



УДК 615.9:632.95:612.6:591.16

ПИЩЕВЫЕ КОНТАМИНАНТЫ: МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ИХ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ

Н.Р. Шепельская, доктор мед. наук

ГП «Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности имени академика Л.И. Медведя Министерства здравоохранения Украины», г. Киев

Резюме. У статті викладено дискусійний погляд автора щодо пріоритетності в Україні методологічних підходів при дослідженні репродуктивної токсичності. Детально аналізуються, критично оцінюються та порівнюються засоби по вивченню токсичності пестицидів та інших харчових контамінантів, що використовуються в нашій країні і за кордоном. Виходячи з аналізу результатів масштабних експертно-аналітичних досліджень, доведено високу чутливість та надійність тест-системи, що використовується для вивчення репродуктивної токсичності в Україні.

Ключові слова: харчові контамінанти, харчові добавки, пестициди, репродуктивна токсичність, методологічні підходи.

Резюме. В статье изложен дискуссионный взгляд автора в отношении приоритетных в Украине методологических подходов при исследовании репродуктивной токсичности. Детально анализируются, критически оцениваются и сравниваются подходы к изучению токсичности пестицидов и других пищевых контаминантов, используемые в нашей стране и за рубежом. На основании анализа результатов масштабных экспертно-аналитических исследований показана высокая чувствительность и надежность тест-системы, используемой для изучения репродуктивной токсичности пестицидов и других ксенобиотиков в Украине.

Ключевые слова: пищевые контаминанты, пищевые добавки, пестициды, репродуктивная токсичность, методологические подходы.

Summary. The article shows author's discussable view on the reproductive toxicology research methodological approach priority. In the article the methodological approaches to the study pesticides and other food contaminants reproductive toxicity used in Ukraine and abroad are analyzed, critically evaluated and compared. Based on the analysis of the results of large-scale expert-analytical studies a higher sensitivity and reliability of the foreign test system used for the reproductive toxicity study in our country have been shown.

Key words: food contaminations, pesticide, reproductive toxicology, methodological approaches.

Основной задачей превентивной токсикологии является предупреждение вредного воздействия ксенобиотиков, поступающих в организм человека из различных объектов окружающей среды. Такими объектами могут служить продукты питания, пищевые добавки и вода, загрязненные остаточными количествами химических средств защиты растений. Решение этой проблемы сводится к минимизации загрязнения продуктов и пищевых добавок пестицидами, а также к оценке риска их применения, которая невозможна без адекватной и надежной идентификации опасности тестируемых соединений. Идентификация опасности репродуктивной токсичности пестицидов и других химических веществ является одной из актуальнейших в процессе оценки риска их применения. В этой связи методология исследования репродуктивной токсичности представляется детерми-

нирующим фактором в получении релевантных данных.

В настоящее время существует достаточно большое разнообразие схем и методов изучения нарушений функции воспроизведения. В зависимости от целей и задач структура постановки опыта может существенно изменяться. В данном сообщении основное внимание будет уделено методологии идентификации нежелательных изменений в репродуктивном процессе под влиянием ксенобиотиков.

Понятие репродуктивная токсичность химических веществ в контексте идентификации их опасности для репродуктивной системы предполагает способность тестируемых соединений индуцировать как нарушение функции размножения у взрослых животных, так и патологию развития у потомства. Однако следует отметить, что в силу

ряда причин изучение патогенетических изменений в процессе эмбриогенеза выносятся за рамки всех остальных исследований по оценке репродуктивной токсичности и методологически кардинально от них отличается.

В данном сообщении нам бы хотелось провести параллель между методологией изучения репродуктивной токсичности в нашей стране и за рубежом, а также дать сравнительную оценку чувствительности и диагностической ценности упомянутых подходов.

Репродуктивная токсичность пестицидов как научная проблема возникла в середине 50-х годов, когда сформировалось понимание необходимости разработки методических подходов для изучения возможных нарушений репродуктивной функции под влиянием ксенобиотиков, поступающих в организм человека с пищей, водой, воздухом в течение всей его жизни.

За рубежом поиски и разработка методических подходов оформились в методологическом тесте "Three Generation Reproductive Study" [1]. Согласно предложенной схеме эксперимента тестирование химических соединений предусматривало исследование репродуктивной функции как минимум трех поколений и 9 пометов. Несмотря на то, что в течение десятилетия этот методический подход использовался всеми ведущими зарубежными научными центрами мира, проблема оптимизации схемы эксперимента оставалась предметом широкой научной дискуссии.

В декабре 1969 года USA FDA подготовил новый программный документ, посвященный исследованиям репродуктивной функции при оценке безопасности пищевых добавок и пестицидов [2]. Перед группой экспертов была поставлена задача пересмотра требований к указанным исследованиям, а также анализ адекватности используемых в то время методов.

Первоначально в основу уже используемой тест-системы 3-х поколений животных была заложена схема исследований, которая позволяла бы получить такую информацию:

- 1) действие на плодовитость самцов и самок;
- 2) действие в течение беременности на мать;
- 3) действие в течение беременности на плод;
- 4) постнатальные эффекты на мать (например — состояние лактации);
- 5) постнатальные эффекты на потомство;
- 6) мутагенные эффекты.

Однако в процессе накопления информации стало очевидным, что рассматриваемая тест-система не может считаться адекватной для оценки потенциальной тератогенной и мутагенной активности ксенобиотиков [2].

В первую очередь потому, что задача доказательства отсутствия риска мутагенного действия на соматические клетки является качественно

отличной и намного более сложной, чем выполнение и оценка других токсикологических тестов, включая репродуктивные. По данным ряда авторов, наиболее достоверные и убедительные тесты для выявления химического мутагенеза у млекопитающих требуют приблизительно 0,5 миллиона животных или более (в зависимости от деталей теста) для того, чтобы определить удвоение мутационного коэффициента. Не выдерживает критики также и предложение о том, чтобы в рамках тест-системы нескольких генераций животных одному поколению или одной группе родительских животных была предоставлена возможность непрерывного размножения (5, 6 или более пометов) с целью достижения в конце концов значимого мутагенного эффекта, поскольку увеличение мутационного фона или генетическая поломка не могут быть выявлены на одном поколении.

Что касается тератогенности, то и в этом случае задача получения достоверных данных в рассматриваемой тест-системе представляет ряд проблем. Известно, что хроническое или многократное введение химических веществ изменяет способность животных к их метаболизму. Скорость метаболизма может быть как увеличена, так и замедлена в зависимости от того, происходит индукция ферментов метаболизма в печени или их депрессия. В любом случае хроническое воздействие вызывает изменение метаболической реакции по сравнению с краткосрочным или острым воздействием. В связи с этим возникает риск получения ложноотрицательного тератогенного эффекта в тесте нескольких поколений (предусматривающем длительное воздействие тестируемого соединения) в то время как он может быть потенциально возможен при краткосрочном или остром воздействии.

Указанное обстоятельство послужило основанием для рекомендации дополнительного отдельного изучения показателей мутагенной и тератогенной активности в специальных тест-системах за рамками рассматриваемого эксперимента.

Большое внимание в этом документе было уделено вопросу о необходимом количестве исследуемых поколений животных. В связи с неподтвержденными впоследствии данными о возможном возникновении нарушений лишь в третьем или даже в четвертом поколении при отсутствии их в первой генерации, около десяти лет обновленная схема "Three Generation Reproductive Study" оставалась господствующей в мире. Хотя количество пометов в 1969 году сочли целесообразным сократить до шести. И лишь в 1982 году после оценки ряда опровергающих публикаций вопрос о количестве исследуемых генераций был пересмотрен. В результате была предложена тест-система изучения репродуктивной токсичности пестицидов на 2-х поколениях животных и 4-х пометах [3].

Однако оптимизация схемы эксперимента по-прежнему оставалась актуальной, что привело в конечном итоге к тому, что в настоящее время родительским поколением для второй генерации служит F_{1a} помет, а не F_{1b} и количество изучаемых пометов практически во всех случаях сведено к одному в каждом поколении.

Основное внимание в исследованиях на нескольких поколениях животных уделяется оценке качественных и количественных показателей, характеризующих способность к размножению у родительских особей, а также процессы развития потомства. Наряду с указанными тестами большой объем занимают гистоморфологические исследования тканей внутренних органов взрослых животных и потомства.

Причем необходимо подчеркнуть, что процессы функционирования гонад достаточно долгое время вообще не оценивались. И только к концу 90-х годов пришло понимание того, что в тест-системе нескольких поколений животных из поля зрения исследователей выпадают важнейшие параметры состояния репродуктивной системы. А именно: непосредственные показатели функционирования гонад как самок, так и самцов.

В 1996 году была опубликована статья группы экспертов из США [4], которая начиналась словами: «До последнего времени способность соединений индуцировать повреждения мужской репродуктивной системы оценивалась на основании изучения фертильности в эксперименте на крысах или на мышах. Однако в настоящее время обнаружено, что фертильность у грызунов **не самый чувствительный и надежный показатель** возможных нарушений. Поскольку по сравнению с грызунами, продуцирующими избыточное количество спермы, необходимое для нормальной плодовитости, у человека продукция спермы значительно слабее. В этой связи возникла необходимость пересмотра протокола исследований с целью включения в него оценки количественных и качественных параметров спермы». Пересмотр был осуществлен в 1998 году [5]. Т.е. до этого репродуктивная токсичность оценивалась с помощью не самых чувствительных и надежных показателей.

Таким образом, очевидно, что оптимизация изучения репродуктивной токсичности пестицидов в тест-системе нескольких поколений животных сводилась к постепенному сокращению количества генераций и пометов и к осознанию необходимости изучения состояния гонад. Эта тенденция сохраняется и в наши дни.

В настоящее время для скрининговой оценки опасности репродуктивной токсичности пестицидов обязательной считается тест-система 2-х поколений животных (как правило, крыс). В протокол обязательных исследований включены также некоторые параметры спермы у самцов и эстраль-

ные циклы у самок. Однако, на наш взгляд, диагностический потенциал такого ценнейшего показателя репродуктивной системы у самок, как состояние эстрального цикла, используется далеко не полностью. В зарубежных исследованиях репродуктивной токсичности фирм изготовителей пестицидов представлены только длительность цикла и их количество. Совершенно не исследуются отдельные фазы цикла, их продолжительность и регулярность.

А ведь изменения гормонального статуса у самок, сопровождающиеся нарушением регулярности и чередования фаз полового цикла, независимо от механизма их происхождения, характеризуются нарушением баланса эстрогенов и прогестеронов. Генетическая близость структуры эстральных циклов у грызунов и менструальных у приматов (включая человека) обусловлена отсутствием видовой специфичности гормонов, что позволяет использовать столь простой и доступный метод для идентификации эндокринных деструкторов и экстраполировать на человека данные, полученные в экспериментах на самках грызунов.

Теперь мы бы хотели перейти к методологии изучения репродуктивной токсичности пестицидов, существующей в нашей стране. В Советском Союзе первые «Методические указания по гигиенической и токсикологической оценке новых ядохимикатов, предложенных для внедрения в сельское хозяйство» были утверждены Главным Государственным санитарным инспектором СССР в 1957 году. Этими указаниями свыше 10 лет руководствовались исследователи при выполнении заданий Минздрава СССР по гигиенической оценке новых пестицидных препаратов.

Здесь уместно будет напомнить, что под руководством выдающегося украинского ученого Льва Ивановича Медведя в 1964 году в Киеве был основан Всесоюзный научно-исследовательский институт гигиены и токсикологии пестицидов, полимеров и пластических масс. Он стал первым в мире научным центром, призванным разрабатывать научную стратегию и тактику предупреждения возможных отрицательных эффектов химических соединений на население.

И уже в 1969 году были разработаны и утверждены следующие «Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов» [6].

В новых методических указаниях, в отличие от первых, были предусмотрены также методологические подходы к исследованию отдаленных последствий действия тестируемых соединений.

В разработке методологии изучения репродуктивной токсичности пестицидов принимали участие ведущие ученые нашей страны. И в отличие от исследований на нескольких поколениях животных в нашей стране был разработан совершенно

другой подход к изучению репродуктивной токсичности пестицидов.

Принимая во внимание тот факт, что гонады, вспомогательные репродуктивные железы и нейроэндокринная система проявляют особую чувствительность к воздействию токсичных химических веществ, а также половые различия в чувствительности к токсичным факторам, основное внимание было сосредоточено на изучении гонадотоксической активности химических соединений и индуцированные ими возможные нарушения функции воспроизведения потомства у самок и самцов экспериментальных животных.

При изучении гонадотоксического эффекта воздействию подвергаются самки и самцы экспериментальных животных до спаривания, которые затем спариваются с интактными самками и самцами. Воздействие изучаемого агента на эмбриогенез в данном эксперименте исключается. Обнаруженные в процессе этих исследований нарушения развития потомства или репродуктивной функции четко увязываются с воздействием на предзародышевую стадию гаметогенеза, половые железы и другие репродуктивные органы.

Планирование эксперимента предусматривает получение информации о функции гонад, сексуальном поведении животных, способности к спариванию, зачатию, оплодотворению и плодовитости. Определяются также показатели пренатального развития потомства.

Изменения здесь могут проявляться замедлением или прекращением продукции герминативных клеток, образованием дефективных клеток со сниженной плодовитостью или оплодотворяющей способностью, производством клеток, несущих наследственные изменения в их генетическом аппарате или нарушение способности к нормальному развитию оплодотворенного яйца.

Необходимо при этом принимать во внимание, что токсическое действие на различные звенья процесса воспроизводства может осуществляться непосредственно воздействием на гонады и другие репродуктивные органы или в результате влияния на систему гипоталамус-гипофиз-гонады.

Все эти показатели оцениваются как с помощью специальных морфо-функциональных тестов, так и посредством изучения результатов процесса воспроизведения потомства.

К преимуществам указанной тест-системы следует отнести ее информативность, высокую чувствительность, возможность идентификации органа-мишени и половой избирательности к воздействию тестируемого соединения, а также, что немаловажно, относительно высокую экономическую эффективность.

Естественным продолжением изучения гонадотоксической активности тестируемых соединений по замыслу авторов разработанной методологии

служили исследования эмбриотоксической и тератогенной активности, схема постановки экспериментов которых также отличалась от принятой за рубежом. В отличие от зарубежной методологии, предусматривающей воздействие на плод только в период активного органогенеза (у крыс это период с 6 по 15 дни беременности), в соответствии с нашими методическими указаниями воздействие осуществлялось еще и в течение всей беременности.

Нелишним будет отметить, что в настоящее время, начиная с 2000 года, за рубежом в экспериментах по тератогенности, воздействие осуществляется с момента имплантации также в течение всей беременности.

Естественно, что вопрос о сравнительной диагностической ценности и чувствительности двух рассмотренных методологических подходов не мог оставаться без внимания.

Благоприятным фактором для его решения явилось то обстоятельство, что все исследования по изучению гонадотоксической активности пестицидов проводились и проводятся в нашем институте как в Советском Союзе, так и теперь в независимой Украине. Аналогично и экспертно-аналитические исследования экспериментальных данных о репродуктивной токсичности на поколениях активных ингредиентов всех пестицидных препаратов, предлагаемых для регистрации в Украине, осуществляются у нас.

Располагая столь ценной и обширной базой данных и проведя ряд соответствующих исследований, нам удалось выяснить следующее.

Результаты собственных экспериментальных исследований по изучению гонадотоксичности пестицидов показали, что

1. 65 % изученных пестицидов в той или иной дозе обладают гонадотоксическим эффектом. Из них 29 % способны избирательно вызывать отклонения в репродуктивной функции.
2. Среди пестицидов, обнаруживающих гонадотоксический эффект, 15% избирательно влияют на самок, 35% — на самцов и 50 % в одинаковой степени индуцируют гонадотоксический эффект и у самок, и у самцов.
3. Результаты исследований свидетельствуют о том, что индуцируемые в эксперименте изменения могут проявиться на любом этапе пренатальной стадии онтогенеза, в том числе и предзародышевой. Как правило, избирательное гонадотоксическое действие пестицидов проявляется отклонениями в морфофункциональном состоянии гонад и процессах гаметогенеза у самцов и изменением гормонального баланса у самок, которые коррелируют с нарушением развития зародышей (эмбриолетальное действие). Характер указанных изменений позволяет предположить эндокринный меха-

низм их возникновения, т.е. отнести изученные пестициды к эндокринным деструкторам.

5. Корреляционный анализ связи между выраженностью гонадотоксического действия и острой системной токсичностью пестицидов показал, что среди препаратов, оказавших токсическое влияние на репродуктивную функцию, большая часть принадлежит к 4 классу по острой системной токсичности. Т.е. среди пестицидов, особо опасных для репродуктивной функции (избирательно действующих на репродуктивную функцию и отнесенных к 1 и 2 классу опасности по репродуктивной токсичности), больше малотоксичных соединений, чем высокотоксичных.

Проведенные нами экспертно-аналитические исследования экспериментальных данных о репродуктивной токсичности, осуществленные за рубежом в тест-системе нескольких поколений животных, показали следующее.

1. 67 % пестицидов относятся к веществам, способным оказывать вредное воздействие на функцию размножения.
2. Среди всех пестицидов, подвергавшихся исследованию в тест-системе нескольких поколений животных, около 9 % обладают избирательным токсическим действием на функцию размножения.
3. Избирательное действие пестицидов на функцию размножения не зависит от токсичности препаратов. Вероятность обнаружения соединений, обладающих избирательной репродуктивной токсичностью, находится примерно на одном уровне для препаратов 1–3 класса опасности по острой системной токсичности.

Анализ спектра обнаруженных повреждений позволил сделать следующее заключение: среди пестицидов, обладающих избирательным токсическим потенциалом для функции размножения, преобладают вещества (80 %), индуцирующие на уровне минимально действующих доз нарушения репродуктивной системы у родительских поколений. К этим нарушениям можно отнести изменения морфологического состояния половых желез, гормональные отклонения (бифентрин, винклозолин, фентин-гидроксид, карбарил, карбендазим, процимидон, ципроконазол), а также снижение плодовитости и способности к спариванию, зачатую и оплодотворению (диметоат, фенвалерат, карбарил, фенаримол).

20 % из рассмотренных действующих веществ способны избирательно индуцировать нарушение развития потомства. Последнее включает в себя такие эффекты, как повышение внутриутробной гибели плодов (пиридофентион, изоксафлютол, каптан, фенпропатрин), а также задержка развития и повышенная смертность в раннем постнатальном периоде (2,4-ДМ кислота, малатион, фуберидазол). При этом следует учесть, что состояние

функции гонад в этих экспериментах не изучалось, хотя гипотетически нарушения их функции с большой долей вероятности присутствовали.

Качественная характеристика обнаруженных нарушений, а также исследования механизма токсического действия некоторых из указанных пестицидов свидетельствуют о том, что большинство перечисленных соединений можно отнести к так называемым “endocrine disrupting chemicals”.

Совершенно иное распределение наблюдается среди препаратов 3 класса опасности по репродуктивной токсичности, т.е. не обладающих избирательным действием на функцию размножения. Репродуктивная токсичность названных препаратов проявляется значительно чаще влиянием на пре- и постнатальное развитие потомства. Установленный факт можно объяснить вторичностью наблюдаемых изменений, т.е. тем, что их репродуктивная токсичность обусловлена общетоксическим, неспецифическим действием и является одним из проявлений последнего. В то время как избирательный эффект на репродуктивную функцию является явно специфическим, отличающимся по механизму реализации от общетоксического и с одинаковой частотой встречающимся среди пестицидов с различной степенью острой токсичности.

Таким образом, как видно из представленных данных, если принять в качестве показателя чувствительности тест-системы процент выявляемых с ее помощью пестицидов избирательного действия на репродуктивную систему, то преимущество принадлежит тест-системе по изучению гонадотоксической активности (29 % при изучении гонадотоксичности против 9 % при изучении репродуктивной токсичности на поколениях).

Объяснение этому можно найти не только в большей гонадотоксической активности химических соединений при введении зондом по сравнению с таковой при поступлении ксенобиотиков с пищей [7–12], но и в качественном различии критериев оценки наблюдаемых эффектов. Чем уже спектр учитываемых показателей, тем выше минимальный действующий уровень испытуемого вещества. Как мы имели возможность убедиться, при изучении пестицидов в тест-системе нескольких поколений животных более уязвимыми оказываются показатели состояния репродуктивной системы родительских поколений. В то же время в этих исследованиях не было предусмотрено изучение функциональных изменений половых желез и герминативных клеток, которое является обязательным при изучении гонадотоксического действия. При таком подходе изменения, индуцированные на какой-либо стадии репродуктивного процесса, но не приведшие к нарушению конечного результата (фертильности животных), в этой тест-системе просто не идентифицируются.

В заключение хотелось бы отметить, что в ноябре 2011 года появился Draft Guidance Document 151 OECD по расширению исследований репродуктивной токсичности в тест-системе одного поколения животных, в котором предусматривается значительное расширение исследований репродуктивных параметров у родительских поколений, в том числе морфофункциональ-

ных показателей состояния гонад и вспомогательных половых желез, а также эндокринных нарушений. Не исключено, что вскоре методология исследования репродуктивной токсичности пестицидов в ЕС будет оптимизирована до одного поколения животных и, таким образом, вплотную приблизится к методологическому подходу, существующему в нашей стране.

ЛИТЕРАТУРА

1. Procedures for the testing of intentional food additives to establish their safety for use : second report of the Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives. –WHO, 1958. –WHO Technical Report Series №144, FAO nutrition meetings report series № 17. –19 p.
2. Food and Drug Administration. Advisory Committee on Protocols for Safety Evaluations: Panel on Reproduction Report on Reproduction Studies in the Safety Evaluation of Food Additives and Pesticide Residues / L. Friedman, C. M. Kunin, N. Nelson [et al.] // Toxicol. and Appl. Pharmacol. –1970. –Vol. 16, № 1. –P. 264–296.
3. Health effects test guidelines and support documents. EPA–560/6–82–001. PB82-232984 –Washington: U.S. Environmental Protection Agency, 1982
4. Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit and Dog: a Consensus Report / J. Seed , R.E. Chapin , E.D. Clegg [et al.] // Reproductive Toxicology. –1996. –Vol. 10, № 3. –P. 237–244.
5. Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.3800. Reproduction and Fertility Effects. –Washington: U.S. Environmental Protection Agency, Office of prevention, pesticides and toxic substances, 1998. –EPA 712-C-98-208. –19 p.
6. Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов: утв. Минздравом СССР 05.05.1969 N 286-69. –Киев, 1969. –160 с.
7. Reproductive toxicity of tricresyl phosphate in male rats and mice by two dosing routes / B.D. Carlton, R.Irwin, M. Hejtmanck [et al.] // Toxicologist. –1986. –Vol. 6, № 1. –P. 292–301.
8. Metabolism and testicular toxicity of 1,3–dinitrobenzene in the rat: Effect of route of administration / S.F. McEuen, S.F. Jacobson, S.D. Brown, M.G. Miller // Fundam. Appl. Toxicol. –1995. –№ 28. –P. 81–98.
9. Kimmel C.A. Effect of route of administration on the toxicity and teratogenicity of EDTA in the rat / C.A. Kimmel // Toxicol. Appl. Pharmacol.–1977. –No. 40. –P. 299–306.
10. Staples R.E., Goulding E.H. Dipterex teratogenicity in rat, hamster, and mouse when given by gavage / R.E. Staples, E.H. Goulding // Environmental Health Perspectives. –1979. –Vol. 30. –P. 105–113.
11. Staples R.E. Developmental toxicity in the rat after ingestion or gavage of organophosphate pesticides (Dipterex, Imidan) during Pregnancy / R.E. Staples, R.G. Kellam, J.K. Haseman // Environmental Health Perspectives. –1976. –Vol. 13. –P. 133–140.
12. Teratogenic effects of benomyl in the Wistar rat and CD–1 mouse, with emphasis on the route of administration / R.I. Kavlock, N. Chernoff, L.E. Gray, I.A. Gray // Toxicology and Applied Pharmacology. –1982. –№ 62. –P. 44–54.

Надійшла до редакції 13.05.2013 р.