

## ОЦЕНКА НА РИСКА ПРИ ХИМИЧЕСКАТА БЕЗОПАСНОСТ НА ХРАНИТЕ – ЗАВИСИМОСТ ДОЗА-ОТГОВОР

*P. Vachkova-Petrova*

## RISK ASSESSMENT IN CHEMICAL FOOD SAFETY – DOSE-RESPONSE RELATIONSHIP

*R. Vachkova-Petrova*

**Резюме.** Първият стадий на оценката на риска – идентифицирането на опасността е насочен към идентифициране на ефектите, които се приемат за неблагоприятни. Характеризирането на опасността е фокусирано върху количествяването на тези ефекти, така че установената зависимост доза-отговор може да бъде след това сравнена с потенциала за експозиция (характеризиране на риска). Принципът на Парацелзус, че „дозата прави отровата” е базата на фундаменталната концепция в токсикологията и оценката на риска. Прието е, че за повечето химически вещества има прагова доза, под която може да се определи нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект – NOAEL (no-observed-adverse effect level). NOAEL е базата за изчисляване на човешката експозиция на замърсителите и добавките в храните без неблагоприятен здравен ефект (осигуряване на безопасността). Определянето на бенчмарк отговора и бенчмарк дозата са отправна точка за определяне на границата на експозиция и здравните параметри за допустим прием основно на генотоксичните вещества. През последните години предизвикателство към класическата (монотонна) парадигма доза-отговор е така наречената „хипотеза за ниската доза”. Според нея, специално ендокринно активните вещества или ендокринните нарушители могат да проявяват „ефекти при ниската доза” в рамките на типичната човешка експозиция, отсъстващи при по-високите дози и, които могат да покажат немонотонен профил доза-отговор.

**Summary.** The first stage of a risk assessment, hazard identification is primarily a question of identifying the effects that are considered as adverse. Hazard characterization is centered on the quantification of these effects, so that the identified dose-response relationship can be compared subsequently with the potential for exposure (risk characterization). The principle of Paracelsus (dosis sola facit venenum) is the basis for a fundamental concept in toxicology and risk assessment. It is generally accepted that for most chemicals there is a threshold dose below which the no-observed-adverse effect level (NOAEL) can be determined. NOAEL is the basis for a calculation of human exposure to food additives and contaminants which is without adverse health effects (safety assurance). The estimation of the benchmark response and benchmark dose is a point of departure for estimation of the margin of exposure and health parameters for acceptable intake mainly of genotoxic chemicals. In recent years, the classical (monotonic) dose-response paradigm has been challenged by the so-called 'low dose hypothesis'. According to it, particularly the endocrine active substances or endocrine disruptors may exert "low dose effects", i.e. in the range of typical human exposure, which are not present at higher doses, and which may display a non-monotonic dose-response profile.

**Key words:** hazard characterization, dose-response relationship, NOAEL, benchmark dose, "low dose" hypothesis

С регламент 178/2002 Европейският Съюз създаде орган по безопасност на храните – European Food Safety Authority (EFSA). Със същия регламент Европейският Съюз очерта общите принципи и изисквания на закона за храните, както и процедурите от значение за безопасността на храните. Основни функции на EFSA са оценката на риска и комуникацията на риска. Той действа в тясно сътрудничество с компетентните органи на страните членки, които изпълняват подобни на неговите задачи. EFSA, Комисията и страните членки си сътрудничат в стимулирането на ефективна взаимовръзка при оценката на риска, управлението на риска и функциите по комуникация на риска.

**Оценката на риска съдържа четири стъпки:** идентифициране на опасността; характеризирание на опасността; оценка на експозицията и характеризирание на риска.

Оценката на риска има практическо значение. Изискванията към тази оценка е да се идентифицира и характеризира риска от "източника на риск" (на базата на наличните данни и в светлината на последните научни схващания), за да предостави ясна база за решение дали рискът трябва да се ограничи/избегне/елиминира или е достатъчно малък, че да се разглежда като приемлив/незначителен. Именно оценката на риска е процедурата, която е в основата на съвременната концепция за предпазването на здравето на населението от неблагоприятните химически фактори в храните – замърсители и добавки. Подходите за оценка на риск за праговете и безпраговете вещества имат като резултат различна характеристика на риска.

Първият стадий на оценката на риска е идентифицирането на опасността, като има за цел да идентифицира ефек-

тите, които се разглеждат като неблагоприятни. Характеризирането на опасността е вторият стадий и е фокусирано върху количествения израз на тези ефекти, така че установената зависимост доза-отговор, идентифицирана на този стадий да бъде след това сравнена с потенциала за експозиция (характеризиране на риска). По определението на ФАО/СЗО характеризирание на опасността е „качествената и/или количествената оценка на природата на неблагоприятния ефект върху здравето, свързан с биологичен, химически или физически агент, който може да се съдържа в храната. За химическите агенти трябва да се определи зависимостта доза-отговор. За биологичните и физическите агенти се прави оценка на зависимостта доза-отговор, ако има налични данни” [6].

Стадиите на характеризирание на опасността са следните:

- установяване на зависимостта доза-отговор за всеки критичен ефект;
- идентифициране на най-чувствителните видове и породи, сравнение на видовите различия и сходства;
- характеризирание на начина на действие/механизмите за критичните ефекти (включително ролята на възможен активен метаболит);
- екстраполране от високата към ниската доза/експозиция, междувидова екстраполация.

Един от главните критерии за характеризирание на опасността е определянето на наличие или отсъствие на връзка доза-отговор. Данните за наличието на такава зависимост са много съществени като анализът им е главната част на характеризирание на опасността в рамките на парадигмата оценка на риска. Тези данни могат да произхождат

от изследвания *in vivo* върху животни, а в някои случаи – и върху хора.

В наличност са допълнителни методи: проучване на фармакокинетика, моделите РВРК (physiologically based pharmacokinetic modeling), които са техника за математическо моделиране за прогнозиране на абсорбцията, разпределението, метаболизма и елиминирането на синтетични или натурални химически вещества у хората и други животински видове, за подобряване на интерпретацията на свързаните с дозата ефекти и намаляване на неопределеността при екстраполацията от връзката доза-отговор при характеризирането на риска.

Интерпретацията на данните за ефекта обикновено изисква познаването на нивото на експозиция, което не предизвиква измерим ефект и връзката между увеличаването на честотата, тежестта или природата на ефекта с увеличението на дозата.

При анализирането на зависимостта доза-отговор важно значение има концепцията за „дозата“, която е използвана за наличните данни. Има три основни типа „доза“ в научните изследвания: 1. въведената или външната доза; 2. вътрешната (абсорбираната) доза; 3. таргетната доза или тъканната доза. [13]

Външната доза е количеството от агента или химическото вещество, което се въвежда на експерименталното животно или човека в контролирана експериментална постановка и специфични път и честота на въвеждане. В терминологията на Смесения експертен комитет ФАО/СЗО по хранителните добавки (Joint expert committee FAO/WHO on food additives (JECFA) външната доза се означава като експозиция или прием. Външната доза или външната експозиция е често използваната мерна единица при наблюденията в епидемиологичните изследвания.

Вътрешната доза е количеството, което е в наличност в организма и може да бъде разглеждано като фракция на външната доза, което се абсорбира и навлиза в общата циркулация. То е последствие на процесите на абсорбция, разпределение, метаболизъм и екскреция на химическото вещество и може да бъде измерено в подходящи проучвания на токсикокинетиката. В епидемиологичните изследвания често се използват биомаркери на вътрешната доза (концентрация в плазмата или екскрецията с урината).

Тъканната доза е количеството, което се разпределя и е в наличност в специфична тъкан, предмет на анализ. Проучвания могат да покажат дали се отнася за изходното вещество или изходното вещество заедно с метаболитите му.

Два параметъра са определящи за дозата: честота на дозата и времетраене на дозирането. Дозирането може да бъде остро, субхронично или хронично. Дозата може да бъде изразена в различни мерни единици, включително единичната доза (mg/kg телесна маса), дневният прием (mg/kg телесна маса/ден), общото натоварване на организма (ng/kg телесна маса), осредненото натоварване за определен период от време или тъканната концентрация.

В контекста на оценката на риска „отговор“ означава ефект, който се проявява след експозиция *in vivo* или *in vitro*. Възможни са различни отговори, от ранен отговор като биохимични промени, до по-сложни ефекти като рак и дефекти на развитието.

Отговорът може да бъде адаптивен или неблагоприятен (вреден). Lewis и съавт. (2002) определят неблагоприятния ефект като „биохимична“, морфологична или физиологична промяна (в отговор на стимул, в случая с химическите вещества), която или единично, или в комбинация въздейства неблагоприятно на работата на целия организъм (тестираните видове), или намалява способността на организма да отговаря на допълнително предизвикателство на околната среда [8].

Процедурата по осигуряване на безопасността на химическите вещества в храната се базира на класическия принцип на Парацелзиус „дозата прави отровата“ (dosis sola facit venenum).

Индивидуалният отговор на организма към химическото вещество се увеличава пропорционално на експозицията (дозата). Прието е, че за повечето химически вещества съществува прагова доза, под която липсва неблагоприятен ефект. Прагът ниво на експозиция е общоприета парадигма, използвана през последните 40 години за определяне на допустимите приеми на не-генотоксичните химически вещества.

Това предполага праг за дневния прием за голямата част от химически вещества, под който не се произвежда измерима токсичност, така че може да се изчислят експозиции за човека без значителни неблагоприятни ефекти за здравето (осигуряване на безопасността).

Фигура 1. Осигуряване на безопасността



На Фигура 1 са представени основните стъпки в процедурата по осигуряване на безопасността на химическите вещества в храната, които не са генотоксични. Крайният резултат като заместител на прага е нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект (no-observed-adverse-effect level – NOAEL), което е подпрагово ниво. Нивото без наблюдаван неблагоприятен ефект или NOAEL е най-голямата концентрация или количество от веществото, установени чрез проучване, които не предизвикват установими, обикновено неблагоприятни изменения в морфологията, функционалния капацитет, растежа, развитието и продължителността на живота на съответния животински вид. Пред вид се взема най-ниската NOAEL, получена с най-чувствителния тест (критичен ефект) и с най-чувствителния животински вид. [6]

Обикновено неблагоприятните ефекти се установяват в хроничните изследвания. В някои случаи 90-дневният опит е по-чувствителен, защото при него липсват проявите на остаряването. През 2007 г. Смесеният комитет ФАО/СЗО по хранителните добавки (JECFA) взе решение да използва термина NOAEL, когато ефектът в съседната по-голяма доза е неблагоприятен. Ако ефектът не се приема за неблагоприятен, тогава се използва терминът no-effect level – NOEL. Съществуват оценки, в които не се установявани ефекти и в най-високите тествани дози. В такъв случай най-високата доза се приема за NOEL. Същият подход ще бъде използван от Комитета и за най-ниското ниво с наблюдаван ефект (lowest – effect level – LOEL) или най-ниското ниво с наблюдаван неблагоприятен ефект (lowest – observed – adverse-effect level – LOAEL). [13]

Стойността на NOAEL зависи от чувствителността на теста – колкото е по-чувствителен методът за определяне, толкова по-ниско е NOAEL. При недобър подбор на методите NOAEL е високо. Този факт стимулира изискванията към

проучванията, които се предоставят за целите на регулирането, да бъдат в съответствие с добрата лабораторна практика и с необходимите подробности за осигуряване на качеството.

NOAEL е изходната точка, от която след подходяща екстраполация се определят здравните норми за допустим прием на негенотоксичните химически вещества в храните.

Концепцията “осигуряване на безопасността” не е подходяща за генотоксичните канцерогени, поради предполагаемото наличие на риск при всички дози, даже при най-ниската – нулев риск при нулева доза.

Количествената оценка на риска с екстраполация при ниските дози осигурява оценка на риска или на честотата на проявата на ефекта, свързани с предварително определено ниво на риск. Тази оценка се използва преди всичко за безп्राговите вещества – *Фигура 2*.

**Фигура 2.** Количествена оценка на риска



Токсикологичните и епидемиологичните изследвания на зависимостта доза-отговор са използвани от специализираните комитети на ФАО/СЗО, ЕС и националната регулация в областта на безопасността на храните по три главни начина:

1. Разработване на норми за допустими нива на химическите вещества в храната като допустима дневна доза (ДДД), поносим дневен прием (ПДП), временен поносим дневен (седмичен) прием – ВПД(С)П. Методологията на ДДД определя, че приемливата доза от химическото вещество, което може да се поема ежедневно може да се изчисли като се раздели NOAEL на подходящ фактор на неопределеност (наричан често фактор за безопасност). Факторите на неопределеност са произволни и се използват, за да компенсират неопределеностите и вариабилността (вътривидова и междувидова). В случаите, когато химическите вещества се съдържат в храната неизбежно като замърсители се използва терминът поносим дневен прием (ПДП), а за тези от тях, които имат кумулативен ефект – временен поносим дневен (седмичен) прием – ВПД(С)П [12];

2. Определяне на границата на експозиция – ГНЕ (margin of exposure – MOE), която е отношението между дозата, която произвежда малък, но измерим ефект у животни или хора и оценената експозиция на хората. Този подход е използван от JECFA и EFSA за определяне на ГНЕ предимно на генотоксични канцерогени [1, 3];

3. Околичествяване на степента на риска при определено ниво на човешка експозиция. Данните могат да се използват за определяне на експозицията, която теоретично би била свързана с определено ниво на риск, например увеличение на риска от рак в рамките на човешкия живот с 1 на  $10^{-6}$

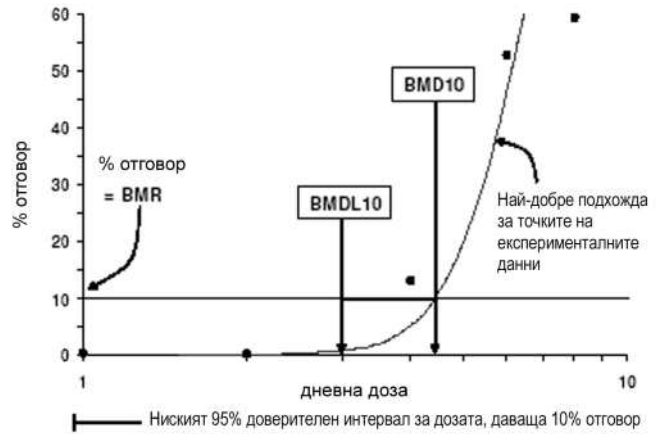
Моделирането доза-отговор може да бъде използвано да се идентифицира дозата с известно ниво на отговор при или леко под наблюдаемата поредица. Предопределеното ниво на отговор е известно като бенчмарк отговор – БМО

(benchmark response – BMR) и съответната доза – бенчмарк доза (benchmark dose – BMD). Долната граница на доверителния интервал на BMD (benchmark dose lower – BMDL) може да послужи за отправна точка при определянето на здравните параметри за допустим прием или за изчисляване на границата на експозиция – *Фигура 3* [14]. Тя се изчисляват като се раздели референтната точка (напр. BMDL10) на оценения човешки прием на даденото вещество с храната. Според Научния комитет на EFSA използването на BMD подходът е приложим за всички химически вещества в храните – добавки, замърсители, пестициди. Неговото използване е особено наложително в следните случаи: 1. при несигурност в идентифицирането на NOAEL; 2. при веществата, които са генотоксични и канцерогенни за определяне на ГНЕ (MOE) и 3. при наблюдаемите епидемиологически изследвания [2].

Научният комитет на EFSA изразява становището, че веществата, които са генотоксични и канцерогенни не трябва да бъдат одобрявани за целенасочено влагане в храната. ГНЕ трябва да се използва за случаите, когато такива вещества се срещат в храната независимо от произхода и където е необходимо указание за възможния риск за тези, които са били или са изложени на тяхното въздействие.

Интерпретацията на ГНЕ се свързва с междувидовата вариабилност, вътривидовата вариабилност, същността на канцерогенния процес и референтната точка върху кривата доза-отговор. Общо взето ГНЕ 10 000 или по-висока, ако се базира на BMDL10 в проучване върху животни, не би налагала спешни управленски действия. Това в най-голяма степен зависи от мнението на управляващите риска. Такъв размер на ГНЕ обаче не изключва предприемането на управленски мерки за намаление на експозицията на човека. Този подход за веществата, които са генотоксични и канцерогенни носи подходяща информация за управляващите риска колко близка е човешката експозиция до тази, за която се предполага, че предизвиква вреден ефект [1, 3]

**Фигура 3.** Изчисление на BMD



**Хормезис**

Интересно предизвикателство към конвенционалната оценка на риска е наличието на някои източници на риск и специално – този при ниските дози при експериментални животни, при което понякога се произвежда отговор, който е статистически по-нисък от този в нетретираните животни. Този феномен е известен като „хормезис”. Обратната ситуация също е възможна. В токсикологията хормезис е феноменът доза-отговор, характеризиран със стимулация при ниската доза, инхибиция при високата доза, което има за резултат доза-отговор с формата на J или обърнато U. Въпреки че значимостта на хормезиса остава противоречива, тя не е без биологична приемливост, защото ниската експозиция може

да служи за стимулиране на цитопротективните и хомеостатичните процеси в системата в по-висока степен от тази на прибавеното токсично въздействие. До времето, когато се установи важността на хормезиса като общ биологичен принцип, интерпретациите са спекулативни [4, 7].

За десетилетия изследванията на химическите вещества, които са ендокринни нарушители (endocrine disrupting chemicals – EDC) са предизвикателство за традиционните концепции в токсикологията, специално за догмата, че „дозата прави отровата”. „Ефекти при ниските дози” се определят като каквато и да е биологична промяна, която се случва в рамките на типичните човешки експозиции или при дози под тези, които типично се използват в стандартния протокол за тестване при токсикологичната оценка [9]. Според „хипотезата за ниската доза” много вещества, специално EDC могат да проявят ефект при ниската доза т.е. в границите на типичната човешка експозиция, който не се проявява при по-високи дози и които могат да покажат немонотонен профил доза-отговор (non-monotonic dose-response – NMDR), например форма на U или обърната U. Според хипотезата немонотонната връзка между доза и ефект не би позволила да се извърши проста монотонна екстраполация от високи към ниски дози при оценката на риска от тези химически вещества [5, 10]. Но какво следва ако предположението на Парацелзиус е грешно? Какво се случва, ако за широк и мощен клас вещества, по-ниските дози представляват по-висок риск? Растящ брой академични изследователи правят такава предположение за ендокринните нарушители, широката група синтетични химически вещества, които са в състояние да взаимодействат с клетъчните хормонални рецептори. Тези вещества, които се простират от атразин, препарат за борба с плевелите и пластификатора бисфенол А (БФА) до антибактериалния агент трихлоран и лозовият фунгицид винклозолин не играят по обичайните правила на токсикологията [4, 5].

Въпреки че за някои от съобщаваните ефекти при ниските дози се предполага, че предизвикват не-монотонна крива доза-отговор (non-monotonic dose-response curve-NMDRC) немонотонността не е синоним на „ефекти при ниските дози”. При NMDRC наклонът на кривата се променя някъде в границите на изследваните дози. При тези случаи нивата на безопасните дози, определени чрез токсикологичното тестване при високите дози не гарантира безопасността при по-ниските нетествани дози, които могат да бъдат по-близки до нивата на настоящата човешка експозиция.

Работната група на EFSA, която обсъди проблема за ниските дози в токсикологията и оценката на риска направи заключение, че всички органи трябва да бъдат обсъждани като таргетни органи за неблагоприятен ефект от EDC, тъй като хормоните могат да засегнат всички органи. Резултатите от епидемиологичните изследвания също са полезни за идентифициране на неблагоприятни ефекти при ниски дози, но причинността трудно може да бъде определена [4].

Какви експериментални доказателства биха били необходими за определяне на неблагоприятния ефект при ниските дози и немонотонните доза-отговори? Последните протоколи за токсикологично тестване могат да бъдат използвани за проучване на химическите вещества с ефекти при ниските дози и/или NMDRC. Главната промяна в стратегията за тестване е, че трябва да се тестват повече дози, за да се идентифицират такива ефекти специално в областта на ниските дози. Ако размерът на предполагаемия ефект е малък, трябва да се обсъди статистическата сила на изследването.

Изразява се становището, че най-ниската доза, която предизвиква неблагоприятен ефект не е непременно най-

подходящата. Установяването на начина на действие на химическото вещество е важно изискване за всяко решение за приложимост на даден ефект/краен резултат при избрания таргет (например, хората) [4].

Vandenbergh и сътрудници (2012) дискутират в детайли две главни концепции в изследванията на EDCs: ниски дози и немонотонност. Авторите илюстрират, че не-монотонните отговори и ефектите при ниски дози са забележително общи при изследвания на натурални хормони и EDC. Според същите автори вече не е предположение, че ниски дози на EDC въздействат върху някои човешки разстройства, тъй като епидемиологичните изследвания показват, че експозицията на EDC от околната среда са свързани с човешки болести и инвалидност [11].

## Заклучение

Оценката на риска е основен принцип в осигуряването на безопасността на храните, който е възприет в политиката на Европейския съюз и страните членки. Създаден бе Европейския орган по безопасност на храните (EFSA), който се занимава с този проблем. Характеризирането на връзката доза-отговор в изследвания върху животни и при хора е главен компонент на характеризирането на опасността и формулирането на NOAEL, BMD и границата на експозиция. Получените параметри са в основата на здравната регулация и установяването на норми за допустим прием на негенотоксичните и генотоксичните химически вещества в храните – замърсители и добавки, в рамките на Европейския съюз и на национално ниво. Характеризирането на опасността и оценката на експозицията са основата на характеризирането на риска и възможните профилактични мерки, които се предприемат от управляващите риска. Специална оценка на зависимостта доза-отговор се налага при веществата, проявяващи ефект при ниските дози и не-монотонна крива на зависимостта доза-отговор, в частност при EDC (ендокринните нарушители).

## Библиография

1. EFSA. Opinion of the scientific committee on a request from EFSA related to a harmonised approach for risk assessment of substances which are both genotoxic and carcinogenic, EFSA Journal (2005) 282, 1-31
2. EFSA. Scientific opinion. Use of the benchmark dose approach in risk assessment. Guidance of the Sci Committee. EFSA J (2009), 1150,1-72
3. EFSA. Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment, EFSA Journal 2011;9(9):2379
4. EFSA. Scientific Colloquium Series of the European Food Safety Authority, Summary Report 1, EFSA Sci Colloquium XVII, 2012, Parma, Italy
5. EFSA. Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods... EFSA Journal 2013;11(3):3132.
6. FAO/WHO. Application of risk analysis to food standards issues. Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation, Geneva, Switz, 1995, 13-17
7. European Commission. First Report on the Harmonization of Risk Assessment Procedures, Part I, 26-27 October 2000
8. Lewis, R. W., Billington, R., Debyrune, E. et al. Recognition of adverse and nonadverse effects in toxicity studies. Toxicol. Pathol. 2002, 30, 66-74
9. Melnick R, Lucier G, Wolfe M. et al., Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review, Environ Health Perspect. 2002, 110(4),427-31
10. Reiter L, DeRosa C, Kavlock R. et al., The US federal framework for research on endocrine disruptors and an analysis of research programs supported during fiscal year 1996, Environ Health Persp. 1998, 106(3):105-13
11. Vandenberg L, Colborn T, Hayes T. et al., Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocr Rev. 2012; 33(3):378-455
12. WHO Technical Report 909. Evaluation of certain food additives and contaminants. 57 report of the Joint FAO/WHO Expert Committee, 2002
13. WHO Technical Reports 947. Evaluation of certain food additives and contaminants, 68 report of the Joint FAO/WHO Expert Committee, 2007
14. WHO. Environmental Health Criteria 239. Principles for Modelling Dose-Response for the Risk Assessment of Chemicals, WHO, 2009

