

УДК 614.7

Е.В. Зарицкая, В.В. Шилов, Е.В. Полозова

АЛЬТЕРНАТИВНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ТОКСИКОЛОГО-ГИГИЕНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ ОБЪЕКТОВ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ И ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

«Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья» 2-я Советская ул., д. 4, С.-Петербург, Россия, 191036

Проведен обзор используемых в России токсикологических альтернативных методов исследования, применяемых для оценки состояния производственной и окружающей среды.

Ключевые слова: биотестирование, вредные факторы, токсичность, биологический тест-объект, тест-реакция.

E.V. Zaritskaya, V.V. Shilov, E.V. Polozova. **Alternative investigation methods in toxicologic hygienic evaluation of industrial and environmental objects**

North-West Public Health Research Center, 4, 2-ya Sovetskaya str., S.-Petersburg, Russia, 191036

The authors reviewed toxicologic alternative investigation methods used in Russia for evaluation of occupational and natural environment.

Key words: biotesting, hazards, toxicity, biologic test-object, test-reaction.

Одной из отрицательных сторон научно-технического прогресса является постоянно нарастающее антропогенное загрязнение окружающей среды. Поэтому одной из важнейших задач является контроль условий окружающей среды, которые влияют на человеческий организм и могут повлечь за собой различные нарушения здоровья. В связи с этим разрабатываются законодательные, нормативные и методические документы, связанные с нормированием качества природных сред.

Для комплексной оценки состояния окружающей и производственной среды необходимо выполнение токсикологических исследований как *in vivo*, так и *in vitro*. Недостатками методов *in vivo* являются большие материальные затраты и длительность эксперимента. В связи с чем, в последние десятилетия, интенсивно ведутся поиски новых биологических тест-объектов, которые были бы способны достоверно отражать воздействие различных токсикантов на организм человека.

Большую актуальность в связи с этим приобретает разработка методологических и теоретических вопросов применения при токсикологических исследованиях биологических тест-объектов (культур клеток, микроорганизмов, простейших и т. д.), которые позволяют, как правило, в короткие сроки получить ценную информацию о биологическом действии веществ [1].

Таким образом, наряду с традиционными методами контроля, в России для оценки и нормирования состояния окружающей природной и производственной среды широко применяются различные альтернативные токсикологические методы исследования с использованием биологических тест-объектов, так называемые методы биологического тестирования или методы *in vitro*: бактерии (рода *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Echerichia*, стафилококки, люминисцирующие бактерии), клеточный тест-объект (гранулированная сперма быка), грибы (актиномицеты, плесневелые, дрож-

жевые), водоросли (сценедесмус, хлорелла), беспозвоночные (черви, нематоды, пиявки, коловратки), инфузории (парамеции, тетрахимена периформис), амфибии (лягушка *Rana ridibundo*), ракообразные (ветвистые рачки, дафнии), рыбы (гуппи, данио), высшие растения

Альтернативные токсикологические методы исследования основаны на оценке степени опасности исследуемого объекта по реакции живых организмов (тест-объектов) на воздействие вредного фактора, а информация, получаемая при использовании методов биотестирования, отражает комплексное токсическое воздействие всех содержащихся в данной среде токсикантов, их совместного присутствия. Полученные результаты анализируются и обобщаются с помощью таблиц, графиков, формул, на основе которых можно делать заключение о степени токсичности исследуемых сред.

По длительности воздействия вредных веществ на организмы различают: тесты на выявление токсичности острой (длительность менее 96 часов) и хронической (более 96 часов). В последних тестах учитывается эффект адаптации живых организмов к вредным факторам.

Для оценки состояния окружающей и производственной среды методы биотестирования широко применяются для определения острой и хронической токсичности питьевых, поверхностных, сточных вод, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления, растворов отдельных химических веществ, атмосферного воздуха и воздуха рабочей зоны [2–4,7–9]. При отнесении отходов производства и потребления к I–V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду, согласно Приказу Минприроды России от 4 декабря 2014 г. № 536 «Об утверждении Критериев отнесения отходов к I–V классам опасности по степени негативного воз-

действия на окружающую среду», одним из критериев является кратность разведения водной вытяжки из отхода, при которой вредное воздействие на гидробионты отсутствует. При определении данного критерия применяется не менее двух тест-объектов из разных систематических групп, например дафнии и инфузории, цериодафнии и бактерии или водоросли. За окончательный результат принимается класс опасности, выявленный на тест-объекте, проявившем более высокую чувствительность к анализируемому отходу. В случаях, когда на основании применения Критерия степени опасности отхода для окружающей среды (на основании показателей степени опасности отдельных компонентов отхода для окружающей среды) получен V класс опасности отхода, для его подтверждения проводится проверка с применением Критерия кратности разведения водной вытяжки из отхода, при которой вредное воздействие на гидробионты отсутствует. При несовпадении значения класса опасности отхода, он устанавливается на основании значений кратности разведения водной вытяжки из отхода [5].

Таким образом, для оценки состояния окружающей человека среды, объектами исследований с использованием альтернативных биологических моделей являются: вода питьевая, природная, сточная, осадки сточных вод, отходы производства и потребления, почвы, грунты, донные отложения, воздух (атмосферный, закрытых помещений, рабочей зоны). Для данных целей применяются аттестованные методики выполнения измерений с использованием в качестве тест-объектов спермы крупного рогатого скота, бактерий, культуры водоросли, одноклеточных организмов — инфузорий, высших растений, низших ракообразных (рачков, дафний, цериодафний), микроскопических червей-коловраток (кл. Rotatoria) [2–4,7–9].

Сперма быка в гранулах — стандартный, доступный и дешевый биологический материал, который используется в токсикологических исследованиях для определения индекса токсичности проб воздуха различного происхождения, отходов производства и потребления, почв, вод. Клетки спермы в гранулах хранятся в жидком азоте в сосудах Дьюара при температуре $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, что обеспечивает неограниченный срок хранения. Критерием токсического действия является изменение двигательной активности сперматозоидов под воздействием токсиканта. Принцип работы анализатора основан на автоматическом компьютерном анализе микроскопических видеоизображений суспензии сперматозоидов [7]. Как правило, индекс токсичности менее 70 и более 120 % свидетельствует о цитотоксичности вытяжки.

Методы люминесцентного бактериального теста широко распространены во многих странах в качестве первичного быстрого и количественного лабораторного теста на токсичность и безопасность проб воды и водных вытяжек из различных объектов окружающей среды. В РФ в качестве тест-объекта используются препараты лиофилизированных люминесцентных

бактерий или ферментные системы из этих бактерий серии «Эколюм». Токсическое действие исследуемой пробы на тест-объект определяется по уменьшению интенсивности биолюминесценции (интенсивного свечения в видимой области спектра, отражающего специфическую ферментативную функцию и общую метаболическую активность организмов) за определенный период экспозиции. Уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту [4]. Время одного анализа — не более 30 мин., а при экспрессном варианте — 5 мин. Данный метод можно использовать для быстрого определения общих токсикологических характеристик образца, мониторинга в режиме реального времени, а также проводить исследования в полевых условиях.

При использовании в качестве тест-объекта культуры водорослей, наиболее часто применяется зеленая одноклеточная водоросль Хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer), распространенная практически повсеместно, что делает ее доступным биологическим объектом. Быстрый и обильный рост, простота культивирования, высокая чувствительность хлореллы к широкому спектру различных токсикантов делает ее незаменимым тест-объектом при биотестировании. При этом, штамм водоросли Хлорелла способен в течение долгого времени без поддержания стерильности оставаться альгологически чистой культурой, что создает идеальные условия для выращивания культуры водоросли в лабораториях в качестве тест-объекта. Критерием токсичности являются подавление или стимуляция роста культуры водоросли при воздействии на нее исследуемого объекта [2].

При использовании в качестве тест-объектов простейших приоритет принадлежит представителям типа инфузорий (*Ciliophora*): *Tetrachymena pyriformis* — роду преимущественно свободноживущих пресноводных ресничных инфузорий. В целях биотестирования используется *Paramecium Caudatum* (инфузория-туфелька). Инфузория-туфелька относится к одноклеточным организмам, к классу *Ciliata* (ресничные) и является наиболее распространенным обитателем пресных водоемов. Характерной особенностью туфельки являются таксисы — двигательные реакции в ответ на односторонне действующий стимул, которые могут быть как положительные, так и отрицательные. Поэтому наиболее часто для количественного определения степени токсичности при биотестировании на инфузориях применяется хемотаксический метод, в основу которого положена реакция хемотаксиса тест-объекта против градиента концентрации загрязняющих веществ [8]. О токсичности исследуемой пробы также можно судить по выживаемости, интенсивности размножения, изменению двигательной активности инфузорий, но хемотаксическая реакция является наиболее перспективной из быстрых тест-реакций.

Низшие ракообразные — дафнии (*Daphnia*) — род планктонных ракообразных из надотряда ветвистых (*Cladocera*), семейства *Daphnidae*. Для лаборатор-

ных исследований наиболее часто используют *Daphnia magna* (дафния магна), *Seriodaphnia affinis* (цериодафния аффинис). Данный тест-организм является одним из основных при исследованиях окружающей среды. При биотестировании на дафниях можно регистрировать различные тест-реакции: смертность, изменение плодовитости, двигательной активности, поведенческих реакций, морфометрии и окраски тела, скорости поедания корма, а в хроническом эксперименте появление физиологических, морфологических и генетических изменений, возникших под влиянием токсиканта, но традиционными остаются выживаемость и плодовитость [3].

Коловратки (лат. Rotifera=Rotatoria) — класс мелких многоклеточных беспозвоночных организмов, которые в систематическом отношении близки круглым червям и насчитывающих более 1500 видов и разнообразных форм. В качестве тест-объектов используют *Brachionus calyciflorus*, *B. rubens*, *B. plicatilis*, *Philodina roseola*, *P. Acuticornis*. В качестве тест-объекта коловратки *Brachionus calyciflorus* обладают рядом преимуществ по сравнению с дафниями *Daphnia magna*: они более экспрессны (определение острой токсичности возможно за 2–24 ч, хронической токсичности — за 5–7 суток; а с использованием дафний — за 96 ч и 24 суток соответственно), компактны, для проведения исследований достаточно микрообъемов воды, имеется возможность проведения непрерывных анализов.

Оценка токсического загрязнения проб воды и донных отложений с использованием коловраток осуществляется по показателям пищевой активности, выклева коловраток из покоящихся яиц, выживаемости и плодовитости [6].

Для определения фитотоксических свойств почв, грунтов и вод в качестве тест-объекта используют семена культурных растений — овса, кресс-салата и др. [9]. В этом случае показателями токсичности служат энергия прорастания семян, морфометрические характеристики листа, всхожесть семян, длина корней, средний сухой вес проростков.

Выводы. 1. Токсикологические исследования необходимы для возможности комплексной оценки состояния окружающей и производственной среды. Альтернативой исследованиям на животных являются методы биотестирования или методы *in vitro*. 2. Методы *in vitro* более экспрессны (некоторые из них могут использоваться даже в полевых условиях), относительно дешевы и просты в исполнении, проводятся с использованием различных тест-объектов, методики выполнения исследований позволяют анализировать разнообразные объекты окружающей и производственной среды. 3. Информация, получаемая при использовании методов биотестирования, отражает комплексное токсическое воздействие всех содержащихся в данной среде токсикантов, их совместного присутствия. Альтернативные методы исследования широко распространены и используются в практической деятельности для оценки состояния окружающей и производственной среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богачева А.С., Шилов В.В., Полозова Е.В., Салова Л.С. Исследование токсичности химических веществ с использованием биологических тестов (альтернативных методов) // Вестн. Росс. Военно-мед. академии. — 2008. — № 1 (21). — С. 23–27.
2. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.10–04, ПНД Ф Т 16.1:2:2:3:3.7–04 (изд. 2014 г.) Методика измерений оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления.
3. ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12–06, ПНД Ф Т 16.1:2:2:3:3.9–06 (изд. 2014 г.) Методика измерений количества *Daphnia magna* Straus для определения токсичности питьевых, пресных природных и сточных вод, водных вытяжек из грунтов, почв, осадков сточных вод, отходов производства и потребления методом прямого счета.
4. ПНД Ф Т 16.2:2:2.1–96 ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.1–96 Методика определения токсичности вод, почв и донных отложений по ферментативной активности бактерий (колориметрическая реакция).
5. Приказ Минприроды России от 4 декабря 2014 г. № 536 «Об утверждении Критериев отнесения отходов к I–V классам опасности по степени негативного воздействия на окружающую среду».
6. Р 52.24.662–2004 Рекомендации. Оценка токсического загрязнения вод и донных отложений пресноводных экосистем методами биотестирования с использованием коловраток.
7. ФР. 1.31.2009.06301. ПНД Ф 14.1:2:4:15–09; 16.1:2:2:3:3.13–09. Методика выполнения измерений индекса токсичности почв, почвогрунтов вод и отходов по изменению подвижности половых клеток млекопитающих *in vitro*.
8. ФР. 1.39.2006.02506. ПНД Ф Т 14.1:2:3:13–06 (ПНД Ф Т 16.1:2:3:3.10–06). Методика определения токсичности отходов, почв, осадков сточных, поверхностных и грунтовых вод методом биотестирования с использованием равноресничных инфузорий *Paramecium caudatum* Ehrenberg.
9. ФР. 1.39.2006.02264. Методика выполнения измерений всхожести семян и длины корней проростков высших растений для определения токсичности техногенно-загрязненных почв.

REFERENCES

1. Bogacheva A.S., Shilov V.V., Polozova E.V., Salova L.S. Studies of chemical toxicity via biologic tests (alternative methods). // Vestnik Rossiyskoy Voenno-meditsinskoy akademii. — 2008. — 1 (21). — P. 23–27 (in Russian).
2. PND F T 14.1:2:3:4.10–04 PND F T 16.1:2:2:3:3.7–04 (edition 2014). Method measuring optic density of alga chlorella (*Chlorella vulgaris* Beijer) to assess toxicity of drinkable, fresh natural and waste waters, water extracts from grounds, soils, waste water sediments, industrial and consumers waste. (in Russian).
3. PND F T 14.1:2:3:4.12–06 PND F T 16.1:2:2:3:3.9–06 (edition 2014). Method measuring quantity of *Daphnia magna* Straus to assess toxicity of drinkable, fresh natural and waste waters, water extracts from grounds, soils, waste water sediments, industrial and consumers waste via direct count method. (in Russian).

4. PND F T 16.2:2:2.1–96 PND F T 14.1:2:3:4.1–96 Method measuring toxicity of waters, soils and bed silt according to enzymatic activity of bacteria (colorimetric reaction). (in Russian).

5. Order of Nature Ministry of Russia on 4 December 2014 N 536 «On approval of Criteria of assigning waste to I–V jeopardy classes according to degree of negative influence on environment» (in Russian).

6. R 52.24.662–2004 Recommendations. Evaluation of toxic pollution of waters and bed silt of fresh water ecosystems via biotesting methods using rotifers (in Russian).

7. FR. 1.31.2009.06301. PND F 14.1:2:4:15–09; 16.1:2:2.3:3.13–09. Method measuring toxicity index of soils, grounds of waters and waste via changes in mobility of mammal reproductive cells in vitro (in Russian).

8. FR. 1.39.2006.02506. PND F T 14.1:2:3.13–06 (PND F T 16.1:2:3.10–06). Method measuring toxicity of waste, soils, sediments of waste, superficial and subsoil waters via biotesting method using holotrichs *Paramecium caudatum* Ehrenberg (in Russian).

9. FR. 1.39.2006.02264. Method measuring germinating capacity and root length of high plant germinants to assess toxicity of technogenously polluted soils (in Russian).

Поступила 20.04.2016

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Зарицкая Екатерина Викторовна (Zaritskaya E.V.),
зав. сан.-гиг. лаб. ФБУН «СЗНЦ гигиены и общественного здоровья». E-mail: zev-79@mail.ru.

Шилов Виктор Васильевич (Shilov V.V.),
гл. науч. сотр. лаб. токсикологии ФБУН «СЗНЦ гигиены и общественного здоровья», д-р мед. наук, проф. E-mail: vshilov@inbox.ru.

Полозова Елена Валентиновна (Polozova E.V.),
вед. науч. сотр. ФБУН «СЗНЦ гигиены и общественного здоровья», д-р мед. наук, доц. E-mail: doctorpolozova@yandex.ru.

УДК 616.833–002–031.14(035)

И.В. Бойко^{1,2}, Н.Н. Логинова¹

ОБОСНОВАНИЕ СТАНДАРТА ОБСЛЕДОВАНИЯ БОЛЬНЫХ С ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ПОЛИНЕВРОПАТИЕЙ ОТ ВОЗДЕЙСТВИЯ ФИЗИЧЕСКИХ ПЕРЕГРУЗОК

¹«Северо-Западный научный центр гигиены и общественного здоровья», 2-я Советская ул., д. 4, С.-Петербург, Россия, 191036

²«Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова», ул. Кирочная, д. 41, С.-Петербург, Россия, 191015

Рассмотрен алгоритм обследования в центрах профессиональной патологии больных с подозрением на профессиональную полиневропатию от воздействия физических перегрузок.

Предложена процедура обследования больных рассматриваемого профиля, включающая консультации врачей-специалистов, набор лабораторных и инструментальных методов исследований с разделением на выполняемые в обязательном порядке и по конкретным показаниям.

Ключевые слова: профессиональная полиневропатия, физические перегрузки, стандарт обследования, дифференциальная диагностика.

I.V. Boiko^{1,2}, N.N. Loginova¹. **Justifying standards of workup in patients with occupational polyneuropathy caused by physical overload**

¹North-West Public Health Research Center, 4, 2-ya Sovetskaya str., St-Petersburg, Russia, 191036

²North-Western State Medical University named after I. Mechnikov, 41, Kirochnaya str., St-Petersburg, Russia, 191015

The authors examined algorithm of investigations in occupational pathology centers for suspected occupational polyneuropathy due to physical overload. Suggestions included a procedure to investigate the patients, including medical specialists consultations, set of laboratory and instrumental studies divided into obligatory and by special indications.

Key words: occupational polyneuropathy, physical overload, workup standard, differential diagnosis.

По состоянию на 2014 г. удельный вес профессиональных полиневропатий (ПП) и мононевропатий, вызванных физическими перегрузками, в целом по РФ в структуре профессиональной заболеваемости группы

работников, занятых в условиях воздействия физических перегрузок класса 3.2, составлял 56,7% [12]. Диагностика столь распространенных профессиональных заболеваний до сих пор связана с рядом сложностей, так