

Evoluzione della tossicologia industriale tra dosi effimere e genoma umano

A. COLOMBI, MARINA BURATTI*, F.M. RUBINO**, R. GIAMPICCOLO, S. PULVIRENTI, GABRI BRAMBILLA

Dipartimento di Medicina del Lavoro, Clinica "L. Devoto" dell'Università degli Studi di Milano, Sezione Ospedale San Paolo

* Azienda Ospedaliera Istituti Clinici di Perfezionamento di Milano, Laboratorio di Tossicologia Professionale

** Dipartimento di Medicina, Chirurgia ed Odontoiatria dell'Università degli Studi di Milano

KEY WORDS

Biological monitoring; low doses; occupational exposure

SUMMARY

«Evolution of industrial toxicology: vanishing doses and genomics». Background: *This article aims to discuss the influence that the application of the recent discoveries in genomics will have on the theory and practice of industrial toxicology in developed post-industrial countries. It is stressed that the recent advances in toxicogenomics can be integrated into the existing wealth of knowledge on the toxic properties of industrial chemicals to improve the efficacy of prevention of toxicological risk.* Methods and Results: *The understanding of the biochemical and physiological mechanisms underlying susceptibility or resistance to the toxic effects of industrial xenobiotics, and in particular to carcinogens, allows us to split the epidemiologically derived relationship linking the frequency of disease in the exposed population to the level of workplace contamination into a set of sequential sub-relationships linking: a) the exposure level to that of workplace contamination; b) the internal dose to the exposure level; c) the biological effect (e.g., measured through biochemical markers of early effect) to the internal dose; d) the frequency of disease to that of observation of early biochemical effects. Each of the cited relationships is affected by a degree of uncertainty due to the variability of biological response among the examined individuals, which in turn requires a definition of the statistical limits for the association functions between the variables. As a consequence, the possibility of investigating the individual biochemical and physiological steps in the causal mechanism that links toxic exposure to disease does not necessarily lead to an increase in the information potential of biological monitoring, since the uncertainty due to inter-individual variability is amplified through the sequence of causal relationships to the point that the data from biological monitoring become valueless with regard to the prediction of the frequency or probability of disease. This is particularly true when exposure to 'low doses' is investigated, as is now increasingly frequent in post-industrial developed countries, where workplace contamination is now greatly reduced to levels which may be borderline with those in the general environment. Thus at the low-dose end of the range of contamination and exposure values there is an area where, for statistical reasons consequent to the heterogeneity of examined populations, a quantitative prediction of internal exposure due to environmental contamination, of biological adverse effects due to exposure levels and of frequency of disease due to the extent or frequency of biological effects is no longer reliably possible. This in turn impairs the preventive efficacy of biological monitoring.* Conclusions: *A closer integration between industrial toxicology and state-of-the-art molecular genetics derived from the recent sequencing of the human genoma is the way to overcome the limitations described. In particular, the individual subjects in the examined populations can be classified with regard to some genetically controlled characters relevant to the biotransformation of xenobiotics and to DNA repair and the statistical analysis of data can be performed on more homogeneous subpopulations, in order to decrease inter-individual variability of biochemical and physiological response. This in turn increases the predictive power of the biological markers, both of dose and effect, and improves the efficacy of prevention, e.g., by highlighting oversensitive subpopulations or lifestyles which can increase the risk of occupational and environmental disease.*

RIASSUNTO

Questo articolo, presentato come breve comunicazione nell'ambito della commemorazione del centenario della fondazione della Clinica del Lavoro 'Luigi Devoto' di Milano, si propone di esaminare brevemente l'influenza che l'introduzione della tossicogenomica comporta nella teoria e nella prassi della tossicologia industriale. In particolare viene esaminato il ruolo che riveste l'integrazione tra le attuali conoscenze sulle proprietà tossicologiche dei contaminanti ormai ubiquitariamente presenti nell'ambiente di vita e di lavoro e quelle sulle caratteristiche biologiche individuali investigabili su base genetica in forza dei recenti progressi nella conoscenza del genoma umano. L'acquisizione dei meccanismi biochimici e fisiologici responsabili della suscettibilità/resistenza agli effetti tossici derivanti dalla esposizione a sostanze esogene, con particolare riguardo a quelli cancerogeni, ha portato alla scomposizione nella popolazione esposta, della relazione epidemiologica tra i livelli di contaminazione dell'ambiente e la frequenza di danno o di comparsa degli effetti tossici con l'identificazione di una serie di sottorelazioni in sequenza tra loro causale, che legano: a) il livello di esposizione della popolazione all'agente chimico alla sua concentrazione ambientale; b) la dose interna tossicologicamente attiva alla dose circolante; c) l'effetto biologico (ad esempio descritto dalla modificazione di opportuni parametri biochimici di effetto precoce) alla dose interna attiva; d) la frequenza di danno alla frequenza di comparsa degli effetti biologici precoci. Ciascuna di queste relazioni risulta affetta da indeterminatezza conoscitiva riferibile alla variabilità delle risposte biologiche dei singoli individui esaminati, che viene rispecchiata dalla necessità di definire i limiti statistici di variabilità nelle funzioni che descrivono l'associazione tra le variabili. Il poter scomporre in una sequenza di fenomeni elementari il meccanismo causale che lega l'esposizione al danno non sempre comporta, sotto i vincoli che la variabilità interindividuale impone, un miglioramento dell'informatività, in quanto l'incertezza conseguente alla variabilità biologica si propaga amplificandosi fino a rendere privi di valore predittivo nei confronti della probabilità di danno i risultati del monitoraggio biologico. La mancanza di valore predittivo delle misure si manifesta soprattutto in prossimità dell'estremo inferiore dei valori delle variabili indagate, corrispondenti alle 'basse dosi' di esposizione che caratterizzano le attuali condizioni di inquinamento, in particolare da composti cancerogeni negli ambienti di vita e di lavoro dei Paesi ad economia post-industriale. Si determina infatti l'esistenza di una zona di dosi in cui i risultati delle misure biologiche risultano inadeguati a descrivere accuratamente i fenomeni indagati a livello individuale, in quanto viene attenuato in termini statistici il nesso causale quantitativo tra contaminazione ambientale, esposizione dei soggetti, entità dei fenomeni fisiopatologici indotti e frequenza di danno e quindi viene meno l'intento preventivo delle misure. Una più stretta integrazione tra le conoscenze della tossicologia industriale e le moderne acquisizioni della genetica molecolare, recentemente culminate nel sequenziamento del genoma umano può portare al superamento di queste limitazioni. In particolare, classificando le popolazioni esposte in funzione del possesso o meno di alcuni caratteri genetici influenti sulla biotrasformazione dei composti esogeni e sulle reazioni di riparazione delle alterazioni del DNA, è possibile stratificare i soggetti nella analisi statistica dei risultati in sottopopolazioni allo scopo di ridurre l'intervallo della variabilità inter-individuale nelle relazioni biochimiche e fisiopatologiche intercorrenti. Nello studio della relazione tra esposizione e insorgenza di effetti cancerogeni, la possibilità di scomporre la variabilità di una popolazione in un insieme di sottopopolazioni omogenee per alcuni caratteri genomici, consentirà in termini generali di aumentare il valore predittivo degli indicatori biologici di dose e di effetto e migliorare l'efficacia degli interventi preventivi ad esempio identificando i gruppi di popolazione ipersuscettibili e le abitudini voluttuarie o gli stili di vita che influiscono sul comportamento fisiopatologico dei soggetti esposti.

PREMESSA

Storicamente, la tossicologia industriale è stata principalmente indirizzata allo studio dell'interazione tra l'organismo umano e le sostanze chimiche esogene presenti nell'ambiente di lavoro.

Tale studio, inizialmente motivato dall'osservazione della comparsa di patologie di origine professionale gravi e a carattere epidemico, si è progressivamente orientato al miglioramento delle condizioni igieniche degli ambienti di lavoro e, parallelamente al progredire degli interventi preventivi si

in ambito tecnico che legislativo, si è rivolto alla indagine di situazioni meno estreme, caratterizzate dal decrescere delle dosi e dallo sfumare della frequenza e gravità degli effetti ad esse correlati. Anche i metodi di indagine si sono evoluti, in forza dei progressi tecnici della chimica analitica strumentale, che a partire dagli anni '60 hanno consentito un affinamento dei metodi di misura dell'esposizione, dallo sviluppo di indicatori di effetto capaci di valutare alterazioni precoci e reversibili e di tecniche di valutazione non solo cliniche ma anche epidemiologiche.

La disponibilità di tali strumenti conoscitivi ha consentito l'affermarsi del paradigma centrale della tossicologia industriale che consiste nello studio della relazione tra la dose esterna (concentrazione ambientale dell'agente lesivo aerodisperso) e l'entità degli effetti dannosi ad essa conseguenti. Questo approccio si è sempre mostrato adeguato per attuare interventi preventivi efficaci, almeno nel contesto di una patologia frequente e franca, ben riferibile all'esposizione. Infatti, nelle condizioni di esposizione diffusa e massiva del passato, il nesso di causalità tra dose ed effetto appariva macroscopico e di certa, anche se non sempre facile, identificazione (2, 9).

Con il diminuire dell'entità delle esposizioni, in forza degli interventi preventivi di natura tecnica e normativa ispirati alle conoscenze scientifiche accumulate, si è constatata una apparente attenuazione della relazione tra esposizione e insorgenza della patologia, erroneamente attribuita ad una perdita di specificità degli effetti tossici delle sostanze chimiche di interesse industriale alle basse dosi, invece che alla scomparsa delle manifestazioni cliniche in forma epidemica: in un contesto di più complessa intelligibilità, gli obiettivi dell'intervento preventivo si sono spostati dalla prevenzione dell'insorgenza della malattia professionale alla rivelazione di effetti avversi precoci e reversibili, quando noti, e nella maggioranza dei casi, alla prevenzione dell'eccesso dell'esposizione. L'originaria semplicità e linearità del paradigma centrale si è complicata e l'interazione organismo-sostanze esogene si è arricchita di una serie di relazioni intermedie, di associazioni, di interdipendenze che hanno frammentato e arricchito il nesso di causalità della relazione

causa-effetto. La "scatola nera" rappresentata dall'organismo umano ha iniziato a scomporsi in sottosistemi in una sorta di illimitata serie di scatole cinesi.

Il recente sviluppo della biologia molecolare e la conseguente possibilità di studiare il corredo genico individuale di ampie serie di lavoratori, ha creato la necessità di una nuova subdisciplina scientifica, derivata dalla confluenza delle conoscenze e degli approcci metodologici della tossicologia e della genomica e volta allo studio della relazione tra le caratteristiche genomiche individuali e gli effetti biologici conseguenti all'esposizione a specifici agenti tossici. Questa integrazione ha a sua volta richiesto la creazione, a partire dalla epidemiologia tradizionale, di una nuova disciplina, l'epidemiologia molecolare. Inoltre, se era ben noto che la risposta tossicologica è un fenomeno strettamente specifico ed individuale, poiché legato alle caratteristiche genetiche del singolo, recentemente è stato constatato che ormai quasi senza eccezioni, l'espressione genica stessa risulta modulata come conseguenza diretta o indiretta dell'esposizione a numerose classi di sostanze chimiche tossiche di origine endogena ed esogena.

Questo articolo, presentato come breve comunicazione nell'ambito della commemorazione del centenario della fondazione della Clinica del Lavoro 'Luigi Devoto' di Milano, si propone di esaminare brevemente l'influenza che l'introduzione della tossicogenomica comporta nella teoria e nella prassi della tossicologia industriale, cercando di distinguere tra ruoli tradizionali ed entusiasmi scientifici in un panorama sociale e culturale dal quale proviene la richiesta di azioni preventive crescenti e generalizzate nei confronti della comunità scientifica.

DAGLI ASPETTI QUALITATIVI A QUELLI QUANTITATIVI

Come premesso, la relazione tra esposizione ad un inquinante pericoloso per la salute e comparsa della malattia può essere schematizzata, nella sua enunciazione più semplice e diretta, attraverso il semplice modello 'a scatola nera' riportato nella fi-

gura 1. In essa, quale causa è indicata la presenza di una sostanza pericolosa, l'evento causale è rappresentato dalla esposizione e l'effetto è la manifestazione di una alterazione biologica (non necessariamente) rappresentata da danno. L'evento causale, ovvero l'agire della causa sul sistema ad esso sensibile, è suddivisibile nelle sue componenti necessaria e sufficiente (indicate rispettivamente dai tratti A e B dello schema di figura 1) e rappresenta l'elemento di collegamento e di associazione tra i due fenomeni che stabilisce il loro nesso in termini di causalità.

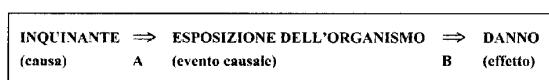


Figura 1 - Rappresentazione elementare della relazione causale esistente tra esposizione ad un inquinante pericoloso per la salute e comparsa di danno alla salute del soggetto esposto

In termini non solo descrittivi ma quantitativi, tale relazione può essere meglio espressa nella forma esemplificata dal diagramma in figura 2, laddove a livelli crescenti di (intensità di) dose ambientale di un agente lesivo corrisponde una frequenza crescente di danno per la salute dei soggetti esposti.

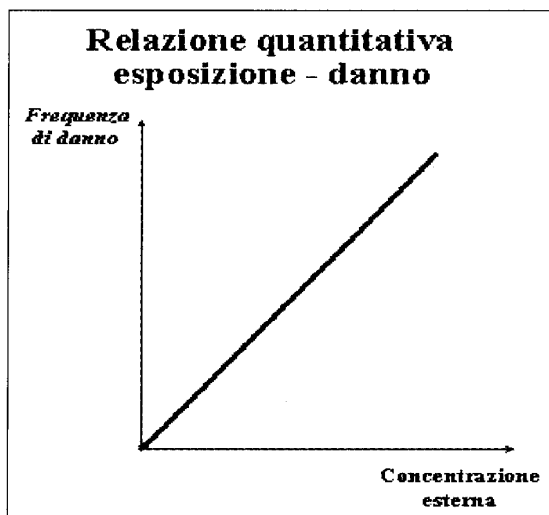


Figura 2 - Rappresentazione diagrammatica della relazione causale esistente tra il livello di esposizione ad un inquinante pericoloso per la salute e la frequenza del danno alla salute in un gruppo di soggetti esposti

Questa relazione che è quella apparsa all'osservazione in termini epidemici è stata scomposta dalla Medicina del Lavoro in sequenze di eventi più articolati. La rappresentazione delle relazioni passa così dalla semplice forma diagrammatica bidimensionale ad una multidimensionale (4, 6) come quella riportata nella figura 3, che riassume i tre approcci tradizionali della prevenzione in Medicina del Lavoro e le figure professionali coinvolte, identificati nelle azioni di monitoraggio ambientale (competenza igienistica), monitoraggio biologico (competenza tossicologica) e sorveglianza sanitaria (competenza medica).

I progressi nella biochimica e nella farmacologia dell'ultimo ventennio hanno inoltre consentito di scomporre l'interazione tra la sostanza chimica tossica e l'organismo in numerose tappe sequenziali - o compartimenti intermedi - che partendo dall'ingresso della sostanza nell'organismo giungono fino alla comparsa degli effetti lesivi.

Tale sequenza è schematicamente rappresentata nella figura 4.

Il generico termine di suscettibilità individuale impiegato nella figura 4 comprende tutte le variabili biologiche che caratterizzano la specificità del comportamento del singolo soggetto nei confronti dell'azione tossica della sostanza, mentre l'interazione esposizione-organismo viene ricondotta alle proprietà tossicocinetiche e di biotrasformazione della sostanza stessa.

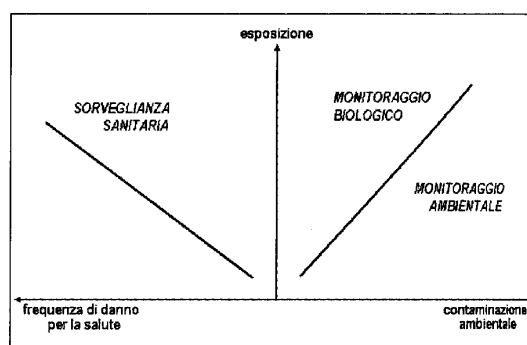


Figura 3 - Rappresentazione diagrammatica della relazione causale esistente tra il livello di contaminazione dell'ambiente da parte di un inquinante pericoloso per la salute, l'entità dell'esposizione e la frequenza del danno alla salute in un gruppo di soggetti esposti

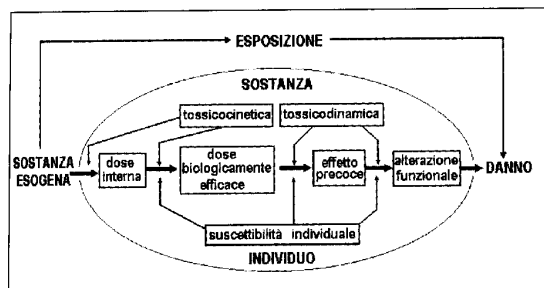


Figura 4 - Rappresentazione articolata della sequenza di eventi che intercorrono tra l'esposizione ad un agente chimico lesivo e la comparsa di danni alla salute, in funzione dell'interazione sostanza-organismo e delle caratteristiche biologiche del soggetto esposto

Mano a mano che il destino metabolico delle sostanze esogene veniva approfondito, furono sviluppati metodi di indagine capaci di misurare nell'uomo dapprima le dosi interne delle specie chimiche corrispondenti alla sostanza come tale ed ai suoi prodotti di biotrasformazione nei differenti compartimenti corporei eticamente accessibili (sangue, urine, aria espirata) (1) e successivamente anche quelle delle dosi considerate 'biologicamente attive', poiché rappresentate dai prodotti di interazione covalente tra alcuni metaboliti chimicamente reattivi e le macromolecole (proteine ed acidi nucleici) costituenti le strutture e le funzionalità biologiche (dosimetria molecolare) (8).

Lo scopo ultimo di tutte queste misure è stato quello di accertare le associazioni presenti tra i diversi fenomeni e di poter stabilire tra essi l'esistenza di correlazioni quantitative più articolate dell'originario postulato paracelsiano di proporzionalità tra dosi ed effetti. In altri termini, l'intento speculativo è stato quello di poter sostituire ad una visione bidimensionale del fenomeno inquinamento-danni per la salute (riconducibile alla sola relazione tra la dose esterna e la comparsa di danno riportata nella figura 2) un algoritmo capace di rendere ragione, in termini quantitativi e predittivi, della complessità dell'interazione e dell'articolazione delle tappe che dall'esposizione portano al danno, come quello esemplificato nella figura 5 per un meccanismo di tossicità arbitrariamente semplice, nel quale l'agente lesivo è la medesima specie chimica presente nell'ambiente (e non un suo metabo-

lita), e necessita solamente di essere assorbita (processo a) e trasportata dal circolo sistemico all'organo bersaglio (processo b), dove essa esercita un'azione tossica caratterizzabile come un singolo danno biologico (processo c). L'insieme di relazioni si 'chiude' su se stesso, con lo stabilire un nesso di causalità (relazione epidemiologica) tra l'insorgenza della specifica patologia e la contaminazione dell'ambiente di lavoro con la sostanza cancerogena, evidenziata nel IV quadrante come processo d.

La rappresentazione del fenomeno così come mostrata in figura 5 soggiace ad una serie di convenzioni:

- fenomeni consecutivi nel tempo ed in relazione causale tra loro (ad es., presenza dell'agente chimico nell'ambiente e suo assorbimento sistemico da parte dell'organismo; trasporto dell'agente chimico dal circolo sistemico all'organo bersaglio) sono rappresentati in quadranti consecutivamente disposti in senso antiorario nel medesimo piano cartesiano;
- le variabili numeriche ad essi relative sono rappresentate su coppie consecutive di semiassi cartesiani ortogonali tutti orientati a partire dal centro comune, in cui l'asse della variabile dipendente in una relazione diviene quello della variabile indipendente nella relazione successiva;

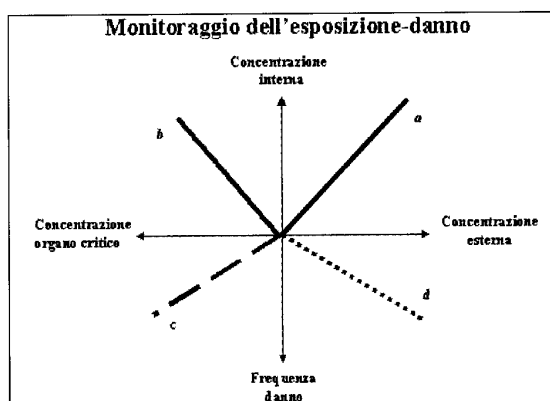


Figura 5 - Rappresentazione della relazione causale esistente tra il livello di esposizione ad un inquinante pericoloso per la salute, il suo assorbimento sistemico, il suo trasporto all'organo bersaglio e la frequenza del danno alla salute del soggetto esposto. Per motivi di chiarezza, nella rappresentazione grafica, non sono rappresentati né i punti sperimentali, né i limiti di confidenza delle rette che rappresentano le relazioni mostrate

– per corollario, fenomeni in competizione tra loro (ad es., la formazione nell'organo bersaglio di un metabolita) sono anche essi rappresentabili su semipiani non-complanari e spiccati dalla medesima semiretta che costituisce la variabile indipendente loro origine comune.

Ne consegue che la limitazione a 4 del numero delle variabili corrispondenti ai fenomeni (o compartimenti) consecutivi rappresentati in figura 5 è inerente alla convenzione costruttiva del piano cartesiano, che ha 4 semiassi orientati spiccati dall'origine, ma tale limitazione può venire meno adottando una rappresentazione alternativa matematicamente e graficamente più complessa, costituita da n semirette uscenti dall'origine e formanti tra di loro angoli uguali e pari a $2\pi/n$, dove n è il numero di fenomeni indipendenti e consecutivi presi in esame intercorrenti tra esposizione e comparsa di danno.

DALLE MACRODOSI ALLE MICRODOSI: LA "ZONA D'OMBRA"

I meccanismi della azione lesiva delle sostanze chimiche vengono ricondotti prevalentemente a due tipi di interazioni: la tossicità somatica, ovvero quella che si manifesta in termini funzionali descrivibili attraverso l'interazione tra sostanza e cellule di organi ed apparati, e la tossicità genomica per la quale il sito di azione è rappresentato dal DNA cellulare. Ai fini preventivi, mentre per la tossicità somatica si ammette la esistenza di una soglia di dose al disotto della quale non compaiono effetti avversi, al contrario, le conoscenze attualmente disponibili sui meccanismi molecolari della cancerogenesi chimica indicano che sussiste una proporzionalità continua e diretta della frequenza di tumore al crescere della dose assunta: il corollario di tale relazione è che non esiste una dose-soglia della sostanza cancerogena al disotto della quale la frequenza di tumore sia uguale a zero e che qualsiasi dose, anche la più piccola, è in grado di indurre la formazione di un tumore, seppure in proporzione altrettanto piccola.

In conseguenza del livello decrescente dell'esposizione a composti xenobiotici tossici, caratteristica degli ambienti di vita e di lavoro nei Paesi ad eco-

nomia avanzata, l'effetto tossicologico che continua ad essere oggetto di studio e di interventi preventivi è prevalentemente quello cancerogeno.

Siamo così passati nell'arco di mezzo secolo dallo studio delle macrodosi a quello delle microdosi, la cui entità non è stata ancora tuttavia definita in termini numerici (vedi Appendice). Lo studio degli effetti conseguenti all'esposizione ubiquitaria a microdosi di composti cancerogeni presenta una serie di difficoltà tecniche e conoscitive, delle quali quella fondamentale è la difficoltà della loro misura analitica sia nell'ambiente che nei compartimenti biologici, nonostante questo vincolo sia andato sfumando per l'avvento di tecniche strumentali di potenza crescente, che consentono il raggiungimento di limiti di rilevazione nell'ordine delle parti per bilione e per trilione e con la possibilità di conseguire, in sistemi biologici isolati, la misura di singole molecole.

Un aspetto che tuttavia appare al momento ancora di difficile gestione è costituito dalla grande variabilità presente nei risultati bioanalitici. Ogni misura effettuata su un sistema biologico è infatti affetta da due sorgenti di variabilità (o di errore, nel caso questa variabilità non sia nota o controllabile) di natura differente: quella analitica, riconducibile all'influenza delle variabili strumentali sulla misura (errori accidentali, casuali e sistematici) e quella biologica.

La variabilità biologica è a sua volta dipendente dall'azione di variabili inerenti al campionamento del materiale biologico, a quelle influenti sulla conduzione del monitoraggio (quali, ad es., quelle riconducibili agli aspetti tossicocinetici dell'interazione sostanza-organismo) e a variabili intrinseche alla popolazione dei soggetti studiati.

Quest'ultima porzione di variabilità biologica è riconducibile all'influenza delle caratteristiche individuali (genotipiche e fenotipiche) dei soggetti, che sono in grado di condizionare la suscettibilità-resistenza all'azione lesiva delle sostanze tossiche e costituisce ciò che genericamente viene indicato come variabilità interindividuale. Se lo studio della relazione dose esterna-effetti nell'organismo è compiuto correttamente, tutte le sorgenti di errore analitico sono virtualmente controllabili; analoga possibilità vale per le variabili riconducibili alla na-

tura del campione biologico raccolto e alla riproducibilità delle condizioni di monitoraggio adottate, mentre ineliminabile appare al contrario la variabilità interindividuale riferibile all'eterogeneità delle caratteristiche individuali dei soggetti allo studio.

Se l'effetto studiato è una grandezza discontinua, ad esempio misurabile in termini dicotomici, e l'indagine è compiuta su un numero sufficientemente grande di casi, la variabilità biologica risulta automaticamente considerata nell'andamento della relazione stessa. È questo, il caso che si presenta nella relazione 'classica' tra dose e risposta, utilizzata, ad esempio, nella misura della $DL_{50\%}$, dove la correlazione tra dati sperimentali (numero di animali morti nel gruppo trattato ed in quello di controllo) e la funzione sigmoideale, che li rappresenta associandoli ammette dei limiti di tolleranza solo nel caso che sussistano errori o limiti sperimentali, quali quelli imposti dal vincolo arbitrario del numero di animali impiegabili per l'esperimento. E' solamente l'inadeguatezza sperimentale dovuta alla limitazione del numero di osservazioni, con presenza di errori casuali nelle stesse, che introduce dei limiti conoscitivi e la conseguente necessità di tracciare la curva dose-risposta con i corrispondenti limiti di tolleranza. In questo caso la loro presenza non è da ascrivere alla variabilità biologica interindividuale degli animali trattati, ma solamente all'imprecisione del modello sperimentale che forzatamente si deve adottare. Da sottolineare che la limitatezza del modello può essere presente anche negli studi osservazionali (epidemiologici), dove la non comparabilità sperimentale delle osservazioni ottenute su popolazioni diverse impone la costruzione di curve dose-risposta con margini di incertezza.

Al contrario, per tutti i fenomeni biologici (sia quelli legati alle dosi interne che quelli descritti in termini di effetti; figura 3) che vengono misurati quantitativamente come grandezze continue sulla scala della concentrazione o della intensità, e la cui entità è influenzata dalle caratteristiche individuali dei soggetti esaminati, la variabilità di queste ultime contribuisce a quella interindividuale osservata nello studio di una popolazione eterogenea (3, 10). Come esemplificato per la relazione tra la concentrazione ambientale e quella sistemica di un gene-

rico agente chimico, riportata nella figura 6, l'entità della variabilità del comportamento dei singoli soggetti rispetto al gruppo è manifestata in termini statistici dal maggiore o minore scostamento dei valori da quello medio del gruppo e condizionerà l'ampiezza dei limiti di tolleranza della funzione che esprime l'andamento della relazione di associazione tra le due variabili. A titolo esemplificativo, i soggetti 1 e 3, pur esposti alla medesima concentrazione ambientale di agente chimico, ne avranno assorbito dosi differenti, o di converso i soggetti 1 e 2 ne avranno assorbito la medesima dose, pur esposti a concentrazioni ambientali diverse tra loro. All'estremo inferiore di entrambi gli assi sussiste una 'zona d'ombra' che costituisce il rettangolo $0ACB$ nella figura 6, delimitata dall'e-

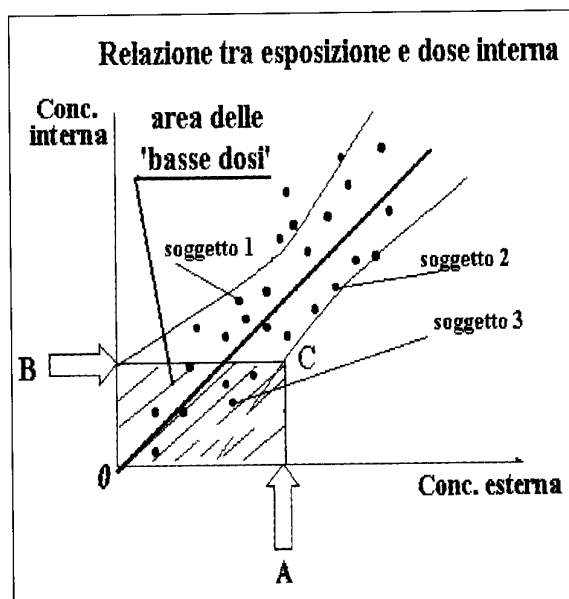


Figura 6 - Rappresentazione della relazione causale esistente tra il livello di contaminazione ambientale di un inquinante pericoloso per la salute (espresso come concentrazione esterna) e la corrispondente esposizione di un gruppo di soggetti (espressa come dose sistemica o concentrazione interna). Nella rappresentazione grafica sono rappresentati i singoli punti sperimentali del monitoraggio ambientale e biologico, la funzione di regressione ed i relativi limiti di tolleranza. I punti 0, B, C, A identificano l'area delle basse dosi (area tratteggiata) definita come 'zona d'ombra' per la quale qualsiasi concentrazione ambientale compresa tra 0 e A può dare origine ad esposizioni con valori casualmente compresi tra 0 e B

stremo superiore B del limite di tolleranza della funzione di regressione per la variabile dipendente (la dose sistemica) e dal corrispondente limite inferiore per la variabile indipendente (la concentrazione ambientale). Tale area è delimitata dall'intervallo di dose esterna compreso tra 0 e A; per qualsiasi valore di concentrazione ambientale dell'agente chimico in esame (sempre quantificabile con accuratezza adeguatamente elevata) il corrispondente valore di dose assorbita risulta 'casualmente' compreso tra 0 e B, ancora in modo indipendente dall'accuratezza della misura biologica. Capovolgendo i termini, ciò equivale ad affermare che una concentrazione sistemica di agente chimico con valore compreso tra 0 e B, può essere risultante dall'esposizione a qualsiasi valore di dose esterna compreso tra 0 e A.

La presenza di questa imprecisione nelle misure biologiche rappresenta il maggior inconveniente che si sta profilando nell'uso a fini preventivi del monitoraggio biologico dell'esposizione ad agenti chimici: infatti, nei paesi ad elevato sviluppo industriale, caratterizzati al momento attuale da un'esposizione a dosi di inquinanti via via decrescenti, la variabilità biologica comporta l'impossibilità di studiare l'intervallo della relazione dose-risposta biologica nella sua completezza, poiché esso comprende, al suo estremo inferiore, un intervallo di dose che non risulta interpretabile. Al contrario, quando in passato lo studio di questa relazione avveniva per l'esposizione umana a dosi elevate, il tratto inferiore dell'asse delle concentrazioni esterne appariva di entità trascurabile, ed irrilevante risultava l'incertezza e l'inesplorabilità del conseguente intervallo di valori nei corrispondenti compartimenti biologici.

Ora che progressivamente le condizioni di igiene degli ambienti di lavoro e dell'ambiente di vita riducono, almeno in via di principio, l'esposizione, l'incertezza conoscitiva assume rilevanza cruciale ai fini preventivi e può rappresentare un limite intrinseco e non superabile per qualsiasi ricerca voglia indagare i nessi di causalità tra l'esposizione a 'basse dosi' e la comparsa di effetti sulla salute.

Infatti, analogamente a quanto mostrato nella figura 6, tutte le relazioni che possono essere stabilite

tra la dose circolante e quella biologicamente efficace, in successione tra loro fino alla comparsa di un effetto, dapprima precoce e reversibile, poi dannoso (come riportato nella figura 5), soffriranno della presenza di un ambito di variabilità biologica e dell'esistenza dei relativi limiti di tolleranza nella quantificazione delle rispettive funzioni di correlazione.

La figura 7 riporta un'ipotetica relazione tra le variabili concentrazione ambientale, esposizione sistemica e dose all'organo bersaglio che concorrono nel determinismo dell'effetto di un agente chimico su di un organismo. Essa mostra come la variabilità nella relazione iniziale tra la sua concentrazione ambientale A ed il corrispondente valore di esposizione sistemica (ad es., la concentrazione dell'agente chimico presente come tale nei fluidi biologici) dovuta alla variabilità dei parametri farmacocinetici entro la popolazione esaminata si propaghi amplificandosi alla relazione tra il valore dell'esposizione sistemica (che risulta compresa nell'intervallo di dose B-B') e quello riscontrato all'organo bersaglio (intervallo di dose C-C') e da questo, in sequenza, a tutte le successive relazioni tra loro interdipendenti, fino ad arrivare all'evento ultimo (l'effetto dannoso), legato, ad es., alla comparsa di tumore nel soggetto esposto. Ciò equivale ad affermare che

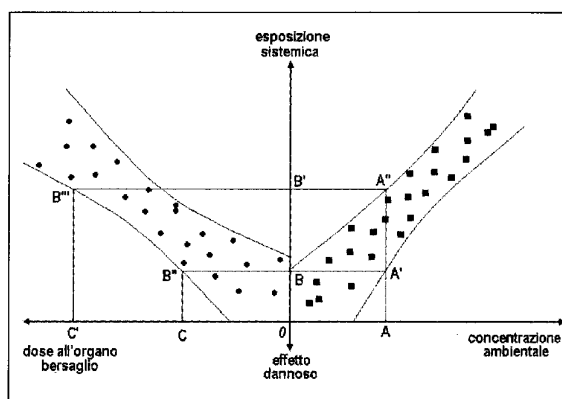


Figura 7 - Rappresentazione diagrammatica della relazione causale esistente tra il livello di contaminazione dell'ambiente da parte di un inquinante pericoloso per la salute, l'entità dell'esposizione sistemica in un gruppo di soggetti esposti, la risultante concentrazione dell'inquinante nell'organo bersaglio della sua azione tossica

soggetti di una popolazione eterogenea esposti al medesimo valore A di concentrazione ambientale dell'agente chimico in questione sono in condizione di assorbirne dosi differenti, alle quali corrispondono dosi all'organo bersaglio ancor più variabili, e che l'effetto finale sul singolo individuo esposto potrà essere espresso come un intervallo di probabilità (corrispondente ad un intervallo di frequenze di danno nella popolazione) di subire l'effetto dannoso in seguito all'esposizione dipendente dalla maggiore o minore suscettibilità dei singoli soggetti.

All'esistenza di questa variabilità nei parametri biologici coinvolti nel meccanismo dell'azione tossica di un agente chimico e nelle relazioni tra essi esistenti consegue inoltre che, nella relazione tra l'esposizione ad un agente chimico e la comparsa degli specifici effetti biologici da essa prodotti esiste un ambito di relazioni 'non indagabili' mostrata nel grafico di figura 8, e che è corrispondente all'area delle basse dosi individuata nella figura 6. In essa, soggetti che subiscono un livello di contamina-

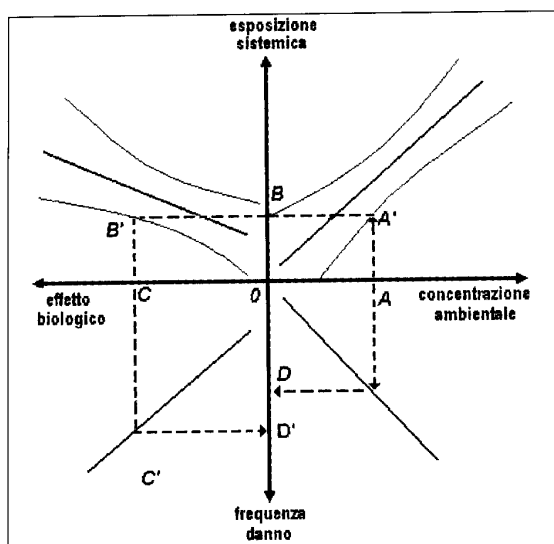


Figura 8 - Rappresentazione diagrammatica della relazione causale esistente tra il livello di contaminazione dell'ambiente da parte di un inquinante pericoloso per la salute, l'entità dell'esposizione sistemica in un gruppo di soggetti esposti, la risultante concentrazione dell'inquinante nell'organo bersaglio della sua azione tossica ed il conseguente effetto dannoso per la salute

zione ambientale da parte dell'agente chimico compreso tra 0 e A avranno, in forza della variabilità della risposta tossicocinetica della popolazione esaminata, un livello di esposizione sistemica casualmente compreso tra 0 e B (rettangolo 0AA'B); a livelli di esposizione sistemica compresi tra 0 e B sono associati, per la variabilità del comportamento metabolico individuale, livelli di dose all'organo bersaglio compresi tra 0 e C (rettangolo 0BB'C); da ultimo, a causa della variabilità della popolazione esaminata nei confronti della risposta tossicodinamica all'agente chimico, a tali livelli di dose è associata una frequenza di danno compresa tra 0 e D (rettangolo 0CC'D').

L'immediata conseguenza dell'esistenza di tale 'zona d'ombra', che è inerente all'eterogeneità del comportamento fisiologico dei diversi soggetti che compongono la popolazione esaminata, è l'impossibilità di cogliere il nesso causale tra esposizione e danno nei termini biochimici e fisiopatologici, anche quando tale relazione risulta evidente dal punto di vista epidemiologico.

Va sottolineato che la presenza della variabilità biologica è sempre stata considerata una caratteristica positiva del monitoraggio (almeno di quello che storicamente viene definito monitoraggio biologico), poiché permetteva di tenere conto delle caratteristiche individuali dei soggetti. Questa affermazione, tuttora vera, ha sempre però sottinteso la speranza e l'intento di dare un significato ed una interpretazione oggettiva a questa variabilità, per sfruttare appieno e con sicurezza l'informazione che in essa è racchiusa.

Allo stato attuale, tuttavia, nello studio dell'esposizione sul campo (ovvero in condizioni non sperimentali), la variabilità è risultata non un pregio, ma una limitazione del monitoraggio biologico: alla ricchezza dell'informazione veniva a contrapporsi l'apparente imprevedibilità dei risultati, la cui incontrollabile e inspiegabile variabilità conferiva spesso le caratteristiche di inaffidabilità ai risultati o veniva ricondotta, come *ultima ratio*, all'errore analitico negli stessi. Fa parte quindi degli intenti della disciplina promuovere strumenti conoscitivi capaci di gestire l'informazione racchiusa nell'individualità dei comportamenti biologici (1, 7).

DALLA TOSSICOLOGIA INDUSTRIALE ALLA TOSSICOGENOMICA

Lo studio della componente 'costitutiva' e dell'influenza di quella 'ambientale' nel comportamento fisiopatologico dei soggetti è iniziato parecchi decenni orsono. Per quanto riguarda la Medicina del Lavoro ed in particolare per la tossicologia industriale, di pari passo alla conoscenza del quadro di distribuzione e metabolismo delle sostanze tossiche di origine industriale ed ambientale, è proceduta la conoscenza e lo sviluppo di indicatori biologici atti a rivelare alterazioni genomiche predittive dell'insorgenza di danni o effetti irreversibili a carico dell'individuo esposto o della sua progenie (genotossicità e cancerogenesi). Lo studio degli enzimi implicati nel metabolismo di prima e di seconda fase delle sostanze esogene ha comportato l'identificazione dei geni ad essi corrispondenti, il riconoscimento del loro polimorfismo e la conferma dell'inducibilità selettiva della loro trascrizione. L'insieme di queste conoscenze ha avviato lo studio delle differenze interindividuali nei confronti del metabolismo e della suscettibilità all'azione tossica delle sostanze chimiche.

Con la mappatura dei geni che compongono il genoma umano è iniziata una nuova fase della ricerca sullo studio dei meccanismi di insorgenza delle patologie sia ereditarie che acquisite, ed in particolare di quelle di natura genomica quali la mutagenesi, la teratogenesi e la cancerogenesi. Lo studio del genoma, delle condizioni che influenzano i meccanismi di trascrizione (transcriptoma), delle proteine da esso codificate, ivi compresi i meccanismi di regolazione post-traduzionale (proteoma) e da ultimo delle reazioni metaboliche da essi controllate (metaboloma), rappresenta un approccio integrato per la delucidazione delle interazioni fisiopatologiche che intercorrono tra esposizione alle sostanze esogene ed i meccanismi di insorgenza delle specifiche patologie ad esse riconducibili.

Per restringere le prospettive di queste conoscenze al solo settore della tossicologia industriale, è ormai assodato che la variazione interindividuale osservata nella suscettibilità alla cancerogenesi chimica, dipende dalla entità e tipologia delle reazioni metaboliche cui va incontro nell'organismo il can-

cerogeno presente nell'ambiente, dalla efficacia delle reazioni di riparazione delle alterazioni del DNA operate dai suoi metaboliti (5, 11). Infatti numerosi cancerogeni chimici esercitano i loro effetti lesivi solo dopo l'attivazione metabolica a intermedi biologicamente reattivi (elettrofilo), i quali sono in grado di reagire con specifici raggruppamenti atomici della struttura del DNA (siti nucleofili), spesso con la produzione di nuovi composti derivati dal legame covalente DNA-cancerogeno (addotti). L'esposizione a tali composti genotossici porta quindi alla formazione di addotti al DNA la cui struttura chimica, se non viene riconosciuta dai meccanismi di riparo del DNA come alterazione del genoma originario, può dare luogo ad una serie di errori nelle sequenze di trascrizione e traduzione, con l'innescare di una serie di eventi che possono sfociare nell'instaurarsi di un processo di cancerogenesi.

Per la maggior parte degli enzimi coinvolti nel metabolismo ossidativo delle sostanze esogene (enzimi della prima fase quali la famiglia dei citocromi P450), nelle reazioni di coniugazione (enzimi della seconda fase, tra i quali le glutatione-transferasi, le epossido-idrolasi ed i sistemi di glucuronidazione e solfatazione) e nella riparazione delle alterazioni a carico del DNA, esistono polimorfismi genetici che sono in grado di modificare la velocità delle diverse reazioni fisiopatologiche conseguenti all'interazione tra l'organismo e le sostanze esogene. La presenza del polimorfismo metabolico ossidativo, coniugativo e riparativo, influenza i livelli sistemici, *in situ* ed escreti delle sostanze (sia esogene che endogene) ed influenza, oltre che le concentrazioni misurabili nei diversi distretti e fluidi biologici, anche la suscettibilità individuale all'azione tossica e quindi al rischio di contrarre il tumore. Da ultimo va anche considerato che il controllo di queste attività enzimatiche non è solo genomico ma è anche mediato dalla intensità e durata della esposizione stessa o dagli stili di vita e dalle abitudini voluttuarie dei soggetti, tramite meccanismi di tolleranza, induzione-repressione e/o attivazione-repressione mediati a livello del transcriptoma.

Pur con queste brevi premesse, è evidente come il crescere delle conoscenze sulle differenze genetiche esistenti a carico di queste abilità metaboliche permetterà di scompare la variabilità biologica da

fenomeno generico e collettivo a comportamento specifico ed individuale, non più casuale ma patrimonio di sottopopolazioni di soggetti metabolicamente simili perché accomunati da identico genotipo o fenotipo. Nello studio delle funzioni di regressione sia delle dosi interne che delle alterazioni funzionali, a sostituzione della singola funzione che rappresenta il comportamento 'medio' di interi gruppi di soggetti, verrà introdotto un fascio di funzioni con le quali si potrà rappresentare il polimorfismo dei geni presenti nella popolazione e gestire con un approccio razionale gli effetti della variabilità biologica. Alla singola retta di regressione farà riscontro un insieme di rette, in prima approssimazione descritte nella figura 9 come tra loro quasi parallele, ognuna delle quali descrive il comportamento tossicocinetico e tossicodinamico riferito a singole caratteristiche genetiche possedute da ciascuno dei soggetti facenti parte di uno specifico sottogruppo della popolazione studiata. Nel caso esemplificativo della figura 9, il gruppo di popolazione a1 tenderà ad avere, a pari livello di contaminazione ambientale da parte dell'agente chimico considerato rispetto agli altri gruppi, un'esposizione inferiore a quella del gruppo a2, ad es., in forza di una ventilazione respiratoria inferiore. Analogamente, nel secondo quadrante della medesima figu-

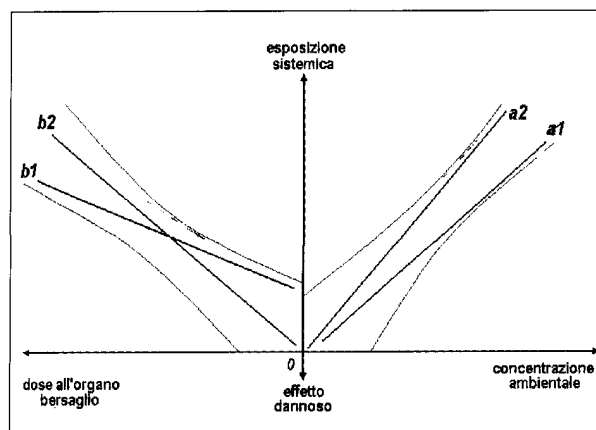


Figura 9 - Rappresentazione della relazione causale esistente tra il livello di contaminazione dell'ambiente da parte di un inquinante pericoloso per la salute, l'entità dell'esposizione sistemica in un gruppo di soggetti esposti, la risultante concentrazione dell'inquinante nell'organo bersaglio della sua azione tossica in gruppi di soggetti con differente suscettibilità

ra, il gruppo di popolazione b1 tenderà ad avere, a livelli di dose interna (ad es., di concentrazione plasmatica) superiori ad un determinato valore una dose di agente chimico all'organo bersaglio (ad es., una concentrazione di addotti al DNA di un agente cancerogeno genotossico) superiore a quella del gruppo di popolazione b2, in quanto portatore, ad es., di un genotipo con una bassa efficienza di una via biochimica di detossificazione (5, 11).

In tale prospettiva la 'zona d'ombra' della dose evidenziata nella figura 7, ora non indagabile, verrà a scomparire man mano che la conoscenza diminuirà il margine di incertezza (figura 6) presente nell'interpretazione dei risultati.

Solo in queste rinnovate condizioni di sapere, la variabilità biologica dei soggetti sarà fonte di informazione sui comportamenti individuali e non sarà più attribuibile alla stravaganza ed alla bizzarria delle misure.

CONCLUSIONI

Il cammino conoscitivo della Tossicologia Industriale, nato con l'intento di mitigare i danni sull'uomo conseguenti all'industrializzazione, è evoluto con il crescere delle conoscenze fisiopatologiche sull'interazione tra l'organismo e le sostanze esogene e molti sono stati i traguardi raggiunti con la conoscenza dell'azione lesiva di gran parte delle sostanze chimiche di largo impiego industriale o presenti nell'ambiente di vita in forza della sua contaminazione antropogenica.

La genomica può rappresentare un'altra occasione di sviluppo di tali conoscenze, in forza del potenziale informativo in essa racchiuso. La possibilità di interpretare il comportamento metabolico e la suscettibilità all'azione lesiva dei tossici su base individuale offre opportunità enormi ai fini preventivi e terapeutici, che dovranno essere sfruttate pienamente e con saggezza dalla Medicina del Lavoro. Il miglioramento delle condizioni di igiene dei luoghi di lavoro, se da un lato ha fatto diminuire l'interesse speculativo su molte delle sostanze di uso industriale, ha anche evidenziato il limite di un approccio conoscitivo generico e aspecifico per lo studio dei meccanismi dell'azione lesiva delle esposi-

zioni a basse dosi, in particolare per esposizione alle sostanze cancerogene ed a quelle che agiscono sul sistema endocrino.

In una condizione di sviluppo industriale in cui la compartimentazione dell'inquinamento tra l'interno e l'esterno della fabbrica appare superata per l'ubiquitarità e la limitata distinguibilità delle dosi presenti nei due ambiti, la prospettiva offerta dalla genomica per lo studio su base oggettiva del comportamento metabolico individuale appare uno strumento di indagine capace di interpretare e rendere ancora attuale e fruibile l'enorme numero di osservazioni compiute in passato sull'uomo esposto in maniera impropria ed indebita a sostanze lesive nell'ambito della sua attività lavorativa.

BIBLIOGRAFIA

1. ALESSIO L, BERTAZZI PA, FORNI A, e coll: *Il monitoraggio biologico dei lavoratori esposti a tossici industriali. Aggiornamenti e sviluppi*. Pavia: Fondazione Maugeri, 2000: 1-413
2. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENE: *2001-2002 TLV and BEIs for chemical substances and physical agents*. Cincinnati (OH): ACGIH, 2001
3. COLOMBI A, BURATTI M, FOÀ V: Variabilità analitica e biologica degli indicatori utilizzati nel monitoraggio biologico. In Bertazzi PA, Alessio L, Duca PG, Marubini E (eds): *Monitoraggio biologico degli ambienti di lavoro*. Milano: Franco Angeli Editore, 1984: 57-85
4. COLOMBI A, BURATTI M, ZOCCHETTI C, e coll: Limiti biologici di esposizione: evoluzione dei criteri interpretativi e metodologici. *Med Lav* 1989; 80: 25-42
5. LUCAS D, FERRARA R: Cytocrome Cyp2E1 phenotyping and genotyping in the evaluation of health risks from exposure to polluted environments. *Tox Lett* 2001; 124: 71-81
6. MUTTI A: Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. *Tox Lett* 1999; 108: 77-89
7. NATIONAL RESEARCH COUNCIL: Biological markers in environmental health research. *Environ Health Perspect* 1987; 74: 1-191
8. SCHULTE PA: Use of biological markers in occupational health research and in practice. *J Toxicol Environ Health* 1993; 40: 359-366
9. SCOEL: *Metodologia per la derivazione dei limiti di esposizione professionale: documentazione di riferimento*. Commissione Europea DGV V/F/5D 99GAA1, 1999
10. TUGGLE RM: Assessment of occupational exposure using one-sided tolerance limits. *Am Ind Hyg Assoc J* 1982; 43: 338-346
11. WORMHOUDT LW, COMMANDEUR JNM, VERMEULEN NPE: Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, cytochrome P450, gentathione S-transferase and epoxide hydrolase enzymes: relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29: 59-124

APPENDICE

Una definizione di 'microdose' di un agente chimico di interesse tossicologico può essere fornita facendo riferimento a criteri differenti, ad esempio, in relazione ai limiti di rivelabilità analitica (che risente dell'evoluzione tecnologica degli strumenti di misura) oppure ai livelli misurati nelle situazioni tipiche di interesse (che registra il generale miglioramento nelle condizioni igieniche degli ambienti di vita e di lavoro). Tali definizioni sono tuttavia di carattere puramente empirico, in quanto non hanno relazione con le proprietà tossicologiche delle sostanze e possono essere, a secondo dei casi, eccessivamente elevati (l'impiego di alcune moderne tecniche analitiche in grado di 'vedere tutto dappertutto' ha generato l'insorgere di preoccupazioni improprie nei confronti di contaminanti ambientali relativamente poco tossici ma ormai ubiquitari) o ancora insufficientemente tutelanti, nel caso di composti quali i cancerogeni genotossici, attualmente considerati come privi di una dose-soglia per l'insorgenza degli effetti tossici.

In termini puramente speculativi, una definizione preliminare di 'microdose' può essere fornita in termini tossicocinetici e tossicodinamici dalla considerazione che è necessaria (e nel caso di alcuni meccanismi di tossicità, tra i quali quello attualmente accettato per l'iniziazione della cancerogenesi da agenti genotossici, è ritenuta sufficiente) almeno una singola molecola per cellula per dare luogo all'interazione biochimica in grado di scatenare la produzione dell'effetto lesivo.

Questa trattazione, necessariamente approssimata dal punto di vista fisiologico e biochimico, si propone di definire in termini razionali il concetto di 'microdosi' riferito a taluni contaminanti ubiquitariamente presenti in tracce nell'ambiente e di render ragione dell'interesse tossicologico che riveste lo studio dell'esposizione a tali livelli di concentrazione, mostrando come in linea di principio essi siano in grado di produrre effetti biologici nell'uomo.

Per quanto riguarda gli aspetti farmacocinetici di assorbimento e biodistribuzione, si consideri innanzitutto che un organismo umano di circa 70 kg è composto di circa 10^{14} cellule; pertanto, per realizzare una dose interna corrispondente a 1 molecola di agente chimico per ogni cellula è necessaria una dose complessiva pari a 10^{14} molecole nell'intero organismo.

Inoltre, una mole di qualsiasi specie chimica atomica o molecolare è definita come la quantità di materia contenuta in una massa, in grammi, pari al suo peso atomico o molecolare; tale quantità contiene circa 6×10^{23} molecole (numero di Avogadro), e ciò indipendentemente dalla natura della sostanza e dal suo stato fisico di aggregazione. Pertanto, considerando un composto organico di massa molecolare pari a 300 unità di massa atomica (un valore tipico per contaminanti ambientali ubiquitari quali gli idrocarburi policiclici aromatici e le diossine), 300 g (ovvero 1 mole) di esso contiene 6×10^{23} molecole.

Di conseguenza, un numero di molecole pari a 10^{14} (1 molecola di agente chimico per ogni cellula) corrisponde a

$$10^{14} \text{ molecole} / 6 \times 10^{23} \text{ molecole} / \text{mole} = 1,7 \times 10^{-10} \text{ moli,}$$

ovvero a 170 picomoli di composto;

per un composto di massa molecolare pari a 300 u, tale quantità di materia corrisponde a:

$$170 \text{ picomoli} * 300 \text{ picogrammi/picomole} = 49800 \text{ picogrammi,}$$

ovvero circa 50 nanogrammi.

Tale quantità di materia, se considerata come uniformemente distribuita nell'intero organismo, corrisponde in termini ponderali a circa 700 picogrammi (o 0,7 nanogrammi) per kg di peso corporeo.

Valori di dose interna di composti organici tossici di questo ordine di grandezza sono riportati per alcuni contaminanti ambientali ubiquitari, quali gli idrocarburi policiclici aromatici e composti organoclorurati quali le policloro-diossine e i policloro-bifenili.

Il valore di concentrazione 'media' nell'intero organismo sopra calcolato, e corrispondente ad 1 molecola di agente chimico tossico per ogni cellula dell'intero organismo, rappresenta tuttavia un parametro di interesse limitato, in quanto è noto che la biodistribuzione dei composti chimici nell'organismo non è uniforme nei diversi organi e tessuti, ma varia ampiamente in funzione sia delle caratteristiche di idro- e liposolubilità del composto in esame, sia delle caratteristiche istologiche, anatomiche e fisiologiche dell'organo o tessuto considerato.

Ne consegue che i composti chimici polari, che possiedono un'elevata solubilità in acqua, tenderanno a ripartirsi nei compartimenti biologici a più elevato contenuto in acqua (quali il sangue, il fluido extracellulare ed organi quali il cuore, il polmone, il rene ed il fegato), mentre i composti apolari, che possiedono scarsa solubilità in acqua ma elevata solubilità nei solventi organici apolari, tenderanno ad accumularsi nei tessuti ricchi di lipidi, quali il grasso sottocutaneo e viscerale ed il tessuto nervoso.

Di conseguenza, la concentrazione di alcuni contaminanti ambientali ubiquitari quali gli idrocarburi policiclici aromatici e le diossine, che sono altamente liposolubili, tenderà ad essere più elevata nei tessuti ad alto contenuto lipidico che in quelli più ricchi di acqua. Tale fattore di concentrazione può essere dell'ordine di 10^2 - 10^3 , ovvero la concentrazione di tali contaminanti organici in alcuni distretti corporei, quali i lipidi di deposito, può essere da 100 a 1000 volte superiore a quella presente nel sangue e nei tessuti di alcuni organi bersaglio e quindi la dose corporea totale alla quale viene raggiunta la concentrazione di 1 molecola per cellula in tali compartimenti diviene proporzionalmente maggiore. Al contrario, se gli organi bersaglio dell'azione tossica sono quelli ricchi di lipidi, come gli organi del sistema nervoso, la dose corporea totale alla quale viene raggiunta la concentrazione di 1 molecola per cellula in tali compartimenti si riduce proporzionalmente.

Per contro, nei casi in cui l'agente tossicologicamente attivo non è la specie chimica presente nell'ambiente ed assorbita come tale dall'organismo ma un suo prodotto di biotrasformazione, la dose biologicamente efficace in termini tossicologici può rappresentare una frazione esigua (1-0,1%) di quella totale, e pertanto la dose di specie chimica precursore alla quale corrisponde la concentrazione di 1 molecola di metabolita attivo per cellula diviene proporzionalmente maggiore.

La stima della concentrazione intracellulare corrispondente alla presenza in essa di una singola molecola di agente chimico tossicologicamente attivo risulta importante in particolare nel caso in cui la specie tossica agisca attraverso un meccanismo basato sull'interazione molecolare specifica di tipo recettoriale (agonismo/antagonismo recettoriale, inibizione enzimatica reversibile, attivazione/repressione della trascrizione genica).

In prima approssimazione, considerando come interamente accessibile il volume di una singola cellula (nell'ordine di 0,1-1 pL, ovvero 10^{-12} - 10^{-13} Litri circa), la presenza in essa di una singola molecola di agente chimico corrisponde ad una concentrazione:

$$1 \text{ molecola} / 10^{-12} \text{ Litri} = 10^{12} \text{ molecole/Litro,}$$

ovvero a:

$$10^{12} \text{ (molecole/Litro)} / 6 \times 10^{23} \text{ molecole/mole} = 0,17 \times 10^{-11} \text{ moli/Litro}$$

corrispondenti a una concentrazione nell'ordine di 1-10 picomolare (pM).

L'interazione reversibile tra l'agente tossico (T) ed il suo recettore (R) a formare il complesso Recettore-Tossico (R-T)



è descritta in funzione delle concentrazioni di agente Tossico e di Recettore da un'equazione (isoterma di Langmuir) della forma:

$$[R-T]=[R] * [T]/(k_{dec} + [T]) \quad [2]$$

Nella teoria dell'equilibrio chimico reversibile, la costante di decomposizione (k_{dec}) dell'equazione chimica [1] rende conto della maggiore o minore tendenza alla dissociazione del complesso non covalente Recettore-Tossico, ed è definita come il rapporto:

$$k_{dec}=[R] * [T]/[R-T] \quad [3]$$

ed ha le dimensioni di una concentrazione.

Un valore della costante di decomposizione pari a 1 significa che, al raggiungimento dell'equilibrio chimico, la concentrazione del complesso Recettore-Tossico (R-T) è pari al prodotto delle concentrazioni di R e di T liberi nel mezzo intracellulare, mentre valori della costante nell'ordine di 10^{-9} - 10^{-12} M corrispondono a situazioni nelle quali la formazione del complesso è largamente favorita rispetto alla sua dissociazione, ovvero che il complesso è molto stabile. Ad esempio, affermare che un complesso Recettore-Tossico ha una costante di dissociazione pari a 10^{-9} M equivale a dire che, su un miliardo di molecole di complesso R-T formate e presenti in un litro di soluzione, solamente una andrà incontro alla dissociazione, ripristinando una molecola di recettore libero ed una di agente chimico tossico.

Valori della costante di dissociazione nell'ordine di 10^{-9} - 10^{-15} M sono caratteristici di fenomeni farmacologici come l'interazione tra neurotrasmettitori e recettori post-sinaptici o tra ormoni peptidici come l'insulina e i rispettivi recettori sulla membrana cellulare e degli ormoni steroidei e dei loro analoghi di interesse farmacologico con il proprio recettore intracellulare. L'affinità di alcuni inquinanti ubiquitari di elevata tossicità, come le diossine ed i bifenili policlorurati, con il 'recettore degli idrocarburi aromatici' intracellulare (AHR) è dell'ordine di 10^{-8} M.

Ciò premesso, diviene possibile calcolare l'entità dell'effetto farmacologico (interazione tra una molecola di diossina ed il recettore AHR) in cellule esposte a 'basse dosi' di diossina.

Si consideri una popolazione di cellule che esprimono il recettore intracellulare AHR in un numero di 1000 copie per cellula (un valore tipico per i *low-copy gene products*, corrispondente ad una concentrazione $[R]=1,7*10^{-9}$ M) e ciascuna delle quali contenga una molecola di diossina (corrispondente, come sopra calcolato, ad una concentrazione $[T]=01,7*10^{-12}$ M).

Attraverso l'uso dell'equazione [2], e considerando la costante di dissociazione del complesso R-T pari a 10^{-8} M, è possibile calcolare la frazione di cellule nelle quali un recettore AHR è occupato dalla molecola di diossina. Poiché nel caso qui preso in esame il fattore limitante è costituito non dal numero di recettori presenti ma dal numero di molecole di diossina disponibili (una per cellula!), nell'equazione risulta necessario considerare quale Recettore (la specie limitante) l'agente Tossico e viceversa. Di conseguenza, l'equazione [2] viene riformulata come [4]:

$$[R-T]=[R] * [T]/(k_{dec}+[R]) \quad [4]$$

Il calcolo effettuato con i dati sopra riportati fornisce una 'concentrazione' di Recettore 'legato' intracellulare $[R-T]=2,7*10^{-14}$ M, che - rapportata alla concentrazione totale di recettori AHR nella cellula pari a $[R]=1,7*10^{-9}$ M - corrisponde ad una frazione di recettori occupati pari allo 0,0016%, o in altri termini a 1 recettore occupato ogni 7024. Tale risultato appare paradossale, in quanto l'occupazione del recettore da parte del ligando è un fenomeno tipicamente dicotomico (il recettore è occupato, o non lo è), ma può essere più correttamente interpretato se viene considerato nei suoi termini probabilistici: in un tessuto composto da 'molte' cellule, ciascuna delle quali contenente 1000 copie del recettore AHR ed una molecola di diossina, 1 cellula ogni 7024 avrà un recettore occupato e quindi in grado di scatenare l'effetto biochimico pertinente.

Dalle semplici stime numeriche sopra presentate risulta di conseguenza evidente che, anche a dosi apparentemente oltre i limiti della plausibilità biologica, alcuni contaminanti organici ormai ubiquitariamente presenti nell'ambiente sono potenzialmente in grado di attivare risposte biochimiche; di conseguenza lo studio degli effetti biologici di tali dosi non rappresenta solo un esercizio scientifico, mentre la preoccupazione nei confronti dei loro effetti a lungo termine e gli sforzi volti alla limitazione della loro immissione nell'ambiente non devono essere considerati puramente pretestuosi o allarmistici.