

БЕЗОПАСНОСТЬ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

ОБЗОР МЕТОДОВ IN VITRO ОЦЕНКИ ОРАЛЬНОЙ БИОДОСТУПНОСТИ МЕТАЛЛОВ И МЕТАЛЛОИДОВ ИЗ ЗАГРЯЗНЕННЫХ ПОЧВ

Н.С. Седов, О.А. Максимова

Российский университет дружбы народов
Подольское шоссе, 8/5, Москва, Россия, 115093

В статье рассмотрены лабораторные методы оценки оральной биодоступности металлов и металлоидов из загрязненных почв (in vitro тесты). Данные методы основаны на физиологических особенностях желудочно-кишечного тракта человека. Проведено сравнение десяти методов, подробно рассмотрен метод РВЕТ и его упрощенная версия SBET.

Ключевые слова: оральная биодоступность, загрязнение почв, тяжелые металлы, методы in vitro.

Оральное поступление тяжелых металлов с почвенными частицами в организм человека более существенно, чем может показаться на первый взгляд. Особенно это актуально для детского населения. Увеличение содержания свинца в почве на каждые 100 мг/кг вызывает увеличение содержания свинца в крови детей в возрасте до трех лет на 0,5—1,6 мкг/дл [1]. На поверхность почвы тяжелые металлы поступают в различных формах. Это оксиды и различные соли металлов, как растворимые, так и практически нерастворимые в воде (сульфиды, сульфаты, арсениты и др.). Известно, что доступны для организма человека и участвуют в биологических процессах не все формы тяжелых металлов. Данных по валовой концентрации металлов в почве недостаточно для прогнозирования токсического эффекта на организмы, категорирования почв по степени загрязненности и разработки ремедиационных мероприятий. За рубежом уже более 10 лет проводятся исследования по оценке оральной биодоступности токсикантов, главным образом, свинца, кадмия, никеля, мышьяка, ПАУ в лабораторных условиях. Данные методы основаны на физиологических особенностях желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) человека.

Существуют три основных пути поступления загрязняющих веществ из почвы в организм человека: оральный, транскутанный и ингаляционный. Опасность для

здоровья представляют те элементы и их соединения, которые попадают в кровеносную систему.

Результаты испытаний на животных показывают, что загрязняющие вещества в почвенной матрице оказывают меньшие токсические эффекты по сравнению с теми же концентрациями растворимых солей загрязняющих веществ в жидкой матрице (воде или пище). Однако во многих случаях не существует различий между содержанием загрязняющих веществ в пище или почве. Особенно это касается детей, в организм которых токсиканты (например, соединения мышьяка) могут попадать через грязные руки и грязные игрушки. Таким образом, очевидна необходимость в методах, позволяющих получать информацию о доле загрязняющих веществ, которая в случае перорального приема может достигать кровотока и вызывать токсические эффекты, т.е. оральную биодоступность (*bioavailability*). Оральная биодоступность формально определяется как отношение содержания загрязняющих веществ в крови к их содержанию в ЖКТ. Этот термин не нужно путать с растворимостью вещества в биологических жидкостях (*bioaccessibility*), которая определяется как отношение содержания растворимых в желудочном соке веществ (доступных для поглощения) к их содержанию в твердой фазе почвы. Определение оральной биодоступности загрязнителей почвы на экспериментальных животных (*in vivo* тесты) — процесс достаточно медленный и дорогостоящий. Для проведения анализа большого количества образцов все чаще используются *in vitro* тесты, имитирующие среду ЖКТ в лабораторных условиях.

Применение *in vivo* и *in vitro* тестов для оценки оральной биодоступности токсикантов

Для тестов *in vivo* используются животные с ЖКТ, имеющим сходные черты с ЖКТ человека. Обычно это свиньи, карликовые свиньи (мини-пиги), кролики, мыши, крысы, обезьяны. В процессе тестирования исследуемые вещества добавляются в корма для животных в виде растворимых солей или загрязненных продуктов и скармливаются в несколько приемов (прерывистая схема питания). Регулярно до гибели животного забираются для анализа образцы крови и мочи, после вскрытия — образцы тканей мозга, сердца, печени, легких, ЖКТ, мочевыводящих путей.

Альтернативой методам *in vivo* являются лабораторные методы оценки биодоступности (*in vitro* тесты) — определение растворимой фракции в условиях, имитирующих выщелачивание загрязняющих веществ и их соединений из твердой матрицы в ЖКТ человека. Лабораторные тесты оценки оральной биодоступности основаны, как правило, на физиологических особенностях ЖКТ маленьких детей (0—5 лет), которые подвергаются наибольшему риску случайного проглатывания почвы и наиболее восприимчивы к негативному воздействию факторов окружающей среды.

Желудочно-кишечные процессы трудновоспроизводимы в лабораторных условиях. В тестах традиционно используют различные соли металлов или образцы почвы, которые инкубируют при низком рН в течение времени, соответствующего времени нахождения пищи в желудке, с последующим повышением рН для имитации попадания пищевого комка в тонкий кишечник. Для имитации биологиче-

ских жидкостей используются также ферменты и органические кислоты. В результате испытаний *in vitro* не может быть определена абсолютная биодоступность. В настоящее время существует несколько модификаций *in vitro* тестов в зависимости от типов почв и видов загрязнителей. Тесты варьируют от простых одноступенчатых схем экстракции до более сложных многоступенчатых схем последовательного химического извлечения. На сегодняшний день данные исследования привлекают внимание широкого круга научной общественности, обсуждение результатов носит дискуссионный характер [4].

Целью работы явился краткий обзор тестов, которые используются в настоящее время для оценки оральной биодоступности отдельных металлов и металлоидов в загрязненных почвах. Не приводятся сведения по фитобиодоступности, а также по оральной биодоступности органических загрязнителей.

Методы *in vitro* оценки оральной биодоступности металлов и металлоидов в загрязненных почвах получили широкое распространение для решения различных экологических и эколого-медицинских задач. Методика подобных исследований изначально была разработана для целей оценки биодоступности железа в продуктах питания [4]. Европейский стандарт по безопасности детских игрушек [2] создан для оценки оральной биодоступности металлов и металлоидов (сурьма, мышьяк, барий, кадмий, хром, свинец, ртуть и селен). Метод, регламентируемый стандартом, предполагает извлечение определенного металла из материала игрушки, измельченного до размера < 500 мкм при pH 1,5, температуре 37 °C в течение двух часов. Этот метод используют с 1994 г. 18 стран — членов Европейского комитета по контролю безопасности детских игрушек.

Обращает на себя внимание тот факт, что проблема определения и регулирования биодоступности достаточно хорошо изучена в биофармации, где исследуются условия биодоступности лекарственных препаратов. Накопленные знания и опыт в этой области вполне могут быть использованы в отношении химических загрязнителей, с той лишь разницей, что целью будет являться снижение оральной биодоступности. Фармацевтический *in vitro* метод (US Pharmacopoeia Method, US P) был разработан в США для моделирования растворения лекарственных средств в организме человека, но также используется для определения биодоступности тяжелых металлов из загрязненной почвы [4].

Лабораторные тесты определения биодоступности можно разделить на две группы:

- 1) тесты с использованием методов химической экстракции наиболее легко извлекаемых металлов в условиях низких значений pH;
- 2) тесты, основанные на физиологических особенностях ЖКТ, целью которых является максимально возможное приближение в лабораторных условиях к условиям в живой системе.

Рассмотрим подробнее тесты второй группы. ЖКТ человека состоит из нескольких отделов, в которых загрязненная почва претерпевает ряд изменений, обусловленных изменением химического состава биологических жидкостей, pH, времени реакции и действием ряда других факторов (табл. 1).

Таблица 1

Условия пищеварения (время и pH) в различных отделах ЖКТ человека

Стадия	Название отдела	Время нахождения пищевого комка	pH
1	Полость рта	От нескольких секунд до нескольких минут	6,5
2	Желудок	8—15 мин. (пустой желудок) 0,5—3 ч (полный желудок)	1—2 2—5
3	Тонкий кишечник: 12-перстная кишка; тощая кишка; подвздошная кишка	0,5—0,75 ч 1,5—2 ч 5—7 ч	4—5,5 5,5—7 7—7,5
4	Толстый кишечник	15—60 ч	6—7,5

Методы экстракции, имитирующие пищеварение, учитывают только биохимический фактор и игнорируют эффекты, вызываемые активным транспортом и ролью микробного сообщества в ЖКТ. Биодоступность, рассчитанная для одних и тех же элементов при моделировании условий разных отделов ЖКТ, может существенно различаться. Например, мышьяк, представленный в основном анионными формами, и свинец, представленный катионами, в растворе при извлечении из твердой матрицы будут вести себя по-разному при различных режимах pH. Известно, что биохимические условия в ЖКТ зависят также от присутствия (или отсутствия) пищи: pH желудочного сока различается для пустого и полного желудка. По отдельным данным [4] присутствие пищи может уменьшить поглощение свинца и увеличить биодоступность других элементов.

Металлы и нерастворимые частицы в конечном итоге попадают в толстую кишку. В настоящее время не существует работ, посвященных оценке биодоступности металлов в толстом кишечнике. В толстом кишечнике создаются очень специфические физико-химические и биохимические условия, обусловленные присутствием огромного количества бактерий. Это может оказать воздействие на почвенные частицы, следовательно, мобилизация токсичных металлов также может иметь место. Вероятно, в будущем, отдел толстой кишки не должен игнорироваться при оценке поступления токсикантов в организм человека.

В настоящее время достаточно хорошо разработаны восемь методов (с модификациями) определения биодоступности *in vitro*. Основные характеристики методов приведены в табл. 2.

Наиболее хорошо разработан метод экстракции, основанный на физиологии человека (The Physiologically Based Extraction Test, PBET). Этот тест является, по существу, двухступенчатой последовательной экстракцией с использованием различных ферментов для имитации среды желудка или кишечника. Через реакционные сосуды для экстракции пропускают аргон, чтобы поддерживать систему в анаэробных условиях. Постоянное перемешивание используется для имитации движения пищи в желудке. Метод впервые был описан специалистом в области экологической химии из США Майклом Руби [3]. В настоящее время используются две модификации метода — полная (PBET) и упрощенная (SBET).

**Основные характеристики методов определения
оральной биодоступности тяжелых металлов и металлоидов**

Метод	Отдел ЖКТ	pH	T °C	Присутствие пищи	Ж/Т	Время	Анализируемая фаза	Тестируемые металлы/металлоиды	Проверка другими методами in vitro или in vivo	Простота использования
	Прим. А				Прим. В	Прим. С			Прим. D	Прим. E
PВЕТ	2 3	2.5 7	37 37	Нет Нет	100/1	1 час 4 часа	Рас- твор Рас- твор	As, Pb	V/свины, обязьяны	Ориги- нальный 3 Моди- фици- роvan- ный 7
SBET	2	1.5	37	Нет	100/1	1 час	Рас- твор	As, Pb, Cd	V/свины (Pb)	9
IVG	2 3	1.8 5.5	37	Да Да	150/1	н/у н/у	Рас- твор Рас- твор	As	V/свины (As)	5
US P	2	ca.1	37	Нет	1000/1	2 часа	Рас- твор	As, Pb, Cd, Cr, Ni	NV	9
MB&SR	1 2 3	ca.1	37 37 37	Нет Нет Нет	160/1 2160/1 4770/1	5 секунд 2 часа 4 часа	Рас- твор Рас- твор + твер- дая фаза	As, Pb, Cd, Cr	С/челове- к (Pb)	3
DIN	1 2 3	6.4 2 7.5	37 37 37	Да Да Да	15/1 50/1 100/1	0.5 2 часа 6 часов	Рас- твор	As, Pb, Cd, Cr, Hg	V/свины	5
SHIME	2 3	5.2 6.5	37 37	Да Да	2.5/1 4/1	3 часа 5 часов	Рас- твор	As, Pb, Cd	C	5
RIVM	1 2 3	6.5 1.1 5.5	37 37 37	Нет Нет Нет	15/1 37.5/1 97.5/1	5 минут 2 часа 2 часа	Рас- твор + твер- дая фаза	As, Pb, Cd	C	6
TIM	1 2 3	5 2 7.2	37 37 37	Нет Нет Нет	5/1 30/1 51/1	5 минут 1.5 часа 6 часов	Рас- твор	As, Pb, Cd	C	2
АОАС	2	1.12	37	Нет	150/1	16 ча- сов	Рас- твор	Cu, Zn, Mn, Fe, Al	NV	9

Примечание А: 1 — ротовая полость; 2 — желудок; 3 — тонкий кишечник.

Примечание В: соотношение жидкой (Ж) и твердой (Т) фазы при экстракции.

Примечание С: время реакции в каждом отделе; н/у — не указано.

Примечание D: NV — не проводилась; V — результаты были проверены на живых моделях (человеке или животных); C — результаты не проверялись на животных, но сравнивались с результатами других методов in vitro.

Примечание E: простота использования по шкале от 1 до 10.

Упрощенная форма SBET (Simplified Bioaccessibility Extraction Test) была разработана специально для определения биодоступности свинца. Экстракция производится с использованием 0,4 М раствора глицина, pH раствора доводится до pH = 1,5 хлороводородной (соляной) кислотой. Метод прошел тщательную проверку в США в соответствии с требованиями United States Environmental Protection Agency (USEPA) и, скорее всего, будет принят в качестве стандартной процедуры [4]. Этот метод учитывает только поглощение свинца в желудочной фазе, фаза тонкого кишечника не исследуется, так как при pH выше 5,5 свинец не растворяется и будет выведен из организма вместе с твердым веществом содержимого кишечника. При проведении теста SBET используются простые реагенты в процессе одноступенчатой экстракции в течение относительно короткого периода времени, что делает его удобным в использовании для больших партий образцов, но только для оценки биодоступности свинца, так как некоторые другие потенциально токсичные элементы, например мышьяк, наиболее доступны при высоких значениях pH (5,5—7), что соответствует условиям тонкого кишечника.

Использование для оценки риска валовой концентрации загрязняющих веществ в почве предполагает, что все загрязняющие вещества (металлы), представленные в почве, попадут в кровь. Однако абсолютная оральная биодоступность может варьировать от близкой к нулю до почти 1 (т.е. 100%) в зависимости от физико-химической формы загрязнителя. Регулирование оральной биодоступности тяжелых металлов посредством химической мелиорации может быть альтернативой таким формам защиты населения, как перемещение больших объемов загрязненного грунта и фиторемедиация территорий, что может быть весьма дорого и трудноисполнимо. Для того чтобы получать корректные данные по оценке оральной биодоступности любым из рассмотренных методов, необходимо выполнять ряд условий. Отбор проб почвы должен производиться в соответствии с действующими стандартами (в РФ это ГОСТ 17.4.4.02-84. Охрана природы. Почвы. Методы отбора и подготовки проб для химического, бактериологического, гельминтологического анализа). Если отбор проб проводится неправильно, то независимо от того, насколько хорошо будет выполнен анализ, данные не будут репрезентативны. Знание природы соединений токсичных элементов в почве позволяет предсказывать их биодоступность в условиях ЖКТ. Полученные данные при возможности необходимо сравнивать с данными других методов.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Быков А.А., Ревич Б.А. Оценка риска загрязнения окружающей среды свинцом для здоровья детей в России // Медицина труда и промышленная экология. — 2001. — № 5. — С. 6—10.
- [2] European Standard EN 71—3 1994. Режим доступа: URL: <http://ec.europa.eu/enterprise/policies/european-standards/harmonised-standards/toys>
- [3] Ruby M.V., Davis A., Link T.E., Schoof R., Chancy R.L., Freeman G.B., Bergstrom P. Development of an in Vitro Screening Test To Evaluate the in Vivo Bioaccessibility of Ingested Mine-Waste Lead // Environ. Sci. Technol. — 1993. — 27. — P. 2870—2877.

- [4] *Wragg J., Cave M.R.* In vitro Methods for the Measurement of the Oral Bioaccessibility of Selected Metals and Metalloids in Soils: A Critical Review. R&D Technical Report P5-062/TR/01: British Geological Survey. Environment Agency, Rio House, Waterside Drive, Aztec West, Almondsbury, Bristol, BS32 4UD, 2002.

IN VITRO METHODS FOR THE ASSESSMENT OF THE ORAL BIOACCESSIBILITY OF SELECTED METALS AND METALLOIDS IN SOILS: A REVIEW

N.S. Sedov, O.A. Maksimova

Peoples' Friendship University of Russia
Podolskoe shosse, 8/5, Moscow, Russia, 115093

The article describes the laboratory methods for evaluating the oral bioaccessibility of metals and metalloids from contaminated soils (in vitro tests). These methods are based on the physiological characteristics of the gastrointestinal tract of humans. A comparison of ten methods. Methods PBET and SBET described in detail.

Key words: oral bioaccessibility, bioavailability, contamination of soils, heavy metals, in vitro methods.