

Лекция 4

Экспериментальные методы обоснования ПДК

Экспериментальное исследование токсических свойств веществ с целью гигиенического регламентирования в различных средах состоит из следующих основных этапов:

- изучение острой токсичности, индивидуальной и видовой чувствительности животных при путях введения вещества, адекватных условиям воздействия. Установление основных параметров острой токсичности (LD_{50} , LC_{50}) и коэффициента видовой чувствительности (КВЧ). В тех случаях, когда вещество вызывает частичную гибель или не вызывает гибели животных, используют показатели LD_{min} или LD_0 , равные максимально достижимой дозе;
- изучение субхронической токсичности в подостром опыте с определением коэффициента кумуляции, выявлением наиболее поражаемых органов и их систем;
- изучение воздействия токсичных веществ в условиях хронического опыта, при длительном многократном поступлении вещества в организм при использовании путей поступления аналогичных таковым в реальных условиях среды. Анализ функциональных и морфологических изменений, наступающих в организме в результате хронического воздействия;
- оценка способности вещества проникать через кожу и оказывать воздействие на кожные покровы и слизистые оболочки глаз;
- установление пороговых концентраций по различным показателям при однократном воздействии вещества и адекватных путях и времени поступления в организм;
- изучение отдаленных последствий интоксикации (канцерогенного, мутагенного, тератогенного, эмбриотоксического, аллергенного и др.);
- обоснование пороговых концентраций вещества при длительном воздействии с позиции критерия вредности и разработка гигиенического норматива.

Все перечисленные исследования по установлению пороговых концентраций проводятся как минимум на двух видах животных. Каждый тест испытывается не менее чем на 12 мелких или 6 крупных животных. После применения экстремальных нагрузок животные исключаются из эксперимента. Общее минимальное количество животных, используемых в длительных экспериментах, должно быть не менее 36-48 особей (Курляндский, 2002).

Исследования состояния здоровья животных проводятся в динамике, в сроки, предусмотренные соответствующими методическими указаниями. По окончании эксперимента часть подопытных животных используется для гистологических исследований. На оставшихся животных прослеживается восстановительный период длительностью в 1—2 мес. Аналогичные требования распространяются на животных, не подвергавшихся воздействию токсичного вещества, параллельных контрольных групп.

Проведение хронического экспериментального исследования с целью обоснования гигиенического норматива имеет ряд особенностей, обусловленных техническими и экономическими причинами. Это связано с вынужденно малым числом испытываемых доз (концентраций), что позволяет оценивать полученные результаты только путем прямого сравнения средних величин показателей состояния подопытных животных с

параллельным контролем и практической невозможности построения зависимости доза — эффект. Вторым ограничивающим обстоятельством (Курляндский, 2002) является то, что большинство используемых в токсикологическом эксперименте показателей являются градуированными и степень их отклонения от параллельного контроля не отражает зависимости изменений показателя от величин испытуемых количеств. В связи с этим при планировании хронического эксперимента решающее значение приобретает:

— оптимальный выбор испытуемых количеств вещества,
— их близость к прогнозируемой величине порога хронического действия,
— выбор диапазона разрыва между ними.

При выборе испытуемых количеств вещества для хронического эксперимента основываются на анализе параметров острой токсичности, порога однократного действия (Lim_{ac}) и коэффициента кумуляции (K_{cum}). Так, в ингаляционном эксперименте испытуемые концентрации всегда не должны быть выше Lim_{ac} и разрыв между ними, как правило, не должен превышать десятикратного уменьшения каждой последующей концентрации по отношению к предыдущей.

Для веществ, обладающих кумулятивными свойствами, рекомендуется проводить испытания не менее чем 3 концентраций. В этом случае разрыв между испытуемыми концентрациями может быть уменьшен.

При внутрижелудочном введении вещества испытуемые дозы (концентрации) вещества должны быть ниже максимально переносимых, т.е. максимальных количеств вещества, не вызывающих гибели животных.

Оптимальным результатом хронического токсикологического опыта является установление пороговой (Lim_{ch}) и недействующей концентраций. Однако в условиях эксперимента при малом числе испытуемых доз (концентраций) это не всегда удается. В этих случаях рекомендуется основываться на сведениях о свойствах аналогов испытуемого токсичного вещества.

При оценке реальной опасности вещества обязательным является проведение патогенетической оценки характера и степени его токсического действия с позиций критерия вредности.

Выделяют четыре категории вредности веществ:

- способность веществ вызывать изменения генетических свойств организма, влиять на качество и количество потомства, снижать продолжительность жизни, а также стойко изменять показатели физического и умственного развития, приводящие к деградации вида;
- способность веществ влиять на состояние здоровья индивидуума, вызывать заболевания химической этиологии, в том числе патологические изменения отдельных органов и их систем;
- способность веществ вызывать напряжение систем регулирования гомеостаза, приводящее к патологическим состояниям в условиях нагрузок;
- способность веществ вызывать реакцию регуляторных систем организма, не выходящую за пределы физиологических адаптаций.

Соответствие вещества категории вредности зависит от свойств самого вещества, его количества и времени, в течение которого осуществляется воздействие.

Оценка количеств вещества с точки зрения его вредности и установление пороговых количеств в условиях экспериментов позволяет обосновать величину его гигиенического норматива.

Важную роль в этом процессе играет установление величины "коэффициента запаса" ($K_{\text{зап}}$), на которую уменьшается пороговая концентрация, полученная в хроническом опыте, и которая является отношением Lim_{ch} к ПДК. Величина коэффициента запаса варьирует в пределах от 2 до 20 и значение его увеличивается от минимального в следующих случаях:

- при наличии отдаленных последствий и специфических проявлений токсического действия; при существенных различиях в видовой чувствительности;
- с увеличением кумулятивных свойств;
- с уменьшением зоны острого действия;
- при выраженном кожно-резорбтивном действии (для веществ, находящихся в газообразном состоянии)
- с увеличением абсолютной токсичности.

Токсический эффект под действием больших доз или концентраций веществ в условиях острого или подострого воздействия проявляется гибелью животных. При действии малых количеств токсиканта в условиях хронического эксперимента оценка степени воздействия затруднена. В этом случае необходимо выявление выраженных морфологических и физиологических проявлений воздействий токсиканта.

Принято, что в опытах на животных продолжительность воздействия потенциально токсического вещества моделируется в соответствии с реальным временем воздействия данного вещества на организм человека. При этом учитываются возможности экстраполяции на человека результатов проведенных экспериментов на животных. Так, при разработке ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны опыты проводятся на мышах по 4 ч в день 5 раз в неделю на протяжении 4 месяцев. Для атмосферного воздуха населенных мест ингаляционная затравка животных осуществляется круглосуточно в течение до 4 месяцев. Для водоемов продолжительность эксперимента составляет от 3 до 6 месяцев и более в случае необходимости внутрижелудочного введения вещества.

Все предельно допустимые концентрации по способу установления являются средневзвешенными, так как их величина рассчитывается путем деления суммы всех аналитических определений вещества в исследуемой среде на число определений. При непрерывном контроле средневзвешенная концентрация устанавливается отношением измеренного количества вещества к исследованному объему.

Исключение составляют предельно допустимые максимально разовые концентрации загрязняющих веществ в атмосферном воздухе населенных мест, устанавливаемые при однократном воздействии по изменению рефлекторных реакций организма.

Среднесуточные ПДК вредных веществ в атмосферном воздухе населенных мест по способу установления и по системе контроля идентичны. ПДК вредных веществ в воздухе рабочей зоны устанавливаются по существующей методике и соответствуют среднесменным ПДК, разрабатываемым для высококумулятивных веществ. Они являются средними концентрациями, полученными при непрерывном или прерывистом

отборе проб воздуха при суммарном времени не менее 75 % продолжительности рабочей смены, или концентрациями средневзвешенными в течение длительности всей смены в зоне дыхания работающих на местах постоянного или временного их пребывания.

Аналогично обосновываются максимально разовые ПДК в воздухе рабочих помещений. Они являются по способу установления для большинства веществ средневзвешенными и среднесменными величинами.

ПДК вредных веществ в воде водоемов также устанавливаются на основе общих принципов токсикометрии при длительном внутрижелудочном поступлении вещества в организм животных с водой и оценке по общетоксическому (санитарно-токсикологическому) лимитирующему показателю вредности.

Расчетные методы определения токсикологических характеристик

В ряде случаев токсикологические характеристики могут быть определены расчетным путем, например, временно допустимые концентрации (ВДК) пестицидов в продуктах питания. Однако необходимо учитывать, что расчетные методы определения ВДК и других санитарно-гигиенических нормативов токсичных соединений дают достоверные результаты только в тех случаях, когда уравнения для их расчетов основаны на токсикометрических и физиологических параметрах и нормативных величинах из смежных областей гигиены, которые, в свою очередь, были установлены по результатам экспериментальных исследований. Экспериментальное определение токсичности в отдельных случаях подтверждает или уточняет расчетные данные. Так, отнесение опасных отходов к классу опасности для окружающей среды проводится расчетным и экспериментальным методом. Экспериментальный метод используется в тех случаях, когда необходимо подтвердить отнесение отходов к 5-му классу опасности, установленному расчетным методом, при уточнении класса опасности отходов, полученного расчетным методом.

Для расчета **временно допустимых концентраций** (ВДК_{пр}, мг/кг) пестицидов в продуктах питания Каган, Сасинович и Овсеенко (1971) предложили формулу:

$$\text{ВДК}_{\text{пр}} = 0,13 \cdot 10^{-2} \cdot \text{ЛД}_{50} + 76.$$

Щицкова, Елизарова и др. (1973) рекомендовали рассчитывать ВДК_{пр} для пестицидов различных классов по их предельно допустимым концентрациям, регламентированным для воды природных водоемов (ПДК_в).

Для фосфорорганических пестицидов была предложена формула:

$$\text{ВДК}_{\text{пр}} = 1,45\text{ПДК}_{\text{в}} + 0,68 ,$$

а для хлорорганических:

$$\text{ВДК}_{\text{пр}} = 2,2\text{ПДК}_{\text{в}} + 0,33.$$

Строгое соблюдение величин ПДК и ВДК в отдельных компонентах биосферы и продуктах питания еще не является гарантией сохранения здоровья людей и обеспечения чистоты окружающей среды. В последние годы ПДК многих химических соединений

неоднократно пересматривались и в подавляющем большинстве случаев — в сторону их уменьшения. Кроме того, известно, что многие живые организмы и растения значительно чувствительнее к загрязняющим веществам, чем люди. Поэтому в будущем нормативы содержания химических соединений в окружающей среде должны устанавливаться не только с санитарно-гигиенических, но с экологических позиций, что неизбежно приведет к дальнейшему снижению величин ПДК и ВДК.

Воспроизведение в эксперименте на животных процессов взаимодействия химического вещества и организма составляет сегодня методическую основу большинства токсикологических исследований.

Несмотря на то, что этические, материальные и другие актуальные проблемы обязывают ставить вопрос об исключении теплокровных животных из токсикологических экспериментов, их замене альтернативными моделями, опыты на теплокровных животных в настоящее время являются преобладающими при оценке токсичности и опасности веществ.

В качестве подопытных животных в токсикологических исследованиях используются преимущественно грызуны: кролики, морские свинки, белые крысы, мыши. Значительно реже используются собаки и кошки.

Наиболее массово токсикологические эксперименты проводятся на беспородных животных, белых крысах и мышах. Они устойчивы к заболеваниям и удобны с точки зрения представительности исследуемых функций и показателей. Из всех видов животных мыши наиболее изучены и на мышах разработано большое количество моделей, адекватных различным состояниям человека. Эти модели позволяют изучать аспекты развития реакции на различные токсиканты.

В тех случаях, когда возникает необходимость изучения влияния химических веществ на специфические функции, преимущественно свойственные отдельным видам или породам животных, используют так называемых линейных животных, получаемых в результате близкородственного разведения (инбридинга).

Беременность мышей продолжается 19—21 день; от одной мыши может быть получено до 10—12 новорожденных; уже через 2—3 мес. детеныши становятся половозрелыми и могут сами давать потомство. При дальнейшем повторяющемся скрещивании между сестрами и братьями через 20 генераций в генотипе животных наблюдается 98% гомозиготных аллелей.

Таких животных называют сингенными. В настоящее время известно более 150 генетически чистых (инбредных) линий мышей, которые различаются по своим свойствам.

За рубежом наиболее известна лаборатория Jackson (Bar Harbor, USA), занимающаяся получением инбредных линий животных. В нашей стране животные поставляются из питомников РАН и РАМН. Кроме мышей получены также чистые линии крыс, морских свинок, кроликов, хомяков, домашних птиц и собак. Эти экспериментальные животные модели дают возможность изучать ответ в отсутствие варибельности генов главного комплекса гистосовместимости, которая наблюдается у обычных животных и человека. Только используя инбредные линии можно осуществлять пересадку клеток и тканей от одного животного данной линии к другому.

Такие животные могут быть низкоракowymi или высокоракowymi, низколейкемическими или высоколейкемическими и т.д.

Из линейных животных для проведения массового токсикологического эксперимента наиболее пригодна линия крыс "Вистар" стадного разведения. Морские свинки являются оптимальным объектом для изучения аллергических реакций и кожных эффектов, в том числе и резорбции ядов через кожу. Для аналогичных целей широко используются кролики, особенно при изучении кожного и кожно-резорбтивного действия, а также влияния веществ на слизистую оболочку глаз и роговицу. Крольчихи являются хорошим объектом для изучения функции яичников. Кролики представляют прекрасную модель для изучения безусловнорефлекторной деятельности.

Собаки и кошки довольно редко используются в токсикологии. Вместе с тем описано значительное число исследований на собаках по изучению влияния химических веществ на пищеварение, центральную и вегетативную нервную систему, а также на кошках по изучению биоэлектрической активности головного мозга.

Токсикологические исследования на биологических моделях в профилактической токсикологии занимают ведущее место и проводятся в следующих целях:

- установление основных параметров токсичности веществ при остром, подостром и хроническом воздействии (LD_{50} , LC_{50} , K_{cum} , Lim_{ac} , Lim_{ch} и др.) при адекватных реальным условиям путях поступления в организм;
- выявление преимущественно поражаемых органов и систем при различных условиях, путях и времени воздействия, изучение патогенеза интоксикации;
- изучение механизма действия вещества и его превращений в организме;
- изучение способности вещества вызывать отдаленные последствия интоксикации и воздействовать на наследственные свойства;
- оценка полученных результатов исследований с позиций "критерия вредности", обоснование показателей опасности и допустимых количеств вредных веществ, а также пределов риска;
- разработка методов специфической и неспецифической профилактики и терапии отравлений.

Экологическая токсикология – это раздел токсикологии, изучающий токсические эффекты, возникающие в результате действия химических веществ на живые организмы, популяции и биоценозы, входящие в состав экосистем. Она изучает функционирование и устойчивость биологических систем в условиях токсического загрязнения.

Выделяется **биогеоэкологическая токсикология** – раздел биогеоэкологической патологии, занимающийся изучением массовых заболеваний, возникающих у организмов вследствие неблагоприятных изменений в биогеоценозах и их составных компонентах: популяциях, биоценозах, почве, воде, воздухе и т.д.

При изучении токсических эффектов на популяционном и биоэкологическом уровнях возрастает значение компонентов окружающей среды в биотрансформации веществ-токсикантов. Действие токсикантов может быть самым разнообразным: увеличение хромосомных нарушений и мутаций, изменение ферментативной активности отдельных систем организма, снижение репродуктивной функции и продолжительности

жизни, изменение половой и возрастной структур популяций, соотношения видов, смены доминирующих форм и т.д. Для организмов, находящихся на высоких уровнях цепей питания, вред токсикантов, например пестицидов, нередко связан не столько с действием на сами организмы, сколько на их потомство. Так, известно, что рыбацкие виды белоголовый орлан и скопа вымирали в США потому, что родители не могли высиживать птенцов из-за того, что яйца разбивались в гнезде вследствие слабой скорлупы, обусловливаемой нарушением кальциевого обмена под воздействием ДДТ.

Особые проблемы экологической токсикологии связаны с воздействием радиации на экосистемы. Так, в северо-восточной части Черного моря, между гг. Туапсе и Новороссийском, сформировался огромный участок морского дна с резким повышенным содержанием цезия-147 и стронция-90. Такие выводы сделали ученые после завершения специальной экспедиции научно-исследовательского судна «Спасатель Прокопчик» и окончания работ в российском секторе Черноморского бассейна (Известия, от 22.12.98г.). Специалисты МЧС России рассчитывали обнаружить в придонных отложениях повышенное содержание радионуклидов: предыдущие экспедиции ясно указывали, что выпадение из атмосферы продуктов аварийного выброса 1986 года на Чернобыльской АЭС не прошло бесследно для экологии прибрежной полосы. Однако никто не мог даже предположить, что источники

γ -излучения будут найдены на глубине не только 50 метров, но даже полутора километров, а их содержание превысит допустимую норму в десятки раз.

Другим аспектом этой же проблемы является то, что территория, на которой невозможно проживание человека из-за радиационного загрязнения, становится привлекательной для диких животных. Так в Полесском экологическом радиационном заповеднике радиация создала уникальные условия спокойствия. После ухода человека с этой территории на нее вернулись такие животные, которые исчезли из этих лесов десятки лет назад, например, появились зубры, черные аисты, рысь, орланы-белохвосты. Возросла численность таких животных, как дикие кабаны, олени, лоси, косули. Однажды, к удивлению зоологов, выползли на сушу сотни редчайших болотных черепах (Усманов, 2001). Мигрирующие птицы и звери разносят радиацию по всему миру.

В зависимости от характера действия экотоксикантов на экосистемы и их особенностей диагностики проводится подбор таких методов исследования, использование которых позволяет обеспечить оценку энзоотии (или эпизоотии) на разных уровнях организации: организменном; популяционном; биогеоценологическом.

Биогеоценологическая диагностика энзоотии проводится в определенной последовательности:

- а) сбор анамнеза и анализ анамнестических данных;
- б) объективная оценка больных животных (трупов), популяций (стад), биогеоценозов;
- в) методы клинической диагностики и патоморфологии;
- г) оценка надорганизменных систем (популяций, биогеоценозов);
- д) методы популяционной экологии;
- е) методы биоценологии;
- ж) картографический метод и др.

На заключительном этапе проводится системно-экологический анализ полученных данных и постановка биогеоценологического диагноза. Биогеоценологический диагноз и прогноз - основа для разработки экологически обоснованных лечебно-профилактических мероприятий. К диагностической и профилактической работе привлекаются различные специалисты.

Популяция — надорганизменная система, представляющая собой группировку организмов определенного вида. Ее основное биологическое предназначение — поддержание жизнедеятельности вида в течение неограниченно долгого времени.

Благоприятные условия среды способствуют повышению воспроизводительной функции популяции, что увеличивает численность и процветание вида. Одним из важных показателей популяции является ее плотность. При переуплотнении популяций возникают условия для возникновения массовых заболеваний, особенно, при загрязнении окружающей природной среды.

Необходимо осуществлять эколого-генетический контроль за ходом воспроизводства популяций, проводить работу по регуляции процессов, протекающих в пастбищных и ферменных биогеоценозах, по охране среды от загрязнения химическими веществами, обладающими гонадотоксическим, тератогенным и мутагенным действием.

Термин **биогеоценоз** (био — жизнь, гео — земля, ценоз — общество) был предложен в 1940 г. В.И.Сукачевым. Наряду с термином биогеоценоз существует термин **экологическая система** (экосистема), предложенный А.Тенсли в 1935г. Эти термины отражают общие понятия.

Биогеоценоз — система, поскольку его компоненты взаимосвязаны. Он состоит из четырех взаимодействующих категорий:

- **Компоненты неживой (косной) природы** — атмосфера, вода, материнская порода, минеральная часть почвы и ила.
- **Продуценты** (производители) — организмы, осуществляющие процесс новообразования органических веществ из простых неорганических соединений (высшие и низшие зеленые растения, серобактерии и нитрифицирующие бактерии — хемосинтетики).
- **Консументы** (потребители) — организмы, потребляющие готовое органическое вещество фотосинтетического, хемосинтетического происхождения и переводящие его в другие формы (животные и паразитирующие растения).
- **Редуценты** (разрушители, разлагатели) — организмы, разлагающие сложные органические вещества растительного происхождения (грибы и микроорганизмы).

Живые и неживые компоненты биогеоценоза функционально взаимосвязаны между собой и образуют единую целостную биокосную систему. Используя солнечную энергию, растительные организмы они синтезируют органические вещества своих тел из углекислого газа, минеральных солей и воды.

Различают биогеоценозы природные и антропогенные.

Отличительной чертой природных биогеоценозов является их относительная устойчивость. Считают, что в природных биогеоценозах массовых заболеваний растений (**эпифитотий**) и животных (**эпизоотий**) обычно не бывает. Устанавливается баланс между численностью популяции и запасами корма. Это позволяет популяции выжить в экстремальных условиях, что необходимо для сохранения вида.

На большой территории нашей планеты созданы агробиогенозы — поля, сады и огороды, культурные пастбища. Это природные комплексы с господством популяций одного или небольшого числа видов растений.

Человеком созданы искусственные биогенозы с господством одного или нескольких видов животных — животноводческие фермы и комплексы. Они пространственно друг от друга отделены, но их автономия относительная.

Сельскохозяйственная деятельность человека направлена на поддержание искусственных биогенозов. Однако эта деятельность, проводимая без всестороннего учета экологических законов, может иметь непредвиденные негативные последствия. Так, в результате неблагоприятных изменений биогенозов появились нежелательные виды растений и животных, сорняки, паразиты и т.д.

Если в биогенозе присутствуют ксенобиотики, то возможны отравления. Энзоотики могут возникать в результате патогенного действия низших, высших растений и ядов (микрофлора, ядовитые травы и ксенобиотики) или животных (гельминты, насекомые, ядовитые змеи, клещи, моллюски). В.Н.Ягодинский вспышки очагов эндемического энцефалита связывает с циклическим увеличением численности популяций белок и их миграцией (белки — основные прокормители нимф лесного клеща).

Нерациональное внесение минеральных удобрений, использование пестицидов, а также попадание других ксенобиотиков в почву может стать причиной отравления.

При диагностике и профилактике массовых болезней необходимо оценивать биогенозы и учитывать изменения их структуры под влиянием процессов, протекающих в смежных природных комплексах, ландшафтах, биосфере. К.А.Дорофеев отмечает, что вспышки ящура у животных наблюдаются в годы спокойного солнца.

Повышенное содержание токсикантов в окружающей среде приводит к их накоплению в почве, а затем в различных организмах, включенных в пищевые цепи и сети.

При оценке природных комплексов, особенно большого размера, используются данные экологического мониторинга.

Основные задачи мониторинга следующие:

- наблюдение за текущим состоянием природной среды в целях выявления антропогенных изменений;
- оценка этого состояния и интенсивности воздействия факторов антропогенного происхождения; прогноз изменений состояния природной среды под влиянием антропогенных воздействий.