

STATO DELL'ARTE SULLA VALUTAZIONE DEL RISCHIO D'ESPOSIZIONE A MISCELE DI SOSTANZE ED EFFETTI SULLA SALUTE DEI LAVORATORI

E. BARBASSA

INAIL - Direzione Regionale Lombardia - Consulenza Tecnica Accertamento Rischi e Prevenzione

RIASSUNTO

In passato gli studi tossicologici disponibili in letteratura erano relativi principalmente alle sostanze singole, anche se l'esposizione umana riguarda di solito una molteplicità di composti chimici.

La conoscenza della tossicità delle sostanze singole è quindi spesso inadeguata per la valutazione del rischio per la salute dei lavoratori, ma occorre conoscere quali sono i principali tipi di interazioni che avvengono tra i componenti delle miscele, ovvero se essi si combinano tra di loro in modo additivo, sinergico od antagonistico.

Scopo del presente lavoro è stato quello di fare il punto sullo stato dell'arte nella valutazione del rischio per la salute dei lavoratori derivante dall'esposizione a miscele di sostanze attraverso una revisione critica dei documenti sulla tossicità delle miscele pubblicati da alcune delle principali Agenzie regolatorie internazionali (EPA, ATSDR, ACGIH) al fine di evidenziare quelli che si ritengono i principali limiti e criticità di tali approcci.

SUMMARY

Most toxicological studies to date are performed on single chemicals even though human exposure is rarely limited to individual compounds.

The current knowledge of the chemicals' toxicity is often unsuitable for the risk assessment of the workers' health, but we have to know what are the main types of interactions (dose and response addition, synergism, antagonism) occurring among the mixtures' components.

This work aimed at reviewing the current theoretical and practical approaches to the mixtures toxicity, through an in-depth analysis of the chief regulatory Guidance Documents (EPA, ATSDR etc.) concerning the mixtures risk assessment, and at discussing the most important limits and the major roadblocks of the current mixtures risk assessment methodologies.

1. INTRODUZIONE

La valutazione del rischio derivante dall'esposizione a miscele di sostanze chimiche e la stima delle potenziali interazioni tra agenti chimici rappresentano problemi molto complessi, ma di grande importanza in quanto l'esposizione umana sia nell'ambiente di vita che in ambito occupazionale è caratterizzata dalla presenza contemporanea di una molteplicità di sostanze chimiche.

Occorre sottolineare che, nonostante la disponibilità in letteratura di numerosi studi tossicologici sulle interazioni tra agenti chimici, l'attuale conoscenza dei meccanismi di interazione tra le sostanze chimiche è piuttosto limitata e presenta delle lacune.

Una miscela può essere definita (EPA: Environmental Protection Agency, 1986) come qualsiasi combinazione di due o più sostanze chimiche che, indipendentemente dalla loro origine spaziale o temporale, possono influenzare il livello di rischio a cui è soggetta una popolazione. Si può distinguere tra:

- *miscele semplici*: consistono di un relativamente piccolo numero di componenti (10 o meno) la cui composizione è qualitativamente e quantitativamente nota (es. un cocktail di pesticidi, un'associazione di farmaci)
- *miscele complesse*: comprendono decine, centinaia o migliaia di agenti chimici la cui composizione non è completamente nota (es. fumi di saldatura, inquinanti dell'aria urbana)

- *miscele simili*: miscele che sono leggermente differenti, ma che si ritiene che abbiano caratteristiche paragonabili per destino, trasporto, processi fisiologici e tossicità. Queste miscele possono essere costituite dagli stessi componenti, ma in proporzioni leggermente differenti, od avere in comune la maggior parte dei componenti, in quasi le stesse proporzioni, con soltanto alcuni componenti diversi. Miscele simili determinano la stessa attività biologica ed agiscono attraverso lo stesso meccanismo di azione o riguardano lo stesso endpoint tossico.

Sono state definite (U.S. EPA, 2000) le seguenti principali categorie di meccanismi d'azione delle sostanze chimiche:

- a) *azione congiunta indipendente o additività di risposta* (situazione di non interazione): si riferisce a sostanze che agiscono in modo indipendente ed hanno differenti meccanismi di azione così che la presenza di una sostanza non influenzerà la tossicità di un'altra e la tossicità combinata è eguale alla somma delle risposte dei componenti così come definita dalla formula per la somma delle probabilità di eventi indipendenti
- b) *simile azione congiunta o additività di dose o di concentrazione* (situazione di non interazione): si riferisce a sostanze chimiche che causano effetti simili attraverso meccanismi d'azione simili ovvero si verifica quando ciascun composto chimico si comporta come una concentrazione o diluizione di ciascun altra sostanza presente nella miscela e la risposta della combinazione è la risposta attesa dalla dose equivalente di un composto chimico di riferimento
- c) *sinergismo*: si verifica quando l'effetto tossico della miscela è maggiore della somma degli effetti che si avrebbero considerando le singole sostanze
- d) *antagonismo*: si verifica quando la tossicità osservata della miscela è minore della somma degli effetti che si avrebbero considerando le singole sostanze.
- e) *potenziamento*: si verifica quando una sostanza non ha di per sé un effetto tossico su un certo organo o sistema, ma se aggiunta ad una sostanza tossica ne aumenta la tossicità.

Scopo del presente lavoro è stato quello di esaminare in modo critico la letteratura sulla tossicità delle miscele pubblicata a scopo regolatorio da alcune delle principali Agenzie regolatorie internazionali al fine di fare il punto sullo stato dell'arte e sulle prospettive future nella valutazione del rischio per la salute derivante dall'esposizione a miscele di sostanze chimiche.

2. MATERIALI E METODI

Alcune delle più importanti Agenzie regolatorie internazionali (EPA: Environmental Protection Agency, ATSDR: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ACGIH: American Conference of Governmental Industrial Hygienists) hanno sviluppato delle metodologie per la valutazione del rischio di esposizione a miscele di sostanze chimiche che vengono analizzate in dettaglio nel presente lavoro e confrontate criticamente tra di loro.

L'analisi delle metodologie di valutazione del rischio delle miscele proposte dalle sopra citate Agenzie internazionali ha permesso di evidenziare quelli che si ritengono i principali limiti e criticità di tali approcci, mettendo in rilievo quali sono gli aspetti su cui è ancora necessario lavorare e che meritano di essere approfonditi in futuro.

3. RISULTATI

3.1 Metodologia di valutazione del rischio delle miscele sviluppata dall'EPA

La Guida Supplementare per la valutazione del rischio delle miscele (EPA, 2000) fa riferimento al modello generale per la valutazione del rischio chimico proposto dall'EPA nel 1992 che prevede, partendo dalla formulazione del problema, lo sviluppo delle seguenti fasi:

- identificazione dei pericoli
- valutazione della relazione dose – risposta
- valutazione dell'esposizione
- caratterizzazione del rischio.

Il documento prende in esame diversi possibili approcci per la valutazione del rischio delle miscele in funzione della completezza e della qualità dei dati disponibili sulle miscele e descrive procedure per la valutazione del rischio che utilizzano dati relativi a:

- l'intera miscela di interesse che è trattata come una singola sostanza complessa
- miscele simili dal punto di vista tossicologico alla miscela di interesse
- i componenti della miscela di interesse.

La Guida dell'EPA non raccomanda alcun singolo approccio per la valutazione del rischio delle miscele, ma intende fornire un certo numero di opzioni finalizzate alla scelta degli approcci più adatti al tipo specifico di miscela ed alla qualità dei dati disponibili, come è evidenziato in Figura 1:

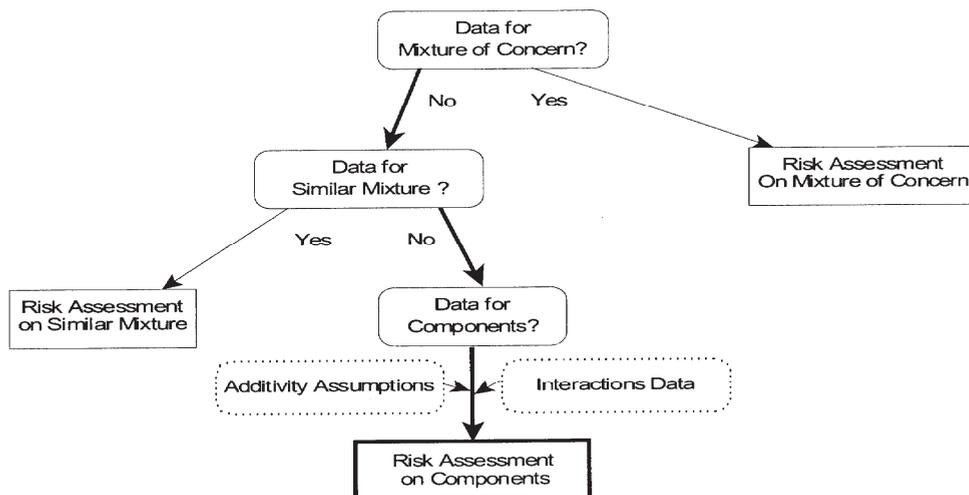


Figura 1: differenti approcci per la valutazione delle miscele proposti dall'EPA

La Guida supplementare dell'EPA inizia il processo di valutazione del rischio con una stima preliminare della qualità ed affidabilità dei dati disponibili sulle miscele e suggerisce, per valutare l'enorme varietà di miscele presenti negli ambienti di vita e di lavoro, di investigare direttamente poche miscele considerate "ad alta priorità" e di utilizzare i dati relativi a queste miscele per estrapolazioni ad altre miscele ambientali ritenute simili.

Esempi di miscele considerate ad alta priorità sono costituite dai combustibili diesel o dalle miscele di PCB (policlorobifenili) per cui esiste una grande quantità di dati di tossicità relativi alle miscele commerciali che possono essere estrapolati alle miscele ambientali ritenute simili in composizione.

Il problema principale consiste nel determinare quali sono le miscele da testare in modo prioritario, basandosi sulla documentazione relativa alla frequenza con cui le miscele sono presenti nell'ambiente di vita e di lavoro, alla presenza di componenti altamente tossici nelle miscele, a problemi di salute pubblica in popolazioni esposte a miscele di sostanze etc..

Per le rimanenti miscele considerate non prioritarie, occorre focalizzarsi sui metodi da sviluppare per estrapolare le stime di esposizione e tossicità dalle miscele testate a quelle non testate.

Si sottolinea che, in aggiunta ai problemi tipici delle estrapolazioni concernenti sostanze singole (incertezze interspecie, correlate alle diverse vie di esposizione etc.) le miscele includono ulteriori incertezze relative alla presenza o meno di interazioni ed ai cambiamenti di composizione.

Pertanto, per migliorare l'estrapolazione dose – risposta, occorre condurre contemporaneamente sia esperimenti tossicologici che studi epidemiologici oltre a sviluppare modelli matematici.

La Guida supplementare dell'U.S. EPA del 2000 è basata essenzialmente sui concetti riguardanti i meccanismi dell'azione tossica e la somiglianza tossicologica tra differenti miscele.

Un limite serio della suddetta Guida consiste nel fornire poche indicazioni su come determinare quando 2 miscele possono essere considerate simili dal punto di vista tossicologico.

Tale Guida Supplementare distingue anche tra metodi di valutazione del rischio specifici per le miscele complesse e per le miscele semplici.

Per le miscele complesse, particolarmente quelle che consistono di miscele commerciali od industriali comunemente prodotte, come ad es. i combustibili diesel per cui esiste una grande quantità di dati di tossicità relativi alle intere miscele (WHO: World Health Organization, 1996), il metodo preferito è l'utilizzo di dati di tossicità relativi alla miscela considerata nella sua totalità.

Occorre sottolineare che a seguito del rilascio delle miscele nell'ambiente i componenti delle miscele possono essere alterati; quindi, la miscela per cui esistono i dati tossicologici può non essere più identica per composizione alla miscela rilasciata nell'ambiente.

In questi casi chi valuta il rischio può optare per l'utilizzo di una miscela che è considerata "sufficientemente simile" (U.S. EPA 2000).

Sfortunatamente, dati di tossicità sulle intere miscele o su miscele simili sono raramente disponibili per miscele differenti dalle miscele originali commerciali od industriali.

Per quanto riguarda le miscele semplici, in assenza di dati adeguati su una specifica miscela, si può utilizzare l'approccio basato sulla valutazione del rischio dei componenti della miscela, in cui i dati relativi a ciascun composto vengono combinati, spesso in modo additivo.

In assenza di informazioni adeguate sulla presenza di interazioni chimiche, la Guida dell'EPA del 2000 assume che si verifichi una situazione di "non interazione" e raccomanda l'utilizzo dei modelli di "additività di dose" o di "additività di risposta".

Il modello di "additività di dose" è suggerito per sostanze che hanno simili end points e tossicocinetica, ovvero agiscono attraverso lo stesso meccanismo d'azione (ad es. si legano allo stesso recettore) e per cui l'assenza di interazioni è assunta o dimostrata attraverso dati sperimentali.

I 3 metodi utilizzati per il calcolo dell'additività di dose sono i seguenti:

- il Fattore di Potenza Relativa: RPF (Relative Potency Factor)
- il Fattore di Equivalenza Tossica: TEF (Toxic Equivalency Factor)
- l'Indice di Pericolo: HI (Hazard Index).

Nel caso in cui i meccanismi d'azione siano conosciuti, la Guida dell'EPA raccomanda l'uso dei metodi RPF e TEF, mentre in assenza di dati meccanicistici è preferibile utilizzare l'Hazard Index.

Il metodo RPF pesa ciascun componente della miscela in base alla sua potenza relativa rispetto ad una determinata sostanza di riferimento, selezionata tra tutti i componenti della miscela, che è ben caratterizzata dal punto di vista tossicologico in quanto sono disponibili dati per la valutazione della relazione dose – risposta e che è considerata rappresentativa dei componenti della miscela.

Gli insetticidi organofosforici che agiscono attraverso l'inibizione dell'enzima acetilcolinesterasi sono considerati composti idonei per l'applicazione del metodo RPF.

Il contributo, in termini di esposizione equivalente in relazione alla sostanza di riferimento, di ciascun composto che agisce con lo stesso meccanismo d'azione viene determinato moltiplicando il livello di esposizione di ciascun composto per la sua tossicità relativa rispetto al composto di riferimento. La risposta cumulativa è quindi quantizzata usando la somma delle esposizioni equivalenti e la curva dose – risposta del composto di riferimento.

Il metodo TEF è considerato dall'EPA come una speciale applicazione del metodo RPF poiché è basato sulla presenza di dati più numerosi e di maggior certezza riguardo al meccanismo di azione.

I TEF sono stati sviluppati per gli idrocarburi aromatici clorurati, usando la 2,3,7,8 – tetraclorodibenzo-p-diossina (TCDD) come composto di riferimento. L'impatto cumulativo della miscela si ottiene moltiplicando la concentrazione di ciascuna sostanza per il suo valore di TEF.

Il metodo dell'Hazard Index (HI) assume, come il metodo RPF, che l'impatto dei composti chimici sia cumulativo e che non siano presenti interazioni.

Con questo metodo, le sostanze chimiche, per cui sono disponibili valori di dosi di riferimento (Reference Dose, RfD), vengono pesate usando come end point comune il valore di RfD.

I valori di RfD si basano sui valori di NOAELs (No Observed Adverse Effect Levels), ricavati dai test di tossicità, che includono studi in vivo di tipo subcronico e cronico ottenuti per l'end point più sensibile od effetto critico (U.S. EPA 1993).

Il contributo di ciascun componente della miscela all'HI è calcolato facendo il rapporto tra la sua concentrazione C ed il suo valore di RfD (C/RfD); tale rapporto rappresenta una potenza relativa.

Queste concentrazioni pesate sono quindi sommate a dare l'HI (Hazard Index) per l'intera miscela.

Nell'utilizzare questo approccio, l'EPA suggerisce che i dati di esposizione dovrebbero riguardare livelli relativamente bassi (vicini al NOAEL) a cui non sono attesi effetti di interazione.

Come nel caso dell'additività di dose, l'additività di risposta è un approccio di "non interazione".

La U.S. EPA suggerisce di utilizzare l' "additività di risposta" per sostanze chimiche con differenti meccanismi di azione per cui la presenza di una sostanza non influenza in alcun modo la tossicità di qualsiasi altro componente della miscela.

La principale applicazione del metodo di "additività di risposta" è limitata alla valutazione dei cancerogeni chimici. La U.S. EPA propone che le curve dose – risposta ricavate attraverso test di tossicità vengano usate per stimare il rischio di ciascuna sostanza chimica e quindi sommate a determinare un rischio cumulativo.

Il metodo dell'additività di risposta può essere applicato solo a sostanze chimiche presenti in piccole concentrazioni così che si sia in presenza di una situazione di non interazione.

Quando si applica una metodologia additiva, se tutte le sostanze chimiche presenti nella miscela non contribuiscono alla tossicità, o se avviene un'interazione antagonista, l'assunzione di additività può condurre ad una sovrastima del rischio; allo stesso modo interazioni di tipo sinergico possono risultare in una sottostima del rischio.

3.2 Metodologia di valutazione del rischio delle miscele proposta dall'ATSDR

Anche l'ATSDR ha pubblicato 2 Guide sulla valutazione tossicologica delle miscele, che includono un documento generale Guida per la valutazione delle interazioni tossiche degli agenti chimici nelle miscele (ATSDR, 2004) ed una Guida per preparare un profilo di interazione (ATSDR, 2001).

La Guida per la valutazione delle interazioni tossiche è abbastanza simile a quella dell'EPA, sebbene l'ATSDR sottolinei maggiormente l'importanza dell'utilizzo di modelli di farmacocinetica (PBPK: Physiologically Based Pharmacokinetics) e di farmacodinamica (PBPD: Physiologically Based Pharmacodynamics).

Un modello PBPK è un modello matematico che consente di predire l'assorbimento, la distribuzione, la metabolizzazione e l'escrezione di una sostanza nell'uomo od in altre specie.

I modelli PBPK permettono una descrizione tossicocinetica biologicamente accurata del modello sperimentazione animale e possono incorporare vie multiple di somministrazione (orale, inalatoria etc.), volumi di tessuto, valori di flusso e parametri di solubilità realistici per singole specie animali e per specifiche sostanze chimiche. Soprattutto i modelli PBPK incorporano le vie metaboliche mediante l'uso di parametri cinetici misurati.

Poiché una delle più importanti interazioni chimiche per le sostanze organiche consiste nell'alterazione del metabolismo, l'espressione delle vie metaboliche è critica per una predizione corretta della possibile natura dell'effetto interattivo.

La Guida del 2004 esprime una chiara preferenza per l'uso di dati relativi all'intera miscela di interesse e segue un approccio a gradini per selezionare i dati disponibili simile allo schema raccomandato dall' EPA nel 1986. Quando non sono disponibili dati sulla miscela di interesse, l'Agenzia suggerisce di utilizzare i dati relativi ad una miscela sufficientemente simile.

Si sottolinea che l'ATSDR non cita alcuno studio di validazione dei criteri seguiti per predire la somiglianza tossicologica delle miscele chimiche.

In assenza di dati sulla miscela di interesse o su una miscela sufficientemente simile, l'ATSDR suggerisce di usare le informazioni disponibili sui componenti della miscela.

L'approccio ATSDR parte dall'utilizzo del metodo HI e dalla stima del rischio di cancro usando le dosi di riferimento dell'EPA (RfDs) ed i fattori di pendenza per le sostanze cancerogene.

L'ATSDR considera improbabile che una miscela costituisca un problema significativo per la salute soltanto quando meno di 2 sostanze chimiche in una miscela superano il quoziente di pericolo di 0.1 per gli effetti non cancerogeni od un livello di rischio di 10^{-6} per quelli cancerogeni.

In aggiunta alla sua Guida per valutare le interazioni, l'ATSDR ha pubblicato un documento Guida per assistere i produttori nel preparare i profili di interazione per l'Agenzia (2001).

L'ATSDR ha sviluppato anche parecchi profili di interazione, relativi a sostanze persistenti riscontrate nel latte e nel pesce (dibenzo – p – diossine clorurate, esaclorobenzene, PBC così come alcune altre sostanze non clorurate).

3.3 Metodologia di valutazione del rischio delle miscele proposta dall'ACGIH

L'ACGIH ha sviluppato per prima nel 1963 una procedura relativa all'esposizione a miscele di sostanze chimiche, che è cambiata relativamente poco fino ad oggi; infatti l'ACGIH nel 2000 raccomanda l'approccio dell'additività di dose per la valutazione del rischio occupazionale.

Per miscele di 2 o più sostanze chimiche con stesso meccanismo d'azione ed organo bersaglio l'ACGIH raccomanda l'approccio dell'Hazard Index che prevede di sommare, per ciascuno dei componenti, i rapporti tra le concentrazioni ed i valori di TLV (Threshold Limit Value).

Se tale somma supera 1, allora si è in una situazione di pericolo per la salute.

Eccezioni all'approccio dell'Hazard Index si possono verificare quando ci sono buone ragioni per ritenere che i componenti della miscela agiscano attraverso differenti meccanismi di azione.

L'ACGIH raccomanda di valutare condizioni di sinergismo o di potenziamento caso per caso, in quanto tali interazioni sono generalmente esibite ad alte concentrazioni, mentre sono meno probabili alle basse concentrazioni tipiche degli ambienti di vita.

4. CONCLUSIONI

L'analisi critica dello stato dell'arte a livello regolatorio nella valutazione del rischio derivante dall'esposizione a miscele di sostanze chimiche ha evidenziato che sono disponibili pochi dati tossicologici sulla maggior parte delle miscele di sostanze chimiche, che la maggioranza dei dati disponibili valutano soltanto le interazioni binarie tra sostanze e che ci sono pochi studi relativi all'esposizione cronica a basse concentrazioni dei componenti delle miscele, che rappresenta la situazione più comune per le esposizioni ambientali.

Sono stati identificati i più rilevanti limiti e criticità delle sopra descritte metodologie di valutazione del rischio delle miscele, tra cui si citano:

- la necessità, per predire in modo più efficace la tossicità delle miscele, di più approfonditi studi sui meccanismi di azione a livello molecolare delle sostanze chimiche,
- lo sviluppo di modelli PBPK specifici per le miscele complesse, che possono essere utili per predire gli effetti di interazioni dose – dipendenti,
- la mancanza di un sistema di classificazione universalmente accettato dei modi/meccanismi di azione delle sostanze chimiche; si sta infatti cominciando soltanto di recente a sviluppare i criteri per la determinazione di una somiglianza meccanicistica tra sostanze,
- l'utilizzo generalizzato, per la valutazione del rischio delle miscele di sostanze, di modelli di non interazione (di additività di dose o di risposta) che non tengono conto del possibile verificarsi di interazioni,
- l'influenza dei fattori temporali di esposizione agli agenti chimici sugli effetti tossici provocati dalle sostanze e sulle interazioni tra agenti chimici,
- la non considerazione del fatto che sia i meccanismi di azione che di interazione delle sostanze chimiche sono dose – dipendenti con differenti effetti e/o interazioni possibili a differenti intervalli di dose.

Quest'ultimo è un punto particolarmente critico in quanto la maggioranza degli studi sulle miscele disponibili in letteratura sono costituiti da esperimenti condotti ad alte dosi su un numero ridotto di

componenti della miscela, mentre la maggior parte delle reali esposizioni umane ed ambientali avvengono a basse dosi ed in presenza di miscele complesse di sostanze chimiche.

BIBLIOGRAFIA

EPA/630/R-00/002: Supplementary Guidance for conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures, agosto 2000

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Guidance Manual for the Assessment of Joint Toxic Action of Chemical Mixtures, maggio 2004

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry: Guidance for the preparation of an Interaction Profiles, febbraio 2001