УДК 615.038:632.95.024:615.015.35

ТОКСИКОЛОГО-ГІГІЄНІЧНА ОЦІНКА ФУНГІЦИДУ ВАЛІФЕНАЛА ТА ОБГРУНТУВАННЯ ЙОГО ДОПУСТИМОЇ ДОБОВОЇ ДОЗИ ДЛЯ ЛЮДИНИ

А.А. Борисенко, С.Т. Омельчук

Кафедра гігієни та екології
Національний медичний університет імені О.О.Богомольця, м. Київ

Резюме. *У роботі приведені результати токсиколого-гігієнічної оцінки нового фунгіциду валіфенала, науково обгрунтована його ДДД для людини, що дозволить мінімізувати ризик негативної дії даного препарату на тих, що працюють і населення.*

Вступ. Пестициди і агрохімікати є новими, штучно створеними об'єктами – потенційно небезпечними факторами впливу на здоров'я людини. Внаслідок їх високої біологічної активності, надзвичайно швидкого поширення, усвідомленого цілеспрямованого застосування в різних галузях господарства та побуті, можливого забруднення практично усіх об'єктів оточуючого середовища, постійного прямого або опосередкованого контакту з різними прошарками населення, вказані речовини потребують особливих комплексних науково-методологічних підходів до оцінки їх небезпечності. Згідно з чинним законодавством України, впровадження в сільськогосподарську практику нових хімічних засобів захисту рослин можливе лише після наукового обґрунтування гігієнічних нормативів та регламентів їх безпечного застосування [1].

Невід'ємним етапом реєстрації пестицидів є наукова експертиза матеріалів отриманих у ході гострих, субхронічних та хронічних досліджень. На етапі токсиколого-гігієнічної оцінки діючої речовини чи препарату необхідно провести глибоку всебічну оцінку їх біологічної дії в експерименті на тваринах та індикацію змін на органному, системному, клітинному і субклітинному рівнях [2, 3]. Дані токсикологічних досліджень дозволяють не лише встановити клас та оцінити ступінь небезпечності препаративних форм пестицидів та їх д.р., а й обґрунтувати величину допустимої добової дози (ДДД) для людини, провести комплексне гігієнічне нормування [4, 5, 6], визначити та провести оцінку ризику шкідливої дії пестицидів при їх використанні у сільському господарстві для здоров'я населення та працюючих [7, 8].

Ось чому необхідним є проведення гігієнічної класифікації за ступенем небезпечності та обґрунтування величини ДДД нового фунгіциду - валіфеналу. Варто зауважити, що валіфенал, окрім країни виробника, не зареєстрований в жодній країні, чим підкреслюється актуальність даної роботи.

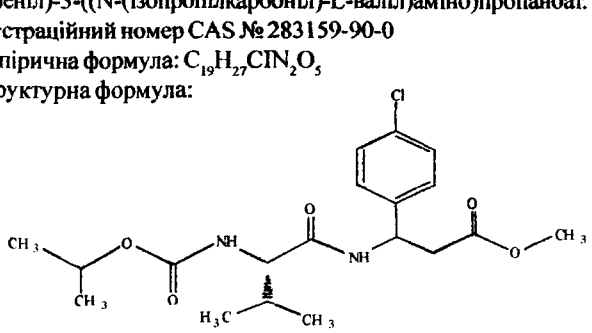
Мета. Враховуючи вищезазначене метою нашої роботи була токсиколого-гігієнічна оцінка валіфеналу і препарату на його основі - Валіс М в.г. та обґрунтування ДДД згідно з чинними в Україні методичними підходами.

Матеріали та методи дослідження. Хімічна назва валіфеналу: метил-3-(4-хлорфеніл)-3-((N-(ізопропілкарбоніл)-L-валіл)аміно)пропаноат.

Реєстраційний номер CAS № 283159-90-0

Емпірична формула: $C_{19}H_{27}ClN_2O_5$

Структурна формула:



Відносна молекулярна маса: 398,89.

Валіфенал – твердий сипучий порошок з невеликою кількістю м'яких частинок, білого кольору, без запаху. Відносна щільність: 1,25 кг/дм^3 (при 21±0,5°С). Тиск насичених парів: 9,6Ч10^{-6} Па (при 20°С). Температура плавлення - 147°С при 101,74 кПа. Коефіцієнт розподілу н-октанол/вода: lg $K_{o/s}$ 3,05 (pH 4); 3,09 (pH 7); 3,06 (pH 9). Валіфенал та препарат на його основі Валіс М, в.г. виробляється ф.Ізагро С.п.А., Італія.

Токсиколого-гігієнічну оцінку досліджуваного фунгіциду проводили на підставі результатів досліджень гострої токсичності при різних шляхах надходження, кумулятивних властивостей, подразнюючої та сенсибілізуючої дії препарату Валіс М,в.г. та валіфеналу на основі даних літературних джерел, інформації Інтернет-ресурсів і матеріалів досьє фірм-виробників.

Вивчення гострої токсичності при пероральному, перкутанному та інгаляційному шляхах надходження валіфеналу, препарату на його основі Валіс М в.г. було проведено на щурах лінії Spraue Dawley та Wistar.

Вивчення гострої пероральної токсичності проводили після одноразового введення препарату та його діючої речовини (д.р.) у дозі 5000 мг/кг у вигляді водного розчину. Спостерігали за тваринами впродовж 14 діб.

Гостру інгаляційну токсичність вищезазначеного препарату та його д. р. вивчали в інгаляційних камерах при 4-годинній експозиції.

Подразнюючу дію на шкіру вивчали на Новозеландських білих кролях. При нанесенні валіфеналу на шкіру через 1, 24, 48, 72 години після видалення пов'язки і промивання місця аплікації.

Сенсибілізуючі властивості досліджуваного препарату та д. р. вивчали у максимізаційному тесті за методом Магнуссона-Клігмана на морських свинках.

Дослідження субхронічної активності валіфеналу проводили на різних видах ссавців (миші, щурі, собаки) при надходженні речовини із кормом протягом тривалого періоду часу (28 днів і/або 90 днів).

Токсичні властивості речовини в хронічному експерименті досліджували на мишах, крисах та собаках. Віддалені наслідки, а саме канцерогенну дію, вивчали на мишах та щурах, репродуктивну токсичність, ембріотоксичність, тератогенність – мишах, щурах та кролях, мутагенну активність – на різних тест-системах. А саме, в різних варіантах були проведенні тести на індукцію генних мутацій (тест Еймса, тест на індукцію генних мутацій в культурі клітин Китайського хом'ячка, в культурі лімфоцитів або лімфоми мишей), хромосомних мутацій (тест на індукцію аберацій хромосом в культурі оваріальних клітин Китайського хом'ячка, в культурі лімфоцитів людини, в культурі клітин кісткового мозку або в сперматоцитах та сперматогоніях мишей, мікроядерний тест) та вплив досліджуваних речовин на позаплановий синтез ДНК у культурі фібробластів людини.

Обгрунтування ДДД валіфеналу здійснювали у відповідності до [4].

Результати дослідження та їх обговорення. При вивченні гострої пероральної токсичності встановлено, що після одноразового введення найвищих концентрацій препарату Валіс М в.г та валіфеналу у дозі 5000 мг/кг білим щурам обох статей видимих симптомів інтоксикації та випадків смерті тварин не спостерігали як протягом перших 2 годин, так і в подальшому впродовж 14 діб. Клінічна картина гострої пероральної інтоксикації для кожної з вищевказаних речовин проявлялася неспецифічними симптомами (зниження рухової активності, апатія, пілоерекція, жорстке дихання, диспное та інші), які зникали протягом 14 днів. Всі тварини набирали вагу. При автопсії не виявлено ніяких патологічних змін внутрішніх органів. Таким чином, величина середньої смертельної дози препарату Валіс М в.г та д.р. валіфеналу для щурів самців і самиць перевищує 5000 мг/кг.

Після одноразового інгаляційного впливу гідроаерозолю д.р. валіфеналу у концентрації 3118±217 мг/м^3 видимих симптомів інтоксикації та випадків смерті тварин не спостерігали. За зовнішнім виглядом та поведінкою піддослідні тварини не відрізнялися від контрольних.

Враховуючи, що у відповідності до вимог Директиви 94/79/ЕС від 21.12.1994р. інгаляційна токсичність препаративної форми обов'язково вивчається лише у випадках коли препарат є газом чи зрідженим газом, фумігантом, паром, аерозолем, порошком з вмістом частинок діаметром до 50 мкм > 1% по вазі, що призначений для авіаційного застосування, має тиск

парів > $1Ч10^{-2}$ Па і застосовується в теплицях, гостра інгаляційна токсичність препарату Валіс М в.г. не вивчалась. Небезпечність препарату при його можливому інгаляційному надходженні до організму оцінювали на основі інгаляційної токсичності його д.р. - валіфеналу.

В результаті дослідження гострої дермальної токсичності (при 4-годинній експозиції) діючої речовини і препарату на його основі було встановлено, що при перкутанному шляху надходження до організму препарату Валіс М в.г. $ЛД_{50}$ для щурів перевищує 5000 мг/кг, валіфеналу – більше 2000 мг/кг. При цьому в місцях аплікації препарату Валіс М в.г. протягом перших 4 днів після зняття пов'язки спостерігали десимеровані червоні плями, на 5 день ознаки місцевої дії були відсутні. У всіх інших випадках видимих симптомів інтоксикації, ознак подразнення шкіри та випадків смерті тварин не спостерігали як впродовж першої доби, так і в наступні 14 діб. При автопсії не виявлено ніяких патологічних змін внутрішніх органів.

Подразнюючу дію на шкіру вивчали на Новозеландських білих кролях. При нанесенні валіфеналу на шкіру через 1, 24, 48, 72 години, після видалення пов'язки і промивання місця аплікації, ознак подразнюючої дії не виявлено. Через 1 годину після видалення аплікаційної пов'язки з препаратом Валіс М в.г. у всіх тварин виявлена еритема. Після 24 годин почервоніння зафіксовано у 2 тварин, а через 48годин – у 1 тварини. Через 72 години ніяких ознак подразнюючої дії не виявлено.

При дослідженні подразнюючої дії препарату та його д. р. на слизові оболонки було встановлено, що валіфенал такої дії не чинить. Через 1 годину після інстиляції препарату Валіс М в.г. в кон'юнктивальний мішечок правого ока кролів у всіх тварин спостерігали гіперемію кон'юнктиви інтенсивністю в 1 бал, хемоз – 2 бали, виділення з очей у 2 з 3 тварин інтенсивністю 1 бал. Через 24 години гіперемія кон'юнктиви зберігалася у 2 тварин інтенсивністю в 1 бал, а у 1 кроля посилилась до 2 балів; хемоз – інтенсивністю 1 бал. Через 48 годин – кон'юнктивіт у 2 тварин інтенсивністю 1 бал. Через 72 години ознак подразнюючої дії не виявлено.

Дослідження сенсибілізуючих властивостей показало, що при інтрадермальній індукції та нашкірній аплікації валіфеналу ніяких дермальних реакцій не реєстрували впродовж 14 діб спостереження, що свідчить про відсутність алергенних властивостей. В експерименті з нашкірною сенсибілізацією морських свинок препаратом Валіс М в.г. виявлено помірну алергенну активність фунгіциду за рахунок вмісту манкоцебу, який класифікується як помірний алерген при контакті з шкірою. Параметри гострої токсичності досліджуваного препарату та його нової діючої речовини наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Параметри гострої токсичності валіфеналу та препарату на його основі Валіс М в.г.

Досліджуваний ефект, тривалість впливу	Вид тварин	Виявлений ефект, ступінь прояву (клас небезпечності, згідно з ДСанПіН 8.8.1.002-98)	
		валіфенал	Валіс М в.г.
$ЛД_{50}$ per os, одноразово, мг/кг	щурі	>5000 (4)	>5000 (4)
$ЛК_{50}$ інгаляційно, 4 год., мг/м^3	щурі	>3118 (2)	Оцінку проводимо за валіфеналом (2)
$ЛД_{50}$ на шкіру, одноразово, мг/кг	щурі	>2000 (4)	>5000 (4)
Подразнююча дія на шкіру	кролі	Відсутня (4)	Слабка (3)
Подразнююча дія на слизові оболонки	кролі	Відсутня (4)	Помірна (2)
Сенсибілізуюча дія, нашкірно, багаторазово	морські свинки	Відсутня (4)	Помірна (2)

Аналізуючи табличні дані, можна зробити висновок, що за параметрами гострої токсичності згідно з [9] для валіфеналу лімітуючим критерієм є інгаляційна токсичність, для препарату Валіс М в.г. - інгаляційна токсичність, подразнююча та сенсибілізуюча дія. Але необхідно взяти до уваги, що $ЛК_{50}$ не була досягнута і загибелі тварин при цьому не спостерігалося, тому більш логічним є віднесення діючої речовини саме до помірно небезпечних. Вважаємо за необхідне зазначити, що за класифікацією ВООЗ [10] валіфенал належить до III класу токсичності (малотоксичні речовини).

Узагальнені дані та отримані величини NOEL в субхронічному та хронічному експерименті при різних шляхах надходження, в дослідах на різних видах тварин наведені в табл. 2.

Як видно з табл. 2, валіфенал не проявив мутагенної активності в достатній кількості тестових систем in vitro та in vivo. Відповідно, речовина не володіє генотоксичним потенціалом і за мутагенною активністю може бути віднесена до IV класу небезпечності за гігієнічною класифікацією пестицидів.

Органом-мішенню в субхронічних та хронічних експериментах на всіх досліджуваних видах тварин є печінка. Валіфенал у високих дозах володіє анемізуючим ефектом. У собак в субхронічному та хронічному експерименті і в щурів в хронічному досліді валіфенал у високих дозах викликав фолікулярноклітинну гіпертрофію щитовидної залози, частота появи якої залежала від дози речовини.

Таблиця 2

Величини NOEL за загальнотоксичним впливом, визначені в субхронічних та хронічних експериментах, та віддалені ефекти дії валіфеналу

Досліджуваний ефект (шлях надходження та тривалість впливу	Вид тварин	Досліджувані дози, мг/кг маси тіла (мг/кг корму)	Виявлений ефект NOEL, мг/кг маси тіла
Субхронічна токсичність (перорально 28 днів)	щури	♂:13, 63, 311, 1518 ♀:13, 64, 314, 1537 (0;120;600;3000,15000)	13,0
	миші	♂:18, 68, 266, 1105 ♀:27, 96, 402, 1536 (0;110;440;1750,7000)	68,0(♂), 96,0(♀)
	собаки	250, 500, 1000	250,0
Субхронічна токсичність (перорально 90 днів)	щури	7, 150, 1000	7,0(♂), 150,0(♀)
	миші	♂:15,3; 133,7; 995 ♀:16,7; 147,5; 1144 (110,900,7000)	15,3(♂), 147,5(♀)
	собаки	0, 50, 250, 750	50,0
Хронічна токсичність (перорально 52 тижні)	собаки	0, 1, 7, 50, 250	1,0
Хронічна токсичність (перорально 104 тижні)	щури	0, 15, 150, 1000	15,0
Хронічна токсичність (перорально 78 тижнів)	миші	♂:16,8; 97,2; 657 ♀:21,6; 124; 756 (150; 850; 5000)	16,8(♂), 21,6(♀)
Канцерогенна активність (перорально 104 тижні)	щури	0, 15, 150, 1000	150,0
Канцерогенна активність (перорально 78 тижнів)	миші	(150; 850; 5000)	16,8(♂), 21,6(♀)
Тератогенна активність (у щлунок, протягом періоду органогенезу)	щури	100, 300, 1000	Не виявлена 100,0(♀), 100,0(плід)
	кролі	250, 500, 1000	100,0(♀), 100,0(плід)
Репродуктивна токсичність (перорально, тест двох поколінь)	щури	(0; 1250; 4300; 15000)	80,0-100,0
Мутагенна активність	5 тестових систем in vitro та in vivo		Не виявлена в жодному з тестів

В хронічному експерименті на щурах лімітуючим критерієм при оцінці валіфеналу є системна токсичність, величина NOEL по загальнотоксичному впливу складає 15 мг/кг м.т. для тварин обох статей, за канцерогенним впливом – 150 мг/кг м.т. В хронічному експерименті на мишах валіфенал в гепатотоксичних дозах провокує появу доброякісних і злоякісних пухлин, величини NOEL по системній токсичності і канцерогенності співпадають – 150 ppm, що відповідає 16,8 мг/кг м.т. для самців і 21,6 мг/кг м.т. для самиць.

Оскільки канцерогенну активність валіфенал проявив на одному виді тварин (мишах) в високих (гепатотоксичних) дозах, генотоксичного потенціалу у речовини не виявлено, механізм розвитку пухлин – епігеномний, вважаємо,

що валіфенал можна віднести до малоймовірних канцерогенів для людини – III клас небезпечності згідно з [9].

В досліді по вивченню репродуктивної токсичності, NOEL валіфеналу за загальнотоксичним впливом, впливом на параметри та розвиток потомства встановлений на рівні 1250/850 ppm, що відповідає 80-100 мг/кг маси тіла. NOEL грунтується на гепатотоксичних ефектах, підвищенні неонатальної і постнатальної смертності нащадків батьківського покоління F_1 і зниження індексу їх виживання, зниження маси тіла F_2 потомства при дії валіфеналу в більш високих дозах.

Валіфенал не володіє тератогенною активністю. За ембріотоксичним ефектом може бути віднесений до III класу небезпечності пестицидів.

Дані, наведені в табл. 2, свідчать про те, що канцерогенна активність, репродуктивна токсичність і ембріотоксичність не є лімітуючими при токсиколого-гігієнічній оцінці валіфеналу. Найменше значення NOEL – 1,0 мг/кг, встановлено по загальнотоксичній дії на собак у хронічному (1 рік) досліді, орган-мішень – печінка. Спеціалістами фірми-виробника рекомендована величина ДДД на рівні 0,168 мг/кг м.т. При цьому виходили із найменшого, на їхню думку, значення NOEL – 16,8 мг/кг, яке було встановлено в хронічному експерименті на мишах, і коефіцієнту запасу 100, оскільки валіфенал не класифікується як ймовірний канцероген для людини.

На нашу думку, при обгрунтуванні ДДД, необхідно виходити з мінімальної NOEL – 1,0 мг/кг, яку встановлено по загальнотоксичній дії на собак в хронічному досліді. Враховуючи виявлений в дослідах на мишах канцерогенний ефект гепатотоксичних доз валіфеналу, доцільно використовувати коефіцієнт запасу 200 і встановити ДДД на рівні 0,005 мг/кг м.т. При цьому допустиме добове надходження валіфеналу до організму людини масою 60 кг буде становити 0,3 мг.

Висновки

1. В ході проведеної роботи встановлено, що препарат Валіс М, в.г. за параметрами гострої пероральної та перкутанної токсичності відноситься до IV класу небезпечності, слабо подразнює шкіру (III клас) і помірно (II клас) слизові оболонки, є помірним алергеном (II клас).

2. Валіфенал за параметрами гострої пероральної та перкутанної токсичності відноситься до IV класу небезпечності, за інгаляційною токсичністю до II класу, не подразнює шкіру і слизові оболонки очей (IV клас), не володіє сенсибілізуючою дією (IV клас).

3. Аналіз даних показав, що валіфенал при тривалому надходженні до організму не володіє генотоксичним потенціалом і за мутагенною активністю може бути віднесений до IV класу небезпечності згідно з [9]. За канцерогенною активністю, ембріотоксичними ефектами і репродуктивною токсичністю може бути віднесений до III класу.

4. Віддалені біологічні ефекти дії не є лімітуючим критерієм при оцінці небезпечності та обґрунтуванні ДДД валіфеналу для людини. Враховуючи те що величина NOEL за загальнотоксичною дією становить 1,0 мг/кг м.т., рекомендуємо затвердити величину ДДД валіфеналу для людини на рівні 0,005 мг/кг м.т.

Література

1. Закон України «Про пестициди та агрохімікати» : №87/95 – ВР від 02.03.95 / Верховна Рада України. – Офіц.вид. К. : Парлам. Вид-во, 1995. – 91 с.

2. Потапов А.И. Гигиена и токсикология пестицидов на современном этапе / А.И. Потапов, А.П. Шицкова, В.Н. Ракитский // Гигиена и санитария. – 1996. - №3. – С. 33-35.

3. Кириченко А.В. Порівняльна оцінка використання на сільськогосподарських культурах різних форм препаратів на основі металаксилу-М: дис. кандидата медичних наук : 14.02.01 / Кириченко Аліна Володимирівна. – К., 2004. – 202с.

4. Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов: МУ № 4263-87. – [Утв. 13.03.87]. – К.: М-во здравоохранения СССР, 1988. – 210 с.

5. Проданчук Н.Г. К проблеме использования величин допустимой суточной дозы при установлении гигиенических нормативов пестицидов в продуктах питания и объектах окружающей среды / Н.Г. Проданчук, А.Е. Подрушняк, В.Д. Чмиль // Современные проблемы токсикологии. – 2002. – № 2. – С. 51–55.

6. Проданчук Н.Г. Современные проблемы комплексного токсиколого-гигиенического регламентирования пестицидов / Н.Г. Проданчук, Е.И. Спыну // Современные проблемы токсикологии. – 2000. – № 1. – С. 3–5.

7. Вивчення, оцінка і зменшення ризику інгаляційного і перкутанного впливу пестицидів на осіб, які працюють з ними або можуть зазнавати впливу під час і після хімічного захисту рослин та інших об'єктів: Методичні вказівки МВ 8.1.4-2006. – К., 2006. – 21 с.

8. Методические рекомендации по изучению и гигиенической оценке условий труда при применении пестицидов: МР № 01-19/140-17. – М., 1995. – 11 с.

9. Пестициди. Класифікація за ступенем небезпечності: ДСанПін 8.8.1.002-98 – [Затв. 28.08.98] // Зб. важливих офіційних матеріалів з санітарних і протиепідемічних питань. – Київ, 2000. – Т. 9. – Ч. 1. – С. 249–266.

10. The WHO Recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification: 2009 (ISBN 978 92 4 154796 3) / [World Health Organization]. - WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2009. – 81p.