

SESSIONE VIII

ARGOMENTI DI CARATTERE GENERALE

Sulla tossicità a breve ed a lungo termine degli inquinanti ambientali. Metodologie per la valutazione sperimentale (*)

L. DI BATTISTA, F. GHEZZO, F. ORECCHIO, G. TOGNA e A. TOMASI

Istituto di Igiene, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

Obiettivo principale delle ricerche in campo epidemiologico e tossicologico a proposito di inquinanti ambientali è la determinazione di quegli « standards di protezione primaria » sui quali l'OMS ha più volte richiamato l'attenzione degli studiosi e delle autorità preposte alla tutela della salute pubblica.

Essi si possono intendere come « *no adverse effect levels* » per le sostanze in causa, la cui ricerca a livello laboratoristico e nell'ambito della epidemiologia di campo impone la codificazione di alcune metodologie, strumenti di lavoro quotidiano, che permettano la quantificazione dei fenomeni osservati e la loro elaborazione biometrica.

Posto che « il problema va affrontato con criteri selettivi, correlando cioè il fattore dominante ambientale con conoscenze già acquisite in campo tossicologico » [1], i principali punti metodologici si possono così schematizzare:

A) Ricerca accurata della fenomenologia biochimica della sostanza in causa, affinché si possano cogliere quegli eventi metabolici subclinici o preclinici che realizzano la possibilità di un intervento realmente preventivo [2]. In questo ambito naturalmente va studiata la correlazione fra l'*input* della sostanza e le risposte dell'organismo bersaglio: ciò sia a livello epidemiologico di campo, sia a livello sperimentale in laboratorio. È noto ad esempio che l'esposizione ai ditiocarbamati ed agli erbicidi, provoca un *impairment* di alcune attività enzimatiche. Sperimentalmente è possibile provocare una intossicazione cronica in animali con ditiocarbamati e rilevare le conseguenti variazioni a livello di pool isoenzimatico di quelle attività spia che possono essere utilizzate in seguito come test.

(*) Le ricerche citate sono state svolte con i contributi del Ministero della Sanità, Direzione Generale per l'Igiene degli Alimenti e la Nutrizione.

B) La curva dose-risposta di cui il « *no adverse effect level* » rappresenta un punto teorico ha in laboratorio la sua più classica rappresentazione nella analisi, col metodo dei *probits*, della DL_{c_0} . È d'altro canto evidente che tale parametro non ha alcun significato se applicato alla epidemiologia di campo e la sua maneggevolezza rimane confinata ad esperimenti di simulazione in laboratorio, dove spesso la stessa maneggevolezza si trasforma in difetto poiché inficia una più accurata descrizione dei fenomeni osservati.

Ad esempio nel nostro Istituto si è misurata la tossicità acuta del parathion e paraoxon in gruppi di animali di laboratorio, preintossicati con ditiocarbamati a dosi sublimali, con il calcolo della DL_{90} . Essa nel nostro caso si è rivelata del tutto inadeguata a svelare differenze di tossicità nei gruppi sperimentali provocate dalla preintossicazione con ditiocarbamati. È stato così necessario andare oltre il dato grezzo di enumerazione (morto-sopravvissuto) e sono stati ottenuti dati di misura dai tempi di sopravvivenza degli animali stessi, il cui confronto con l'analisi della varianza ha permesso di evidenziare quelle differenze che erano sfuggite al calcolo della DL_{90} [3].

C) Le nostre esperienze ora citate ci introducono ad un ulteriore aspetto metodologico del problema: l'interazione fra più principi attivi contemporaneamente presenti nel biosistema. È possibile entro certi limiti simulare tale situazione a livello sperimentale. Infatti il danno metabolico provocato da una sostanza, ancorché lieve, può spostare gli equilibri omeostatici fisiologici dell'organismo bersaglio alterando la sua responsività a successivi *input* tossici. È ciò che si verificava negli animali pretrattati con ditiocarbamati dove il danno reso alla m.f.o. epatica alterava il metabolismo degli organo-fosforici successivamente introdotti. Infatti la quasi totalità delle ricerche sulla patologia da pesticidi fanno riferimento agli effetti acuti conseguenti all'assorbimento di dosi massive di prodotto, mentre emerge l'esigenza di nuove indagini per identificare ogni effetto derivante da esposizioni prolungate o ripetute con bassi livelli di assorbimento di queste sostanze. A questo proposito si può affermare che in questi ultimi anni i lavoratori agricoli sono esposti ai tossici con modalità sempre più analoghe a quelle che interessano i lavoratori dell'industria [4]. Per quanto riguarda gli antiparassitari, cioè, il contatto avviene con politossici (cocktail di pesticidi) dispersi nell'ambiente e spesso assorbiti in micro-dosi. Qui, fra l'altro, i concetti di tossicità acuta e cronica sfumano impercettibilmente l'uno nell'altro. L'ipotesi di Aldridge [5] che la tossicità cronica non sia altro che l'effetto a lungo termine di un danno metabolico provocato con modalità pressoché analoghe all'*input* acuto di una sostanza tossica, ha in parte trovato conferma in queste nostre ricerche.

D) Tutti i punti metodologici fin qui descritti succintamente, richiamano un altro imperativo tecnico: « la standardizzazione delle condizioni spe-

rimentali e delle metodiche di valutazione biometrica » [6]. Sono classiche le esperienze di Griffith [7] che riusciva ad ottenere per la stessa sostanza sei diverse DL_{50} inviandone richiesta a sei laboratori diversi. Le condizioni sperimentali vanno codificate e descritte con particolare riguardo non solo ai materiali e alle metodiche usate ma riportando inoltre le situazioni ambientali, nutrizionali, genetiche, temporali che condizionano sia la situazione sperimentale sia la realtà epidemiologica. Nel caso della nostra esperienza sui temi di sopravvivenza (si noti che *survival time* può anche significare tempo di risposta, tempo di ricorrenza della malattia, durata della risposta, ecc.) i problemi su accennati erano tutti presenti: la necessità di gabbie metaboliche per gli animali da esperimento onde seguirne con precisione le variazioni fisiopatologiche e cogliere il tempo esatto di sopravvivenza, la elaborazione biomatematica dei dati [8], sia che seguissero una distribuzione logaritmo normale o esponenziale, la percentuale di errore sperimentale ampliata da condizioni ambientali incontrollate (temperature delle gabbie, cibo degli animali, ecc.).

La cooperazione tra il biologo, l'epidemiologo e il biomatematico appare dunque irrinunciabile ai fini di una corretta prassi metodologica sperimentale la cui validità, si noti bene, è sciolta dall'obiettivo della ricerca in sè stessa.

La tossicologia epidemiologica è uno strumento di lavoro induttivo: parte cioè dal dato singolo individuale controllabile in quanto tale sul campo per risalire a definizioni più generali di appartenenza o meno a popolazioni di intossicati, non intossicati, esposti ad alto rischio.

Riassunto. — Gli AA. sulla base di alcune loro esperienze in campo tossicologico, presentano una serie di considerazioni metodologiche sui rapporti tra prove di tossicità a breve ed a lungo termine specie nel campo dell'interazione tra antiparassitari.

Summary (*Short and long term environmental toxicity. Methods for evaluation of experimental results*). — The AA. take in consideration some particular aspects of methodology for evaluation of toxic hazards from environmental pollutants. They refer some experimental results in the field of pesticide interaction.

BIBLIOGRAFIA

1. GHEZZO, F. 1977. La tutela sanitaria dell'ambiente. *Ig. Mod.* **70**: 235-244.
2. BARNES, J. M. Training in toxicology: a consideration of future needs. In: « The prediction of chronic toxicity from short term studies ». *Proceedings of the European Society of Toxicology*, Excerpta Medica, Amsterdam, **17**: 136-139.

3. ORECCHIO, F., TOGNA, G., DI BATTISTA, L., VILLA, P. & FICARRA, M. 1978. Azione biologica dei ditiocarbamati: effetto dell'etilenebisditiocarbamati di zinco (Zineb) sulla tossicità acuta del parathion e del paraoxon nel topo. *Ig. Mod.* **71**, in corso di pubblicazione.
4. ENSBERG, I. F. G., DE BRUIN, A. & ZIELHUIS, R. L. 1974. Health of workers exposed to a cocktail of pesticides. *Intern. Arch. Arbeistmed.* **32**: 191-201.
5. ALDRIDGE, W. N. 1976. Chronic toxicity as an acute phenomenon. In «The prediction of chronic toxicity from short term studies». *Proceedings of the European Society of Toxicology*. Excerpta Medica, Amsterdam, **17**: 5-6.
6. WILLIAM, A. & YOUNG, F. 1970. Biological and analytic components of variation in long term studies of serum constituents in normal subjects. *Clin. Chem.* **16**: 512-520.
7. GRIFFITH, J. 1964. Interlaboratory variations in the determination of the acute oral DL_{50} . *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **6**: 726-730.
8. JAMES, K. 1973. Regression toward the mean in uncontrolled clinical studies. *Biometrics.* **29**: 121-130.

Considerazioni metodologiche sull'uso della correlazione e della regressione nel campo della tossicologia ambientale (*)

L. DI BATTISTA, M. FICARRA, G. GHEZZO, N. SAVARESE, A. TOMASI,
P. VILLA e F. ZAMPETTI

Istituto di Igiene, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma

L'intensa chimizzazione dell'ambiente, dovuta sia all'elevato e spesso discutibile uso degli antiparassitari, sia allo scarico effettuato per lo più in modo non corretto, dei residui industriali, ha posto la popolazione di fronte ad una serie di *inputs* tossici ambientali dalla natura più diversa, e non sempre esattamente individuabili per i complessi fenomeni di sinergismo e di azioni antagoniste che queste sostanze presenti in contemporanea nell'ambiente possono avere sugli organismi.

Di fronte a questa realtà il tossicologo ambientale deve determinare delle spie metaboliche che siano espressione di danno subcronico onde permettere gli interventi preventivi più opportuni a livello di popolazione. Per fare questo egli ha due possibilità:

- 1) indagini epidemiologiche sulla popolazione esposta che gli indichino le alterazioni metaboliche più significative;
- 2) studio sistematico in laboratorio delle possibili spie metaboliche, individuate mediante l'analisi della letteratura scientifica.

In entrambi i casi, la nostra esperienza ci ha dimostrato che il più grosso strumento statistico disponibile per ottenere il maggior numero di informazioni, è l'uso della correlazione e della regressione sui dati disponibili.

Ad esempio, nel primo caso un rilevamento epidemiologico su un gruppo di popolazione esposta ad insetticidi organofosforici [1] ha permesso, mediante un'analisi multivariata con il metodo della correlazione, di rivelare come la acetil colinesterasi eritrocitaria e l'arilesterasi plasmatica termoresi-

(*) Le ricerche citate sono state svolte con i contributi del Ministero della Sanità, Direzione Generale per l'Igiene degli Alimenti e la Nutrizione.

stente, fossero le spie più idonee a rivelare un danno da organofosforici, che non la colinesterasi e l'arilesterasi plasmatiche totali.

Nel secondo caso invece, l'uso della regressione ci permette non solo di rivelare le spie più significative, ma di fornire informazioni sulle possibili differenze di comportamento di enzimi diversi, che siano spie significative di danno dovuto allo stesso tossico.

Vediamo ora alcuni esempi tratti da ricerche eseguite nel nostro Istituto che ci permettono di chiarire il concetto.

1) Gruppi di conigli sono stati intossicati cronicamente con somministrazione giornaliera per 15 gg con 10 mg/kg di Zineb [2] per via gastrica. Il trattamento è stato ripetuto 3 volte a distanza di circa 2 mesi uno dall'altro. I valori ematici di leucino-amino peptidasi (LAP) e paraoxonasi (POX) sono stati misurati sia in preesposizione sia per tutti i 15 giorni del trattamento per ogni trattamento. I dati di ogni trattamento sono stati considerati come un unico insieme, e sui tre insiemi derivati è stata ricavata la media geometrica (Fig. 1). Ne è risultato che se il LAP potrebbe essere considerato una buona spia di danno (infatti si ha una diminuzione con correlazione e

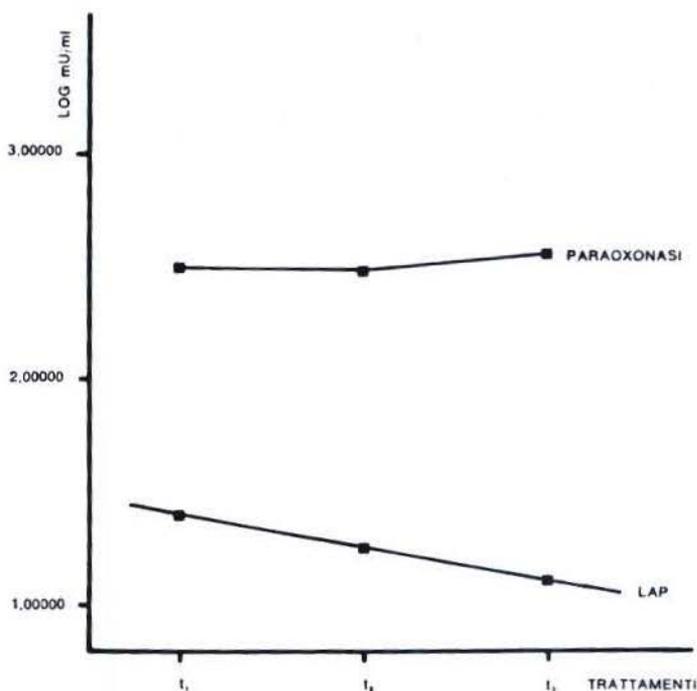


Fig. 1. — Confronto tra effetti dei trattamenti su LAP e paraoxonasi. Per ogni trattamento è riportata la media dei log. mU/ml.

regressione nel tempo dei tre insiemi significativi), la POX non ha praticamente subito alcuna variazione significativa. Questo ci dice che, sebbene entrambi questi enzimi facciano parte della M.F.O. (Mixed Function Oxidase) epatica, deputata alla detossificazione, solo il LAP è interessato dall'azione dei ditiocarbamati.

2) Gruppi di conigli sono stati intossicati per 15 giorni con 1 mg/kg/giorno di TMTD [3] per via gastrica. In preespositorio, al 7 e 15 giorno sono stati dosati il LAP e la fosfatasi alcalina. Il calcolo delle rette di regressione ed il confronto fra i coefficienti angolari relativi (Fig. 2) ha dimostrato che la diminuzione dei due enzimi avviene con un andamento significativamente

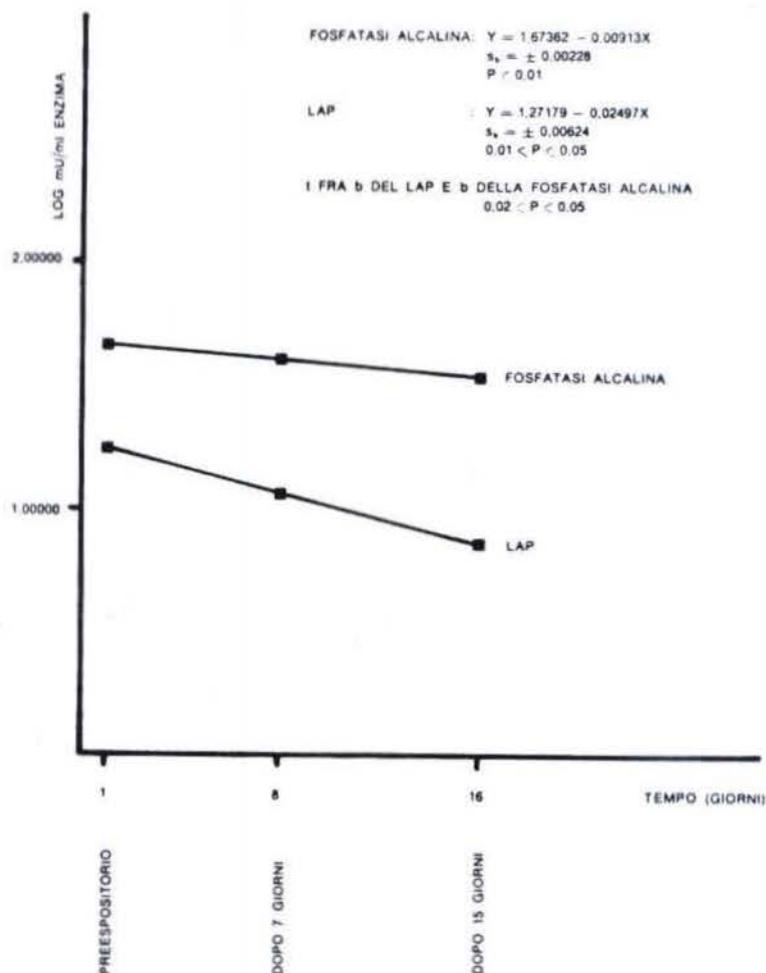


Fig. 2. — Confronto fra le rette di regressione di LAP e fosfatasi alcalina.

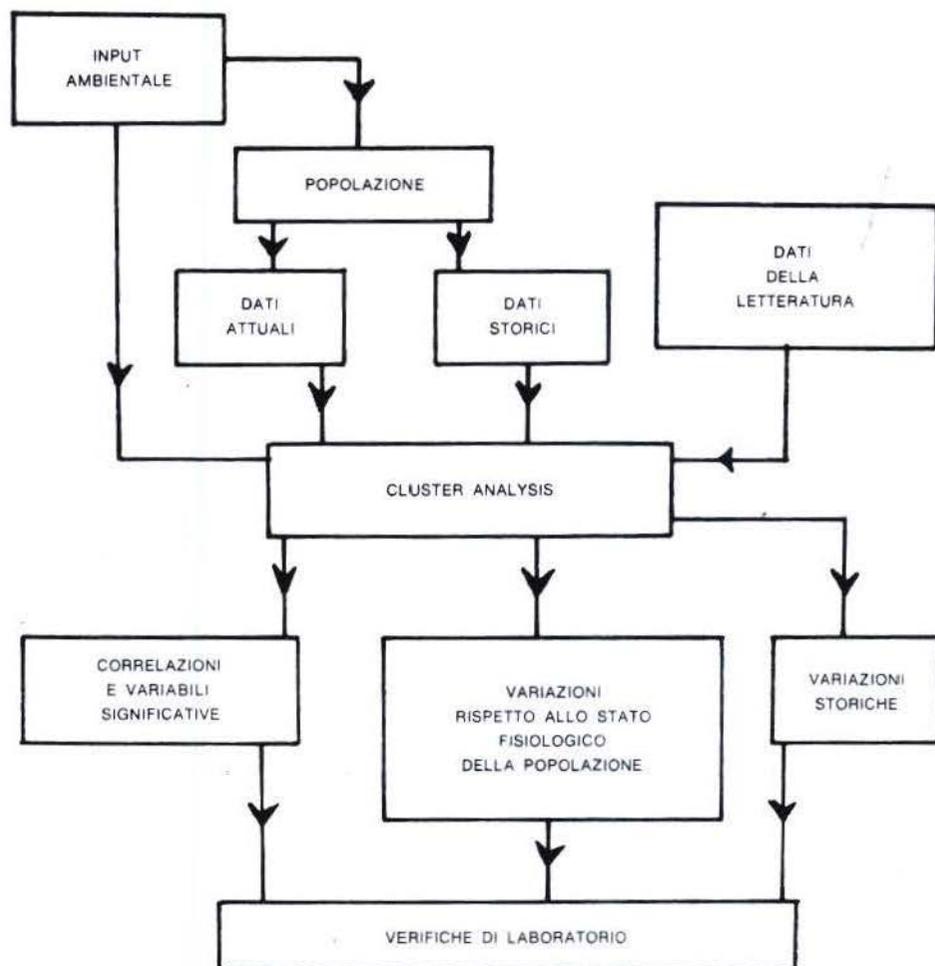


Fig. 3. — Schema di applicazione della Cluster Analysis a partire da rilevazioni epidemiologiche di campo.

diverso, indice di un diverso meccanismo di azione dei DTC sui due enzimi. In particolare la fosfatasi alcalina potrebbe essere, visto anche la sua minore variabilità, interessata da una azione diretta similchelante dei DTC, mentre la diminuzione del LAP potrebbe essere legata ad un effetto indiretto sui meccanismi di sintesi o di rilascio dell'enzima.

Tuttavia il metodo epidemiologico e quello sperimentale di laboratorio vanno integrati in quanto che ciò che si rileva sul campo non sempre è trasferibile in laboratorio, a causa di variabili non considerate; spesso infatti ci si trova di fronte ad una molteplicità di *inputs* tossici, nelle situazioni reali, rispetto alla possibilità di una simulazione di laboratorio; d'altra parte,

quanto viene riscontrato in laboratorio non sempre può essere trasferito nelle situazioni reali epidemiologiche.

Una ulteriore espansione biomatematica per un approccio che possa superare lo *hiatus* tra epidemiologia e tossicologia sperimentale, già sperimentato in questo Istituto in altri campi [4], potrebbe essere rappresentata dalla « Cluster Analysis » [5]. Questo metodo permette di riunire qualsivoglia numero di variabili influenzanti un fenomeno dinamico in un unico vettore espressione dello stesso fenomeno, il quale vettore confrontato sia con i vettori ottimali e pessimali ricavabili da sperimentazioni già fatte, sia con i vettori ottenuti da dati storici precedenti, sia con la popolazione complessiva dei dati, ci dà queste due possibilità di informazione:

a) di seguire l'andamento del complesso fisiologico sottoposto a rischio di danno valutandone le eventuali correlazioni significative esistenti tra le variabili considerate, e tra queste ultime le vere responsabili delle variazioni totali osservate;

b) di valutare, nel caso di più *inputs* tossici, quali di questi siano veramente responsabili di rischio di danno, e quali ancora siano le spie metaboliche effettive da considerare, nel sistema complessivo.

Questo si ottiene partendo e dalla popolazione per le verifiche di laboratorio (Fig. 3), e da un modello funzionale di laboratorio per la verifica sulla popolazione.

Concludendo, pare che l'argomento da noi rapidamente illustrato in questa sede meriti ogni attenta considerazione e studi approfonditi ulteriori, perché l'uso di modelli matematici standardizzati permetterebbe di valutare in modo più oggettivo i risultati, da una parte, e dall'altra di programmare la sperimentazione in modo più ordinato.

Riassunto. — Gli AA., sulla base di loro osservazioni epidemiologiche e di tossicologia sperimentale esaminano l'uso della correlazione e regressione per l'interpretazione dei dati onde ottenere l'individuazione, tra le variabili in esame, di quelle più significative.

Essi propongono infine l'applicazione della « Cluster Analysis » per superare eventuali discrepanze tra i risultati epidemiologici e di tossicologia sperimentale.

Summary (*Methodological considerations on correlation and regression analysis in environmental toxicology*). — The AA. consider the use of correlation and regression analysis in order to evaluate, from epidemiological and experimental data, the most significant parameters.

They suggest also the use of Cluster Analysis to improve the correlation between epidemiological and experimental informations.

BIBLIOGRAFIA

1. GHEZZO, F. & ORECCHIO, F. 1972. Analisi multivariata con il metodo delle correlazioni dei livelli di colinesterasi e di arilesterasi ematiche in un gruppo di popolazione esposta ad insetticidi organofosforici. *Acta Med. Rom.* **10**- 71-78.
2. ORECCHIO, F., FICARRA, M., VILLA, P & TOMASI, A. 1978. Azione biologica dei ditiocarbamati: effetto su alcuni sistemi enzimatici. Nota II. Variazione della leucino-aminopeptidasi plasmatica (LAP) nel coniglio dopo trattamento con etilenbisditiocarbamato di zinco (Zineb). *Ig. Mod.* **71**, in corso di pubblicazione.
3. ORECCHIO, F., FICARRA, M., VILLA, P., & SCIARRA, M. 1978. Azione biologica dei ditiocarbamati: effetto su alcuni sistemi enzimatici. Nota I. Variazioni della fosfatasi alcalina, della leucino-aminopeptidasi (LAP) e della gamma glutamiltranspeptidasi plasmatica (γ -GT) nel coniglio dopo trattamento con tetrametiltiltiourambisolfuro (TMTD). *Ig. Mod.* **71**, in corso di pubblicazione.
4. VILLA, P., JOVINE, R. & DELL'AIA, V. 1977. Sulla gestione automatizzata mediante elaboratore di impianti di depurazione a fanghi attivi. Modello metodologico per un depuratore ospedaliero. *VI Conv. Internaz. Soc. Ital. Informatica Medica*. Roma 18-20 novembre 1977, in corso di pubblicazione.
5. JOVINE, R. Comunicazione dell'Autore non pubblicata.