

METODOLOŠKI PRISTUP PROCJENJIVANJU
TOKSIČNOSTI KEMIJSKIH SUPSTANCIJA*

L. J. SKENDER

Institut za medicinska istraživanja i medicinu rada, Zagreb

(Primljeno 24. VII 1980)

Sve se češće čuje mišljenje da je danas opasnost od kemijskih supstancija (ksenobiotika) jednaka onoj od prije stotinu godina od bakterija. Povećanjem spoznaje o opasnosti od kemikalija postavlja se pitanje boljeg osiguranja prihvatljivog rizika. U tu svrhu iznesene su neke zakonske regulative u svijetu i u nas, te osnovni problemi provedbe toksikološkog ispitivanja počevši od izbora eksperimentalnih životinja i uniformnosti provođenja toksikoloških pokusa.

Stalni razvitak različitih grana industrije i sloboda suvremene proizvodnje doveli su do nezadrživog priljeva sve većeg broja kemijskih supstancija u neposredni okoliš čovjeka. Prema podacima Američkog kemijskog društva registrirano je danas u svijetu 4 039 907 različitih kemijskih spojeva od kojih je više od 60 000 u svakodnevnoj upotrebi, a godišnje se broj poveća za oko 10% (1). Sve su te kemikalije pod stanovitim uvjetima potencijalni otrovi, a neke čak i karcinogeni, što je od posebne važnosti uzme li se u obzir mišljenje da su za nastajanje 60—90% svih karcinoma krivac kemikalije (2).

Dok se prije pažnja usmjeravala samo na izrazito toksične supstancije, danas, uz povećanje broja i vrsta farmaceutskih proizvoda, pesticida, aditiva hrani, sredstava za održavanje čistoće, ambalaže itd., razmatranje samo takvih spojeva nije više dovoljno. Moraju se uzeti u obzir potencijalna opasnost od čestog izlaganja malim dozama kemikalija i rizik kroničnog djelovanja. S druge, pak, strane kemijska industrija je značajan faktor u ekonomici pojedine zemlje te međunarodnom prometu. Ove činjenice dovoljno upućuju na veličinu problema.

Razmatranje opasnosti od kemikalija je relativno novo; početkom 1960-ih godina znanstvena otkrića i mnogi incidenti naveli su pozornost

* Dijelom saopćeno na II. kongresu toksikologa Jugoslavije, Portorož, 1979.

na novi tip problema nastao onečišćenjem okoline koji je stekao naziv »toksične supstancije«. Brzo se uvidjelo da je za procjenjivanje učinka na zdravlje čovjeka, ustanovljenje standarda za ekspoziciju ljudi kemikalijama, ispitivanje i registriranje novih spojeva, proučavanje razgradnje u okolišu, potrebno osnivanje odgovorne državne institucije. U Švicarskoj je 1969. godine donesen Zakon o prometu toksičnih supstancija (3). Američki savjet za kontrolu onečišćenja okoline (U. S. Council on Environmental Quality) počeo je s radom 1970. godine, što je urodilo 1976. donošenjem Zakona o kontroli toksičnih supstancija (Toxic Substances Control Act, TSCA). Japan i Švedska su 1973. usvojili Zakon o kontroli kemikalija. Kanada 1974. usvaja Zakon o kontaminantima okoline (Environmental Contaminants Act), Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj (Organization for Economic Collaboration and Development, OECD) preporučuje da se u zemljama članicama procjenjuju učinci kemikalija na čovjeka i okolinu prije nego se stave u promet, a Batelle Institute u Ženevi završava proučavanje za Evropsku ekonomsku zajednicu (EEZ) o mogućnosti sustava za evaluaciju opasnosti od kemikalija prije uvođenja na tržište. Savjet ministara EEZ-a je u rujnu 1979. odobrio Smjernice za zemlje članice s obzirom na ispitivanje i prijavu novih kemikalija (79/831/EEC).

Za sada su TSCA i Smjernice EEZ-a dvije glavne regulacijske osnove za evaluaciju novih kemikalija. Među njima ima mnogo zajedničkog, ali i mnogo razlika (3). Svih 9 članica EEZ-a se u principu drži Smjernica, ali ima i značajnih nacionalnih razlika u interpretaciji i primjeni tog akta.

Imajući na umu ne samo veličinu prometa kemikalijama, nego i potrebu zajedničkog međunarodnog pristupa procjeni učinaka kemikalija na zdravlje ljudi i okoline, Svjetska zdravstvena organizacija (World Health Organization, WHO) oformila je 1979. Međunarodni program o sigurnosti kemikalija (International Programme on Chemical Safety, IPCS), koji je postao 1980. kooperativno tijelo triju organizacija WHO, Programa za kontrolu okoliša Ujedinjenih naroda (United Nations Environmental Programme, UNEP) i Međunarodne organizacije rada (International Labour Organization, ILO). Polje rada IPCS je vrlo široko (4).

I u nas je u to važno i osjetljivo područje prometa kemijskih supstancija i postavljanja kriterija za ocjenu njihove otrovnosti zahvaćeno postepeno, ali energično: 1977. je donesen novi Zakon o prometu otrova (5) i u njemu su najavljeni propisi o detaljnim kriterijima za razvrstavanje otrova u skupine i o metodama za određivanje stupnja otrovnosti (čl. 11). Za sve kemijske supstancije koje se nalaze niz godina u prometu da se uvrste u Listu otrova, dovoljan je podatak o vrijednosti oralne LD_{50} za štakore. Kemikalija čiji LD_{50} peroralno za štakore prelazi 5 000 mg/kg ne bi spadala među otrove i ne bi trebala biti podvrgnuta daljnjem ispitivanju. Neodrživost navedenog stava je očita jer neka supstancija s LD_{50} iznad 5 000 mg/kg za eksperimentalne životinje, iako je netoksična u smislu akutnog toksičnog djelovanja, može biti jaki alergen, mutagen,

te karcinogen i ne bi smjela doći na tržište. Iako je odmah nakon donošenja Zakona predložen ispravak u tom dijelu (čl. 11), do 1980. to se nije učinilo.

Za svaku novu kemijsku supstanciju koja nije još u prometu u našoj zemlji zahtijeva se:

- u promet se može pustiti samo ako je supstancija registrirana u zemlji proizvođača
- u svrhu ispitivanja i davanja toksikološkog mišljenja potrebno je priložiti svu raspoloživu dokumentaciju
- navesti u koju se svrhu želi pojedina supstancija registrirati
- priložiti popis zemalja u kojima je supstancija registrirana.

Za ocjenu otrovnosti Zakon se oslonio na specijalizirane znanstvene ili stručne ustanove, smatrajući ih mjerodavnim za taj najosjetljiviji i najodgovorniji dio posla (6). Više od dvije godine su te ustanove, koje su postale službeno ovlaštene za davanje »toksikološke ocjene« pojedinih supstancija bile u nezavidnom položaju jer im je bilo prepušteno da same izaberu način rada. Toksikološke ocjene mogu se davati na osnovi istraživanja pojedine organizacije ili na osnovi toksikoloških ispitivanja izvršenih u inozemstvu. Za Komisiju za otrove Saveznog komiteta za rad, zdravstvo i socijalnu zaštitu bitno je i dovoljno stručno mišljenje ovlaštene institucije o otrovnosti pojedine supstancije, dok je pitanje porijekla elemenata na osnovi kojih se daje to mišljenje isključivo stvar radne organizacije koja to mišljenje daje. Zbog toga nije bilo jedno-obraznosti u njihovu radu. Međutim, 14. 7. 1979. stupio je na snagu najavljeni Pravilnik s potanjim kriterijima za razvrstavanje otrova u skupine i o metodama za određivanje stupnja otrovnosti pojedinih otrova (7). U 25 točaka (čl. 2) Pravilnik propisuje niz toksikoloških podataka potrebnih za upotrebu neke nove supstancije, bilo kao sirovine za daljnji tehnološki postupak, bilo kao gotovog produkta. Osim toga, Pravilnik određuje i područja patogenog djelovanja te traži da se ispituju iritacija kože i sluznice očiju, mutagenost, karcinogenost, teratogenost, djelovanje na reprodukciju, na odgovarajuće biokemijske parametre i na eventualni sinergizam s drugim supstancijama.

Nema nikakve sumnje u opravdanost ovih zakonskih propisa. Međutim, ne može se zanemariti ni činjenica da bi cijena takvog toksikološkog ispitivanja kakvo zahtijeva navedeni Pravilnik iznosila, za svaku novu supstanciju koja u nas još nije registrirana, oko 10 milijuna dinara, a ispitivanje bi trajalo 4 godine. Zbog toga je opravdana bojazan da će razvitak mnogih grana industrije biti zakočen, jer one neće uvijek moći pribaviti tolika sredstva. U našoj se zemlji mnoga tražena toksikološka ispitivanja rutinski uopće ne vrše. Tek bi trebalo pomišljati na osnivanje ustanove koja bi bila multidisciplinarno osposobljena za toksikološka ispitivanja. Istina, za neke se preparate može dati toksikološka ocjena na temelju ispitivanja već izvršenih u inozemstvu. Međutim, budući da

zakoni drugih evropskih zemalja (švicarski, njemački, francuski) ne zahtijevaju toliko toksikoloških parametara za sve supstancije kao zakon naše zemlje (napravljen je razlika s obzirom na količinu koja se proizvodi, raširenost upotrebe i mogućnost ekspozicije), strani izvoznici odnosno principali jednostavno ne raspolažu podacima potrebnim našoj industriji za registraciju preparata.

Ima i drugih problema u provedbi toksikoloških ispitivanja. Prve informacije o toksičnosti, tipu i mehanizmu toksičnog djelovanja, nove kemikalije čije se uvođenje planira na tržište, dobivaju se iz istraživanja na eksperimentalnim životinjama. Nije lak izbor životinje koji bi omogućio ekstrapolaciju toksičnosti za ljude (8, 9, 10). Najveći problem su kvantitativne razlike u toksičnom odzivu između čovjeka i životinja. Kemijska toksičnost je manifestacija funkcionalnih i morfoloških promjena koje nastaju zbog interakcije kemijske supstancije ili njezina metabolita s endogenim molekulama tkiva (11). Stupanj toksičnosti se stoga može promatrati sa stanovišta kemijskih reakcija te se može izraziti primjenom zakona o djelovanju masa. Najjednostavniji slučaj:

toksičnost = k [reaktivni kemijski agens] [kritička endogena molekula]

Taj kvantitativan pristup je primijenjen u slučaju jakih karcinogena, gdje je reaktivni kemijski agens krajnji (ultimate) karcinogen, a kritička endogena makromolekula DNA; karcinogenost u različitim vrsta i sojeva je bila proporcionalna koncentraciji krajnjeg karcinogena i količini nastajanja DNA-kompleksa (11, 12). Ti parametri, međutim, variraju ovisno o vrsti životinja. Čini se da uz kontinuiranu i ubikvitarnu ekspoziciju toksičnim kemikalijama životinje koje dugo žive moraju imati djelotvorni zaštitni sustav protiv kemijske toksičnosti. Dugo živuće životinje su, općenito, veće vrste i imaju niži parcijalni tlak kisika (O_2) nego manje, kratko živuće životinje (13). Danas se zna da je oksidativni metabolizam, najčešće odgovoran za aktiviranje kemikalije u toksičnu, uglavnom ovisan o koncentraciji O_2 u tkivima:

brzina oksidacije = k [kemijski agens] [O_2]² (11)

Posljedica tog izraza je da male životinjske vrste (miš, štakor, hrčak) općenito aktiviraju toksične kemikalije brže nego veće vrste (pas, primati, čovjek). Bitno je, dakle, za ekstrapolaciju toksičnih podataka od životinje na čovjeka usporediti kinetike oksidativnog mehanizma da bi se dobila kvantitativna procjena brzine i količine stvaranja reaktivnog intermedijera. Iskustvom se došlo do spoznaje o različitim osjetljivostima pojedinih životinjskih vrsta i čovjeka, npr.:

- najniža LD za metanol za čovjeka je 10–20 puta niža od one za kunića, psa i majmuna (14)
- čovjek je 100–350 puta osjetljiviji prema atropinu, morfinu i nikotinu nego laboratorijske životinje (10)

- miš je osjetljiviji od štakora u manifestiranju kroničnih i/ili karcinogenih učinaka vinilklorida, vinilidenklorida, perkloretilena i kloroforma (13, 15).
- aflatoksin je jači karcinogen za štakora nego za miša (16).

Procesi detoksikacije i aktivacije teku simultano i bitna je i njihova procjena u različitim vrsta. Aktivnost različitih enzima, npr. oksidaza različitih djelovanja (mixed-function oxidases, MFO), epoksid hidrolaza, glutation S-transferaza, glukuronil transferaza, varira od jedne do druge vrste životinja, a i genetski unutar određene vrste (11, 17). Koncentracija zaštitnih supstancija u tkivu, npr. glutationa također utječe na kemijsku toksičnost i također varira s vrstom, ishranom, primijenjenom dozom kemikalije i prethodnom ili istovremenom ekspozicijom drugim agensima (11).

Koncentracija kritičkih endogenih makromolekula u tkivu može isto varirati između pojedinih vrsta životinja, naročito ako se radi o hormonima i drugim molekulama koje reguliraju homeostazu.

Važno je i doziranje ispitivane supstancije, jer kontinuirano visoka ekspozicija može zaštitne endogene molekule i enzimske reakcije iscrpiti i inaktivirati tako da brzina metaboličkih reakcija može biti vrlo različita s obzirom na primijenjenu dozu.

Može se zaključiti da je poznavanje odnosa doza-odziv i toksikokinetike za pojedine vrste životinja i čovjeka bitno za interpretaciju značajnosti podataka dobivenih ispitivanjem na životinjama, te procjene opasnosti za ljude.

Unatoč postojećim razlikama, razumno je pretpostaviti da će neka supstancija biti toksična za čovjeka ukoliko je davana velikom broju različitih životinja, a da su sve one pokazale izraziti toksični učinak. Međutim, nije ni u kojem slučaju sigurno da će neka tvar koja nije pokazala nikakav toksični učinak u životinja biti bezopasna i za čovjeka. Često se predlaže (18) da učinak neke tvari opažen na samo jednoj vrsti životinja diskvalificira tu tvar za daljnje proučavanje u ljudi. Takva bi doktrina olakšala život toksikologa i ovlaštenih organizacija, jer bi vrlo brzo nestalo rizika i odgovornosti. Istina je, međutim, da bi u tom slučaju neke supstancije s negativnim učinkom na samo nekim životinjama bile prebrzo diskvalificirane, pa ne bi došlo do upotrebe nekog prijeko potrebnog lijeka za čovjeka. Cilj toksikološkog pokusa, budući da se ne radi o egzaktnoj nauci, mora biti dobivanje dovoljnog broja podataka na temelju kojih se može prosuditi odnos koristi prema opasnosti (benefit-to-risk judgement) (19).

Za poboljšanje ekstrapolacije animalnih testova na ljude malo je specifičnog učinjeno u selekciji vrsta koje su po reakcijama slične onima u čovjeka (20). U jednoj listi životinjskih vrsta upotrijebljenih tokom 1975. godine vidi se da je eksperimentirano na 21 vrsti, ali je u vrlo malo radova istaknut razlog za upotrebu te vrste. Još uvijek prevladava

upotreba glodavaca, ali to ne znači da su glodavci kvalitativno pogodniji od pasa ili primata, nego se mogu proučavati u većem, statistički važnom broju, pokusi su jeftiniji, a rezultati usporedivi s prethodnim ispitivanjima izvršenim također na glodavcima zbog istih razloga. Sve dok se ne dokaže da proučavanja na psima i primatima imaju veću vrijednost za ocjenu toksičnosti, vjerojatno će i dalje dominirati ispitivanja na glodavcima.

Zbog specifičnosti pojedinih vrsta potrebno je istaknuti na kojoj je vrsti izvršeno ispitivanje i taj se podatak u znanstvenim publikacijama stavlja pod metode rada. Za reproducibilnost rezultata jednako su važni i mnogi drugi faktori. Oni se, međutim, rijetko spominju, što je vidljivo iz revijalnog prikaza *Langa* i *Vesella* na temelju više od 4 000 radova objavljenih u časopisima s najboljom reputacijom (21). Općenito danas, unatoč velikom teorijskom znanju i svijesti o potrebi informiranja, shema ispitivanja, trajanje pokusa, broj i vrsta upotrijebljivih životinja i dr., ovisi isključivo o iskustvu pojedinog laboratorija.

Iz svega izloženog, očita je potreba strogo planiranog i kontroliranog načina rada da bi se postigla što veća vrijednost u predviđanju toksičnosti za čovjeka. U tu je svrhu Američka uprava za hranu i lijekove (Food and Drug Administration, FDA) izdala standardne propise za ispravan laboratorijski rad (Good Laboratory Practice, GLP) (22). Ti propisi podrazumijevaju organizacijski proces i uvjete pod kojima se planiraju, izvode, prate, registriraju, interpretiraju i objavljuju laboratorijska testiranja kemikalija koja se vrše zbog procjene njihovih potencijalnih učinaka na zdravlje i ekosistem čovjeka.

OECD je također preuzela strogu kontrolu nad testiranjem toksičnosti. Na uputama o testiranju toksičnosti kemikalija (OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Draft No 3, Review Panel IV/2) tri godine je radilo oko 300 stručnjaka različitih profila. Delegacija naše zemlje je prisustvovala sastanku u Parizu (Env/Chem/HLM/80. 3) na kojem su razmatrani principi OECD za primjenu metoda o ispitivanju kemikalija. Zaključeno je da će se u Dubrovniku održati tokom travnja 1981. Međunarodni seminar u suradnji s OECD o reguliranju prometa kemikalija s aspekta zaštite čovjekove okoline.

Imajući u vidu iznesene podatke, očito je da postoji velika potreba za reguliranjem upotrebe starih i primjene novih kemijskih supstancija. Ohrabruje činjenica da postoji svijest o toj potrebi i da se puno radi na tom području, u svijetu i u nas, kako u zakonskom tako i u znanstvenostručnom pogledu. Budućnost će pokazati koliko ćemo razumno pristupiti tom problemu, kako ćemo se znati služiti podacima dobivenim od uniformno izvedenih toksikoloških ispitivanja, međunarodnom koordinacijom i kontrolom, kako ćemo obavljati epidemiološka istraživanja, te kako ćemo pronaći najbolju ravnotežu za optimalan život procjenjujući odnos koristi prema opasnosti.

Literatura

1. *Maugh, T. H.*: Chemicals: How many are there, *Science*, 199 (1978) 162.
2. World Health Organisation Report of a Consultation on the Implementation of Resolution, WHA 30. 47., Evaluation of the Effects of Chemicals on Health, *Bull. Med. Leg. Toxicol.*, 22 (1979) 93.
3. *Davies, J. C.*: Regulatory Issues in Toxic Substances Control Legislation, u: *Holmstedt, B., Lauwerys, R., Mercier, M., Roberfroid, M.* (Eds), *Mechanisms of Toxicity and Hazard Evaluation*, Elsevier North-Holland Biomedical Press, 1980, str. 429.
4. *Somers, E.*: The International Programme on Chemical Safety, u: *Holmstedt, B., Lauwerys, R., Mercier, M., Roberfroid, M.* (Eds.), *Mechanisms of Toxicity and Hazard Evaluation*, Elsevier/Nort-Holland Biomedical Press, 1980, str. 465.
5. Zakon o prometu otrova: Službeni list br. 4, 14. 1. 1977.
6. Rješenje o određivanju organizacija udruženog rada i ustanova koje udovoljavaju uvjetima za obavljanje toksikološke ocjene otrova: Službeni list br. 20, 21. 4. 1978.
7. Pravilnik o potanjim kriterijima za razvrstavanje otrova u skupine i o metodama za određivanje stupnja otrovnosti pojedinih otrova: Službeni list br. 31, 6. 7. 1979.
8. *Burgen, A. S. V.*: The Predictive Value of Animal Toxicity Tests, u: *Zaimis E.* (ed.), *Evaluation of New Drugs in Man*, Macmillan, New York, 1965, str. 49.
9. *Dedrick, R. L., Bischoff, K. B.*: Species Similarities in Pharmacokinetics, *Fed. Proc.*, 39 (1980) 54.
10. *Sokal, J. A.*: Extrapolation of Animal Data to Man, International Course on Evaluation and Risk Assessment of Chemicals, 1–6 September 1980, Lodz, Poljska.
11. *Parke, D.*: The Use of Biochemical Studies in Risk Assessment, International Course on Evaluation and Risk Assessment of Chemicals, 1–6 September 1980, Lodz, Poljska.
12. *Weinstein, I. B.*: Current Concepts on Mechanisms of Chemical Carcinogenesis, *Bull. N. Y. Acad. Med.*, 54 (1978) 366.
13. *Ramsey, J. C., Gehring, P. J.*: Application of Pharmacokinetic Principles in Practice, *Fed. Proc.*, 39 (1980) 60.
14. NIOSH Registry of Toxic Health of Chemical Substances, U. S. Department of Health, Education and Welfare, Cincinnati, USA, 1977.
15. *Lee, C. C., Bhandari, J. C., Winston, J. M., House, W. B., Dixon, R. L., Woods, J. S.*: Carcinogenicity of Vinyl Chloride and Vinylidene Chloride, *J. Toxicol. Env. Health*, 4 (1978) 15.
16. *Portman, R. S., Plowman, K. M., Campbell, T. C.*: On Mechanisms Affecting Species Susceptibility to Aflatoxin, *Biochim. Biophys. Acta*, 208 (1970) 487.
17. *Hemminki, K., Sorsa, M., Vainio, H.*: Genetic Risks Caused by Occupational Chemicals, *Scand. J. Work Environ. Health*, 5 (1979) 307.
18. *Paget, G. E.*: The Design and Interpretation of Toxicity Tests u: *Paget, G. E.* (ed.), *Methods in Toxicology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford and Edinburgh, 1972, str. 1.
19. *Darby, T. D.*: Pharmacologic Considerations in the Design of Toxicology Experiments, *Clin. Toxicol.*, 12 (1978) 229.

20. *Fancher, O. E.*: Species Selection and Animal Models for Toxicologic Studies, *Clin. Toxicol.*, 12 (1978) 239.
21. *Lang, C. M., Vesell, E. S.*: Environmental and Genetic Factors Affecting Laboratory Animals: Impact on Biomedical Research, *Fed. Proc.*, 35 (1976) 1123.
22. *Thies, R. C.*: Good Laboratory Practice-A Legal Perspective, *Clin. Toxicol.*, 12 (1978) 207.

Summary

A METHODOLOGICAL APPROACH TO ESTIMATING THE TOXICITY OF CHEMICAL SUBSTANCES

The risk of chemical substances (xenobiotics) is claimed more and more often to be as great today as was the danger of bacterias a hundred years ago. Greater awareness of chemical hazards creates in turn the need for greater safety from acceptable risks. In view of this relevant legislative regulations in Yugoslavia and in other countries are presented and basic problems encountered in carrying out toxicological investigations, from the very choice of experimental animals to uniform conductance of experiments, are discussed.

*Institute for Medical Research and
Occupational Health, Zagreb*

*Received for publication
July 24, 1980*