione (ad es. riduzione dei livelli massimi di rumorosità ai fini della omologazione dei veicoli).

Facendo riferimento, in particolare, ad una situazione reale rilevata a Roma (Corso Vittorio Emanuele) si è potuto infatti calcolare che la soppressione del traffico pesante, che nel caso in esame aveva una incidenza del 13 %, determinerebbe una riduzione di 2,2 dBA dell'EQLh predeterminato.

In modo analogo si è potuta valutare la diminuzione di EQLh in base alle prevedibili riduzioni del SEL conseguenti all'abbassamento dei limiti di emissione sonora previsti dalla CEE nel prossimo decennio, ai fini della omologazione dei veicoli [6].

Sulla base di un calcolo eseguito con valori di SEL, stimati secondo un criterio di larga approssimazione, nelle stesse condizioni di traffico precedentemente esaminate, in Corso Vittorio Emanuele il valore dell'EQLh subirebbe una riduzione di circa 6 dBA.

Qualora poi si voglia tener conto di altre variabili, legate alle caratteristiche geometriche e strutturali del sito di misura o si desideri riportare i valori di EQL ottenuti ad una distanza standard dalla parete degli edifici considerati (criterio OCDE, CETUR, ecc.) [2, 19] o predeterminare, con una certa approssimazione, i livelli di rumore all'interno dei locali che si affacciano sulla strada presa in esame, si potrà integrare il valore precalcolato di EQL utilizzando due serie di specifici fattori di correzione ed ottenendo valori compositi risultanti che potranno essere denominati Equivalent Level Forecast (EQLF) ed Equivalent Level Forecast Adequate (EQLFA).

Nel primo caso pertanto:

$$EQLF = EQL + \Delta_1 + \Delta_2 + \Delta_3 + \Delta_4 \text{ dBA} \quad (22)$$

dove:

- Δ_s : fattore di correzione per le caratteristiche geometriche del sito di misura: deve essere valutato pari a +1 dBA, qualora si utilizzino i valori di SEL per strade chiuse, nel caso che il rapporto L/H' delle strade prese in considerazione sia $< 0,5$; sempre utilizzando i suddetti valori di SEL, Δ_s sarà uguale a -0,5 dBA per strade con edifici da un solo lato.
- Δ_v : fattore di correzione per la velocità media dei veicoli: deve essere preso in considerazione per strade di grande comunicazione o per autostrade, assumendo valori di 2 dBA per ogni incremento di 15 km/h della velocità media dei veicoli in transito nella fascia di velocità compresa fra 60 e 120 km/h.
- Δ_p : fattore di correzione per la pendenza della strada: è di 0 dBA per pendenze sino al 2%, mentre per pendenze superiori aumenta di 1 dBA per ogni ulteriore incremento unitario della pendenza della strada stessa.
- Δ_f : fattore di correzione relativo alle caratteristiche del fondo stradale: esso comporta incrementi compresi fra 2 e 5 dBA per fondo stradale con trattamento superficiale antisdrucchiabile e fra 3 e 7 dBA per fondo stradale lastricato o in mediocri o cattive condizioni di manutenzione.

Qualora si desideri rapportare i valori di EQLF ad una distanza fissa dalla parete degli edifici frontistanti (m 2, ad es., come prescritto, dalle norme francesi del CETUR) [19] o riferirli a vani prospicienti la strada, potrà essere utilizzata la seguente espressione:

$$EQLFA = EQLF + \Delta_s + \Delta_v + \Delta_p + \Delta_f \quad (23)$$

dove:

- Δ_d : fattore di correzione per la distanza: poiché il traffico veicolare deve essere considerato come una sorgente sonora lineare, tale fattore deve essere valutato pari a -3 dBA per ogni

raddoppio della distanza fra l'asse della carreggiata ed il ciglio della strada presa in considerazione (punto teorico di misura). Essendo generalmente modeste le distanze considerate, si trascurano i fattori di correzione per l'assorbimento al suolo e quelli legati alla temperatura dell'aria ed alla umidità atmosferica.

- Δ_h : fattore di correzione relativo all'altezza dal suolo del piano dell'edificio considerato: l'attenuazione può essere mediamente valutata non superiore a 1 dBA per ogni piano a partire dal primo; tale fattore di correzione tuttavia può fornire valori imprecisi in presenza di accentuati fenomeni di riflessione (più frequenti nelle strade strette) e comunque non deve essere utilizzato per strade con rapporto $L/H' < 1$. Nel caso di strade aperte e per edifici posti a considerevole distanza dall'asse della strada, Δ_h diviene egualmente impreciso; in tale evenienza Δ_d e Δ_h potranno essere sostituiti da Δ_d' , valutato secondo la congiungente fra asse stradale e punto della facciata dell'edificio in corrispondenza del quale si desidera valutare il livello di rumore prevedibile; per distanze superiori a m 300 sarà necessario tener conto, ai fini del calcolo di predeterminazione, della temperatura e dell'umidità dell'aria, nonché dell'effetto di assorbimento al suolo del rumore.

- Δ_r : fattore di correzione legato alle caratteristiche dei serramenti: la attenuazione da considerarsi dovrà essere compresa fra 10 e 15 dBA per serramenti ordinari, ma può salire fino a 25 ÷ 45 dBA per serramenti speciali o multipli. In questo caso, per semplicità di calcolo, non si tiene conto del fattore di assorbimento acustico degli ambienti presi in considerazione.

Le misure fonometriche e i rilievi sul traffico stradale sono stati eseguiti dai Sigg. Renato Fuselli e Piero Savini del Laboratorio di Igiene del territorio Istituto Superiore di Sanità.

Ricevuto il 29 maggio 1981,
Accettato il 23 settembre 1981.

BIBLIOGRAFIA

1. OMS. 1980. Environmental Health Criteria 12, Noise. OMS, Geneva.
2. OCDE. 1980. Conférence sur les politiques de lutte contre le bruit. Paris, 7-9 mai 1980.
3. BASTENIER, H., KLOSTERKÖETTER, W. & LARGE, J. B. 1975. Damage and annoyance caused by noise. Commission of the European Communities, Directorate-General for Social Affairs, Health Protection Directorate, Doc. EUR 5398e.
4. ISO. 1971. Estimation du bruit par rapport aux réactions des collectivités. Racc. R 1996.
5. EPA. 1974. Information on levels of environmental noise requisite to protect public health and welfare with adequate margin of safety. Rep. 550/9 74-004, Washington D.C.
6. KLEIN, M. L. 1980. Harmonisation des législations en matière de bruit dans les Communautés Européennes. Conférence sur les politiques de lutte contre le bruit. Paris, 7-9 mai 1980.
7. COSA, M. 1980. Il rumore urbano e industriale. Ist. Ital. Med. Sociale (Ed.). Roma, maggio 1980.
8. VULKAN, G. & GOMERSALL, A. 1979. Traffic Noise. I.F.S. Publications. Bedford, England.
9. COSA, M. & NICOLI, M. 1979. Nuova indagine statistica sulla rumorosità da traffico stradale in Roma, basata su rilevamenti effettuati durante tutto l'arco delle 24 ore. Ann. Ist. Super. Sanità. 15 (2): 197-218.

10. KRYTER, K. D. 1975. Aircraft noise. Congr. Internaz. «L'uomo e il rumore». Torino, giugno 1975.
11. COSA, M. & NICOLI, M. 1977. Rumore da traffico stradale: valutazione, predeterminazione e limiti. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **13** (4): 833-864.
12. BRÜEL & KJAER. 1978. Question and Answer. *Noise and Vibration Bulletin*. November, 322.
13. GRIFFITHS, I. D. & LANGDON, F. J. 1968. Subjective response to road traffic noise. *J. Sound Vib.* **8** (1).
14. BURGESS, M. A. 1977. Previsione del rumore dovuto al traffico urbano, relativo a misure nell'area metropolitana di Sydney. *Appl. Acoust.* **10**, 1.
15. BENEDETTO, G. & SPAGNOLO, R. 1976. Relazioni fra i livelli di rumore ed alcuni parametri del traffico stradale. Quarto Conv. Ass. Ital. Acustica. Roma, maggio 1976.
16. ROCCO, L. 1980. Valori rilevati in aree urbane di $L_{A\alpha}$ di veicoli stradali e correlazioni con la geometria della posizione di rilevamento. Ottavo Conv. Ass. Ital. Acustica. Torino, 22-24 settembre 1980.
17. COSA, M. & NICOLI, M. 1980. Un ulteriore contributo sulla predeterminazione degli indici compositi di inquinamento acustico sulla base del SEL. Ottavo Conv. Ass. Ital. Acustica. Torino, 22-24 settembre 1980.
18. ROCCO, L. 1980. Previsione dell' L_{dn} in aree urbane da misure dell' $L_{A\alpha}$ di veicoli stradali. *Riv. Ital. Acustica*, **IV** (2): 99.
19. MINISTÈRE DE L'EQUIPEMENT. CENTRE D'ETUDES DES TRANSPORTS URBAINS. 1979. Aspects de la gêne due au bruit de la circulation routière. Bagneux, France.

Metabolismo di sostanze genotossiche in specie animali e vegetali

P. ADE (a), R. ESPOSITO, E. FUNARI, A. RAMUNDO-ORLANDO (b) e V. SILANO

Laboratorio di Tossicologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma: a) borsista presso il Laboratorio; b) ospite presso il Laboratorio.

Riassunto. — Questo lavoro è un'analisi critica del ruolo del metabolismo nell'espressione del potenziale tossico delle sostanze genotossiche. In particolare, vengono sinteticamente discussi la natura dei più importanti gruppi di agenti genotossici precursori e finali e i principali meccanismi di attivazione e detossificazione, incluse le reazioni di ossido-riduzione e di coniugazione. Una larga parte di questa rassegna è dedicata ad evidenziare in modo comparato i vantaggi e i limiti dei diversi sistemi in vitro (colture cellulari, frazione S9 e microsomi purificati) disponibili per lo studio del metabolismo in organismi animali e vegetali. Viene, inoltre, fornita una dettagliata descrizione degli aspetti metodologici essenziali che possono assicurare un efficace uso di tali sistemi.

Infine, viene discussa l'influenza sul metabolismo di fattori costitutivi e ambientali, e in particolare quella delle principali categorie di induttori enzimatici.

Summary (Metabolism of Genotoxic Compounds in Animal and Plant Species). — This critical review deals with the role of metabolism in controlling expression of toxic potential of genotoxic compounds. In particular, nature of principal groups of precursor and final genotoxic agents and major biotransformation mechanisms of these compounds are briefly discussed. A large part of this paper is devoted to a comparative analysis of advantages and disadvantages of the available in vitro systems (cell cultures, S9 fraction, and microsomal preparations) for the study of metabolism in animals and plants. A detailed discussion of methodological aspects which should be taken into account to use effectively these systems is also included. Lastly, influence of intrinsic and environmental factors on metabolism is discussed with particular emphasis on the significance of major groups of metabolism inducers.

1. — INTRODUZIONE.

Il decennio 1970-1980 è stato caratterizzato dal punto di vista del progresso tecnico-scientifico e sanitario dei Paesi industrializzati come quello di una più completa presa di coscienza da parte dei Governi dei pericoli posti per l'ambiente da produzione, uso e commercializzazione dei prodotti chimici. Esso è stato, altresì, quello della elaborazione e promulgazione di

sistemi legislativi per un efficace controllo delle sostanze tossiche nell'ambiente. Tali realizzazioni legislative, tuttavia, non potranno divenire pienamente operanti finché la comunità scientifica non avrà superato una serie di carenze conoscitive che rende al momento ancora problematica la previsione e/o stima del rischio per l'ambiente derivante da numerosi prodotti chimici. Nondimeno, poiché ormai gli strumenti legislativi sono in via di definizione e vi è una notevole pressione sulla comunità scientifica da parte dell'opinione pubblica e del mondo del lavoro e della produzione, sembra ragionevole prevedere che gli anni dal 1980 al 1990 potranno essere quelli di un salto di qualità nella nostra capacità di intervenire preventivamente nel controllo degli effetti dei composti chimici sull'ambiente.

Nel 1976 il Congresso degli Stati Uniti d'America approvò il *Toxic Substances Control Act* (TSCA) per regolare la produzione e il commercio dei composti chimici (Public Law 94-459 oct. 11; 1976-90 STAT. 2003). Il TSCA rappresenta un tipo di legislazione per il controllo dei prodotti chimici che presuppone la simultanea valutazione del rischio per l'uomo derivante dall'esposizione all'agente chimico e degli effetti a breve e lungo termine del prodotto chimico sull'ambiente. Tale sistema legislativo è un riconoscimento del fatto che l'ambiente è un sistema globale di cui l'uomo è parte integrante e che la sopravvivenza del genere umano è interamente dipendente dalla conservazione dell'ecosfera. Simili legislazioni sono state adottate dal Canada, Norvegia e Svezia.

La legge TSCA rende necessario esaminare le sostanze chimiche non solo per valutare i loro effetti sugli organismi sperimentali e sull'uomo, ma anche per i loro meno evidenti, ma a volte più duraturi, effetti sull'ambiente naturale dell'uomo. Inoltre, la TSCA dà pieno riconoscimento al fatto che la pericolosità di una sostanza chimica non può essere espressa solo in termini di tossicità, ma che essa dipende anche dalla sua persistenza e mobilità ambientale che determinano l'entità dell'esposizione delle specie ambientali. Le investigazioni e i dati necessari per pervenire a tale valutazione sono essenzialmente di 4 tipi (Tab. 1).

Tra il 1975 e il 1976 anche la Comunità Economica Europea incominciò a studiare un approccio legislativo allo scopo di proteggere la salute e garantire la sicurezza dei lavoratori esposti anche incidentalmente

Tabella 1. - Prove di tossicità ed ecotossicità previste dalla legge TSCA (USA) (*)

1) Prove per effetti sulla salute:

- A) Cancerogenesi
- B) Mutagenesi
- C) Teratogenesi
- D) Riduzione della fertilità
- E) Alterazioni comportamentali
- F) Neurotossicità
- G) Epatotossicità
- H) Tossicità sul sistema cardiovascolare
- I) Tossicità renale
- J) Tossicità acuta
- K) Sensibilizzazione cutanea
- L) Tossicità generale subcronica e cronica
- M) Effetti cumulativi, sinergici, antagonistici, additivi e potenzianti

2) Prove per effetti sull'ambiente:

- A) Inibizione di crescita di batteri
- B) Inibizione di crescita di alghe
- C) Inibizione di crescita di macrofite acquatiche
- D) Inibizione della germinazione di semi
- E) Inibizione della crescita di germogli
- F) Tossicità acuta per invertebrati
- G) Tossicità acuta per pesci
- H) Tossicità per uccelli attraverso alimentazione
- I) Tossicità cronica per invertebrati
- J) Tossicità per pesci nello stadio critico di sviluppo
- K) Bioaccumulazione nei pesci

3) Caratteristiche del destino nell'ambiente:

- A) Potenziale di corrosione e redox
- B) Studi di trasformazione e degradazione nella troposfera
- C) Studi di degradazione stratosferica
- D) Studi di trasporto nell'atmosfera
- E) Spettri di assorbimento di radiazioni UV della fase vapore
- F) Studi di solubilità
- G) Coefficiente di ripartizione ottanolo/acqua (misure e calcoli)
- H) Misure di tensione di vapore
- I) Studi di assorbimento nel suolo
- J) Studi di assorbimento della fase vapore
- K) Studi per la soglia olfattiva
- L) Studi di combustione e pirolisi e analisi teoriche
- M) Misure della permeabilità della sostanza attraverso guanti usati da lavoratori o consumatori
- N) Determinazione dei punti di ebollizione, fusione, sublimazione
- O) Misure di densità (per gas, liquidi o solidi)
- P) Misure delle costanti di dissociazione
- Q) Studi di infiammabilità o esplosività
- R) Misura della dimensione delle particelle
- S) Misure di pH
- T) Studi di incompatibilità chimica e analisi teoriche
- U) Studi di biodegradazione
- V) Studi di idrolisi
- W) Studi di ossidazione in acqua
- X) Studi di degradazione fotochimica in acqua
- Y) Studi di destino ambientale in acque naturali
- Z) Dati spettrali

4) Dati relativi all'esposizione di persone o dell'ambiente alla sostanza

(*) Da: Federal Register (1979).

nei luoghi di lavoro e per tutelare l'integrità dell'ambiente. A quel tempo già esisteva nella Comunità la Direttiva del Consiglio 67/548, adottata per la prima volta nel 1967 ed emendata numerose volte.

Nel settembre 1976 la Commissione inviò al Consiglio la sesta di una serie di modifiche alla Direttiva 1967. Questa proposta è nota come « VI modifica » ed è in sostanza l'equivalente comunitario della legge TSCA per quanto riguarda gli aspetti relativi alla notifica preventiva alla commercializzazione. La sostanziale differenza tra la legge TSCA e la proposta di VI modifica CEE è nel fatto che quest'ultima non riguarda le sostanze già presenti in commercio, che anzi sono esplicitamente escluse. Inoltre, la VI modifica non prevede alcuna esplicita od implicita autorizzazione dei prodotti ed è solo un meccanismo per consentire all'Amministrazione sanitaria di essere informata e supervisionare l'immissione sul mercato delle sostanze chimiche. Secondo il disposto della proposta di VI modifica, con la notifica deve essere presentata all'Amministrazione sanitaria una documentazione contenente le informazioni necessarie per valutare i rischi immediati e differiti che le nuove sostanze possono presentare per l'uomo e per l'ambiente. In particolare, la proposta di Direttiva prescrive per tutte le nuove sostanze i seguenti dati:

- identità della sostanza; informazioni relative all'uso proposto ed alle quantità importate e/o prodotte; proprietà chimico-fisiche: punto di fusione, densità relativa, ecc.; dati tossicologici (effetti acuti, effetti irritanti, effetti corrosivi sulla pelle e sugli occhi, saggi di sensibilizzazione e di mutagenesi); dati ecotossicologici (effetti acuti sul pesce e sulla *Daphnia*, saggi di biodegradazione); possibilità di rendere la sostanza non tossica.

Un'altra possibilità prevista dalla VI modifica è quella di estendere la richiesta di dati tossicologici ed ecotossicologici in modo progressivo con l'aumentare della quantità commercializzata. In altri termini, è previsto dalla VI modifica uno schema gerarchico di saggi per le sostanze tossiche. Per quanto riguarda gli aspetti ecotossicologici, lo schema gerarchico è mostrato in Tab. 2. La VI modifica della Direttiva 67/548/CEE è stata approvata in data 18 settembre 1979, pubblicata nella G.U. CEE L. 259, v. 22, p. 10 del 15 ottobre 1979 e recepita in Italia con il D.P.R. n. 927 del 24 dicembre 1981.

Un aspetto che merita particolare approfondimento nell'ambito dei problemi conoscitivi per una corretta interpretazione dei risultati dei saggi di tossicità sui diversi organismi ambientali, è quello del metabolismo comparato delle sostanze tossiche, e particolarmente di quelle genotossiche (1), in tali organismi. Questa rassegna critica, pertanto, prende in esame le principali recenti acquisizioni scientifiche sulla natura degli agenti genotossici, sui meccanismi della loro attivazione, sulla induzione enzimatica di organismi di diversa complessità biologica. Inoltre sono descritte in modo sintetico le principali metodologie disponibili per lo studio *in vitro* del metabolismo delle sostanze genotossiche.

(1) Gli effetti tossici, letali ed ereditari delle sostanze chimiche, derivanti da interazioni con il materiale genetico, sono descritti con il termine genotossicità.

Tabella 2. - *Schema sequenziale per le indagini ecotossicologiche secondo l'allegato V della VI modifica della Direttiva CEE 79/831, recepita in Italia con il D.P.R. n. 927 del 24 dicembre 1981.*

Livello 0 (dossier di base per tutte le sostanze di cui è prevista una immissione sul mercato superiore ad 1 tonnellata):

- Tossicità acuta su pesce e *Daphnia*;
- Degradazione biotica e abiotica (dovrebbero essere determinati almeno il BOD e il rapporto BOD/COD).

Livello 1 (può essere richiesto per immissioni da 10 tonnellate anno o di 50 tonnellate complessive: è obbligatorio da 100 t/anno a 500 t totali):

- Prova di crescita algale;
- Tossicità a lungo termine con pesce e *Daphnia*;
- Test di bioaccumulo (pesce);
- Tossicità acuta su Anellidi terrestri;
- Tossicità acuta su Insetti;
- Tossicità acuta su Uccelli;
- Tossicità acuta su Batteri;
- Inibizione della crescita di macrofite terrestri.

Livello 2 (obbligatorio per immissioni di 1000 t/anno o di 5000 t complessive):

- Ulteriori prove di bioaccumulo;
- Ulteriori prove di tossicità a lungo termine su specie appartenenti a diversi composti ambientali;
- Studi di biomagnificazione con ecosistemi di laboratorio.

2. NATURA DEGLI AGENTI GENOTOSSICI.

Le sostanze genotossiche, sintetiche o naturali, spesso non sono attive *per se*, ma necessitano di una trasformazione metabolica catalizzata da enzimi per essere trasformate in intermedi reattivi che si combinano con costituenti cellulari critici [1]. Pertanto gli agenti genotossici possono essere:

a) *precursori*: sostanze chimiche diverse (Tab. 3) che non hanno proprietà genotossiche *per se* ma devono essere convertite (bioattivazione) in agenti genotossici finali in organi metabolicamente competenti;

b) *finali*: metaboliti degli agenti genotossici precursori (ad es., vedi Tab. 4, lettere A-I') e sostanze chimiche che possiedono, anche in assenza di metabolismo, le proprietà intrinseche necessarie per interagire con i bersagli cellulari critici e, quindi, per iniziare il processo genotossico (ad es., vedi Tab. 4, lettere G-I). In genere, gli agenti genotossici finali danno risultati positivi anche nei sistemi di saggio *in vitro* che danno risultati negativi con i composti precursori.

Gli agenti genotossici precursori, sintetici o naturali, hanno strutture chimiche molto eterogenee, mentre

Tabella 3. - *Agenti genotossici precursori* (Wright, *ref.* 1).

Idrocarburi eterociclici e policiclici aromatici

Ammine e Azo-coloranti (primari, secondari, terziari, aromatici e eterociclici)

Nitroarili e Nitrofurani

Nitrosammine e Nitrosocarbammati

Alchiltrialzine e Dialchiltrialzine

Acetammide, Tioammidi, Carbammati

Alcuni idrocarburi clorurati, es.: Cloruro di vinile

Prodotti naturali, es.: Cicasina, Saprolo, alcune Micotossine, Alcaloidi Pirrolizidinici

una maggiore somiglianza strutturale esiste tra gli agenti genotossici finali. Si va, infatti, facendo chiaro che la forma reattiva di molte sostanze mutagene e cancerogene è una struttura elettrofila (cioè carente di elettroni) alchilante o arilante. L'entità della formazione di questi reagenti elettrofili a partire da agenti precursori ed i livelli presenti in una data specie animale o in un dato organo sono il risultato del bilancio fra processi di attivazione e la degradazione (Fig. 1). Una volta formato, un composto genotossico finale può reagire con i recettori critici o essere disattivato mediante legame a recettori non critici, degradazione spontanea e/o trasformazione enzimatica. Analogamente i precursori e gli eventuali intermedi possono essere detossificati mediante reazioni enzimatiche e non enzimatiche. I composti elettrofili reagiscono formando legami covalenti con gruppi nucleofili di macromolecole cellulari come il DNA e RNA (guanina N-7, C-6 e C-8; adenina: N-1 e N-3; citosina: N-3) e le proteine (metionina, cisteina, istidina: N-1 e N-3, e tirosina). Ad esempio è stato dimostrato che i derivati N-nitrosoalchilici ed altri agenti alchilanti legano il DNA alla posizione N-7 della guanina [4]. Vale, inoltre, sottolineare che gli agenti elettrofili possono determinare, oltre ad effetti mutageni e cancerogeni, altre forme di

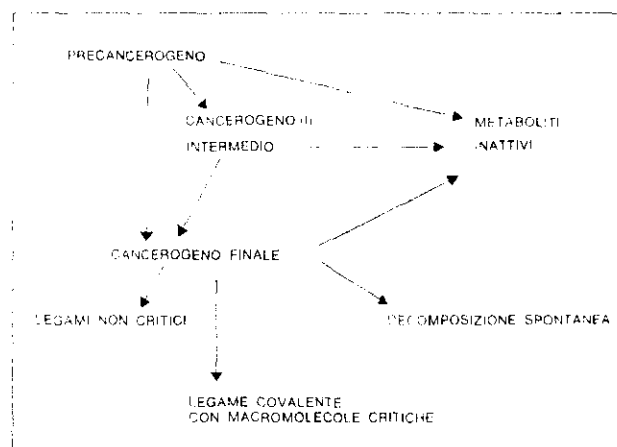


Fig. 1. - Schema di attivazione metabolica di precancerogeni a cancerogeni finali (Wood *et al.*, *ref.* 3).

Tabella 4. - Alcuni agenti mutageni alchilanti (De Bruin, ref. 2).

GRUPPO	Formula di struttura	Esempi	Metabolita mutageno (Gruppo funzionale)
A) Tioeteri alifatici sostituiti..	$\text{S} \begin{cases} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{X} \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{X} \end{cases}$	Di (2-cloroetil) solfuro	Diversi metaboliti urinari
B) Ammine o ammidi	$\text{R}-\text{N} \begin{cases} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl} \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{Cl} \end{cases}$	$\text{R} = -\text{CH}_3$	$\text{R}-\text{N}^+ \begin{cases} \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{Cl} \end{cases} \text{CH}_2$
C) Lattoni	$\text{O} - (\text{CH}_2)_n \text{C} = \text{O}$	β -propiolattone $\begin{array}{c} \text{O}-\text{C}=\text{O} \\ \\ 1,3\text{-propanesulfone} \\ \text{O}-\text{SO}_2 \end{array}$	via intermedi carbossilici forma complessi DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-proteine
D) Alchilsulfonati ed Esteri Metansulfonici	$\begin{array}{l} \text{R}-\text{O}-\text{SO}_2-\text{CH}_3 \\ \text{H}_2\text{C}-\text{S}(\text{O}_2)-\text{O}-(\text{CH}_2)_n \\ -\text{O}-(\text{O}_2)\text{S}-\text{CH}_3 \end{array}$	MMS, EMS $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5$ Busulfan ($n = 4$)	Metilano le purine del DNA e i gruppi -SH proteici
E) Cloroeteri	$\text{O} \begin{cases} (\text{CH}_2)_n\text{Cl} \\ (\text{CH}_2)_n\text{Cl} \end{cases}$	Bis-clorometil etere	Probabilmente attraverso intermedi ciclici
F) N-Nitrosamine	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{N}-\text{R} \\ \\ \text{NO} \end{array}$	DMN, DEN $\text{R} = \text{CH}_3$, $\text{R} = \text{C}_2\text{H}_5$	Ioni metilcarbonio ($^+\text{CH}_3$) via intermedi $\text{R}-\text{NH}-\text{NO}$ e/o $\text{CH}_3 = ^+\text{N} = \text{N}^-$
G) Etilenimine	$\text{R}-\text{N} \begin{cases} \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \end{cases}$	Aziridine Etilenimmina	—
H) Epossidi	$\text{O} \begin{cases} \text{CH}_2 \\ \text{CH}_2 \end{cases}$	Ossido di etilene Ossido di propilene Epicloridrina	—
I) Fosfotriesteri	$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{O} \\ \text{CH}_3\text{O} \end{array} \text{P} \begin{array}{c} \diagup \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \text{O} \\ \text{O} \end{array} \text{O}-\text{X}$	Dichlorvos $\text{X} = \text{CH} = \text{CCl}_2$	—

tossicità come, ad es., effetti embriotossici, necrosi cellulare e reazioni di ipersensibilità [5] e che non mancano esempi di composti chimici che possono influenzare le proprietà del DNA anche senza formare legami covalenti. Ad es., l'icantone induce mutazioni « frameshift » in *Salmonella* e fago T4, intercalandosi fra le basi del DNA [6] e l' HNO_2 trasforma le basi del DNA per deaminazione ossidativa. Inoltre, ovviamente, i processi di bioattivazione non si verificano soltanto per i composti genotossici, ma anche per composti che esercitano altre forme di tossicità, come ad es. gli organotiocianati, l'acido fluoracetico e il nitrobenzene.

3. - ATTIVAZIONE DI AGENTI GENOTOSSICI.

Molti agenti genotossici sono lipofili a pH fisiologico. Dopo assunzione da parte dei mammiferi, l'escrezione di tali composti avviene dopo conversione a metaboliti idrofili, con un processo caratterizzato, nella

maggior parte dei casi, da numerosi stadi, ciascuno catalizzato da un enzima la cui azione aumenta la idrosolubilità del composto (Fig. 2). Queste trasformazioni metaboliche avvengono principalmente nelle cellule del fegato, dove sono catalizzate da enzimi presenti nella frazione cellulare solubile, mitocondriale, microsomiale e nucleare. I sistemi enzimatici che metabolizzano le sostanze xenobiotiche (1) sono presenti, anche se in minor misura, nelle cellule del tratto gastro-intestinale, del rene, del polmone, della placenta e del sangue. Per particolari sostanze chimiche o particolari vie di esposizione, altri organi possono svolgere un ruolo metabolico importante, come quello o più di quello del fegato (ad es. agenti oncogeni presenti nel fumo). Anche il ruolo delle reazioni enzimatiche catalizzate dalla flora intestinale può essere di grande importanza per alcuni agenti genotossici (ad es. nitrosammine) [8,9].

(1) Sono così definiti quei composti di sintesi non rinvenuti nell'ambiente in quantità significative se non come conseguenza di attività antropiche.

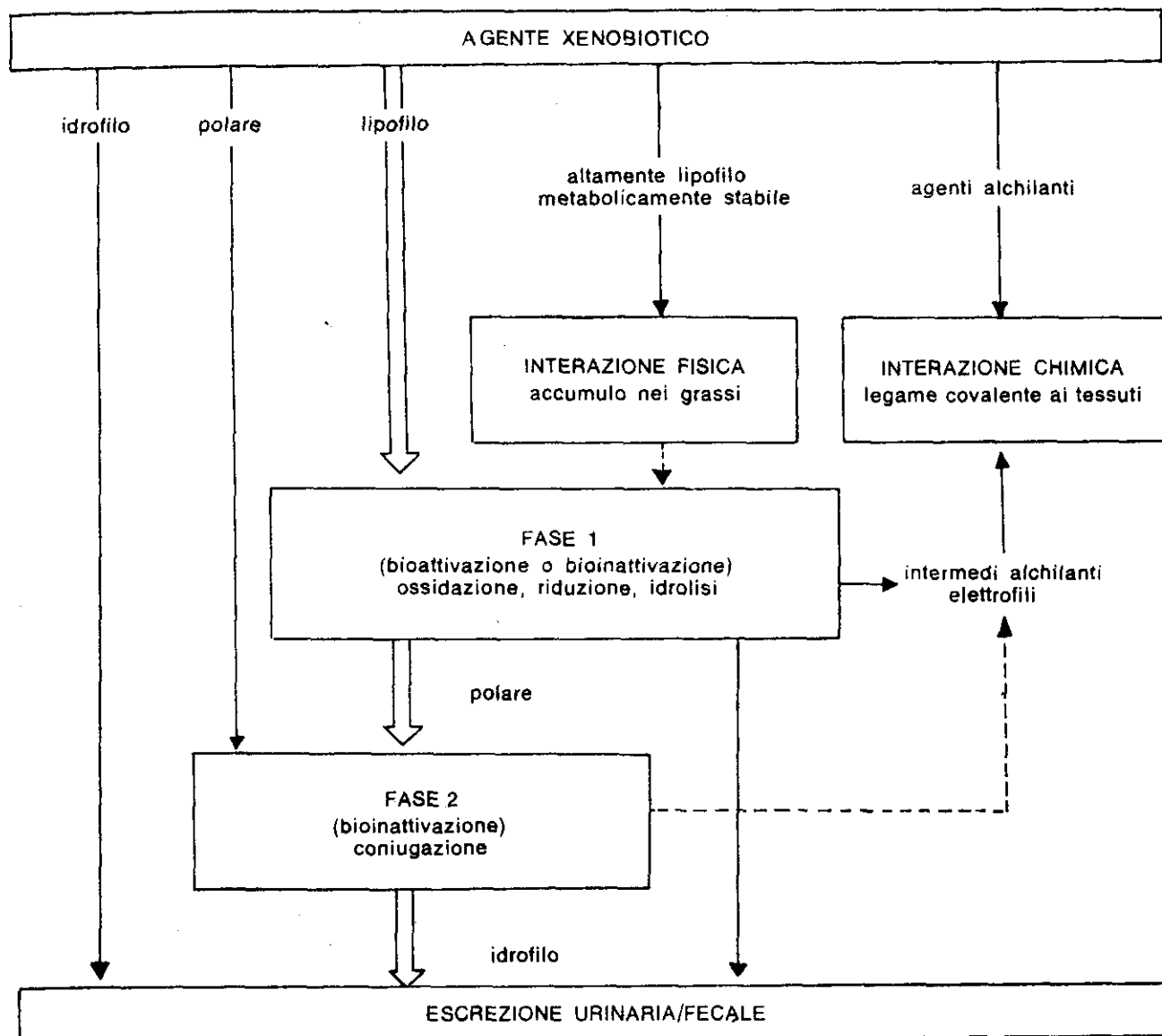


FIG. 2. - Rappresentazione schematica di alcuni aspetti del metabolismo di agenti xenobiotici (Modificata da Ariens *et al.* ref. 7).

3.1. - Reazioni di ossido-riduzione.

Le reazioni ossido-riduttive costituiscono in genere la prima fase della trasformazione metabolica di una sostanza esobiotica. Il più importante sistema per l'attivazione e detossificazione degli agenti cancerogeni e mutageni è il sistema monoossigenasico dipendente dal citocromo P-450 [10]. Questo sistema è presente in tutte le cellule nucleate di mammifero finora studiate [1]. Esso catalizza l'ossido-riduzione di coenzimi piridin-nucleotidici ridotti, ossigeno molecolare e substrato, producendo l'inserimento di un atomo di ossigeno nella molecola di substrato con formazione di un metabolita ossidrilato (Fig. 3). Ciò aumenta l'idrosolubilità del substrato e gli fornisce un gruppo al quale possono essere legate sostanze polari endogene ad opera di enzimi O-transferasici. Il sistema preposto a questa funzione è localizzato nella membrana del reticolo endoplasmatico ed in quella nucleare; esso è costituito da diversi enzimi e richiede, per svolgere la sua funzione, un ambiente lipidico

(fosfolipidi). Il componente proteico centrale del sistema è il citocromo P-450 che, agendo come ossidasi terminale, lega il substrato ed attiva l'ossigeno quando riceve elettroni dal NADPH (donatore principale), attraverso l'azione del flavoenzima NADPH-cit. P-450 riduttasi; uno dei due atomi dell'ossigeno viene incorporato nel substrato e l'altro viene ridotto ad acqua. Il NADH può agire da donatore di elettroni per il citocromo P-450 solo attraverso il citocromo b_5 . La specificità del substrato risiede nella parte proteica e vi è evidenza che il citocromo P-450 esiste in forme multiple in ciascun tipo di tessuto (ad es. cit. P-450 e cit. P₁-450 anche detto P-448). Le reazioni catalizzate dal sistema monoossigenasico includono l'idrossilazione aromatica e alifatica, la formazione di ossidi arenici e alchenici, la N-, O- e S-dealchilazione ossidativa, la sulfossidazione, la deaminazione ossidativa, la desulfurazione e la dealogenazione [11]. La molteplicità delle forme del citocromo P-450 e l'adattabilità e inducibilità delle monoossigenasi forniscono i tessuti dei mammiferi di un sistema estremamente versa-

tile capace di catalizzare le ossidazioni di substrati esogeni ed endogeni molto diversi.

Il fegato possiede le più elevate attività monoossigenasiche nel ratto, topo, coniglio, criceto, cavia [1]. Tali attività sono anche misurabili nel polmone, nella pelle, nell'intestino, nel rene, nelle surrenali e in altri organi [1]. Alcuni dei principali fattori noti per influenzare la quantità e l'attività degli enzimi monoossigenasici sono riportati in Tab. 5. La ben nota differenza del sistema monoossigenasico del fegato di ratto legata al sesso (maschio > femmina) non è caratteristica di

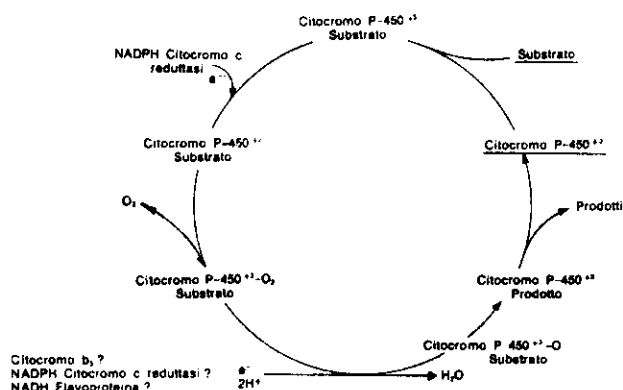


FIG. 3. - Meccanismo del sistema enzimatico del cit. P-450 (Gillette *et al.*, ref. 10).

tutti gli organi del ratto; ad es., essa non è stata osservata per le attività del polmone o dell'intestino [27]. Inoltre, è ben noto che le monoossigenasi dei microsomi di fegato di adulto sono più attive di quelle fetali e che il rapporto P-450/P-448 aumenta dal feto all'adulto [28].

Le differenze metaboliche possono essere di notevole importanza nell'espressione dell'attività genotossica e tossica in genere. Ad esempio nel ratto, topo e cane la 2-N-fluoro-anilacetamide viene trasformata in N-idrossi-fluoro-anilacetamide che è un cancerogeno più potente del composto originario, mentre nella cavia tale trasformazione non avviene. In corrispondenza di ciò è stato dimostrato che ratti, topi e cani sono più suscettibili all'azione cancerogena di tale composto, rispetto alla cavia [29, 30].

Un problema che ha ricevuto molta attenzione è quello relativo alle modalità con cui i composti elettrofili (ad es. epossidi), che si formano a livello del reticolo endoplasmatico, vengono trasportati al nucleo dove avviene il legame covalente al DNA [31]. La prima possibilità è che il metabolita reattivo diffonda attraverso la fase acquosa del citoplasma; in tale caso è prevedibile che una larga parte dei reagenti elettrofili sia convertita in forme stabili prima di arrivare al nucleo. La seconda possibilità è che i metaboliti reattivi possano diffondere dal luogo dove si formano verso il nucleo attraverso il doppio strato membranoso del reticolo endoplasmatico che, quindi, esplicherebbe un ruolo protettivo e stabilizzante per tali agenti reattivi. La terza possibilità è che i metaboliti reattivi si leghino a proteine solubili e siano da queste trasportate al nucleo; a tale proposito, è ben nota la esistenza di proteine citoplasmatiche dotate di elevata affinità di legame verso i metaboliti di sostanze cancerogene (una di queste, la ligandina, rappresenta il 5 % delle proteine

solubili delle cellule epatiche parenchimali). Esiste, inoltre, la possibilità che, almeno in alcuni casi, i metaboliti reattivi che si legano al DNA siano invece prodotti direttamente nella membrana nucleare esterna [32-34]. Ad esempio, i nuclei isolati da cellule di fegato di ratto contengono il citocromo P-450 e l'attività idrocarburo-aromatico-ossidrilasi [32-34].

3.2. - Reazioni di sintesi (coniugazione).

Le principali reazioni di coniugazione sono sintesi di O-N- ed S-glucuronidi, sintesi di solfati esterei, coniugazione con glutazione, coniugazione con glicina, N-, O-, S-metilazione, e acetilazione [11]. Inoltre, nell'uomo e nella scimmia, ha luogo anche la coniugazione con glutammina. In queste reazioni i composti xenobiotici ed i loro metaboliti, contenenti opportuni gruppi (ad es. amminici, ossidrilici, carbossilici, epossidi) si combinano con substrati endogeni per formare coniugati non reattivi che possono essere facilmente escreti. Queste reazioni richiedono ATP, coenzimi e transferasi che di solito sono specifiche per la formazione di coniugati di sostanze esobiotiche. Le coniugazioni procedono di solito in due stadi: il primo extramicrosomiale consistente nella sintesi di acilcoenzima ed il secondo, consistente nel trasferimento della metà acilica allo aglicone, talvolta localizzato nei microsomi. La formazione di glucuronidi è probabilmente il meccanismo di coniugazione microsomiale più importante. Esso si verifica nel fegato ed in minore entità nel rene, nel tratto gastro-intestinale e nella pelle [1].

Tabella 5. - Alcuni parametri che influenzano il metabolismo di sostanze xenobiotiche (Wood, rf. 3).

FATTORE	Referenza
Età	Levin & Ryan, rf. 12; Neims <i>et al.</i> rf. 13
Malattie particolari	Conney <i>et al.</i> , rf. 14; Kato, rf. 15
Bioritmo	Poley <i>et al.</i> , rf. 16
Stato ormonale	Vesell <i>et al.</i> , rf. 17
Condizioni di stabulazione	Vesell <i>et al.</i> , rf. 17
Fattori immunologici ..	Vesell <i>et al.</i> , rf. 17
Induttori	Conney, rf. 18
Attivatori ed inibitori	Cinti, rf. 19, Conney, rf. 18
Nutrizione e dieta	Cambell & Hayes, rf. 20; Conney, rf. 21, 22
Sesso	Kato, rf. 23; Levin & Ryan, rf. 12
Specie	Williams, rf. 24
Ceppo	Nebert & Felton, rf. 25; Vesell, rf. 26
Stress	Vesell <i>et al.</i> , rf. 17

La formazione degli esteri solfati è, invece, un processo extramicrosomiale.

Solo le transferasi microsomiali sono indotte dal benzopirene ed inibite dal SKF 525A. Le acetil-transferasi si trovano nella frazione solubile della cellula.

In genere, le reazioni di coniugazione rappresentano lo stadio finale del metabolismo di numerosi xenobiotici e producono composti privi di attività biologica. Tuttavia vi sono alcune eccezioni a questa regola generale (ad es. N-idrossiammine e N-idrossiammidi) e si ritiene che alcune reazioni di coniugazione giochino un ruolo critico nell'attivazione di alcuni agenti genotossici intermedi [1]. Per esempio, la glucuronidazione o la solfatazione delle N-idrossiammidi produce molecole reattive capaci di interagire con molecole cellulari come il DNA [35] e l'estere solforico dell'N-idrossi-2-acetil-amino-fluorene viene considerato come un importante cancerogeno finale del 2-acetil-amino-fluorene, pur se altri composti (ad es. l'analogo deacetilato) sono anche ritenuti importanti.

3.3. - S-glutatione-transferasi e epossido-idratasi.

I tessuti dei mammiferi contengono due sistemi enzimatici (le S-glutatione-transferasi e le epossido-idratasi) che inattivano gli elettrofili e, quindi, proteggono i nucleofili cellulari dall'attacco di tali agenti (Fig. 4). Sette diversi tipi di glutathione-transferasi sono stati identificati finora [36, 37]; esse attaccano gli alogenuri

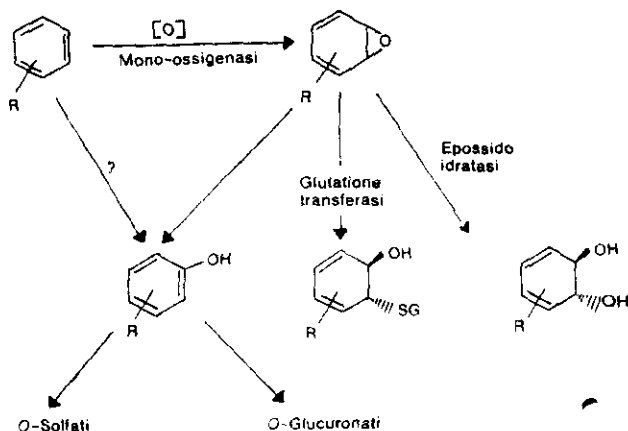


FIG. 4. - Principali vie metaboliche degli idrocarburi aromatici (Wright, ref. 1).

alchilici, arilici e arilalchilici ed i composti che contengono atomi di azoto e zolfo elettrofili. L'attività glutathione-transferasica è stata messa in evidenza in tutte le specie analizzate, incluso l'uomo [1]. Il fegato è il tessuto più ricco di questo enzima, ma esso è presente in numerosi altri tessuti. Nel ratto, questa attività enzimatica è bassa alla nascita ed aumenta rapidamente in circa 40 giorni fino al livello degli adulti [38, 39]. Le glutathione-transferasi sono enzimi citoplasmatici; tuttavia, recentemente è stata riportata l'esistenza di una glutathione-transferasi legata alla membrana microsomiale [40].

L'eossido-idratasi catalizza l'idrolisi di un legame carbonio-ossigeno nell'anello epossidico. Ciò porta regolarmente all'inattivazione dell'eossido genotossico,

per quanto in alcuni casi, come ad es. il benzopirene, il prodotto idrato può essere ulteriormente trasformato in un altro agente genotossico. Dapprima si riteneva che l'attività epossido-idratasica fosse localizzata esclusivamente nel reticolo endoplasmatico in stretta associazione funzionale e topologica con le monoossigenasi microsomiali, ma recentemente epossido-idratasi solubili sono state scoperte nel fegato di topo e ratto [1].

4. - INDUTTORI ENZIMATICI.

Da lungo tempo è nota l'esistenza di sostanze chimiche che possono aumentare l'attività di alcuni sistemi enzimatici metabolizzanti. Queste sostanze chimiche sono dette *induttori enzimatici*; esse agiscono in prevalenza stimolando la sintesi di alcuni sistemi enzimatici responsabili del metabolismo delle sostanze estranee all'organismo. L'importanza di questi *induttori* è duplice. Infatti, se il metabolismo produce metaboliti meno tossici o non tossici, essi riducono la tossicità del composto. Se d'altra parte il composto necessita di una attivazione metabolica, l'induttore ne può aumentare la tossicità. L'entità delle variazioni nell'attività biologica che si possono riscontrare dopo induzione enzimatica è evidente non solo dagli effetti genotossici, ma anche da effetti tossici acuti [11]. A fenomeni di induzione enzimatica è anche dovuta la comune osservazione che la ripetuta somministrazione di alcune sostanze (ad es. pentobarbital, esobarbital, aminopirina, benzo (a) pirene, benzene, 9, 10-dimetil-1, 2-benzopirene e fenil-butazone) determina una modifica del metabolismo di tali sostanze [11]. Numerosi induttori esplicano il loro massimo effetto abbastanza rapidamente e comunque entro 2-3 giorni dalla somministrazione. Può accadere che trattamenti troppo prolungati con l'induttore producano un effetto di minore induzione. Non necessariamente una sostanza si comporta da induttore in specie diverse. Ad esempio, il DDT diminuisce l'accumulo di dieldrin in ratti, maiali e pecore ma non nei polli. Inoltre, il pretrattamento con nicotammide riduce gli effetti del pentobarbital in ratti, conigli e topi ma non in cavia, polli, camaleonti, rane e caimani [41-43].

Gli agenti induttori sono di solito divisi in due gruppi. Il gruppo tipo « barbiturici » (ad es. fenobarbital, DDT, fenilbutazone) e quelli tipo « idrocarburi policiclici aromatici » (ad es. 3-metilcolantrene, 5, 6-benzoflavone (1); tetraclorodibenzo-p-diossina).

Questi due gruppi di composti inducono rispettivamente il citocromo P-450 ed il citocromo P₁-450. Studi più recenti hanno mostrato l'inadeguatezza di questa classificazione; infatti, forme multiple di emoproteine P-450 (e non solo due) sono presenti nei microsomi di animali non trattati ed in quelli di animali trattati con i due tipi di induttori [44]. Inoltre, alcuni induttori non sono classificabili secondo tale schema. Per esempio, i bifenili policlorurati, a seconda del particolare isomero utilizzato, inducono sia i citocromi P-450 che P₁-450 e alcuni steroidi sintetici (ad es. pregnenolone-16 α -carbonitrile) e composti metilenidrossifenilici (ad es.

(1) Anche denominato β -naftoflavone.

isosaftolo) inducono tipici profili di citocromo P-450 [44]. Ad esempio, le proprietà spettrali delle emoproteine microsomiali di ratti trattati con pregnenolone-16 α -carbonitrile furono simili a quelle ottenute a seguito di induzione con fenobarbital (PB) e diverse da quelle ottenute a seguito di induzione con 3-metilcolantrene (3-MC). Tuttavia, il PB esercita la sua massima attività nell'induzione della benzofetamina N-demetilasi, il 3-MC aumenta al massimo la benzopirene idrossilasi, mentre il pregnenolone-16 α -carbonitrile attiva principalmente la etilmorfina N-demetilasi [45]. L'Aroclor (una miscela di policlorobifenili-PCB- a diverso grado di clorurazione) è uno degli induttori dei sistemi monoossigenasici più usato negli esperimenti di attivazione metabolica per il fatto che esso induce sia il P-450 che il P₁-450. Tuttavia la tossicità e la persistenza dei PCB non ne favoriscono un uso routinario negli esperimenti di induzione dei sistemi monoossigenasici microsomiali. Mathsushima *et al.* [46] hanno raccomandato, in alternativa all'Aroclor, la somministrazione simultanea al ratto del fenobarbital e del 5,6-benzoflavone. Il 5,6-benzoflavone induce le stesse emoproteine indotte dal 3-metilcolantrene, ma viene considerato meno tossico. Studi di attivazione metabolica hanno indicato che la frazione subcellulare S9 di tessuto epatico di ratto indotto con il metodo di Mathsushima [46], attiva 6 premutageni con efficacia analoga alla frazione S9 da ratti pretrattati con una miscela di PCB. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per poter valutare l'equivalenza dei due trattamenti.

L'efficacia del trattamento di induzione può essere verificata controllando il livello del citocromo P-450 in animali trattati e non trattati. In aggiunta (o alternativamente) è possibile verificare l'induzione delle due principali forme di citocromo P-450 mediante dosaggi enzimatici. In particolare le attività benzo(a)pirene-idrossilasi e quella etossicumarina-deetilasi sono buoni marcatori dell'induzione del P₁-450, mentre alcune N-demetilasi (aminopirina, benzfetamina ed etilmorfina) e l'anilina-idrossilasi sono buoni marcatori dell'induzione del P-450.

L'induzione dei citocromi e delle ossidasi a funzione mista non è necessariamente sinonimo di induzione

di mutazione valutata con il test di Ames (*Salmonella* microsomi). Ad es. Zeiger *et al.* [47] hanno dimostrato che, a seguito di induzione con Aroclor 1254, la mutagenicità del benzo(a)pirene viene aumentata, mentre quella del 2-aminoantracene viene inibita. La tabella 6 riassume i dati disponibili in letteratura sulla inducibilità del citocromo P-450, di diverse monoossigenasi e della UDP-glucuronide-glucuronil-transferasi nel fegato di organismi diversi (ratto, quaglia e trota) da parte di 3-MC, PB e PCB. La tabella mostra che alcune attività enzimatiche della trota sono meno sensibili all'induzione da PCB di quelle di ratto e quaglia. Inoltre, il fegato di trota non contiene citocromi né attività enzimatiche inducibili da induttori del tipo fenobarbital. Invece, per quanto riguarda la sensibilità agli induttori del tipo 3-metilcolantrene, a parte il caso della UDP-glucuronide-glucuronil transferasi, non sembrano esservi differenze qualitative tra ratto e trota. Pertanto, nonostante la somiglianza tra i sistemi monoossigenasici di mammiferi e di pesci, i pesci rispondono all'induzione esercitata dagli idrocarburi policiclici aromatici, ma sono refrattari agli agenti induttori tipo fenobarbital.

5. - METABOLISMO IN VITRO.

Vi sono diversi casi in cui è desiderabile disporre di sistemi *in vitro* per il metabolismo delle sostanze tossiche. Un esempio ben noto è quello delle indagini di mutagenesi. Infatti, diversi sistemi procarioti ed eucarioti utilizzati come organismi indicatori possono presentare limitate capacità di metabolizzare le sostanze tossiche. Ciò non vuol dire che gli organismi usati come sistemi di saggio per la mutagenesi non abbiano capacità metaboliche importanti. Ad esempio, i batteri contengono efficienti attività nitro-riduttasiche (che possono attivare composti diversi come ad es. i nitrofurani) e alcuni microorganismi contengono un sistema monoossigenasico dipendente dal citocromo P-450 che somiglia in qualche modo al sistema dei mammiferi [64]. L'esistenza di un sistema monoossigenasico è stata accertata sia in funghi (ad es. *Candida tropicalis*, *Claviceps purpurea*) che in batteri (ad es. *Corynebacterium* sp.,

Tabella 6. - Inducibilità di enzimi microsomiali in organismi diversi (*).

	3-Metilcolantrene		Fenobarbital/DDT			PCB		
	Ratto	Trota	Ratto	Trota	Quaglia	Ratto	Trota	Quaglia
Cit. P-450	+	+	+	—	+	+	+	+
NADPH-cit. C reductasi	—	—	+	—	—	+	—	—
BP-idrossilasi	+	+	+	—	—	+	+	—
Anilina idrossilasi	—	—	+	—	+	+	—	+
p-nitroanisolo-O-demetilasi	+	+	+	—	—	+	+	+
7-etossicumarina-O-deetilasi	+	+	+	—	—	+	+	—
Etilmorfina N-demetilasi	—	—	+	—	+	+	—	+
UDP-glucuronil-transferasi	+	—	+	—	—	+	—	+

(*) Simboli: + = presenza induzione. — = assenza induzione.

Ratto: ref. 44,48-55.

Trota: ref. 44,56-60.

Quaglia: ref. 61-63.

Nocardia sp., *Pseudomonas putida* e *Rhizobium japonicum*). Tuttavia, gli organismi utilizzati routinariamente per diversi tests di mutagenesi sono in genere poco efficaci nell'attivare gli agenti premutageni a mutageni [3]. Inoltre, diverse linee cellulari normalmente utilizzate in studi di mutagenesi come le cellule V79, CHO e L5178Y, non sono capaci di attivare efficacemente gli agenti precursori genotossici [65]. In tutti questi casi l'inclusione di un sistema di attivazione metabolica nel sistema di saggio *in vitro* è essenziale. I sistemi metabolici *in vitro* sono di grande utilità anche per confrontare le capacità metaboliche di tessuti diversi dello stesso animale o di tessuti corrispondenti in specie diverse (inclusi i tessuti umani ottenuti mediante autopsia o eventualmente a seguito di biopsia terapeutica). Anche qualora l'obiettivo sia quello di confrontare le attività metaboliche in organismi a diverso livello di complessità biologica, i sistemi *in vitro* possono presentare ovvi vantaggi. Questi sistemi forniscono anche buone possibilità per lo studio di metaboliti intermedi. Infine, i sistemi *in vitro*, e particolarmente quelli cellulari, presentano una maggiore accessibilità ai composti chimici, consentono di mantenere un ambiente uniforme dal punto di vista chimico-fisico e permettono anche lo studio di composti disponibili in quantità molto limitate. Naturalmente i sistemi metabolizzanti *in vitro* non sono privi di limitazioni che saranno discusse più avanti.

5.1. - Sistemi cellulari.

Negli esperimenti di mutagenesi l'attivazione metabolica mediata da cellule intatte viene effettuata coltivando le cellule bersaglio con altre cellule che non si dividono, ma che sono metabolicamente competenti per attivare premutageni [65]. I sistemi più usati sono fibroblasti di roditori irradiati letalmente [66] e cellule irradiate di rene di criceto (BHK-21) [67]. Più recentemente sono state usate culture primarie di epatociti per l'attivazione di sostanze epato-cancerogene come la N-nitroso-dimetilammina, N-nitroso-diethylammina, N-2-acetilammino-fluorene e aflatossina B₁ [68-70]. Espianti bronchiali umani sono anche stati utilizzati per metabolizzare idrocarburi policiclici o prodotti mutageni in co-cultura con cellule di criceto V79 [71]. Recentemente, un metodo rapido è stato proposto per valutare se agenti chimici utilizzati in agricoltura possano essere convertiti in agenti mutageni dal metabolismo vegetale [72]; il metodo è basato sull'uso di colture di cellule di *Nicotiana glauca*. Diversi tipi di cellule, inoltre, sono stati utilizzati simultaneamente come sistemi di attivazione e sistemi bersaglio specialmente per investigare la sintesi non programmata del DNA e la trasformazione [65]. L'uso di cellule coltivate come sistemi di attivazione ha il vantaggio di conservare intatta l'architettura cellulare e la distribuzione dei vari sistemi enzimatici che metabolizzano gli xenobiotici; anche i livelli di cofattori endogeni dei diversi enzimi sono preservati meglio. Nondimeno, anche i sistemi cellulari non sono privi di inconvenienti. Infatti, le colture primarie di epatociti di ratto e topo che contengono il più ampio spettro di enzimi capaci di metabolizzare le sostanze xenobiotiche, manifestano selettive modificazioni delle funzioni microsomiali durante le prime ore di incubazione [71]. Tra queste alterazioni vi è, per esempio, una rapida diminuzione del citocromo P-450. Nel caso degli epatociti di ratto è stato mostrato che questa alterazione

era in parte dovuta ad una carenza di acido ascorbico nelle cellule in coltura (dovuta alla diminuita attività dell'ascorbico-sintetasi) [73]. In ogni caso l'aggiunta di vitamina C al mezzo di coltura mantiene il livello di citocromo P-450 al 50 % circa di quello presente negli epatociti appena isolati. Nel caso delle colture primarie di epatociti di topo fu osservato, invece, che il declino della funzione ossidativa mista era dovuto in parte all'assenza di fattori umorali (testosterone, estradiolo, corticosterone, etc.) necessari a mantenere lo stato differenziato e l'attività MFO *in vivo* [74]. Nonostante alcune limitazioni, le colture primarie di epatociti di ratto hanno *in vitro* un metabolismo delle sostanze xenobiotiche più simile a quello *in vivo* che non la frazione S9. Ciò è stato dimostrato per substrati aromatici e alifatici che vengono idrossilati, N-demetilati o glucuronidati [71]. Inoltre per quanto riguarda, in particolare, il benzo(a)-pirene e alcuni barbiturici, le vite medie e i metaboliti formati nelle colture cellulari, ma non quelli nella frazione S9, sono simili a quelli determinati nel fegato perfuso [75]. Numerose differenze metaboliche sono, inoltre, state messe in evidenza mediante studi comparativi di diversi sistemi cellulari in coltura. Fra i sistemi più studiati, oltre agli epatociti, vi sono cellule della mucosa intestinale, cellule della pelle, della ghiandola mammaria, del polmone e cellule renali [71]. In confronto alle cellule epatiche da adulti, le colture cellulari da tessuti embrionali sopravvivono più a lungo, ma presentano seri inconvenienti per il fatto che in tali cellule le sostanze xenobiotiche sono metabolizzate molto lentamente [71]. Inoltre, tali colture contengono il citocromo P₁-450, ma non il citocromo P-450 [76]. Infine, le linee cellulari non si prestano agli studi di attivazione metabolica per il fatto che contengono forme monoossigenasiche diverse da quelle che predominano nel fegato ed, inoltre, l'attività monoossigenasica in molte linee cellulari stabilizzate è molto bassa [71].

5.2. - Sistemi sub-cellulari.

La Fig. 5 illustra una tipica procedura per la preparazione della frazione S9 e per la purificazione della fra-

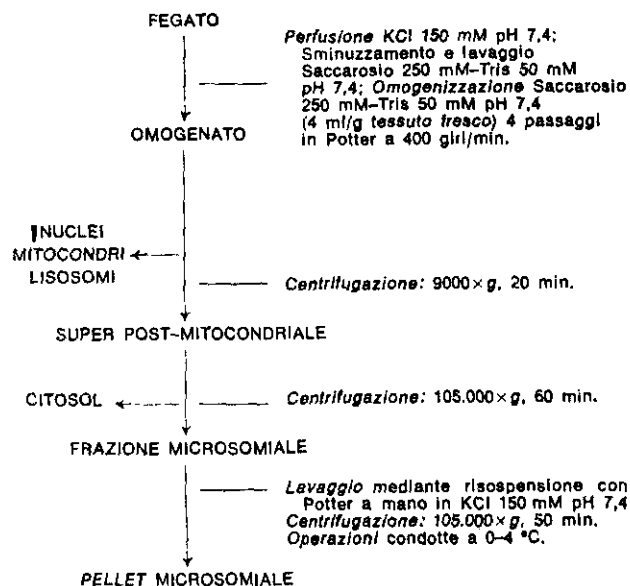


Fig. 5. - Metodo di preparazione delle frazioni microsomiali di fegato di ratto, trota, quaglia (Eriksson *et al.*, ref. 77).

zione microsomiale. Come risulta dalla figura, la frazione S9 è uno stadio intermedio della procedura per la purificazione dei microsomi. Inoltre, la Tab. 7 puntualizza l'assenza, nella preparazione microsomiale purificata, degli enzimi citoplasmatici e, particolarmente, della glutatione S-trasferasi, sulfotrasferasi, acil- e metil-transferasi, deidrogenasi, azo-, nitro- e chinone-reduttasi, esterasi e perossidasi [3]. La purificazione dei microsomi è necessaria per effettuare un'attendibile determinazione delle proteine microsomiali e per caratterizzare tale frazione. Inoltre, i microsomi purificati possono risultare meglio tollerabili per alcune cellule molto delicate usate per tests di mutagenesi [78].

Vi sono diversi dettagli sperimentali che possono influenzare in modo rilevante le proprietà della frazione microsomiale ottenuta. In primo luogo, si deve evitare qualsiasi procedura drastica per lo sminuzzamento. Poi, vi è la scelta del mezzo per l'omogenizzazione del tessuto; in diversi casi sono stati usati saccarosio, sali (ad es. KCl), oppure entrambi. La presenza di ioni aumenta notevolmente la tendenza dei microsomi ad aggregare; tale aggregazione non è necessariamente deleteria, ma non può essere tollerata se si deve effettuare un ulteriore frazionamento. Per questa ragione e per il fatto che il pH delle preparazioni microsomiali è comunque tamponato dalle proteine presenti, in genere si evita l'aggiunta di ioni nell'omogenizzazione. Proprio sulla caratteristica aggregabilità dei microsomi in presenza specialmente di cationi bivalenti si basa il metodo « rapido » per l'ottenimento dei microsomi, consistente nell'aggiungere al supernatante $10.000 \times g$, 8 mM CaCl_2 e 5 mM MgCl_2 e nel centrifugare a $1.500 \times g$ per 10 min [79]. Una modifica di questo metodo prevede la centrifugazione dell'omogenato di tessuto a $15.000 \times g$ e quindi l'aggiunta di ioni calcio e magnesio e la sedimentazione del pellet a $2000 \times g$ [80]. I microsomi così ottenuti presentano livelli di attività farmaco-metabolizzanti e di citocromi P-450 e b_5 normali [80]. Tuttavia, le fosfolipasi endogene microsomiali possono essere

direttamente influenzate dagli ioni Mg^{2+} e Ca^{2+} e possono danneggiare le vescicole membranose. Inoltre, altre proprietà delle membrane microsomiali possono essere direttamente influenzate dai due cationi menzionati [81, 82]. Critiche, per la riproducibilità delle preparazioni microsomiali, sono le modalità della omogenizzazione inclusi il numero di passaggi e la velocità del pestello del Potter [2]. Per quanto riguarda la purezza, si deve rilevare che, con la procedura precedentemente descritta, si ottengono preparazioni microsomiali con bassissimo contenuto di DNA (quindi con scarsa contaminazione da parte di nuclei) e non più dello 0,1 % di citocromo ossidasi (un marcatore del mitocondrio intatto e particolarmente della membrana mitocondriale interna) [77]. L'eventuale presenza di membrane mitocondriali esterne può essere valutata dosando l'attività monoamino-ossidasi. I microsomi di fegato di ratto sono, invece, contaminati da lisosomi e perossisomi. Infatti, circa il 10-15 % dell'attività fosfatasi acida (un'idrolasi lisosomiale) e circa il 9 % della catalasi perossisomiale totale sono in genere ritrovati nelle preparazioni microsomiali purificate [77]. Una difficoltà nel valutare tali contaminazioni è che quando i lisosomi e i perossisomi si rompono, essi perdono il loro contenuto e non è possibile verificare la presenza di frammenti residui a causa dell'assenza di marcatori adeguati. È inoltre impossibile determinare esattamente la contaminazione dei microsomi da parte di vescicole originate dalla membrana plasmatica per il fatto che non vi è un adeguato marcatore per tutte le parti di tale membrana che sono diversamente specializzate dal punto di vista biochimico. Un enzima molto usato come marcatore della membrana plasmatica è la 5'-nucleotidasi (AMPasi); esso, tuttavia, è anche presente nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato del Golgi. Alternativamente è possibile usare come marcatori il colesterolo o le sfingomieline ed i gangliosidi che sono presenti nella membrana plasmatica in quantità più elevata che nei microsomi.

Molto elevata è in genere la contaminazione delle preparazioni microsomiali da parte dell'apparato del Golgi. Infatti, questo apparato è formato anch'esso da piccole vescicole periferiche di grandezza e densità molto simili a quelle dei frammenti del reticolo endoplasmatico liscio; tali vescicole sono frammentate anche dai trattamenti di omogenizzazione più blandi. Circa il 5% delle preparazioni microsomiali purificate da fegato di ratto è costituito da membrane del Golgi; tale 5 % rappresenta il 40-50 % del totale del sistema cellulare del Golgi [83]. Al momento attuale un mezzo per ottenere microsomi liberi da membrane del Golgi è quello di preparare la frazione microsomiale dal fegato di ratti sottoposti ad intossicazione acuta da alcool [83]. Le vescicole del Golgi sono in tale caso riempite con lipoproteine a bassa densità e quindi possono essere separate mediante centrifugazione in gradiente di densità.

Per ottenere una buona resa di microsomi purificati è utile che l'animale sia a digiuno almeno dalla notte precedente il prelievo del fegato. Se infatti vengono utilizzati animali non a digiuno, nel corso della centrifugazione a $9000 \times g$ si ha una considerevole perdita di microsomi a causa della presenza del glicogeno associato al reticolo endoplasmatico [77].

La preparazione di frazioni microsomiali da tessuti diversi dal fegato può essere necessaria, come già men-

Tabella 7. - Alcuni enzimi presenti nella frazione S_9 di fegato e di altri organi (Wood et al., rf. 3).

A) Reticolo endoplasmatico (frazione microsomiale)

Monoossigenasi cit. P-450-dipendenti
Ossidasi cit. P-450-indipendenti
Epossido idratasi
Glucuronil transferasi
Azo- e nitro-reduttasi
Esterasi

B) Citosol ($100.000 \times g$ supernatante)

Glutatione S-trasferasi
Sulfotrasferasi
Acil- e metil-transferasi
Deidrogenasi
Azo-, nitro- e chinone-reduttasi
Esterasi
Perossidasi

zionato, quando sia noto che i tessuti diversi dal fegato sono specialmente competenti per il metabolismo del composto in esame. Inoltre, essa può essere desiderabile in studi metabolici e/o di mutagenesi *in vitro* in cui l'uso di preparazioni microsomiali da diversi organi e/o tessuti (fegato, polmone, rene, milza ecc.) di diverse specie animali possa essere di aiuto per la scelta della specie/ceppo di animale negli studi di oncogenesi e per individuare il possibile organo bersaglio coinvolto nella cancerogenesi. In genere i microsomi di tessuti diversi dal fegato sono preparati utilizzando la stessa procedura messa a punto per il fegato e per le specie diverse dal ratto viene utilizzata la stessa procedura usata per il ratto, anche se non vi è nessuna giustificazione per assumere che tale approccio sia soddisfacente. In effetti vi sono buone ragioni per pensare il contrario. Infatti, tessuti diversi dal fegato possono contenere un grande numero di diversi tipi cellulari e maggiori quantità di tessuto connettivo che non il fegato. Non è quindi sorprendente che i microsomi ottenuti dal pancreas siano costituiti essenzialmente dal Golgi e quelli del rene contengano più elevate quantità di membrane plasmatiche.

I problemi associati con la preparazione dei microsomi dal polmone derivano dal fatto che questo organo (considerevolmente più piccolo del fegato) contiene circa 40 diversi tipi cellulari e meno reticolo endoplasmatico. In questo caso, vi sono anche maggiori pro-

blemi di sterilità. Il polmone, inoltre, è difficile da omogenizzare a causa della elevata quantità di tessuto connettivo presente [77]; ad es., Ames *et al.* [84], a causa della natura fibrosa del tessuto polmonare, effettuarono l'omogenizzazione per 5 min. in omogenizzatore Polytron invece che nel sistema Potter-Elvehjem usato per il fegato di ratto. Una procedura ottimale per il polmone consiste nell'omogenizzare una sospensione al 20 % (p/v) di tessuto polmonare in 0,44 M saccarosio contenente 1 % albumina di siero bovino.

Diversi investigatori hanno avuto difficoltà nel preparare i microsomi dal tessuto intestinale senza denaturare il citocromo P-450 e, di recente, è stato trovato che l'aggiunta di inibitori della tripsina, 20 % glicerolo ed eparina al mezzo di omogenizzazione può essere utile in questo rispetto. Anche l'aggiunta di siero fetale bovino preserva i microsomi intestinali [77]. Inoltre, gli ultrasuoni sembrano particolarmente indicati per la rimozione delle mucoproteine dalle cellule intestinali e il congelamento e scongelamento sono utili per le cellule della epidermide.

Il metodo di Omura e Sato [85] viene largamente usato per misurare il contenuto microsomiale del citocromo P-450 e del citocromo b_5 (Fig. 6). Questo metodo si basa sul cambiamento spettrale del pigmento a seguito dell'esposizione ad agenti riducenti e al monossido di carbonio. Una valutazione della efficacia di legame dei substrati al citocromo P-450 si può avere misurando

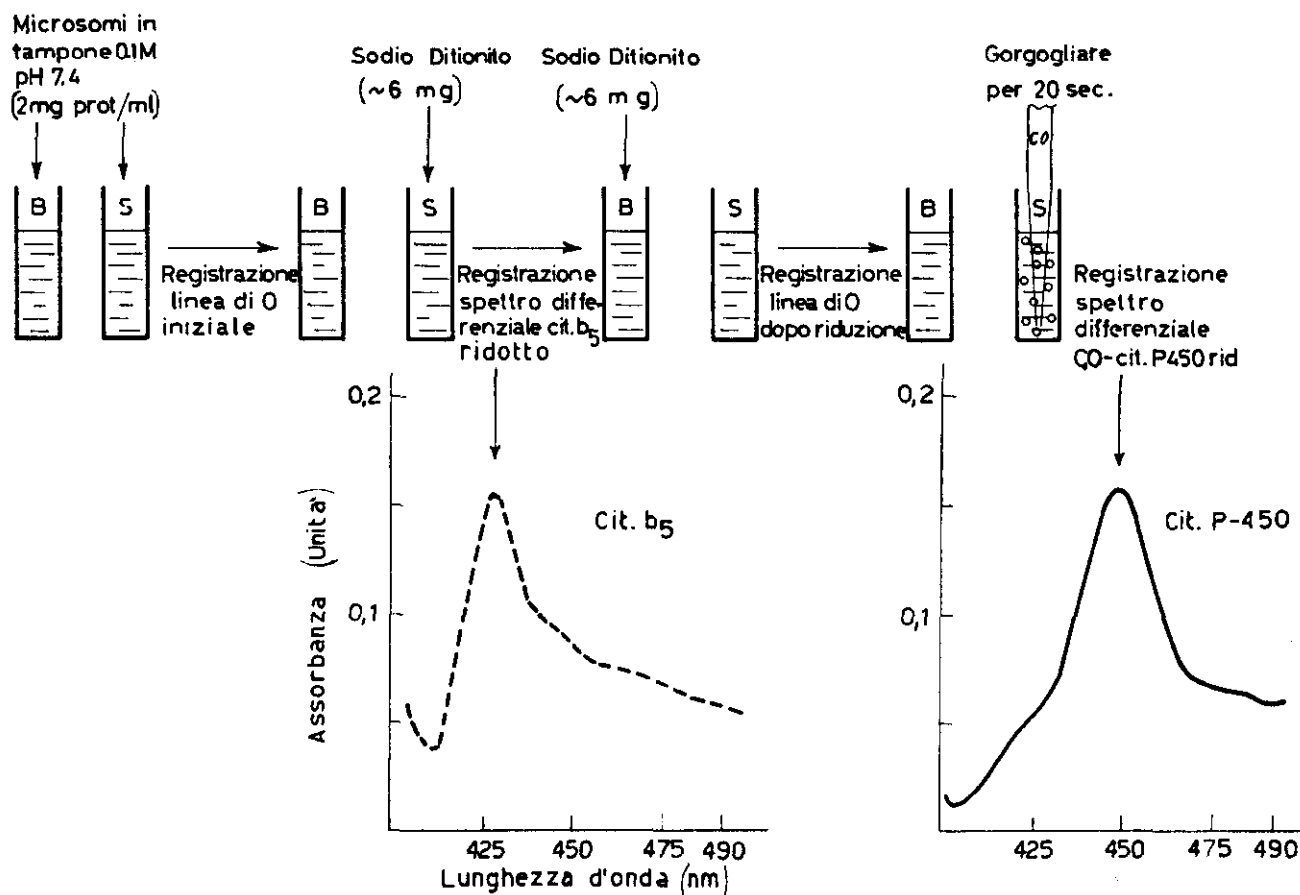


FIG. 6. - Procedura sperimentale per il dosaggio dei citocromi b_5 e P-450 (esempio, fegato di ratto). Pellet microsomiale risospeso in Saccarosio 250 mM-Tris 50 mM pH 7,4. Le determinazioni sono state effettuate a temperatura ambiente (20-25°) con uno spettrofotometro Cary, modello 17D (Omura e Sato, ref. 85). Per spiegazioni vedere il testo.

Tabella 8. - Livelli (intervalli) di citocromi ed enzimi nelle preparazioni microsomiali di organismi diversi.

PARAMETRI	Ratto	Trota	Quaglia
Proteine (mg/g fegato)	16-42	(a) 7,3-25,4	11-38
Citocromo P-450 (nmoli/mg prot.)	0,51-1,09	0,11-0,48	0,21-0,36
Citocromo b ₅ (nmoli/mg prot.)	0,30-0,46	0,03-0,10	—
NADPH-cit. c-reduttasi (nmoli cit. c rid./min/mg prot.)	53,9-164,0	14,7-32,3	56-290
NADH-cit.c-reduttasi (nmoli cit.c rid./min/mg prot.)	250-620	63-123	—
Benzo(a)pirene idrossilasi (nmoli 3-BP-OH/min/mg prot.)	0,02-0,15	0,001-2,28	—
Anilina idrossilasi (nmoli p-aminofenolo/min/g feg.)	2,00-6,70	0,30-0,50	2,70-19,80
Aldrin epossidasi (nmoli Dieldrin/min/g feg.)	13,5-65,0	2,8	1,7-48,2
p-nitroanisolo O-demetilasi (nmoli p-nitrofenolo/min/mg prot.)	0,10	0,18	1,30
7-etossicumarina O-deetilasi (nmoli umbelliferone/min/mg prot.)	0,31-0,72	0,10	—
Etilmorfina N-demetilasi (nmoli HCHO prod/min/mg prot.)	2,86-10,60	0,77	0,50
Aminopirina N-demetilasi (μmoli HCHO prod/h/g feg.)	0,038-9,080	0,001-0,593	—
Acido p-nitrobenzoico reduttasi (nmoli ac.p-aminobenzoico/min/g feg.)	107,0	(b) 3,5	60,0
UDP-glucuronide glucuronil transferasi (nmoli/min/mg prot.)	0,7-4,8	0,2-0,7	2,5

(a) In *Salvelinus fontinalis*.(b) Su frazione S₉.

Ratto: ref. 43, 44, 54, 55, 61, 80, 95-101.

Trota: ref. 44, 56-58, 96, 102-107.

Quaglia: ref. 61-63, 101, 108.

le variazioni spettrali del citocromo a seguito dell'aggiunta di diversi substrati. Inoltre, la determinazione della attività NADPH-cit. P-450 riduttasica, che è la velocità limitante dell'ossidazione microsomiale, fornisce una buona valutazione della efficacia del sistema negli stadi precedenti a quello di ossigenazione.

Frazione S₉. - La calibrazione delle preparazioni S₉ si basa su diversi parametri e particolarmente sul contenuto proteico, sul livello del citocromo P-450, sul dosaggio di attività enzimatiche associate al citocromo P-450 (ad es. alcune demetilasi e l'anilina idrossilasi), al citocromo P₁-450 (ad es. aril-idrocarburi-idrossilasi) e anche di attività enzimatiche non dipendenti da tali citocromi (ad es. transferasi) (Tab. 7). Numerose informazioni sulle attività metaboliche della frazione S₉ sono state ottenute dalle applicazioni di tale frazione come sistema di attivazione metabolica negli studi di mutagenesi. Nella procedura descritta da Ames *et al.* [84] l'attivazione metabolica ha luogo nello strato di agar, ma alcuni composti, e particolarmente alcune N-nitrosoammine, sono attivate più efficacemente in sospensione. In effetti, questi due saggi possono essere combinati preincubando la frazione S₉, i cofattori e i composti in esame con i microorganismi prima dell'aggiunta allo strato di agar. Nel test standard di Ames *et al.* [84] il NADPH (o un sistema che lo genera) è il solo cofattore enzimatico aggiunto al sistema S₉. Tuttavia, anche l'aggiunta di altri cofattori enzimatici aumenta l'attività mutagenica di alcuni composti che necessitano di una bioattivazione. L'aggiunta di riboflavina, che è un cofattore per le azoriduttasi microsomiali, consente, fra l'altro, l'attivazione di alcuni azo- e diazo-coloranti [86, 87]. Un altro problema relativo al metabolismo della frazione S₉ è che quasi

tutto il glutatione cellulare viene ossidato durante la preparazione, per cui gli enzimi glutatione-transferasici sono poco attivi [88]. Anche le reazioni di coniugazione (ad es. glucuronidazione e solfatazione) procedono a velocità subottimale, nella frazione S₉, probabilmente a causa della insufficiente concentrazione di UDPGA e PAPS [1]. In effetti, l'UDPGA viene distrutto nella preparazione subcellulare per azione della pirofosforilasi. Questi dati portano a considerare con crescente attenzione la necessità di fortificare la frazione S₉ con altri cofattori come l'acido uridin-difosfato-glucuronico, l'acido fosfoadenosinfosfolfonico, l'acetil-coenzima A, il glutatione, etc. Una chiara esemplificazione dell'importanza dei diversi fattori che possono influenzare il metabolismo della dimetilnitrosoammina e dietilnitrosoammina è stata prodotta da Frantz e Mallin [78] che hanno dimostrato l'importanza per l'attività della frazione S₉ e, quindi, per l'attività mutagenica di queste sostanze dei seguenti fattori: concentrazione del NADPH, ossigeno e ioni magnesio, ceppo di topo utilizzato per la preparazione dell'S₉, specie animale e pretrattamento con agenti induttori.

La natura del tampone di incubazione è risultata invece essere di minore importanza. Ovviamente anche la concentrazione di proteine microsomiali e la concentrazione del composto in esame nel saggio *Salmonella*/microsomi possono influenzare i risultati dei saggi di mutagenesi [78, 89]. Ad es., la dimetilnitrosoammina risultò mutagenica in *S.typhimurium* TA 1530 solo in presenza di una concentrazione 35 volte maggiore di frazione S₉ epatica da ratti indotti con BP rispetto a quella necessaria per l'aflatossina B₁(AFB). Nel saggio in fase liquida fu osservata una relazione bifasica nell'attività mutagenica in *S.typhimurium* TA 100 del BP e dell'AFB e la concentrazione della frazione S₉ epatica. A concentra-

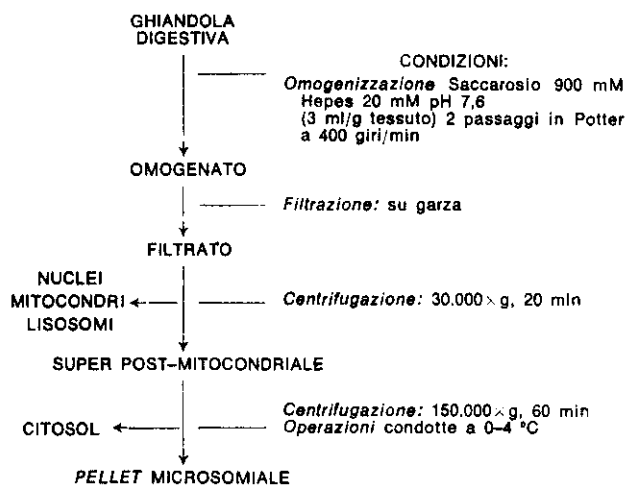


FIG. 7. - Metodo di preparazione della frazione microsomiale di mitilo (De Zwaan e Van Marrewijk, ref. 94).

zioni più elevate la mutagenicità del BP e della AFB fu correlata significativamente in modo negativo alla quantità di frazione S9 nel saggio. Tali risultati sono probabilmente dovuti al fatto che quando la concentrazione di S9 diventa eccessiva, la produzione di metaboliti non aumenta più in modo rilevante, mentre aumentano notevolmente le molecole citoplasmatiche e i nucleofili solubili capaci di intrappolare i metaboliti mutageni e, quindi, di impedire l'esplicarsi dell'attività mutagena. Infine, la variabilità individuale rispetto all'attività metabolica di preparazioni S9 epatiche umane è stata studiata da Tang e Friedman [90].

Poiché la flora microbica intestinale può essere coinvolta in modo importante nel metabolismo delle sostanze cancerogene, sono stati effettuati alcuni tentativi per incorporare questo sistema metabolico nel test di Ames. In un caso la frazione microsomiale di fegato di ratto fu sostituita con un omogenato di due specie batteriche anaerobiche presenti nel tratto intestinale [91]. In questo caso fu dimostrato che il 2-amino-fluorene era attivato e che questa attivazione era ridotta in presenza di ossigeno. In un altro caso fu usato un estratto di batteri cecali di ratto [92, 93]; i risultati ottenuti mostrano che numerosi idrossi-antrachinoni non mutageni nel test di Ames standard con l'omogenato di fegato di ratto, erano mutageni quando attivati dagli estratti batterici.

Microsomi purificati. - Meno noti rispetto al ratto, sono i sistemi di attivazione metabolica di organismi ambientali a diverso livello di complessità biologica, come ad es. quaglia, pesci, molluschi, crostacei e piante, e non è agevole valutare se le preparazioni microsomiali di fegato di ratto possano essere ritenute, da questo punto di vista, rappresentative di analoghe preparazioni da altri organismi. La procedura di purificazione dei microsomi di ratto, trota e quaglia è indicata nella Fig. 5; nel caso del mitilo la procedura di preparazione è descritta in Fig. 7. Nella preparazione dei microsomi di mitilo le centrifugazioni sono effettuate a velocità maggiori allo scopo di compensare la più elevata densità del tampone di omogenizzazione, prescelta per prevenire la lisi delle particelle subcellulari che in tale organismo hanno una maggiore osmolarità [94].

I livelli minimi e massimi riportati in letteratura per i citocromi P-450 e b_5 e per alcune attività enzimatiche delle preparazioni microsomiali di diversi organismi in assenza di induzione metabolica sono confrontati nella Tab. 8. L'ampiezza di tali intervalli indica il possibile ruolo di diversi fattori di variabilità. In primo luogo, in diversi laboratori sono stati utilizzati metodi diversi per lo stesso dosaggio e, talvolta, condizioni di temperatura e pH diversi per lo stesso metodo. Altre importanti cause di variabilità sono da ricercarsi nella mancanza di uniformità delle condizioni sperimentali relativamente ai parametri già indicati in Tab. 5. Vale inoltre rilevare che spesso tali dati sono stati ottenuti in condizioni sperimentali difformi da quelle fisiologiche dell'animale. Dalla tabella risulta che i livelli dei citocromi P-450 e b_5 del fegato di ratto e della NADH e NADPH-cit.c- reduttasi, espressi per mg di proteine microsomiali, sono di norma più elevati che in altri organismi. Anche per quanto riguarda le attività idrossilasiche e N- ed O-dealchilasiche, il fegato di ratto presenta in genere livelli più elevati del fegato di trota e quaglia (Tab. 8). La presenza di attività enzimatiche microsomiali è stata dosata *in vitro* anche in diverse specie di piante [109]. Le prove di inibizione con CO, detergenti ionici, reagenti sulfidrilici, agenti chelanti, accettori di elettroni e la dimostrata presenza di cit. P-450, cit. b_5 e di un'attività NADPH-cit.c-

Tabella 9. - Distribuzione dei citocromi microsomiali in diversi tessuti di pianta (Rich, ref. 109).

T E S S U T O	Citocromo (nmoli/mg proteine)	
	b_5	P-450
<i>Brassica oleracea</i> L. gemma	0.08	0.04
<i>Phaseolus aureus</i> ipocotile	0.036	< 0.01
<i>Phaseolus vulgaris</i> ipocotile (cresciuto 7 giorni alla luce)	0.20	< 0.005
<i>Arum maculatum</i> L.	0.005	0.07
<i>Pisum sativum</i> L. cotiledone (cresciuto 4 giorni al buio)	0.039	0.048
<i>Pisum sativum</i> L. radichetta (cresciuto 4 giorni al buio)	0.045	< 0.005
<i>Tulipa gesnerana</i> L. var. gialla Bulbo	0.04	0.2-0.4
<i>Allium cepa</i> L. bulbo	0.036	0.02
<i>Pastinaca sativa</i> L. radice	0.057	< 0.01
<i>Daucus carota</i> L. radice	0.039	< 0.01
<i>Raphanus sativus</i> L. tubero	0.018	0.005
<i>Iris germanica</i> L. rizoma quiescente..	0.059	0.039
<i>Helianthus tuberosus</i> L. tuberi quie- scenti	0.01	0.02
<i>Hordeum vulgare</i> germogli (crescita 8 giorni al buio)	0.15 approx.	0.013 approx.
<i>Cucurbita pepo</i> cotiledoni (crescita 4 giorni al buio)	0.055	0.023
<i>Solanum tuberosum</i> tubero	0.048	0.03
<i>Zea mays</i> radice	0.16	< 0.01

reduttasica, inducono a ritenere che il sistema di trasporto di elettroni microsomiale delle piante sia simile a quello degli animali.

Vi sono variazioni notevoli dell'attività specifica degli enzimi in parti diverse della stessa pianta: ad es., nella preparazione microsomiale da ipocotile di pianticelle di cotone è stata evidenziata un'attività N-demetilasica 10 volte più elevata di quella delle foglie di 4 settimane [110]. In genere sono state utilizzate, per la preparazione dei microsomi, parti della pianta in accrescimento (quali gemme, germogli, apici radicali), infiorescenze, rizomi, cotiledoni, foglie, ipocotili, tuberi e bulbi [109, 110]. Le metodiche per la preparazione microsomiale impiegate dai diversi autori, benché alquanto diverse, possono essere raggruppate in preparazioni che prevedono centrifugazioni differenziali con o senza Ca^{++} e Mg^{++} . Nel primo caso la frazione microsomiale è stata ottenuta applicando una forza centrifuga di $20.000 \times g$ per circa 20 min [111]; nel secondo caso sono state utilizzate velocità e tempi variabili fra $74.000 \times g$ per 90 min e $105.000 \times g$ per 60 min [112, 113]. Di norma il tessuto viene accuratamente sminuzzato ed omogenizzato in un mezzo spesso contenente inibitori di idrolasi, ad es. polivinilpirrolidone o sostanze che proteggono il citocromo P-450 da agenti denaturanti (ad es. ditiotreitol e glicerolo). In assenza di tali protettori, è stata frequentemente osservata la for-

mazione di citocromo P-420 risultante dalla denaturazione del citocromo P-450 [110, 113, 114]. Da indagini su di un notevole numero di specie vegetali (Tab. 9), risulta che i livelli di cit. P-450 oscillano da valori inferiori a 0,005 nmoli/mg proteina in apici radicali di *Pisum sativum* a 0,4 nmoli/mg proteina in bulbi di *Tulipa gesnerana*, mentre quelli di cit. b₅ sono compresi tra 0,01 nmoli/mg proteina in tuberi di *Helianthus tuberosus* e 0,20 nmoli/mg proteina in ipocotile di *Phaseolus vulgaris*.

In *Pisum sativum* sono state dosate attività NADH-e NADPH-cit.c-reduttasiche pari rispettivamente a 68 e 6,4 nmoli di cit.c ridotto/min/mg proteina [114]. In ipocotile di pianticelle eziolate di cotone sono state determinate attività NADH-e NADPH-cit.c-reduttasiche pari a 223 e 68 nmoli di cit.c ridotto/min/mg proteina [110].

La N-demetilazione di derivati della 3-fenil-1,1-dimetil urea richiede O_2 e NADPH e NADH come cofattori. L'attività specifica dell'enzima varia da 0,24 nmoli di 3-fenil-1,1-metil urea formata/mg prot/30 min. in microsomi di foglie di cotone di 4 settimane e 2,38 nmoli in microsomi di ipocotili eziolati della stessa pianta di 6 giorni [110].

Si ringrazia vivamente il Prof. A. Carere per la documentazione e i suggerimenti forniti.

Ricevuto il 29 maggio 1981.

Accettato l'11 giugno 1981.

BIBLIOGRAFIA

1. WRIGHT, A. S. 1980. The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. *Mutat. Res.* **75**: 215-241.
2. DE BRUIN, A. 1976. Biochemical toxicology of environmental agents. Elsevier, North Holland Biochemical Press, Amsterdam.
3. WOOD, A. W., BARTSCH, H., FISHBEIN, L., GARATTINI, S., GIELEN, J., MALAVEILLE, C., ROBERFROID, M., TEICAMAN, B. & VESEL, E. 1980. Basic requirements for *in vitro* metabolic activation system in mutagenesis testing. *Long-term and short-term screening assays for carcinogenesis. A critical appraisal*. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human. Supplement 2, pp. 277-294.
4. MAGEE, P. N., MONTESANO, R. & PREUSSMAN, R. 1976. N-nitroso compounds and related carcinogens. In: C. Searle (Ed.), Chemical carcinogens, *ACS Monogr.* **173**: 491-625.
5. GILLETTE, J. R. 1974. A perspective on the role of chemically reactive metabolites of foreign chemicals in toxicity. I. Correlation of changes in covalent binding of reactive metabolites with changes in the incidence and severity of toxicity. *Biochem. Pharmacol.* **23**: 2785-2794.
6. MAGNI, G. E. 1979. Mutagenesi ambientale. Metodiche di analisi. Vol. I. Test *in vitro*, pp. 69-82. Consiglio Nazionale delle Ricerche-AQ/I/18-34.
7. ARIENS, J. SIMONIS, A. M. & OFFERMEIER, J. 1976. *Introduction to general toxicology*. Academic Press, New York, p. 62.
8. BATZINGER, R. P., BUEIDING, E., REDDY, B. S. & WEISBURGER, J. M. 1978. Formation of mutagenic drug metabolites by intestinal microorganisms. *Cancer Res.* **38**: 608-612.
9. HILL, M. G. 1980. Bacterial metabolism and human carcinogenesis. *Br. Med. Bull.* **36**: 89-94.
10. GILLETTE, J. R., DAVIS, D. G. & SASAME, H. A. 1972. Cytochrome P-450 and its role in drug metabolism. *Annu. Rev. Pharmacol.* **12**: 57-84.
11. SILANO, V. & VITTOZZI, L. 1980. *Mutagenesi ambientale. Metodiche di analisi*. Vol. II. Test *in vivo*, pp. 37-58. Consiglio Nazionale delle Ricerche. AQ/I/96-107.
12. LEVIN, W. & RYAN, D. 1975. Age and sex differences in the turnover of rat liver cytochrome P-450: the role of neonatal imprinting. In: *Basic and Therapeutic Aspects of Perinatal Pharmacology*. P. L. Morselli, S. Garattini & F. Sereni (Eds.). Raven Press, New York, pp. 265-275.
13. NEIMS, A. H., WARNER, M., LOUGHNAN, P. M. & ARANDA, J. V. 1976. Developmental aspects of hepatic cytochrome P-450 monooxygenase system. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **16**: 427-445.

14. CONNEY, A. H., CRAVER, B., KUNTZMAN, R. & PANTUCK, E. J. 1974. Drug metabolism in normal and disease states. In: *Pharmacology and Pharmacokinetics*. T. Teorell, R. L. Dedrick & P. G. Condliffe (Eds.). Plenum Press, New York, pp. 147-162.
15. KATO, R. 1977. Drug metabolism under pathological and abnormal physiological states in animal and man. *Xenobiotica*. **7**: 25-92.
16. POLEY, G. E., SHIVELY, C. A. & VESELL, E. S. 1978. Diurnal rhythms of aminopyrine metabolism: failure of sleep deprivation to affect them. *Clin. Pharm. Ther.* **24**: 726-732.
17. VESELL, E. S., LANG, C. M., WITE, W. J., PASSANANTI, G. T., HILL, R. N., CLEMENS, T. L., LIU, D. K. & JOHNSON, W. D. 1976. Environmental and genetic factors affecting the response of laboratory animals to drugs. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **35**: 1125-1132.
18. CONNEY, A. H. 1967. Pharmacological implications of microsomal enzyme induction. *Pharmacol. Rev.* **19**: 317-366.
19. CINTI, D. L. 1978. Agents activating the liver microsomal mixed function oxydase system. *Pharmacol. Ther. A*. **2**: 727-749.
20. CAMPBELL, C. & HAYES, J. R. 1974. Role of nutrition in the drug metabolizing enzyme system. *Pharmacol. Rev.* **26**: 171-197.
21. CONNEY, A. H., PANTUCK, E. J., KUNTSMAN, R., KAPPAS, A. & ALVARES, A. P. 1977. Nutrition and chemical biotransformations in man. *Clin. Pharm. Ther.* **22**: 707-719.
22. CONNEY, A. H., PANTUCK, E. J., PANTUCK, C. B., BUENING, M., JERINA, D. M., FORTNER, J. G., ALVARES, A. P., ANDERSON, K. E. & KAPPAS, A. 1979. Role of environment and diet in the regulation of human drug metabolism. In: *The induction of drug metabolism*. R. W. Esabrook & E. Lindenlarb (Eds.). F.K. Schattauer, Stuttgart, New York, pp. 583-605.
23. KATO, R. 1974. Sex-related differences in drug metabolism. *Drug Metab. Rev.* **3**: 1-32.
24. WILLIAMS, R. T. 1971. Species variations in drug biotransformations. In: *Fundamentals of drug metabolism and drug disposition*. B. N. La Du, H. G. Mandel & E. L. Way (Eds.). Williams & Wilkins, Baltimore, pp. 187-205.
25. NEBERT, D. W. & FELTON, J. S. 1976. Importance of genetic factors influencing the metabolism of foreign compounds. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **35**: 1135-1141.
26. VESELL, E. S. 1978. Genetic and environmental factors responsible for interindividual variations in drug response. In: *Advances in Pharmacology and Therapeutics*. P. Duchene-Marullaz (Ed.). Pergamon Press, New York. **6**: 3-12.
27. CHHABRA, R. S. & FOUTS, J. R. 1974. Sex differences in the metabolism of xenobiotics by extrahepatic tissue in rats. *Drug Metab. Dispos.* **2**: 375-379.
28. MCPHERSON, F. J., BRIDGES, J. W. & PARKE, D. V. 1974. The enhancement of biphenyl-2-hydroxylation by carcinogens *in vitro*. *Biochem. Soc. Trans.* **2**: 618-619.
29. WEISBURGER, H. H., GRANTHAM, P. H. & WEISBURGER, E. R. 1964. Metabolism of N-2-fluorenylacetamide in the hamster. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **6**: 427-433.
30. MILLER, J. A. & MILLER, E. C. 1971. Chemical carcinogenesis: mechanisms and approaches to its control. *J. Natl. Cancer Inst.* **47**: 5-14.
31. WHO. 1978. Environmental Health Criteria, n. 6. Principles and methods for evaluating the toxicity of chemicals. Part I, p. 133.
32. ROGAN, E. G., MAILANDER, P. & CAVALIERI, E. 1976. Metabolic activation of aromatic hydrocarbons in purified rat liver nuclei: induction of enzyme activities and binding to DNA with and without monooxygenase-catalyzed formation of active oxygen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**: 457-461.
33. PEZZUTO, J. M., LEA, M. A. & YANG, C. S. 1976. Binding of metabolically activated benzo(a)pyrene to nuclear macromolecules. *Cancer Res.* **36**: 3647-3653.
34. PEZZUTO, J. M., LEA, M. A. & YANG, C. S. 1977. The role of microsomes and nuclear envelope in the metabolic activation of benzo(a)pyrene leading to binding with nuclear macromolecules. *Cancer Res.* **37**: 3427-3433.
35. MILLER, E. C. & MILLER, J. A. 1976. The metabolism of chemical carcinogens to reactive electrophiles and their possible mechanisms of action in carcinogenesis. In: *Chemical carcinogens*, ACS Monogr. 173. C. S. Searle (Ed.). Am. Chem. Soc., Washington, 1976, pp. 737-762.
36. HABIG, W. H., PABST, M. J. & JACOBY, N. B. 1974. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**: 7130-7133.
37. JACOBY, W. B. 1978. The glutathione S-transferase, a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv. Enzymol.* **46**: 383-414.
38. BAINES, P. J., BRAY, H. G. & JAMES, S. P. 1977. Mercapturic acid formation in the developing rat. *Xenobiotica*. **7**: 653-663.
39. HALES, B. F. & NEIMS, A. H. 1976. Developmental aspects of glutathione S-transferase B(ligandin) in rat liver. *Biochem. J.* **160**: 231-236.
40. OESCH, F. 1977. Influence of metabolic activation and interactions on toxic effects, 18th Spring Meeting of the Deutsche Pharmacologische Gesellschaft, Section Toxicology, Mainz, March 15, 1977.
41. HART, L. G. & FOUTS, J. R. 1965. Further studies on the stimulation of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes by DDT and its analogs. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* **249**: 486-500.
42. STREET, J. C., CHADWICK, R. W., WANG, M. & PHILLIPS, R. L. 1966. Insecticide interactions affecting residue storage in animal tissues. *J. Agric. Food Chem.* **14**: 545-548.

43. BRADZA, F. G., HEIDINGSFELDER, S. & MARTIN, M. 1965. Effect of nikethamide on pentobarbital sleeping time in various animal species. *Comp. Biochem. Physiol.* **14**: 239-244.
44. ELCOMBE, C. R. & LECH, J. J. 1979. Induction and characterization of hemoprotein(s) P-450 and monooxygenation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **49**: 437-450.
45. LU, A. Y. H., SOMOGY, A., WEST, S., KUNTZMAN, R. & CONNEY, A. H. 1972. Pregnenolone-16 α -carbonitrile: a new type of inducer of drug-metabolizing enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **152**: 457-462.
46. MATSUSHIMA, T., SAWAMURA, M., HARA, K. & SUGIMURA, T. 1976. A safe substitute for polychlorinated biphenyls as an inducer of metabolic activation system. In: *In Vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*. F. J. De Serres, J. R. Fouts, J. R. Bend, R. M. Philpot (Eds.). Elsevier, North-Holland Biochemical Press, Amsterdam, pp. 85-88.
47. ZEIGER, E., CHHABRA, R. S. & MARGOLIN, B. H. 1979. Effect of the hepatic S9 fraction from Aroclor-1254-treated rats on the mutagenicity of benzo(a)pyrene and 2-aminoanthracene in the Salmonella/microsome assay. *Mutat. Res.* **64**: 379-389.
48. GLAUMANN, H. & JAKOBSSON, S. 1969. Localization of drug metabolic activities in liver and kidney microsomes. *Proc. 4th Congr. Pharmacol.* (Basel, Switzerland) Vol. 4.
49. REMMER, H. 1969. The induction of hydroxylating enzymes by drugs. *FEBS Symp.* **16**: 125-141.
50. MANNERING, G. J. 1971. Properties of cytochrome P-450 as affected by environmental factors: qualitative changes due to administration of polycyclic hydrocarbons. *Metabolism.* **20**: 228-245.
51. ALVARES, A. P., BICKERS, D. R. & KAPPAS, A. 1973. Polychlorinated biphenyls: a new type of inducer of cytochrome P-448 in the liver. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **70**: 1321-1325.
52. BARTOSEK, I., GUAITANI, A., GARATTINI, S. & SIMONAZZI, L. 1974. Microsomal enzyme activity in perfused rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **23**: 599-605.
53. BRUCKNER, J. V., KHANNA, K. L. & CORNISH, H. H. 1974. Polychlorinated biphenyl induced alteration of biologic parameters in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **28**: 189-199.
54. CARLSON, G. P. 1978. Induction of cytochrome P-450 by halogenated benzenes. *Biochem. Pharmacol.* **27**: 361-363.
55. DUVALDESTIN, P. & BERTHELOT, P. 1978. Phenobarbital-induced increase of NADH-cytochrome b₅ reductase activity in rat liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **27**: 367-368.
56. ADDISON, R. F., ZINCK, M. E. & WILLIS, D. E. 1977. Mixed function oxidase enzymes in trout (*Salvelinus fontinalis*) liver: absence of induction following feeding of p,p'DDT or p,p'DDE. *Comp. Biochem. Physiol.* **570**: 39-43.
57. STATHAM, C. M., ELCOMBE, C. R., SRYJKA, S. P. & LECH, J. J. 1978. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on hepatic microsomal enzymes and disposition of methylanthracene in rainbow trout *in vivo*. *Xenobiotica.* **8**: 65-71.
58. FÖRLIN, L. & LIDMANN, U. 1978. Effect of Clophen A50, 2,5,2',5'-tetra- and 2,4,5,2',4',5'-hexachlorobiphenyl on the mixed-function oxidase system of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **60C**: 193-197.
59. ADDISON, R. F. & LAW, F. C. P. 1979. Induction of hepatic mixed function oxidase enzymes in trout fed polychlorinated biphenyls, some proposed polychlorinated biphenyls replacements and related compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **98** (1 Part 2) A: 183.
60. FÖRLIN, L. 1980. Effects of Clophen A 50, 3-methylcholanthrene, pregnenolone-16 α -carbonitrile, and phenobarbital on the hepatic microsomal cytochrome P-450-dependent monooxygenase system in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) of different age and sex. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **54**: 420-430.
61. BUNYAN, P. J., TOWNEND, M. G. & TAYLOR, A. 1972. Pesticide-induced changes in hepatic microsomal enzyme systems. Some effects of DDT and DDE in the rat and Japanese quail. *Chem. Biol. Interact.* **5**: 13-26.
62. BUNYAN, P. J. & PAGE, J. M. J. 1978. PCBs. The effects of structure on the induction of quail hepatic microsomal enzymes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **43**: 507-518.
63. RIVIERE, J. L., DE LAVAU, E. & GROLLEAU, G. 1978. Effects of PCBs on drug metabolism in Japanese quail and its progeny. *Toxicology.* **11**: 329-324.
64. CALLEN, D. F. 1978. A review of the metabolism of xenobiotics by microorganisms with relation to short-term test systems for environmental carcinogens. *Mutat. Res.* **55**: 153-163.
65. KUROKI, T., ABBONDANDOLO, A., DREVON, C., HUBERMAN, E. & LAVAL, F. 1980. Mutagenesis assays with mammalian cells. *Long-term and short-term screening assays for carcinogenesis. A critical appraisal*. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemical to human. Supplement 2, pp. 107-133.
66. HUBERMAN, E. & SACHS, L. 1976. Cell mediated mutagenesis of mammalian cells with chemical carcinogens. *Int. J. Cancer.* **13**: 326-333.
67. NEWBOLD, R. F., WIGLEY, C. B., THOMPSON, M. H. & BLOOKES, P. 1977. Cell-mediated mutagenesis in cultured Chinese hamster cells by carcinogenic polycyclic hydrocarbons: nature and extent of the associated hydrocarbon-DNA reaction. *Mutat. Res.* **43**: 101-106.
68. LANGENBACH, R., FREED, H. J. & HUBERMAN, E. 1978. Liver cell-mediated mutagenesis of mammalian cells by liver carcinogens. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **75**: 2864-2867.
69. LANGENBACH, R., FREED, H. J., RAVEH, D. & HUBERMAN, E. 1978. Cell specificity in metabolic activation of aflatoxin B1 and benzo(a)pyrene to mutagens for mammalian cells. *Nature.* **276**: 277-280.

70. SAN, R. H. C. & WILLIAMS, G. M. 1977. Rat hepatocyte primary cell culture-mediated mutagenesis of adult rat liver epithelia cells by precarcinogens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **156**: 534-538.
71. PAGANUZZI STAMMATI, A., SILANO, V. & ZUCCO, F. 1981. Toxicological investigations with cell culture systems. *Toxicology*.
72. BENIGNI, R., BIGNAMI, M., CARERE, A., CONTI, G., IACHETTA, R., MORPURGO, G. & ORTALI, V. A. 1979. A new *in vitro* method for testing plant metabolism in mutagenicity studies. *J. Toxicol. Environ. Health*. **5**: 809-819.
73. BISSEL, D. M. & GUZELIAN, P. S. 1979. Ascorbic acid deficiency and cytochrome P-450 in adult rat hepatocytes in primary monolayer culture. *Arch. Biochem. Biophys.* **192**: 569-576.
74. DOUGHERTY, K. K. & BYARD, J. L. 1978. Induction of mixed-function oxidases in primary cultures of mouse hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **45**: 261.
75. BILLINGS, R. E., McMAHON, R. E., ASHMORE, J. & WAGLE, S. R. 1977. The metabolism of drug in isolated rat hepatocytes. A comparison with *in vivo* drug metabolism and drug metabolism in subcellular liver fractions. *Drug Metab. Dispos.* **5**: 518-526.
76. OWENS, I. S. & NEBERT, D. W. 1975. Aryl hydrocarbon hydroxylase induction in mammalian liver-derived cell cultures. *Mol. Pharmacol.* **11**: 94-104.
77. ERIKSSON, L. C., DE PIERRE, J. W. & DALLNER, G. 1978. Preparation and properties of microsomal fractions. *Pharmacol. Ther.* **2**: 281-317.
78. FRANTZ, C. N. & MALLING, H. V. 1975. The quantitative microsomal mutagenesis assay method. *Mutat. Res.* **31**: 365-380.
79. KAMATH, S. A., KUMMEROW, F. A. & NARAYAN, K. A. 1971. A simple procedure for the isolation of rat liver microsomes. *FEBS Lett.* **17**: 90-92.
80. SCHENKMAN, J. B. & CINTI, D. L. 1972. Hepatic mixed function oxidase activity in rapidly prepared microsomes. *Life Sci.* **11**: 247-257.
81. BJORNSTAD, P. 1966. Phospholipase activity in rat liver microsomes studied by the use of endogenous substrates. *Biochim. Biophys. Acta.* **116**: 500-510.
82. WAITE, M. & VAN DEENEN, L. L. M. 1967. Hydrolysis of phospholipids and glycerides by rat liver preparations. *Biochim. Biophys. Acta.* **137**: 498-517.
83. DE PIERRE, J. W. & DALLNER, G. 1975. Structural aspects of the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* **515**: 411-472.
84. AMES, B. N., McCANN, J. & YAMASAKI, E. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* **31**: 347-364.
85. OMURA, T. & SATO, R. 1964. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **239**: 2370-2378.
86. SUGIMURA, T., NAGAO, M., KAWACHI, T., HONDA, M., YAHIGI, T., SEINO, Y., SATO, S., MATSUKURA, N., MATSUSHIMA, T., SHIRAI, A., SAWAMURA, M. & MATSUMOTO, H. 1977. Mutagen carcinogens in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in boiled foods. In: *Origin of human cancer*. H. H. Hiatt, J. D. Watson & J. A. Winsten (Eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, New York, pp. 1561-1577.
87. MATSUSHIMA, T., SUGIMURA, T., NAGAO, M., YAHAGI, T., SHIRAI, A. & SAWAMURA, M. 1980. Factors modulating mutagenicity in microbial tests. In: *Short-term mutagenicity tests for detecting carcinogens*. K. Norpoth & R. D. Garner (Eds.). Springer, Heidelberg, Berlin (in press).
88. DEAN, B. J., HUTSON, D. H., WRIGHT, A. S. & STEVENSON, D. E. 1978. The protective action of glutathione against the bacterial mutagenicity of cis-1,3-dichloropropene. *Pharmacologist* (Abstract n° 50). **20**: 154.
89. MALAVEILLE, C., KUROKI, T., BRUN, G., HAUTEFEVILLE, A., CAMUS, A. M. & BARTSCH, H. 1979. Some factors determining the concentration of liver proteins for optimal mutagenicity of chemicals in the Salmonella/microsome assay. *Mutat. Res.* **63**: 245-258.
90. TANG, T. & FRIEDMAN, M. A. 1977. Carcinogen activation by human liver enzymes in the Ames mutagenicity test. *Mutat. Res.* **46**: 387-394.
91. MCCOY, E. C., SPECK, W. T. & ROSENKRANZ, M. S. 1977. Activation of a procarcinogen to a mutagen by cell free extracts of anaerobic bacteria. *Mutat. Res.* **46**: 261-264.
92. BROWN, J. P., DIETRICH, P. S. & BROWN, R. J. 1977. Frameshift mutagenicity of certain naturally occurring phenolic compounds in the « Salmonella/microsome » test: activation of anthraquinone and flavonal glycosides by gut bacterial enzymes. *Biochem. Soc. Trans.* **5**: 1489-1492.
93. BROWN, J. P. & DIETRICH, R. S. 1979. Mutagenicity of anthraquinone and benzanthrone derivatives in the Salmonella/microsome test: activation of anthraquinone glucosides by enzymatic extracts of rat coecal bacteria. Citata da D. F. Callen (ref. 66).
94. DE ZWAAN, A. & VAN MARREWIJK, W. J. A. 1973. Intracellular localization of pyruvate carboxylase, phosphoenolpyruvate carboxylase and « malic enzyme » and the absence of glyoxylate cycle enzymes in the sea mussel (*Mytilus edulis* L.). *Comp. Biochem. Physiol.* **44**: 1057-1066.
95. SOTTOCASA, G. L., KUYLENSTIERN, A. A., ERNSTER, L. & BERGSTRAND, A. 1967. An electron transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. *J. Cell. Biol.* **32**: 415-438.
96. BUHLER D. R. & RASMUSSEN, M. E. 1968. The oxidation of drug by fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* **25**: 223-239.

97. HÖGBERG, J., BERGSTRAND, A. & JAKOBSSON, S. V. 1973. Lipid peroxidation of rat liver microsomes. *Eur. J. Biochem.* **37**: 51-59.
98. AMAR-COSTESSEC, A., WIBO, M., THINÈS-SEMPoux, D., BEAUFAY, H. & BERTHET, J. 1974. Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from liver. *J. Cell. Biol.* **62**: 717-745.
99. POWIS, G., TALCOTT, R. E. & SCHENKMAN, J. B. 1976. Kinetic and spectral evidence for multiple species of cytochrome P-450 in liver microsomes. Microsomes and drug oxidations. *Proc. 3th Int. Symp.* Berlin.
100. BOCK, K. W., CLAUSBRUCH, U. C. & OTTENWALDER, H. 1978. UDP-glucuronyl transferase in perfused rat liver and in microsomes: V. Studies with Gunn rats. *Biochem. Pharmacol.* **27**: 369-371.
101. RIVIERE, J. L. & BACH, J. 1979. Aldrin epoxidase in liver and small intestine of rat and Japanese quail. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **21**: 498-501.
102. ADAMSON, R. H. 1967. Drug metabolism in marine vertebrates. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **26**: 1047-1055.
103. PEDERSEN, M. G. & HERSHBERGER, W. K. 1974. Metabolism of 3,4-benzpyrene in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **12**: 482-486.
104. ADDISON, R. F., ZINCK, M. E. & WILLIS, D. E. 1978. Induction of hepatic MFO enzymes in trout (*Salvelinus fontinalis*) by feeding Aroclor 1254 or 3-methylcholanthrene. *Comp. Biochem. Physiol.* **61** (C): 323-325.
105. EISELE, T. A., NIXON, J. E., PAWLOWSKI, N. E. & SINHUBER, R. O. 1978. Effects of dietary cyclopropene fatty acids on the MFO system of rainbow trout. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* **1**: 773-778.
106. GERHART, E. H. & CARLSON, R. M. 1978. Hepatic mixed-function oxidase activity in rainbow trout exposed to several polycyclic aromatic compounds. *Environ. Res.* **17**: 284-295.
107. STEGEMAN, J. J. & CHEVION, M. 1980. Sex differences in cyt. P-450 and MFO activity in gonadally mature trout. *Biochem. Pharmacol.* **29**: 553-558.
108. GILLET, J. W. & ARSCOTT, G. H. 1969. Microsomal epoxidation in Japanese quail: induction by dietary dieldrin. *Comp. Biochem. Physiol.* **30**: 589-600.
109. RICH, R. & BENDALL, D. S. 1975. Cytochrome components of plant microsomes. *Eur. J. Biochem.* **55**: 333-341.
110. FREAR, D. S., SWANSON, H. R. & TANAKA, F. S. 1969. N-demethylation of substituted 3-(phenyl)-1-methylureas: isolation and characterization of a microsomal mixed function oxidase from cotton. *Phytochemistry*. **8**: 2157-2169.
111. MADIYASTHA, K. M., MEEHAN, T. D. & COSCIA, C. J. 1976. Characterization of a cytochrome P-450 dependent monoterpene hydroxylase from the higher plant *Vinca rosea*. *Biochemistry*. **15**: 1097-1102.
112. POTTS, J. R. M., WEKLYCH, R. & CONN, E. E. 1974. The 4-hydroxylation of cinnamic acid by sorghum microsomes and the requirement for cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **249**: 5019-5026.
113. RUSSEL, D. W. 1971. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. *J. Biol. Chem.* **246**: 3870-3878.
114. ISHIMARU, A. & YAMAZAKI, I. 1977. The carbon monoxide-binding hemoprotein reducible by hydrogen peroxide in microsomal fractions of pea seeds. *J. Biol. Chem.* **252**: 194-204.