МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР
ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Главного Государственного санитарного врача СССР
А. И. ЗАЙЧЕНКО
№ 4050—85 от 6. 12. 85 г.

ПОСТАНОВКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ИЗУЧЕНИЮ ХАРАКТЕРА КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ МЕРОПРИЯТИЙ

Методические рекомендации

МОСКВА, 1987 г.

gost.e-ecolog.ru

В разработке методических рекомендаций принимали участие: Свердловский НИИ гигиены труда и профзаболеваний, Институт гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР (г. Москва), 1 ММИ им. И. М. Сеченова, Всесоюзный НИИ гигиены и токсикологии пестицидов, полимеров и пластических масс, Львовский государственный медицинский институт, Криворожский НИИ гигиены труда и профзаболеваний, Новосибирский научно-исследовательский институт гигиены, Центральный институт усовершенствования врачей (ЦОЛИУВ), НИИ краевой патологии МЗК Каз ССР, Уфимский НИИ гигиены и профзаболеваний, Киевский НИИ общей и коммунальной гигиены.

Исполнители:

Кацнельсон Б. А., Неизвестнова Е. М., Давыдова В. И., Безель В. С., Балезин С. Л., Конышева Л. К.
Саноцкий И. В., Уланова И. П., Мельникова Н. Н., Тимофиевская Л. А. Румянцев Г. И., Новиков С. М.
Каган Ю. С., Светлый С. С., Сова Р. Е., Ракитский В. Н.
Штабский Б. М., Федоренко В. И., Шатинская И. Г., Маменко А. К. Нагорный П. А.
Сперанский С. В.
Рощин А. В., Казимов М. А.
Ачтабаров Б. А., Айтабаев Т. Х.
Карамова Л. М., Максимов Г. Г.
Сватков В. И., Мудрый И. В., Слободской Д. С.

I. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1.1. Настоящие методические рекомендации разработаны в дополнение к «Методическим указаниям к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны», утвержденным Главным Государственным санитарным врачем СССР П. Н. Бургасовым 4 апреля 1980 г. за № 2163—80 и должны использоваться в комплексе с другими документами, созданными в развитие тех же «Указаний», в качестве методической основы изучения и регламентации загрязнителей производственной среды по отдельным специфическим эффектам (например, раздражающее действие, аллергизирующее действие), либо по отдельным типам загрязнителей (например, для аэрозолей), либо по специальным способам оценки действия (например, морфологическим). Частные вопросы оценки комбинированного действия изложены в «Методических рекомендациях по планированию эксперимента и оценке эффекта комбинированного воздействия химических веществ при многократном воздействии» (ВНИИГИНТОКС, 06.06.77 г. за № 1738—77).

1.2. На первом этапе целесообразно поставить задачу накопления опыта и конкретных материалов изучения одновременного действия на организм бинарных комбинаций токсических веществ как непосредственно в практических целях, так и в целях развития теории комбинированного действия. Переход к изучению типов комбинированного действия трех и большего числа химических веществ должен рассматриваться как последующая задача.

1.3. В тех случаях, когда многофакторное воздействие является неизбежным результатом многокомпонентного состава используемого в производстве либо получаемого продукта (например, каменноугольные смолы и пеки, комбинированные пестициды и т. п.) или технологического выброса в производственную среду (например, сварочные аэрозоли) и когда такое многокомпонентное загрязнение среды отвечает условиям, сформулированным в п. 1.5, может оказаться необходимым специальное изучение действия на организм как всей конкретной комбинации в це-

лом, так и отдельных входящих в нее веществ (а в каких-то случаях — и их более простых комбинаций) с целью непосредственного решения задач гигиенической регламентации. В этих случаях, в зависимости от конкретных особенностей комбинации, такая регламентация может осуществляться либо по суммарной весовой концентрации, либо по ведущему (в клинике отравлений) компоненту, либо по компоненту, характеризующему источник выделения (характерному). Общие вопросы нормирования ПДК для многокомпонентных комбинаций нуждаются в разработке и данными рекомендациями не рассматриваются.

Настоящие методические рекомендации не рассматривают также особые подходы к оценке роли химического или физического взаимодействия веществ непосредственно в окружающей среде с позиций гигиено-токсикологической оценки их комбинаций (что может иметь серьезное значение, в первую очередь, для газо-аэрозольных смесей).

1.4. Наряду с исследованиями, непосредственно направленными на установление основного типа и выраженности комбинированного действия, необходимо развивать исследования, ставящие своей целью изучение его механизмов. Только на основе понимания этих механизмов в частных случаях и построения их общей классификации может развиваться теория комбинированного действия. Такая теория необходима для того, чтобы в будущем можно было значительно расширить и одновременно упростить конкретные исследования по оценке тех многочисленных комбинаций, которые характерны для современного производства. Вместе с тем, уже на данном этапе изучение механизма комбинированного действия существенно помогает в выборе тех показателей, на которые следует ориентироваться при оценке основного типа этого действия (см. п.1.9).

1.5. Первоочередному изучению характера действия на организм подлежат те комбинации веществ:

а) которые наиболее часто встречаются в различных отраслях промышленности;

б) которые даже при их наличии лишь в условиях отдельных производств воздействуют на численно значительные контингенты работающих;

в) а также комбинации промышленных и наиболее часто встречающихся бытовых химических веществ (этанол, компоненты дыма табака, препараты бытовой химии и др.).

При выборе комбинаций веществ для первоочередного изучения следует учитывать также класс токсичности и опасности каждого их них; наличие клинических данных, свидетельствующих о возможности развития профессиональной патологии смешанной химической этиологии;

имеющиеся сведения о токсикокинетике и токсикодинамике веществ, входящих в комбинацию, позволяющие предположить возможность того или иного комбинированного действия. При планировании исследований, посвященных токсикологической оценке и регламентации комбинаций из более чем 2-х компонентов наряду с перечисленными в этом параграфе соображениями следует исходить также из приоритетности смесей постоянного состава.

1.6. В соответствии с рекомендациями Комитета экспертов ВОЗ (1981) принимаются в качестве основных следующие определения типов комбинированного действия:

а) аддитивное действие — такой тип комбинированного действия химических веществ, при котором их совместный эффект равен сумме эффектов каждого из веществ при изолированном воздействии на организм;

б) более чем аддитивное действие (потенцирование) — такой тип комбинированного действия, при котором совместный его эффект превышает сумму эффектов каждого из веществ, входящих в комбинацию, при их изолированном воздействии на организм;

в) менее чем аддитивное (антагонизм) — такой тип комбинированного действия, при котором совместный эффект меньше суммы эффектов каждого из веществ, входящих в комбинацию, при их изолированном действии на организм.

Показателем типа и выраженности комбинированного действия может служить отношение наблюдаемого эффекта к эффекту, теоретически ожидаемому при аддитивном типе действия. Всюду, где это допускается применяемым методом математической обработки результатов, должна проводиться оценка статистической значимости отличия рассматриваемого отношения от 1,0; при обнаружении эффекта комбинированного действия, для которого это отношение значимо более или менее, чем 1,0, речь идет, соответственно, о потенцировании или антагонизме. Конкретное численное значение этого отношения учитывается при определении подходов к гигиенической оценке производственной среды, загрязненной данной комбинацией токсических веществ (особенно в случае потенцирования).

1.7. Наряду с определением аддитивности, приведенным в п.1.6, в современной токсикологии широко исполь зуется также другое понятие, основанное на предположении, что при однонаправленном действии смесь ведет себя как одно вещество. С этих позиций аддитивное действие определяется как такой тип комбинированного действия, при котором отдельные компоненты смеси являются взаимозаменяемыми в пропорциональных частях их изоэффективных доз. В этом случае в уравнении:

$$\left(\frac{C_1}{M_1}+\frac{C_2}{M_2}+\ldots+\frac{C_n}{M_n}\right)\cdot K=1$$

где C_1, $C_2 \ldots C_n$ — дозы или концентрации компонентов смеси,

M_1, $M_2 \ldots M_n$ — их изоэффективные дозы или концентрации при изолированном воздействии;

(например, соответствующие LD_{50}), коэффициент K принимается равным 1,0, т. е. эффект действия смеси равен эффекту, наблюдаемому при изолированном воздействии компонентов в соответствующих изоэффективных дозах или концентрациях.

Действию, более чем аддитивному (потенцированию) соответствует значение коэффициента $K > 1{,}0$; действию менее чем аддитивному (антагонизму) — значение $K < 1{,}0$. Сказанное в п.1.6 об оценке статистической значимости и величины отношения эффектов полностью применимо и к оценке рассматриваемого коэффициента, который в данном случае является мерой отличия наблюдаемого типа действия от аддитивного.

Приведенные в этом параграфе формулировки используются при оценке типа комбинированного действия на основе его сопоставления с изолированным действием компонентов смеси в изоэффективных дозах или концентрациях (см. напр. п.2.6.1, 2.8.3 и приложение 1,2 и 4). Формулировки, приведенные в п.1.6, используются в тех случаях, когда проводится сопоставление эффектов изолированного и комбинированного действия при одном соотношении компонентов смеси (см. напр. п.2.8.5 и приложение 3). В тех случаях, когда экспериментальный материал допускает анализ математическими методами, основанными на обоих существующих понятиях аддитивности, рекомендуется проводить такой анализ с целью более углубленной оценки изучаемой комбинации, а также накопления данных для последующих обобщений.

1.8. Под комбинированным принято понимать не только одновременное, но и последовательное действие на организм двух или большего числа токсических веществ. Для этого варианта комбинированного действия существенную роль играет длительность временных интервалов между последовательными экспозициями в сопоставлении с длительностью тех циклических фаз, через которые обычно протекает реакция организма на однократное воздействие токсического вещества, причем как длительность, так и выраженность таких фазовых сдвигов зависят от силы воздействия. Поэтому при различных временных и силовых соотношениях между последовательно воздействующими ве-

ществами тип комбинированного действия может меняться. Это обстоятельство требует специального планирования исследований и обоснования не только выбираемого соотношения доз, но и интервалов между воздействиями с учетом как моделируемых гигиенических ситуаций, так и фазовости реагирования, которая к тому же может иметь существенные межвидовые различия. Следует, в частности, иметь в виду, что в реальных ситуациях разрыв во времени между последовательными токсическими воздействиями может измеряться как часами или даже минутами (например, на разных стадиях технологического процесса), так и неделями и даже месяцами (сезонная работа с ядохимикатами) при весьма вариирующей продолжительности каждого из воздействий.

Детальная методическая разработка соответствующих экспериментальных подходов и моделей требует дальнейшего развития исследований в этой области и данными рекомендациями не предусматривается.

1.9. Накопленный опыт изучения одновременного комбинированного действия токсических веществ свидетельствует о том, что тип этого действия может оказаться различным:

а) на разных уровнях токсического действия (острое летальное и пороговое, подострое, хроническое);

б) при разных количественных соотношениях между компонентами, входящими в изучаемую комбинацию;

в) в зависимости от того, на какие показатели токсического эффекта ориентируется исследователь даже при одном и том же уровне действия.

Поэтому для решения вопросов гигиенического нормирования целесообразно ввести понятие о б о с н о в н о м, или определяющем типе комбинированного действия. Делая вывод о том, какой из наблюдавшихся типов действия может быть принят в качестве основного, следует учитывать:

а) преимущественное значение того типа действия, который характерен для концентраций или доз, вызывающих хроническую интоксикацию, а при острой интоксикации — для доз, близких к пороговым;

б) в тех случаях, когда рассматриваемая комбинация встречается в реальных условиях промышленности лишь при узком диапазоне соотношений между компонентами (подобная ситуация характерна также для комбинированного действия промышленных химических соединений и некоторых бытовых химических факторов — этанола, факторов курения, косметических препаратов, пищевых добавок и т. д.)— преимущественное значение типа действия, характерного для этого диапазона;

в) в тех случаях, когда на основании изучения механизмов комбинированного действия (роли тех или иных эффектов на уровне ферментных систем; значения количественных изменений распределения яда внутри организма с изменением накопления в «критических органах», а также изменений кинетики метаболизма и элиминации яда; роли сдвигов адаптационно-компенсаторного характера со стороны регуляторных систем и т. п.) или на основании анализа клинических данных удается выделить те органы и системы, реагирование которых в наибольшей степени вовлечено в поражение организма при комбинированном действии — преимущественное значение того типа действия, который преобладает по сдвигам, относящимся к органам и системам;

г) в тех случаях, когда для изучаемых веществ характерны те или иные патогномоничные признаки интоксикации или выраженная специфичность действия (в особенности, когда на основании именно последней были установлены стандарты ПДК или ОБУВ для этих веществ) — преимущественное значение того типа действия, который выявляется по соответствующим показателям;

д) особое значение того типа действия, которое выявляется по так называемым отдаленным эффектам; в частности, следует уделить внимание выявлению ко-канцерогенного или ко-мутагенного влияния веществ, входящих в комбинацию с химическими канцерогенами и мутагенами, в том числе бытовыми химическими факторами (например, компонентами дыма табака).

1.10. При обосновании подходов к гигиенической регламентации изученной комбинации вредных веществ по их содержанию в воздухе рабочей зоны следует исходить из выбранного в соответствии с рекомендациями пункта 1.9 о с н о в н о г о типа комбинированного действия. При этом:

1.10.1. В случае аддитивного действия представляются материалы к апробации на Секцию токсикологии Проблемной комиссии «Научные основы гигиены труда и профпатологии» с последующим утверждением Главным Государственным санитарным врачом СССР специального определения об отнесении рассматриваемой комбинации веществ к числу тех, на которые распространяются действие параграфа 2.2 ГОСТ ССБТ «Воздух рабочей зоны. Общие санитарно-гигиенические требования», регламентирующего условия соблюдения стандарта ПДК для комбинации «веществ однонаправленного действия».

1.10.2. В случае доказанного в эксперименте эффекта потенцирования необходима организация тщательного клинико-гигиенического наблюдения за производственной сре-

дой и состоянием здоровья работающих для подтверждения такого потенцирования, а возможно — и планирование дополнительных экспериментов для более надежной количественной оценки степени этого потенцирования, с тем чтобы на основании результатов всех этих исследований могло быть принято решение о внесении для данной комбинации соответствующего корректива в формулу параграфа 2.2 вышеуказанного ГОСТ. Вопрос о целесообразности принятия временного решения по регламентации как для случая аддитивного действия (т. е. в соответствии с изложенным в п.1.10.1) должен быть рассмотрен специально в каждом конкретном случае.

1.10.3. В случае антагонизма после соответствующей апробации материалов исследования вышеуказанная Секция информирует через журнал «Гигиена труда и профессиональные заболевания» или непосредственно заинтересованные предприятия и органы контроля о том, что на рассматриваемую комбинацию распространяется действие параграфа 2.3 того же ГОСТ, устанавливающего, что для «веществ, не обладающих однонаправленным действием, ПДК остаются такими же, как и при изолированном воздействии».

1.11. При обосновании токсикологического прогноза характера и степени нарушений здоровья работающих в условиях комбинированного токсического воздействия следует не только исходить из выбранного основного типа действия, но и учитывать иные типы действия, если они выявлены по отношению к определенным органам и системам. Так, например, ослабление отдельных проявлений интоксикации в результате выявленного по ним антагонистического характера эффекта (при основном аддитивном действии или даже потенцировании) может смазать типичную картину той или иной интоксикации, изменить отношение клинициста к диагностической ценности указанных проявлений, повлиять на его лечебную тактику и т. д.

2. ПЛАНИРОВАНИЕ И ПРОВЕДЕНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Эксперименты, посвященные изучению комбинированного действия веществ, следует планировать таким образом, чтобы на определенных этапах исследования мог быть решен вопрос о целесообразности его дальнейшего развития. Основные этапы предполагают:

I. Исследование при однократном воздействии на уровне как смертельных, так и пороговых доз или концентраций.

II. Исследование характера действия изучаемой комбинации в подостром эксперименте.

III. Исследование характера действия изучаемой комбинации в хроническом эксперименте.

IV. Проведение в случае необходимости специальных дополнительных исследований (на тех или иных уровнях воздействия), направленных на выяснение токсикодинамических и токсикокинетических механизмов комбинированного действия.

Как правило, исследования, соответствующие этапам III и IV, являются необходимыми лишь в тех случаях, когда на предыдущих этапах обнаружен эффект более аддитивного (при всех или хотя бы при некоторых соотношениях между компонентами). Однако, в случаях, имеющих особо важное значение с позиций гигиенической регламентации (см. п. 1.5), они могут быть проведены и при обнаружении на первых этапах лишь аддитивного типа действия. Чаще всего нецелесообразно переходить к последующим этапам при обнаружении на первом этапе явного антагонизма (при любых соотношениях между компонентами).

2.2. Условия проведения исследований должны соответствовать требованиям «Методических указаний к постановке исследований для обоснования стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны», упоминаемых в п. 1.1.

2.3. Принимая во внимание вариабельность биологических эффектов, обусловленную неуправляемыми факторами и приводящую не только к межлабораторным, но и к внутрилабораторным различиям токсикометрических параметров одного и того же вещества, следует опасаться того, что такие различия окажутся более значительными, чем те или иные изменения этих параметров, обусловленные комбинированным действием. Поэтому независимо от степени предварительной изученности токсического действия отдельных компонентов изучаемой комбинации, эксперименты с ними должны обязательно проводиться **параллельно** с соответствующим этапом экспериментального изучения действия комбинации.

2.4. Ингаляционный способ воздействия на организм является обязательным на этапе III. На этапе I и II допустимо (а при работе с нелетучими веществами — и наиболее целесообразно) использовать внутрижелудочное или парентеральное введение. В тех случаях, когда в производственных условиях серьезное значение может иметь проникновение компонентов изучаемой комбинации через кожу, этот путь воздействия также должен служить предметом экспериментального моделирования (главным обра-

зом, на этапе 1). Выбор способа введения при специальном изучении механизмов комбинированного действия (этап IV) диктуется конкретными задачами такого исследования.

2.5. Как правило, эксперименты по изучению характера комбинированного действия могут проводиться на тех же видах животных, которые регламентируются методическими указаниями, упомянутыми в п. 2.2, причем для комбинации веществ, ранее хорошо изученных, можно ограничиться на всех этапах одним видом, отличающимся наибольшей чувствительностью к действию наиболее опасного компонента. Однако, в тех случаях, когда анализ механизмов комбинированного действия указывает на его зависимость от тех или иных функциональных или метаболических особенностей определенного вида животных, заведомо не присущих либо существенно менее свойственных человеческому организму, вопрос о выборе биологического вида для наиболее адекватного экспериментального моделирования комбинированного действия должен рассматриваться специально с учетом указанных особенностей.

2.6. Основной целью этапа 1 является предварительное ориентирование в характере комбинированного действия изучаемой комбинации с определением потенциально наиболее опасного количественного соотношения компонентов.

2.6.1. При выборе соотношения доз (концентраций) для количественной оценки летального эффекта изучаемой комбинации следует исходить из характера ранее изученной зависимости «доза-эффект» при изолированном действии компонентов, а также учитывать данные о типах и механизмах комбинированного действия ранее изученных структурно близких к ним соединений.

В случае равенства углов наклона прямых «доза-эффект» число изучаемых соотношений может быть ограниченным, и, в частности, близким к LD_{50} для каждого вещества при изолированном воздействии, а для математического анализа типа действия может применяться метод Финни либо тот или иной из его вариантов, предлагавшихся различными авторами, например, по Ю. С. Кагану (см. приложение 1).

В случае неравенства углов наклона прямых «доза-эффект» для компонентов, входящих в комбинацию, а также при отсутствии соответствующей предварительной информации, исследование должно охватить весь диапазон соотношений между компонентами с предпочтительным использованием для математического анализа метода изоболограмм Леве либо множественного регрессионного анализа (см. приложение 1). Первый из названных методов реко-

мендуется использовать в модификации, предложенной Н. Н. Мельниковой и Л. А. Тимофиевской (см. приложение 2) с вероятностной оценкой зоны аддитивности.

Для успешного применения множественного регрессионного анализа важное значение имеет выбор уровней воздействия компонентов. С этой целью рекомендуется использование методов математического планирования экспериментов, излагаемых в руководствах по математической статистике, а также в приложении 5.

При анализе результатов экспериментов в соответствии с определениями, приведенными в п. 1.6, оценка статистической значимости отличия наблюдаемого эффекта комбинированного действия от ожидаемого в случае аддитивности может производиться с помощью критерия хи-квадрат. При постоянном количественном соотношении компонентов изучаемой комбинации выявление и анализ зависимостей «доза (концентрация)-эффект» и «время-эффект» с оценкой соответствующих среднесмертельных величин и индекса кумуляции могут быть проведены также по способу ,предложенному Б. М. Штабским и соавт. (приложение 3).

2.6.2. Метод болограмм в модификации Н. Н. Мельниковой и Л. А. Тимофиевской может быть рекомендован также для планирования и математического анализа результатов эксперимента на уровне порогов острого действия, что позволит, в частности, определить на этом уровне то соотношение концентраций (доз) изучаемых веществ, при котором эффект комбинированного действия в наибольшей степени превышает аддитивный при статистически значимом отличии от него с учетом зоны аддитивности и коэффициента усиления. Это соотношение может рассматриваться как потенциально наиболее опасное.

2.6.3. Наряду с этим, в определенных случаях порог острого действия изучаемой комбинации может находиться в экспериментах при однократном воздействии 3—4 концентраций (доз) этой комбинации при фиксированном соотношении компонентов, причем параллельно определяются пороги острого действия для входящих в комбинацию веществ при их изолированном воздействии. Каждому из этих порогов дается вероятностная оценка в соответствии с рекомендациями методических указаний, упомянутых в п. 2.2, причем статистически значимое отличие величины Lim_{ac} вещества, воздействующего в комбинации с другими, от соответствующего параметра, определенного по тому же самому функциональному показателю при изолированном воздействии, свидетельствует о соответствующем типе комбинированного действия.

Для оценки типа комбинированного действия на уровне

Lim_{ac} может быть использован также тот подход, который предложен ниже для соответствующей оценки на уровне Lim_{ch} (см. п.2.8.3).

Следует учитывать, что этот тип может оказаться различным, в зависимости от того, по каким показателям интоксикации определяется величина порога. Подход к подобным случаям с позиций оценки определяющего типа комбинированного действия изложен в п.1.9.

Указанное выше фиксированное соотношение должно соответствовать тому, которое наблюдается в производственных условиях (в тех случаях, когда изучаемая комбинация характерна лишь для определенного технологического процесса или связана с применением смесей постоянного состава). В других случаях оно может быть выбрано как наиболее опасное (по формулировке п.2.6.2) при болографическом анализе данных экспериментов на летальном уровне. Наряду с этим в качестве определенного уровня сравнения рекомендуется всегда испытывать действие комбинации, в которую все компоненты входят в равных долях от соответствующих величин LD_{50} (при изолированном действии).

2.6.4. При наличии предварительно найденной линейной зависимости тех или иных биологических эффектов, используемых для нахождения порога острого действия, от воздействующих доз (концентраций) или от их логарифмов, может проводиться сравнительный анализ таких зависимостей для комбинации (при фиксированном или при различных соотношениях компонентов) и для отдельных компонентов в соответствии с приложением 4.

2.7. Основной целью этапа II является сопоставление кумулятивной способности изучаемой комбинации по летальному или пороговому эффекту) с кумулятивной способностью входящих в нее веществ при их изолированном подостром воздействии на организм. Коэффициенты кумуляции определяются одним из широко распространенных методов при ежедневном введении комбинации (с выбранным соотношением компонентов) и изолированных веществ в дозах, равных определенным долям от соответствующих LD_{50} либо ED_{50}.

Поскольку величина LD_{50} (ED_{50}) как при разовом, так и при повторных введениях вещества определяется со значением ее статистической ошибки, постольку ошибка коэффициента кумуляции может быть оценена как ошибка отношения по формуле:

$$S_{\bar{z}} = \pm \bar{Z} \sqrt{\left(\frac{S_{\bar{x}}}{\bar{x}}\right)^2 + \left(\frac{S_{\bar{y}}}{\bar{y}}\right)^2}.$$

где $\bar{Z}$ — величина отношения (в данном случае — коэффициент кумуляции);

$S_{\bar{z}}$ — его ошибка;

$\bar{x}$, $\bar{y}$ — величины, отношение которых равно $\bar{z}$ (т. е. в данном случае LD_{50} или ED_{50} при однократном и повторном введениях);

$S_{\bar{x}}$, $S_{\bar{y}}$ — соответствующие ошибки этих величин.

Таким образом, легко может быть оценена статистическая значимость разности между значениями коэффициента кумуляции при изолированном введении данного вещества и при его введении в комбинации с другими.

Одновременно на этом этапе, а в ряде случаев уже на I этапе исследования (т. е. при однократном введении доз, близких к пороговым) желательно получить данные о материальной кумуляции и метаболизме изучаемых веществ при их изолированном и комбинированном воздействии. Это может служить одной из предпосылок к проведению исследований на этапах III и IV.

2.8. Основной целью этапа III является проверка того, сохраняется ли на уровне концентраций, оказывающих вредное действие на организм лишь при хроническом ингаляционном поступлении, тот основной тип комбинированного действия, который был выявлен в исследованиях на уровне пороговых доз (концентраций) при однократном воздействии. Решение вопроса о проведении хронического эксперимента принимается с учетом рекомендаций п.2.1. На этом этапе также желательно получение данных о материальной кумуляции и метаболизме; возможно сочетание данного этапа с этапом IV.

2.8.1. Соотношение концентраций комбинируемых веществ для хронического эксперимента выбирается с учетом тех же соображений, которые рекомендованы для выбора фиксированных соотношений при определении порога острого действия комбинации (см. п.2.6.3). Учитывая трудоемкость хронического эксперимента, параллельное исследование действия различных соотношений одной и той же комбинации при нескольких ее концентрациях не представляется в большинстве случаев реальным.

2.8.2. Абсолютные значения концентраций каждого компонента, входящего в комбинацию, а также при параллельно исследуемом изолированном действии этого же вещества, должны подбираться с учетом предварительной токсикометрической информации таким образом, чтобы минимальные из этих концентраций были близки к пороговым при изолированном хроническом действии, а второй уровень соответствовал отчетливо действующему в тех же

условиях. Как правило, нецелесообразно заведомо ориентироваться только на концентрации, не действующие в хроническом эксперименте, например, на соответствующие надежно установленным ПДК, поскольку даже при эффекте более аддитивного (но с коэффициентом усиления, не превыщающем коэффициент запаса, принятый при установлении этих ПДК) комбинация изучаемых веществ может оказаться недействующей. Вместе с тем в качестве третьего уровня изучаемого воздействия недействующие концентрации могут оказаться полезными, повышая обоснованность суждения о пороге хронического действия комбинации.

2.8.3. Учитывая необходимую ограниченность уровней и соотношения воздействий, изучаемых на этом уровне, оказываются практически нереальными почти все методы математического анализа комбинированного действия, рекомендуемые для случая острого токсического действия. Однако возможно сопоставление оцененных в хроническом эксперименте пороговых концентраций веществ при их изолированном и комбинированном действии. Так, если C_1 и C_2 — концентрации двух веществ в комбинации при ее пороговом эффекте, а Lim_{ch_1} и Lim_{ch_2} — пороговые концентрации тех же веществ при изолированном действии, то аддитивному действию соответствует уравнение:

$$\frac{C_1}{\mathrm{Lim}_{ch_1}} + \frac{C_2}{\mathrm{Lim}_{ch_2}} = 1,$$

а величину $K = \dfrac{1}{\dfrac{C_1}{\mathrm{Lim}_{ch_1}} + \dfrac{C_2}{\mathrm{Lim}_{ch_2}}}$

можно принять в качестве коэффициента комбинированного действия (см. п.1.8).

При $K = 1$ действие является аддитивным; при $K > 1$ — более, чем аддитивным; при $K < 1$ — менее, чем аддитивным.

Вместе с тем, практическая невозможность в большинстве случаев оценить статистическую значимость отличия от 1,0 полученного в эксперименте значения K делает подобные выводы лишь ориентировочными. Их надежность существенно повышается и они могут быть приняты в качестве основы предложений по регламентации в тех случаях, когда тот же тип комбинированного эффекта, но с более достоверной математической оценкой был получен на уровне порогов острого действия. Вместе с тем накопленный опыт не позволяет утверждать, что характер комбинированного эффекта в ряде случаев не может оказаться су-

щественно различным на рассматриваемых пороговых уровнях (Lim_{ac} и Lim_{ch}). Данный принципиально важный вопрос нуждается в дальнейшем тщательном изучении.

2.8.4. При наличии хотя бы у одного из входящих в комбинацию токсических веществ выраженной специфичности действия следует особое внимание уделить оценке значения Lim_{ch} по показателям, характерующим это действие. Следует иметь в виду, что как и на уровне порогов острого действия, комбинированный эффект нередко имеет различный тип при оценке его по показателям, характеризующим состояние разных органов и систем. Подход к подобным случаям с позиций оценки определяющего типа комбинированного действия изложен в п.1.9.

2.8.5. Наряду с попыткой математической оценки типа комбинированного действия по соотношению значений Lim_{ch} (см. п.2.8.3), при анализе результатов хронических экспериментов важную роль играет прямое количественное сопоставление среднегрупповых сдвигов отдельных функциональных, морфологических и биохимических показателей интоксикации — в особенности в тех случаях, когда соответствующие ее проявления специфичны для одного из компонентов, но оказываются усиленными либо ослабленными при его действии в комбинации с другими.

При отсутствии строгой специфичности рассматриваемого эффекта для только одного из веществ вопрос о типе комбинированного действия может быть решен с помощью методов дисперсионного анализа, изложенных в руководствах по математической статистике, а также в «Методических рекомендациях по планированию эксперимента и оценке эффекта комбинированного действия химических веществ при многократном воздействии», подготовленных ВНИИГИНТОКС и утвержденных МЗ СССР 06.06.77 за № 1738—77.

Наконец, для оценки типа комбинированного действия в хронических экспериментах особое значение имеет усиленная разработка диагностических подходов, упоминаемых ниже (п. 2.10).

2.9. Исследования, условно выделенные в этап IV, в зависимости от их назначения могут проводиться на разных уровнях воздействия яда (остром летальном, остром пороговом, хроническом) и на различных уровнях биологической организации от субклеточного до организменного. Общей целью этих исследований является выявление тех механизмов, которые лежат в основе того или иного типа комбинированного действия (в первую очередь — действия, отличного от аддитивного) для развития теоретической базы, которая позволит в дальнейшем более надежно прог-

нозировать тип действия новых комбинаций и рациональнее планировать их экспериментальное изучение (см. п.1.4). Кроме того, понимание причин того или иного типа действия непосредственно изучаемой комбинации делает более обоснованной оценку результатов экспериментов на этапах I—III (см. п.1.9—в).

Исследования, относящиеся к этапу IV, могут как сочетаться с проведением токсикометрических экспериментов, рассмотренных выше, так и планироваться самостоятельно. Характер этих исследований определяется в зависимости от типа токсических веществ, входящих в комбинацию, и имеющейся информации о механизмах их действия. Как свидетельствует накопленный опыт, особого внимания заслуживают следующие подходы:

2.9.1. Изучение влияния одних компонентов смеси на метаболизм других как важнейший путь исследования механизма комбинированного действия органических соединений на организм и основа построения общей теории этого действия. Эти исследования должны предусматривать как регистрацию уровня накопления и элиминации метаболитов, так и оценку активности ферментных систем, обеспечивающих биотрансформацию компонентов изучаемой комбинации. В частности, важное значение имеет исследование активности микросомальных монооксигеназ (для липотропных веществ), реакций конъюгации и механизмов антирадикальной защиты.

В связи с тем, что в зависимости от концентрации и времени воздействия могут изменяться пути метаболизма ядов, распределение между тканями и скорость выведения метаболитов, указанные исследования следует проводить в широком временном интервале с охватом достаточно большого диапазона действующих доз или концентраций (от летальных до пороговых), стремясь к получению зависимостей типа «доза-время-эффект» для показателей биотрансформации изучаемых веществ как при обособленном, так и при комбинированном их действии.

2.9.2. Изучение возможности взаимного или одностороннего влияния веществ, входящих в комбинацию,также на другие ообенности их токсикокинетики (поступление, задержку, распределение и элиминацию из организма), особенно для токсических веществ с выраженной способностью к материальной кумуляции (тяжелые металлы, фтор, мышьяк и др. токсические элементы). Существенную роль в анализе этого механизма играет математическое описание токсикокинетических процессов, например, с помощью разгрузочных (одно- и мультиэкспоненциальных) функций, характеризующих клиренс вещества из крови,

а также путем построения «камерных» («частевых») моделей для каждого из веществ, входящих в комбинацию, при изолированном и комбинированном поступлении в организм с сопоставлением констант соответствующих моделей.

Задача идентификации параметров линейной «камерной» модели с одновременной их статистической оценкой может быть решена последовательным применением метода случайного поиска и метода последовательных приближений Гаусса-Ньютона. Универсальная программа «COMPAR» для решения этой задачи с помощью ЭВМ разработана Институтом экологии растений и животных Уральского отделения АН СССР (г. Свердловск).

Для получения экспериментальных данных, лежащих в основе такого моделирования, важнейшим методическим приемом является использование меченых соединений, вводимых однократно либо интактным животным (при изолированном или комбинированном введении), либо на фоне развившейся подострой или хронической интоксикации тем же веществом, вторым компонентом комбинации и всей комбинацией веществ, причем исследования на всех этих группах должны проводиться параллельно. При наличии радиометрического спектрометра кинетика обеих радиоактивных меток может изучаться одновременно. Могут использоваться также высокочувствительные физико-химические методы идентификации изучаемых веществ и их метаболитов в тканях и выделениях.

Выбор структуры камерной модели определяется рядом специальных соображений, не рассматриваемых данным документом. Однако, необходимо стремиться к выделению в отдельные «камеры»: (а) основного органа-накопителя веществ, входящих в комбинацию; (б) органов-мишеней токсического действия: (в) тех органов и тканей, по которым получены экспериментальные данные, свидетельствующие об изменении кинетики в результате комбинированного действия.

При получении данных, свидетельствующих о существенном изменении токсикокинетики в результате комбинированного действия, целесообразно планировать углубленное изучение того влияния на определенные органы, ткани или процессы в организме, которое в свою очередь является причиной указанного изменения (например, на тканевую проницаемость, лигандные характеристики плазменных и тканевых белков, функцию выделительных органов, морфогенез и инволюцию депонирующих тканей и. т. д.) либо его предполагаемым следствием.

2.9.3. В том случае, если хотя бы одно из веществ, входящих в комбинацию, присутствует в аэрозольной форме,

особенно — при умеренной или низкой растворимости аэрозольных частиц, следует уделить внимание влиянию комбинированного действия на физиологические механизмы, обусловливающие задержку этих частиц в легких и их транслокацию в желудочно-кишечный тракт(альвеолярный фагоцитоз, мукоцилиарный транспорт), а в случае значительного усиления такой транслокации — специальному анализу ее значения с позиций так называемого комплексного действия веществ.

2.9.4. Анализ физиологических и патофизиологических механизмов комбинированного действия на организменном уровне с позиций таких обобщающих концепций, как ОАС, СНПС и т. п., с соответствующей постановкой специальных экспериментов. Близкий смысл имеют исследования, посвященные выявлению роли изменения реагирования нейро-эндокринных регулирующих систем (например, фармакодинамический анализ роли холинэргических и адренергических рецепторов в развитии того или иного типа комбинированного действия по летальному или острому пороговому эффекту; анализ состояния системы адаптивных гормонов, простагландинов и т. п.).

2.10. К перспективным направлениям исследований по проблеме комбинированного действия, разрабатываемым в настоящее время в связи с развитием общей методологии гигиенической регламентации токсических веществ в окружающей среде, следует отнести поиск формализованных способов разграничения (с использованием тех или иных интегральных критериев, а также на основе дискриминантного анализа и др.) состояния нормы, различных степеней патологии и состояний на грани нормы и патологии с целью построения и анализа зависимостей типа «доза (концентрация) — состояние». Сопоставление таких зависимостей для изучаемых комбинаций веществ и для тех же веществ при изолированном воздействии повысит гигиеническую значимость оценки типа комбинированного действия, особенно в хронических экспериментах на уровнях, близких к пороговым.

МЕТОДЫ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ХАРАКТЕРА КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ В ОСТРЫХ ОПЫТАХ

Метод Финни

Данный метод применим для оценки комбинированного действия смесей веществ, обладающих так называемым простым подобным действием. Предполагается, что компоненты смеси воздействуют сходным образом на одну и ту же биологическую систему. В этом случае наклоны прямых доза-эффект в координатах «пробит-логарифм дозы» для изолированного и комбинированного действия веществ должны быть одинаковыми.

В предварительных исследованиях при помощи метода наименьших квадратов или графическим способом выявляется зависимость летальности от уровней воздействия отдельных компонентов. Данная зависимость выражается для 1-го и 2-го компонентов уравнениями прямой линии:

$$y = a_1 + b\lg C_1 \quad \text{и}$$

$$y = a_2 + b\lg C_2$$

где $У$ — величина эффекта в пробитах;

C_1 и C_2 — дозы или концентрации 1-го и 2-го вещества.

При использовании графического метода коэффициенты «*a*» и «*b*» могут быть оценены по формуле:

$$b = \frac{2}{\lg LD_{84} - \lg LD_{16}}; \qquad a = 5 - \lg LD_{50}$$

Более точным является расчет коэффициентов уравнения при помощи метода наименьших квадратов. Для этого проводится вычисление ряда вспомогательных величин:

$$S_{xx} = S_{n\omega x^2} - \frac{(S_{n\omega x})^2}{S_{n\omega}};$$

$$S_{xy} = S_{n\omega xy} - \frac{S_{n\omega y} - S_{n\cdot\omega x}}{S_{n\cdot\omega}},$$

где S — знак суммы;

x — логарифм дозы;

w — весовой коэффициент (см. Бессмертный Б. С.);

n — число животных в группе.

При помощи найденных величин рассчитываются коэффициенты уравнения:

$$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}; \quad a = \frac{S_{n\omega y} - bS_{n\omega x}}{S_{n\omega}},$$

а также среднеквадратические ошибки: для любой дозы ($x_к$):

$$m(x_к) = \frac{1}{b}\sqrt{\frac{1}{S_{n\omega}} + \frac{(x_к - \bar{x})^2}{S_{xx}}},$$

для эффекта:

$$m(y) = \sqrt{\frac{1}{S_{n\omega}} + \frac{(x_к - \bar{x})^2}{S_{xx}}},$$

для коэффициента регрессии:

$$m(b) = \sqrt{\frac{1}{S_{xx}}}.$$

Расчет доверительных границ проводится с применением критерия Стьюдента при (Σn_i—1) степенях свободы.

После того как получены уравнения регрессии для изолированного и комбинированного действия компонентов вычисляют относительную эффективность веществ:

$$\lg \rho = \frac{a_2 - a_1}{b}.$$

Теперь дозы второго вещества в смеси можно легко перевести в эквивалентные дозы первого компонента. При аддитивности ожидаемый комбинированный эффект будет равен:

$$y_т = a_1 + b\lg\ (C_1 + C_2\rho),$$

или если представить дозы компонентов в виде величин:

$$P_1 = \frac{C_1}{C_1 + C_2}; \quad P_2 = \frac{C_2}{C_1 + C_2};$$

$$\text{то } y_т = a_1 + b\lg(P_1 + P_2\rho) + b\lg(C_1 + C_2).$$

Мерой отклонения от аддитивности является показатель:

$$M_э = \frac{a_э - a_1}{b} - \lg(P_1 + P_2\rho) = \frac{a_э - a_1}{b} - \lg\frac{C_1 + C_2\rho}{C_1 + C_2},$$

где $a_э$ — коэффициент в уравнении комбинированного действия.

Среднеквадратическая ошибка данной величины оценивается по формуле:

$$m = \frac{1}{b}\sqrt{\frac{\lambda^2}{{}_1S_{n\omega}} + \frac{(1-\lambda)^2}{{}_2S_{n\omega}} + \frac{1}{{}_3S_{n\omega}} + \frac{\{\lambda\bar{y}_1 + (1-\lambda)\bar{y}_2 - \bar{y}_3\}^2}{b^2 \Sigma S_{xx}}},$$

где $\lambda = \frac{P_1}{P_1 + P_2\rho} = \frac{C_1}{C_1 + C_2\rho}$, ${}_1S_{n\omega}$, ${}_2S_{n\omega}$, ${}_3S_{n\omega}$ —

суммы, полученные при обработке данных изолированного и комбинированного действия;

$\bar{y}_1$, $\bar{y}_2$, $\bar{y}_3$ — средние величины эффектов при изолированном и комбинированном воздействии компонентов.

Для оценки типа комбинированного действия смесей только на одном фиксированном уровне (чаще всего на уровне 50% летальности) Финни предложено использовать уравнение:

$$\frac{1}{M_3} = \frac{P_1}{M_1} + \frac{P_2\rho}{M_1},$$

где M_1, M_2 и M_3 — изоэффективные дозы (например, LD_{50}) при изолированном воздействии 1-го и 2-го веществ и их комбинации. В этом случае также должно выполняться требование параллельности прямых доза-эффект при изолированном воздействии компонентов, однако линия регрессии для смеси может быть и непараллельна им. При соблюдении данного условия равные доли от изоэффективных доз компонентов являются изоэффективными, поэтому мерой относительной активности может служить величина:

$$\rho = \frac{M_1}{M_2}.$$

Отсюда при аддитивности должно выполняться равенство:

$$\frac{1}{M_3} = \frac{P_1}{M_1} + \frac{P_2}{M_2} \text{ или } \frac{C_1 + C_2}{M_3} = \frac{C_1}{M_1} + \frac{C_2}{M_2}.$$

Мерой отклонения от аддитивности является величина:

$$Q = P \cdot M_3, \text{ где } P = \frac{P_1}{M_1} + \frac{P_2}{M_2}.$$

при $Q = 1$ действие является аддитивным, при $Q > 1$— менее чем аддитивным, при $Q < 1$— более чем аддитивным. Для ориентировочной оценки типа комбинированного действия принято считать, что аддитивность имеет место при значении Q от 0,8 до 1,5.

Более точная оценка достоверности коэффициента Q проводится путем расчета среднеквадратической ошибки для среднесмертельной дозы смеси (m_3) и для величины P:

$$m_{(p)} = \sqrt{\frac{P_1^2 \cdot m_1^2}{M_1^4} + \frac{P_2^2 \cdot m_2^2}{M_2^4}},$$

где m_1, m_2 — среднеквадратические ошибки для LD_{50} 1-го и 2-го вещества.

Затем вычисляются величины:

$$u_1 = \frac{Q-1}{P \cdot m_3}; \quad u_2 = \frac{Q-1}{[Pm_3 - M_3 m_{(p)}]};$$

$$u_3 = \frac{Q-1}{\sqrt{P^2 \cdot m_3^2 + M_3 \cdot m_{(p)^2}}}$$

при $u_1 < 1{,}96$ и $u_2 \leqslant 2{,}58$ действие смеси является аддитивным, при $u_1 > 1{,}96$ и $u_3 \geqslant 1{,}65$ действие отличается от аддитивного (при положительной величине u_3 действие менее чем аддитивное, при отрицательной u_3 — действие более чем аддитивное).

В связи с тем, что при действии вещества на одни и те же биологические системы равные доли от изоэффективных доз являются изоэффективными, условие аддитивности можно выразить уравнением:

$$1 = \frac{C_1}{M_1} + \frac{C_2}{M_2}.$$

При выполнении данного условия комбинированный эффект будет равен эффекту от изолированного воздействия стандартных изоэффективных доз M_1 и M_2, т. е. составит 50%. В связи с этим для оценки типа комбинированного действия можно использовать анализ зависимости эффекта (в пробитах) от суммы доз компонентов, выраженных в долях от их среднесмертельных доз (Каган Ю. С.).

Методом наименьших квадратов или графическим способом выводится уравнение:

$$y = a + b\left(\frac{C_1}{M_1} + \frac{C_2}{M_2}\right),$$

с помощью которого находятся величины LD_{50}, LD_{16}, LD_{84}. При $LD_{50} = 1$ действие веществ является аддитивным, при $LD_{50} > 1$ имеет место менее чем аддитивное действие, при $LD_{50} < 1$ действие более чем аддитивное. Оценка до-

стоверности найденной LD_{50} проводится путем вычисления среднеквадратической ошибки по формуле:

$$m = \frac{LD_{84} - LD_{16}}{\sqrt{2N}},$$

где N — количество животных в группах, летальность в которых не менее 6,7% (пробит 3,5) и не более 93,3% (пробит 6,5). Однако более точным является расчет LD_{50} и ее доверительных границ при использовании пробит-логарифмического масштаба по ранее изложенному методу наименьших квадратов.

После установления величины LD_{50} по методу Кагана или величины Q по методу Финни характер комбинированного действия смеси может быть представлен в виде уравнения:

$$1 = K\left(\frac{C_1}{M_1} + \frac{C_2}{M_2}\right),$$

где $K = 1/LD_{50} = 1/Q$. При соблюдении этого равенства комбинированный эффект не будет превышать стандартного (например, 50%) уровня.

Важно отметить, что метод Финни и его модификация применимы для анализа комбинированного действия веществ, обладающих сходным механизмом действия и имеющих параллельные линии доза-эффект. В том случае, если данное условие не выполняется, анализ правомерно проводить только при фиксированных соотношениях между компонентами.

Метод болограмм Леве[1]

Согласно данному методу на графике по осям абсцисс и ординат откладываются доли от среднесмертельных доз или концентраций отдельных компонентов смеси. Линия, соединяющая точки с $\frac{C_1}{M_1} = 1$ и $\frac{C_2}{M_2} = 1$, является линией аддитивного действия, а степень отклонения от нее служит мерой отклонения от аддитивного действия. Для оценки комбинированного действия смеси проводится установление среднесмертельных доз при различных соотношениях между компонентами. Полученные значения $\frac{C_1}{M_1}$ и $\frac{C_2}{M_2}$, при воздействии которых наблюдается 50% эф-

[1] Модификация метода Леве, предложенная Н. Н. Мельниковой и Л. А. Тимофиевской, подробно рассмотрена в приложении 2.

фект, наносятся на график. По отклонениям полученной линии от линии аддитивности судят о типе комбинированного действия и его зависимости от соотношения между концентрациями компонентов.

В тех случаях, когда это возможно, необходимо стремиться к выявлению аналитической зависимости характера комбинированного действия от состава смеси, например, путем выявления зависимости коэффициента «К» в уравнении аддитивного действия от соотношения между компонентами.

Метод множественного регрессионного анализа

Данный метод применим для оценки характера комбинированного действия смесей с любым соотношением между компонентами. Целью множественного регрессионного анализа является получение и оценка уравнения, связывающего биологический эффект с уровнями воздействия компонентов: $y = a + \kappa_1 x_1 + \kappa_2 x_2$, где y — биологический эффект (в пробитах); x_1 и x_2 — уровни воздействия 1-го и 2-го веществ, выраженные в долях от их среднесмертельных доз или концентраций:

$$x_1 = \frac{C_1}{M_1}; \quad x_2 = \frac{C_2}{M_2}.$$

Для получения коэффициентов, входящих в данное уравнение, необходимо вычислить ряд вспомогательных величин:

$$\Sigma (x_1^2) = \Sigma x_1^2 - n\bar{x}_1^2$$
$$\Sigma (x_2^2) = \Sigma x_2^2 - n\bar{x}_2^2$$
$$\Sigma (x_1 y_1) = \Sigma x_1 y - n\bar{x}_1\bar{y}$$
$$\Sigma (x_1 x_2) = \Sigma x_1 x_2 - n\bar{x}_1\bar{x}_2$$
$$\Sigma (x_2 y) = \Sigma x_2 y - n\bar{x}_2\bar{y}$$
$$\Sigma (y^2) = \Sigma y^2 - n\bar{y}$$

где n — количество испытанных сочетаний; $\bar{x}_1$, $\bar{x}_2$, $\bar{y}$ — средние величины для x_1, x_2, y.

Затем составляется и решается система уравнений:

$$K_1 \cdot \Sigma (x_1^2) + K_2 \cdot \Sigma (x_1 x_2) = \Sigma (x_1 y)$$
$$K_1 \cdot \Sigma (x_1 x_2) + K_2 \cdot \Sigma (x_2^2) = \Sigma (x_2 y).$$

Величина «*a*» рассчитывается по формуле: $a = \bar{y} - \kappa_1\bar{x}_1 - \kappa_2 x_2$. Для оценки достоверности полученного уравнения вычисляются величины:

$$S_{x_1} = \sqrt{\frac{\Sigma (x_1^2)}{n}}; \quad S_{x_2} = \sqrt{\frac{\Sigma (x_2^2)}{n}};$$

$$r_{x_1x_2} = \frac{\Sigma (x_1x_2)}{n \cdot S_{x_1} \cdot S_{x_2}}; \quad S_{\text{ост.}} = \sqrt{\frac{\Sigma (y^2) - к_1 \Sigma (x_1y) - к_1 \Sigma (x_2y)}{n-3}};$$

$$m_{(к_1)} = \frac{S_{\text{ост.}}}{S_{x_1} \sqrt{1 - r^2_{x_1x_2}} \cdot \sqrt{n}}; \quad m_{(к_2)} = \frac{S_{\text{ост.}}}{S_{x_2} \sqrt{1 - r^2_{x_1x_2}} \cdot \sqrt{n}}.$$

Оценка достоверности коэффициентов регрессии проводится по критерию Стьюдента:

$$t = \frac{к_1}{m_{(к_1)}}; \quad t_2 = \frac{к_2}{m_{(к_2)}}.$$

при n — 3 степенях свободы. Сопоставление между собой величин коэффициентов регрессии позволяет оценить степень влияния компонентов на токсичность смеси. При $К_1 = К_2$ влияние компонентов одинаково и равные доли от их изоэффективных доз являются изоэффективными.

Полученное уравнение регрессии может быть приведено к стандартной форме уравнения аддитивности:

$$1 = Z_1 \cdot \frac{C_1}{M_1} + Z_2 \frac{C_2}{M_2},$$

где $Z_1 = \frac{к_1}{5-a}; \quad Z_2 = \frac{к_2}{5-a}.$

При $Z_1 = Z_2 = 1$ действие смеси является аддитивным, при других значениях характер комбинированного действия будет зависеть от соотношения между компонентами в смеси.

Более точным является проведение множественного регрессионного анализа с применением весовых коэффициентов. В этом случае в качестве анализируемых величин используются

$$x_1 = x_1 \cdot n_i \cdot w_i; \quad x_2 = x_2 \cdot n_i \cdot w_i; \quad y = y \cdot n_i \cdot w_i,$$

где n_i — количество животных в данной группе; w_i — весовой коэффициент (см. Бессмертный Б. С.).

В связи с тем, что получаемые при помощи множественного регрессионного анализа оценки характера воздействия не учитывают зависимости доза-эффект при изолированном воздействии компонентов, рекомендуется дополнительно вычислить величины:

$$m_1 = \frac{y - a_1}{b_1\bar{x}_1 + b_2\bar{x}_2 + a_2 - a_1}; \quad m_2 = \frac{y - a_2}{b_1\bar{x}_1 + b_2\bar{x}_2 + a_1 - a_2},$$

где y — эффект, рассчитанный по уравнению множественной регрессии при средних значениях x_1, x_2; a_1b_1, a_2, b_2 —

коэффициенты характеризующие зависимость доза-эффект при изолированном воздействии, изученном параллельно. Для расчета данных коэффициентов может использоваться функция угла наклона

$$S = \left(\frac{LD_{84}}{LD_{50}} + \frac{LD_{50}}{LD_{16}}\right)/2,$$

тогда $b = \frac{2S}{S^2 - 1}$; $a = 5 - b$.

Величина коэффициента m показывает, во сколько раз изменяется действие данного компонента в смеси по сравнению с изолированным поступлением.

МОДИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ПОСТРОЕНИЯ ДИАГРАММ ЛЕВЕ[1]

Метод Леве в классической его форме не позволяет количественно охарактеризовать эффект и учесть индивидуальный разброс показателей. Предлагаемый способ позволяет путем проведения ряда математических расчетов, основанных на методе наименьших квадратов, методе нелинейного регрессионного анализа и графических приемов, оценить тип комплексного действия (количественно) и установить ведущий путь поступления химического соединения. Метод заключается в построении поверхности отклика, исходя из полученных в эксперименте величин эффекта в различных сочетаниях доз и концентраций вещества в трехмерной системе координат. Полученная модель поверхности отклика проверяется на адекватность экспериментальным данным при помощи критерия согласия Фишера (F). Полученная поверхность рассекается на уровне, принятом за критический. В последующем линия сечения проецируется на координатную плоскость доза (концентрация) одного вещества — доза (концентрация) другого вещества.

Таким образом, получается диаграмма Леве, позволяющая качественно охарактеризовать тип комплексного действия.

Наличие индивидуального разброса диктует необходимость построения доверительных границ для данного числа исследований. При использовании диаграммы Леве индивидуальный разброс показателей можно учесть с помощью зоны аддитивности. Эту зону предполагается определять на основании доверительных интервалов критических уровней для разных путей поступления. Крити-

[1] Метод разработан Н. Н. Мельниковой и Л. А. Тимофиевской для оценки т. н. комплексного действия химических веществ (в частности, для поступления одного и того же вещества ингаляционным и пероральным путями), однако, в равной мере применим для анализа комбинированного действия, т. е. для поступления в организм двух веществ одним и тем же путем. Графики, приводимые для иллюстрации метода, построены для случаи комплексного действия, предполагающего сочетание ингаляционного и внутрижелудочного поступления яда и поэтому имеют координаты «доза — концентрация». Совершенно аналогичный вид эти графики будут иметь в координатах доза (концентрация) вещества № 1 — доза (концентрация) вещества № 2 для случая комбинированного действия.

ческие уровни — точки пересечения диаграммы Леве с координатными осями. Верхнее и нижнее возможное положение изоболы полной суммации лимитируется предельными значениями этих интервалов. Для определения предельных значений применимы методы математической статистики, разработанные для способа наименьших квадратов. Если диаграмма Леве полностью входит в зону аддитивности, то полученный эффект статистически незначимо отличается от аддитивного.

В дальнейшем, в случае проведения исследования на уровне пороговых эффектов по набору диаграмм Леве, построенных для различных показателей интоксикации, графическим методом может быть построена обобщенная диаграмма.

В тех случаях, когда нет оснований принять в качестве определяющего (основного) типа комбинированного действия тот эффект, который выявляется по одному из показателей в силу его специфичности или по другим соображениям, рассмотренным в разделе 1 настоящих методических рекомендаций, для суждения об основном типе действия используется обобщение диаграмм. При исследовании на уровне смертельных доз и концентраций получается одна диаграмма, которая является одновременно и обобщенной.

Оценка асимметрии обобщенной диаграммы позволяет определить вещество, являющееся ведущим в развитии картины интоксикации, а при изучении комплексного действия — ведущий путь поступления яда.

Методика постановки эксперимента и расчета

1. Исследование проводится в эксперименте при двух путях поступления изучаемого соединения в организм (комплексное действие) либо при поступлении одним и тем же путем двух разных веществ (комбинированное действие). В случае изучения комплексного действия, связанного с введением в желудок и ингаляцией его паров или аэрозоля, первой проводится внутрижелудочная затравка (период всасывания —3 часа проходит на фоне ингаляционного воздействия).

2. Количество животных во всех группах должно быть одинаковым.

3. Установление параметров токсикометрии как при изолированном, так и при комплексном воздействии проводится в соответствии с «Методическими указаниями к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны».

4. Выбирается эффект, по которому будет проводиться оценка комбинированного или комплексного действия. Указанный эффект должен иметь численное выражение: для смертельных уровней процент смертности, для пороговых — либо показатель интоксикации (величина СПП, ЭКГ и т. д.), либо статистические производные от них — критерий Т-Стьюдента, процент отклонения от контроля и т. п.

Выбор сочетаний доз и концентраций зависит от конкретного способа построения поверхности отклика.

Величины доз и концентраций выбираются в пределах величин порогов, определенным согласно п. 4.

5. Производится построение поверхности отклика в трехмерной системе координат (доза, концентрация,эффект). Математическая зависимость, приближенно описывающая функцию поверхности отклика, выражается формулой:

$$F = \sum_{i=0}^{N} a_i \varphi^i \cdot \sqrt{x^2 + y^2}, \qquad (1)$$

где x — первый путь поступления (или первое вещество);
y — второй путь поступления (или второе вещество);
a_i — неизвестные коэффициенты;
N — количество неизвестных коэффициентов a;

$$\varphi = \arcsin\left(\frac{y}{\sqrt{x^2 + y^2}}\right).$$

Выбор функции вида 1 обусловлен тем, что F линейная относительно параметров (коэффициентов a_i) и при применении метода наименьших квадратов сводится к решению системы линейных уравнений (Р. С. Гутер, Б. В. Овчинский, 1962).

6. Построение диаграммы Леве. Выбирается критический уровень αк эффекта, принятого в п. 4. Например, для смертельного уровня $\alpha_к = 50$, если выбран 50% уровень гибели, $\alpha_к = 16$, если уровень гибели выбран 16%. Сечение поверхности отклика в плоскости, перпендикулярной оси эффекта и проходящей на уровне $\alpha_к$ проектируется на плоскость x, y (доза-концентрация, доза-доза или концентрация-концентрация в зависимости от того, идет ли речь об анализе комплексного или комбинированного действия и вводится ли вещество ингаляционным или иным способом). Указанная проекция есть изобола Леве (рис. 1). Число опытов обусловлено количеством неизвестных коэффициентов N.

Применение метода наименьших квадратов требует количества опытов $< 3 \div 5N$. Сочетания x_i и y_i должны вы-

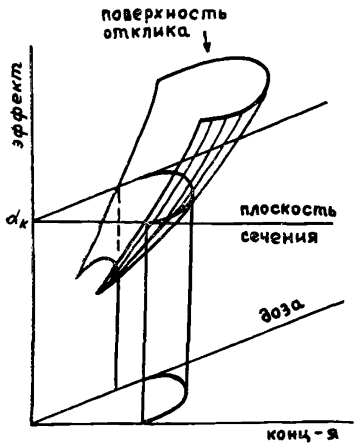


Рис. 1. Построение изоболы Леве

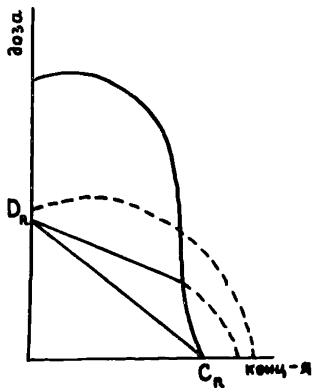


Рис. 2. Построение обобщенной изоболы

биpаться в области наступления принятого эффекта так, чтобы точки приблизительно равномерно покрывали интересующий нас квадрат координат.

7. В случае определения комплексного и комбинированного эффекта на уровне порогов вредного действия указанные диаграммы строятся для всех выбранных показателей, после чего графически может быть получена обобщенная диаграмма, которая представляет собой линию, отделяющую область действующих сочетаний доз и концентраций от недействующих (рис. 2). В случае работы на смертельных уровнях имеем одну диаграмму, которая одновременно является и обобщенной.

8. Оценка эффекта комбинированного или комплексного действия может производиться либо по диаграммам, построенным для одного определяющего признака интоксикации, либо (при отсутствии оснований к выбору такого признака) — по обобщенной диаграмме. Последующие уравнения и иллюстрации рассматривают второй случай на примере анализа комплексного действия веществ, однако как уже указывалось выше, аналогичным образом проводится анализ комбинированного действия. В рассматриваемом примере вещество вводится внутрижелудочно в определенных дозах и воздействует ингаляционно в определенных концентрациях.

Точки D_n и C_n обобщенной диаграммы есть пороговые точки для доз и концентраций, соответственно (рис. 3).

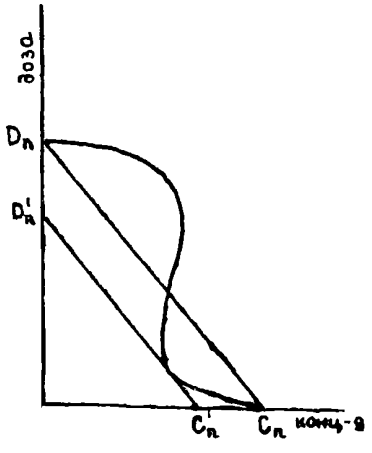


Рис. 3. Оценка эффекта комбинированного или комплексного действия

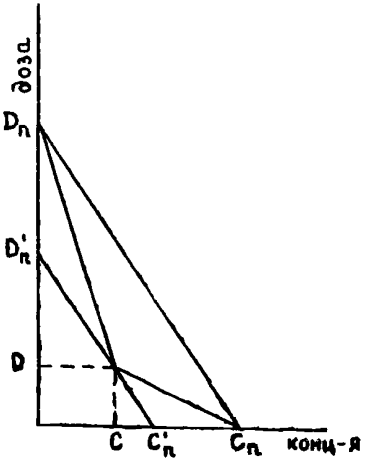


Рис. 4. Оценка ведущего пути поступления в-ва или ведущего компонента комбинации в-в

Прямая D_nC_n есть изобола полной суммации. Проведем прямую $D_n'Cn_n'$ параллельную D_nC_n, лежащую под ней и касающуюся обобщенной диаграммы. Тогда для любых соотношений доз D и концентраций C вредного эффекта наблюдаться не будет, если C и D подчиняются неравенству:

$$\frac{D}{D_n} + \frac{C}{C_n} < 1 \qquad (2)$$

Неравенство (2) показывает, что точка (DC) лежит ниже прямой $D_n'C_n'$ и заведомо находится в области недействующих соотношений концентраций и доз. Так как прямые D_nC_n и $D_n'C_n'$ параллельны, то имеет место соотношение:

$$\frac{C}{C_n'} = \frac{D_n}{D_n'} = K \qquad (3)$$

Учитывая соотношение (3), преобразуем неравенство (2)

$$K\left(\frac{D}{D_n} + \frac{C}{C_n}\right) < 1.$$

Коэффициент K показывает, во сколько раз сдвигается изобола полной суммации, коэффициент принимается за степень потенцирования или антагонизма при комплексном (соотв., комбинированном) воздействии.

9. Оценка ведущего пути поступления вещества или ведущего компонента комбинации веществ.

Изображение диаграммы Леве в масштабе, где за 1 приняты пороги действия, при равнозначном действии вещества будут симметричны относительно угла координат. Отклонение от симметрии указывает на неравнозначность путей поступления. Оценка отклонения точки от биссектрисы координатного угла указывает на ведущий путь поступления (рис. 4).

$$S = \frac{D}{D_n} \cdot \frac{C}{C_n}$$

При S, близком к 1, пути равнозначны. Если $S \ll 1$, то более опасным является путь D. Если $S \gg 1$, то более опасным является путь C. Аналогичным образом оценивается при анализе комбинированного действия ведущий компонент комбинации.

10. Построение зоны аддитивности.

(а) Для критических уровней определяются доверительные интервалы с учетом заданного уровня вероятности.

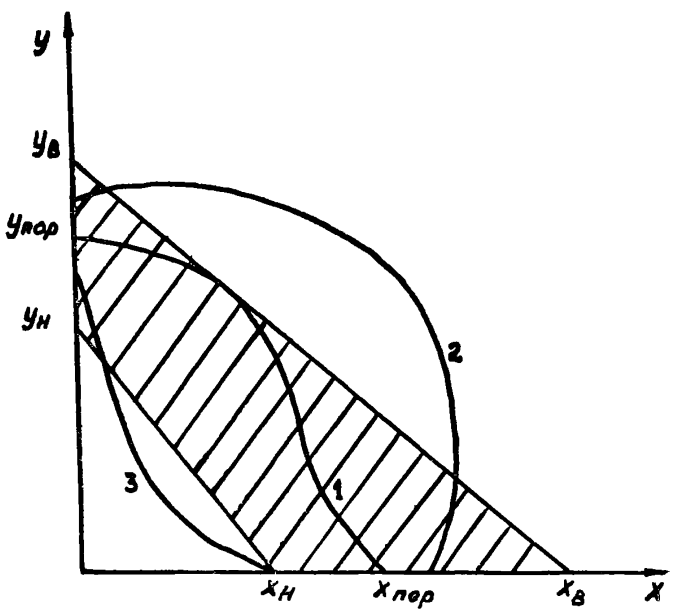


Рис. 5. Построение зоны аддитивности

Доверительный интервал может быть рассчитан при помощи метода пробит-анализа, если эффект выражен в процентах. При выражении величины эффекта в абсолютных единицах построение доверительного интервала следует проводить другими способами с помощью методов математической статистики (Драйпер Н., Смит Г., 1973).

(б) Соответствующие точки доверительных интервалов ($y_в$ и $x_в$, $y_н$ и $x_н$) соединяются прямыми (рис. 5). Площадь между ними является зоной аддитивности. На рис. 5 зона аддитивности заштрихована.

(в) Проверяется, входит ли диаграмма Леве в зону аддитивности. Если кривая входит в зону аддитивности (рис. 5, кривая 1), то эффект принимается значимо не отличающимся от аддитивного. Эффекты, статистически значимо меньше или больше аддитивного, проиллюстрированы на Рис. 5 кривыми 2 и 3, соответственно.

На основе описанного в данном приложении метода авторами разработана программа на языке Фортран IV, позволяющая осуществлять построение диаграмм Леве с помощью ЭВМ «Минск-32». Программа «КОМПЛ — построение поверхности отклика» принята в Гос. фонд алгоритмов и программ, регистр. № П-003684.

МЕТОДИКА АНАЛИЗА КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ СМЕСИ ВЕЩЕСТВ С ПОСТОЯННЫМ СООТНОШЕНИЕМ КОМПОНЕНТОВ

Изучаемая смесь веществ может включать любое количество ($n \geqslant 2$) компонентов, взятых в любых постоянных соотношениях по массе. Программа и методы токсикометрии конкретной смеси и каждого ее компонента планируются тождественными. Характер комбинированного действия смеси выявляют и оценивают на основе сопряженного анализа дозовых зависимостей, полученных для смеси и отдельных компонентов. Техника анализа излагается ниже на примере кривых летальности.

1. Оценка по токсичности.

1.1. Устанавливают зависимость «доза (концентрация) — эффект» и оценивают $ЛД_{50}$ ($ЛК_{50}$) исследуемой смеси и каждого (i-го) ее компонента i = 1, 2, ..., n).

1.2. Зная величину $ЛД_{50}$($ЛК_{50}$) смеси и процентное соотношение масс слагающих ее компонентов, рассчитывают удельную дозу $Д_i$ в мг/кг (удельную концентрацию C_i в мг/м^3) i-го компонента в составе $ЛД_{50}$ ($ЛК_{50}$) данной смеси.

1.3. По графику или уравнению зависимости «доза (концентрация) — эффект», полученному в отдельности для каждого вещества — компонента данной смеси, находят процент гибели животных (эффект E_i) соответственно величине $Д_i$ (или C_i) i-го вещества.

1.4. Суммируя эффекты E_i всех n компонентов и соответственно сумме $\Sigma E_i = E_1 + E_2 + ... + E_n$ находят эквивалентную дозу $Д_к$ (эквивалентную концентрацию $C_к$) по графику или уравнению зависимости «доза(концентрация) — эффект», полученному для изучаемой комбинации. В случае простой суммации $\Sigma E_i = 50\%$ и доза $Д_к = ЛД_{50}$ смеси (или концентрация $C_к = ЛК_{50}$ смеси). Когда $\Sigma E_i < 50\%$, доза $Д_к < ЛД_{50}$ смеси (потенцирование), при $\Sigma E_i > 50\%$ доза $Д_к > ЛД_{50}$ смеси (антагонизм).

1.5. Численную характеристику комбинированного действия смеси получают расчетом коэффициента $К = Д_к / Д_к$, где $Д_к = ЛД_{50}$ смеси (resp. $К = C_к$, где $C_к = ЛК_{50}$ смеси). Значения $К = 1$; $К > 1$ и $К < 1$ (с учетом доверительных границ сравниваемых величин) указывают со-

ответственно на аддитивность, факт и степень потенцирования или антагонизма по токсичности. Следует иметь в виду, что реально частота летального исхода не может быть ниже 0% и выше 100%. Поэтому, когда сумма $\Sigma E_i < < 1\%$ или $\Sigma E_i > 100\%$, эквивалентные дозы $Д_к$ находят соответственно для $\Sigma E_i = 1\%$ и $\Sigma E_i = 100\%$, а значения коэффициента К приводят со знаком «больше» или «меньше».

Пример 1 (данные В. И. Федоренко).

В острых опытах на белых крысах-самцах установлены $ЛД_{50}$ смеси вещества, состоящей из 75% α-метилбензилового эфира 2-хлорацетоуксусной кислоты (МБХ) и 25% монохлорацетона (МХА), а также $ЛД_{50}$ каждого компонента. Все $ЛД_{50}$ оценивали методом пробитов по Миллеру-Тейнтеру (М. Л. Беленький, 1963). Графики зависимостей «доза-эффект» представлены на рисунке. Для смеси МБХ + +МХА доза $ЛД_{50}$ = 436,5 (296,4÷576,6) мг/кг; для МБХ она составляет 864,0 (733,1÷994,9) мг/кг; для МХА —.188,4 (152,5÷224,3) мг/кг. В составе $ЛД_{50}$ смеси находим удельные дозы $Д_1$ и $Д_2$ соответственно для МБХ и МХА. Доза $Д_1 = \frac{436{,}5 \cdot 75\%}{100\%} = 327{,}4$ мг/кг, доза $Д_2 = 109{,}1$ мг/кг. Логарифмам этих доз ($lgД_1 = lg327{,}4 = 2{,}5151$; $lgД_2 = lg109{,}1 = 2{,}0378$) по приведенным на рисунке графикам 3 и 1 соответствуют пробиты 1,75 и 3,80. Следовательно, удельной дозе $Д_1$ соответствует эффект $E_1 < 0{,}1\%$ (МБХ), удельной дозе $Д_2$ — эффект $E_2 = 11{,}6\%$ (МХА).

Сумма эффектов $\Sigma E_i = (< 0{,}1\%) + 11{,}6\% \approx 11{,}6\%$ или, переходя к пробитам,—3,80. По графику 2 пробиту 3,80 соответствует логарифм эквивалентной дозы ($lgД_к$) смеси, равный 2,32. Следовательно, дозе $Д_к = 208{,}9$ мг/кг. Отсюда коэффициент $К = \frac{436{,}5\ (296{,}4 \div 576{,}6)}{208{,}9} = 2{,}1$ (1,4 ÷ ÷ 2,8), что указывает на потенцирование (нижняя доверительная граница коэффициента К больше единицы) и характеризует его степень (среднее значение К = 2,1; потенцирование в 2,1 раза).

2. Оценка по степени кумуляции.

2.1. Изучаемую смесь относят к одной из тех же 4-х групп по степени кумуляции (слабая, средняя, сильная и очень сильная), что и отдельные вещества. Характер комбинированного действия компонентов в плане кумуляции устанавливают с учетом ограничений, налагаемых указанной группировкой. Кумулятивное действие компонентов считают аддитивным, когда смесь и все ее компоненты относятся к одной и той же группе или же смесь относится

к группе, занимающей промежуточное положение по сравнению с наиболее и наименее кумулятивными компонентами. На потенцирование по степени кумуляции указывает принадлежность смеси к группе большей или равной кумуляции по сравнению с наиболее кумулятивным компонентом, на антагонизм — принадлежность смеси к группе меньшей или равной кумуляции по сравнению с наименее кумулятивным компонентом.

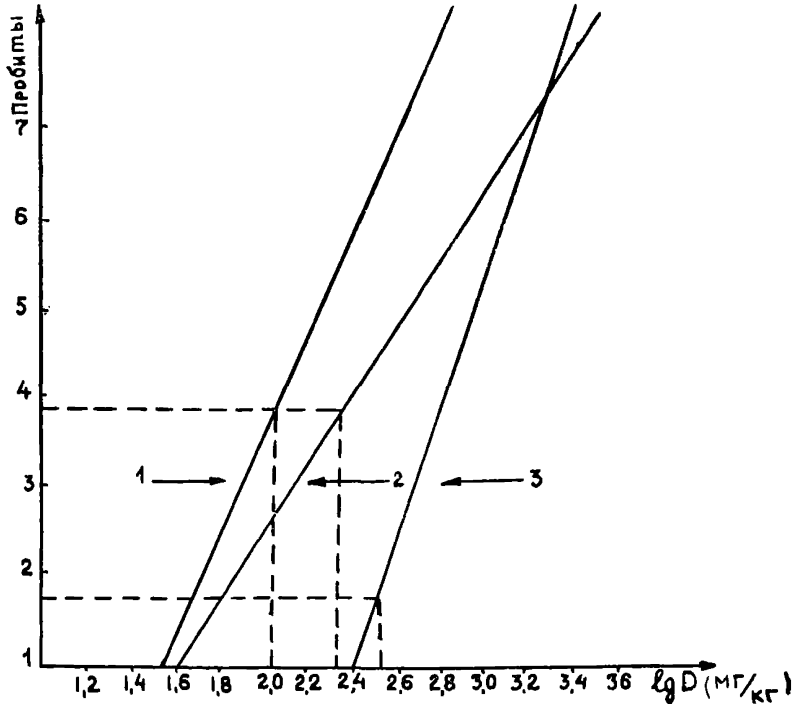
2.2. При ориентации на летальный исход наиболее доступными характеристиками кумулятивных свойств смесей, равно как и отдельных веществ, является индекс кумуляции $J_к$ и среднее время ET_{50} гибели животных в острых опытах, а также среднее время $ET_{50}^{ж}$ гибели животных в непродолжительных подострых опытах при испытании 1/2 $ЛД_{50}$ или 1/2 $ЛК_{50}$ (Б. М. Штабский, 1973, 1974). Индексы кумуляции находят из условия: $J_к = 1 - \overline{Д}^{ж}/\overline{Д}$ где $\overline{Д}^{ж}$ и $\overline{Д}$ — среднесмертельные дозы (концентрации одного и того же вещества (смеси вещества), установленные при учете гибели животных соответственно в первые сутки и за весь период наблюдения (2—4 недели). Время ET_{50} и $ET_{50}^{ж}$ при воздействии смеси и каждого из ее компонентов определяют по Литчфилду (М. Л. Беленький, 1963) или аналогичным методам, позволяющим представить экспериментальные данные в виде соответствующих зависимостей «время-эффект». Исходя из значений $J_к$, ET_{50} и $ET_{50}^{ж}$ и руководствуясь критериями, приведенными в таблице, исследуемую смесь и каждый из ее компонентов относят к соответствующей группе по степени кумуляции и, согласуясь с п.2.1, оценивают характер комбинированного действия веществ, входящих в состав изучаемой смеси.

Критерии оценки степени кумуляции

Степень кумуляции	$J_к$	ET_{50} (сутки)	$ET_{50}^{ж}$ (сутки)
Очень сильная (сверхкумуляция)	$\geqslant 0{,}5$	> 1	< 5
Сильная	$0 < J_к < 0{,}5$	$\geqslant 1$	< 5
Средняя	0	< 1	$5 \div 15$
Слабая	0	$\ll 1$; < 1	> 15

Пример 2.

В острых опытах, описанных в примере 1, установлено, что МХА присуща слабая кумуляция ($J_к = 0$; $ET_{50} = 12$ ч), МБХ — сильная ($J_к = 0{,}21$; $ET_{50} = 28{,}5$ ч), а их смеси — слабая кумуляция ($J_к = 0$; $ET_{50} = 18{,}7$ ч.). В соответст-



Зависимости ,,доза-эффект'' для МХА (1), МБХ (3) и их смеси (3). На оси абсцисс — логарифмы доз, на оси ординат — пробиты

вии с п. 2.1 полученные результаты указывают на антагонизм по степени кумуляции. В аналогичных опытах со смесью, включающей МХА и МБХ и α-метилбензиловый спирт (последний, как и МХА, относится к слабокумулятивным веществам), выявлена очень сильная кумуляция. В этом случае результаты указывают на потенцирование по степени кумуляции.

МЕТОД МАТЕМАТИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ ХАРАКТЕРА КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ПО ИЗМЕНЕНИЮ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Данный метод может использоваться при наличии линейной зависимости биологического эффекта от воздействующих уровней (или их логарифмов). В предварительных исследованиях выявляется зависимость между средними значениям изучаемого показателя и уровнями воздействия отдельных компонентов смеси:

$$\bar{y} = a + b\bar{x}$$

где $\bar{y}$ — среднее значение функционального показателя,
x — уровень воздействия (или его логарифм).

Для получения оценок данного уравнения проводится расчет следующих величин:

$$\bar{x} = \frac{\Sigma\omega_i \cdot n_i \cdot x_i}{\Sigma\omega_i \cdot n_i}; \quad b = \frac{\Sigma\omega_i \cdot n_i (x_i - \bar{x}) \cdot \bar{y}_i}{\Sigma\omega_i \cdot n_i (x_i - \bar{x})^2};$$

$$a = \frac{\Sigma\omega_i \cdot n_i \cdot \bar{y}_i}{\Sigma\omega_i \cdot n_i} - b_1\bar{x};$$

$$S_1^2 = \frac{1}{N-2} \cdot \Sigma\omega_i \cdot n_i (\bar{y}_i - \widehat{y_i})^2;$$

$$S_2^2 = \frac{\Sigma\omega_i (y_i - \bar{y}_i)^2}{\Sigma n_i - N} = \frac{\Sigma\omega_i \cdot n_i \cdot m_i^2 (n_i - 1)}{\Sigma n_i - N};$$

где ω — весовой коэффициент $\omega = \frac{1}{m_i^2 \cdot n_i}$;

m_i — среднеквадратическая ошибка в i-группе животных; подвергнутых воздействию дозы X_i;
n_i — число животных в i-группе;
$\bar{y}_i$ — среднее значение измеряемого показателя в i-группе;
$\bar{x}$ — среднее значение дозы;
$\hat{y}_i$ — значение показателя, рассчитанное по уравнению регрессии;
N — число испытанных доз.

Проверка линейности модели проводится по критерию

Фишера: $F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$, если $F < F_{ст.}$ при $(N - 2)$ и $(\Sigma n_i - N)$ степенях свободы, то полученная модель адекватна. Доверительные границы для расчетных значений эффектов или доз определяются по среднеквадратическим ошибкам и критерию Стьюдента при $(\Sigma n_i - 2)$ степенях свободы. Расчет среднеквадратических ошибок ведется по формулам:

$$m \cdot (\bar{y}) = S_y \sqrt{\frac{1}{\Sigma n_i \omega_i} + \frac{(x_к - \bar{x})^2}{\Sigma n_i \cdot \omega_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$m \cdot (\bar{x}) = \frac{S_y}{b} \sqrt{\frac{1}{\Sigma n_i \omega_i} + \frac{(x_к - \bar{x})^2}{\Sigma n_i \cdot \omega_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

где $x_к$ — значение воздействующей дозы,

$$S_y^2 = S_1^2 + S_2^2.$$

С применением данной модели могут быть получены значения пороговых, действующих и неэффективных доз отдельных компонентов смеси, а также их доверительные границы.

Аналогичным способом можно получить зависимость доза-эффект и для комбинированного воздействия смеси. При этом значения воздействующих концентраций удобно представлять в виде долей от пороговых концентраций при изолированном воздействии, т. е. проводить анализ точно также и при оценке комбинированного действия на уровне смертельных доз. Для выявления характера комбинированного действия при разных соотношениях между компонентами можно использовать изложенный ранее метод множественного регрессионного анализа с выражением переменных:

$\bar{y} = y_i \cdot n_i w_i$; $x_1 = x_{1i} \cdot n_i w_i$; $x_2 = x_{2i} \cdot n_i \cdot w_i$.

Выбрав стандартный уровень эффекта (с использованием данных, полученных в контроле), можно вывести уравнение аддитивности:

$$1 = Z \frac{C_1}{M_1} + Z_2 \frac{C_2}{M_2}$$

(или $1 = K \left(\frac{C_1}{M_1} + \frac{M_2}{C_2}\right)$, если эффект не зависит от соотношения между компонентами или соотношение между компонентами остается постоянным).

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ ПЛАНИРОВАНИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТА КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ

А. При однократном комбинированном действии

Поскольку зависимость доза-эффект при однократном воздействии токсического вещества, как правило, нелинейна, для постановки эксперимента используем ортогональный план II-го порядка. В качестве унифицированного принимаем план вида 3^2 (табл. 1).

На основе результатов y_i 9-ти опытов определяем зависимость $У = f(x_1, x_2)$ в виде многочлена II порядка:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{12}x_1x_2 \qquad (1)$$

Коэффициенты b_0, b_1, b_2, b_{11}, b_{22} и b_{12} квадратического полинома находим при помощи формулы:

$$b_j = \frac{y_j \cdot a_j}{c_j} \qquad (2)$$

Векторы a_j и коэффициенты c_j приведены в таблице 2.

Для определения адекватности полученной математической модели изучаемому процессу находим расчетные значения y_{pi}, подставляя в уравнение (1) условия каждого опыта.

Аналитическое описание искомой зависимости признается адекватным, когда величины $\Delta_i = y_{pi} - \overline{y_i}$ не превышают ошибки измерения изучаемого показателя.

Математическая модель интерпретируется следующим образом:

Коэффициент b_0 соответствует величине изучаемого показателя при среднем значении обоих факторов, т. е. при введении обоих веществ в средних дозах. Следовательно, по увеличению или уменьшению величины b_0, по сравнению с контролем, можно судить об общей направленности комбинированного действия (повышение или понижение активности фермента и т. д.), а также о степени чувствительности данного показателя к воздействию вещества.

Коэффициенты b_1 и b_{11} отражают линейный и нелинейный компоненты эффекта 1-го фактора, соответственно, b_2 и b_{22} — второго фактора.

Поскольку максимальные уровни обоих факторов заданы в кодированном обозначении как (+1), указанные выше

Таблица 5.1

План эксперимента по изучению острого комбинированного воздействия двух факторов (x_1, x_2)

№ опыта	Факторы		Результат		Ошибка $\Delta i = y_i - y_{p_i}$
	x_1	x_2	фактический y_i	расчетный y_{p_i}	
1	—1	—1			
2	1	—1			
3	—1	1			
4	1	1			
5	0	0			
6	0	1			
7	0	—1			
8	1	0			
9	—1	0			

Таблица 5.2

Векторы для вычисления коэффициентов b_j зависимости $y=f(x_1, x_2)$

c_j	9	6	6	6	6	4
№ опыта a_j	a_0	a_1	a_2	a_{11}	a_{22}	a_{12}
1	—1	—1	—1	1	1	1
2	—1	1	—1	1	1	—1
3	—1	—1	1	1	1	—1
4	—1	1	1	1	1	1
5	5	0	0	—2	—2	0
6	2	0	1	—2	1	0
7	2	0	—1	—2	1	0
8	2	1	0	1	—2	0
9	2	—1	0	1	—2	0

коэффициенты непосредственно характеризуют эффект фактора на величину «у» при изменении фактора на интервал варьирования. Чем больше абсолютная величина коэффициента, тем большее влияние оказывает данный фактор, независимо от уровня другого.

Коэффициенты b_{ij} характеризуют изменение влияния одного фактора в зависимости от уровня другого, т. е. эффект взаимодействия факторов.

Знаки при коэффициентах указывают на направленность сдвига показателя при независимом действии факторов.

Знак «+» при линейных коэффициентах обозначает усиление эффекта на верхнем уровне воздействия по сравнению с таковым при среднем уровне фактора и снижение на нижнем, знак «—» — противоположное действие.

Характеристика направленности эффекта взаимодействия более сложна. В случае двух факторов знак «+» при коэффициенте b_{12} означает увеличение величины показателя «у» при одноименных знаках факторов, знак «—» свидетельствует об уменьшении эффекта при одноименных знаках факторов и об его увеличении при разноименных.

Таким образом, путем интерпретации уравнения регрессии — математической модели изучаемого процесса может быть дана количественная оценка, в зависимости от которой комбинированный эффект подразделяется на аддитивный, менее аддитивного и более аддитивного (потенцирование).

В качестве уровней факторов следует использовать величины, выражаемые в долях от $ЛД_{50}$ ($ЕД_{50}$), так чтобы их интервал варьирования был одинаков. Например, 0; 0,5 $ЛД_{50}$; $ЛД_{50}$— интервал варьирования 0,5 $ЛД_{50}$. При этом необходимо учитывать, что вещества с выраженной степенью наклона прямой доза-эффект в дозе 0,5 $ЛД_{50}$ могут не вызывать соответствующего эффекта (рис. 1). В та-

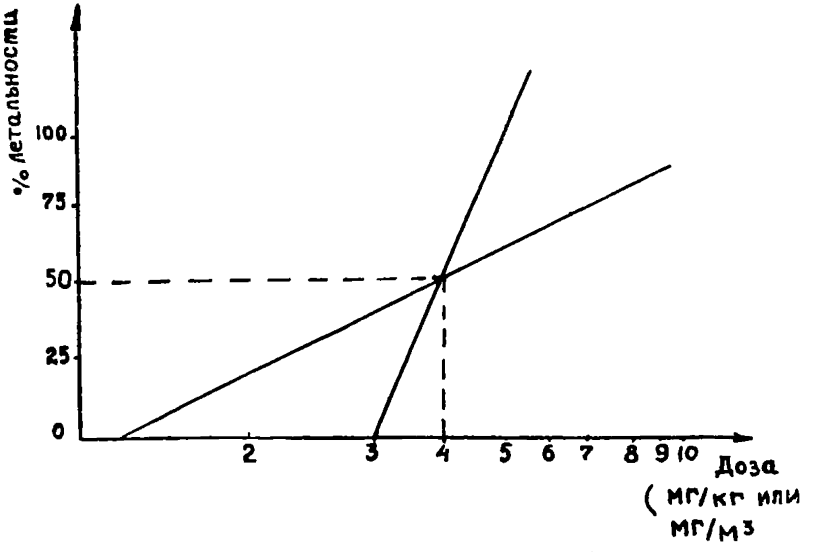


Рис. 1. График летальности веществ А и В

а) $ЛД_{50}$ вещества А — 4 мг/кг;
0,5 $ЛД_{50}$ вещества А — 2 мг/кг (вызывает летальный эффект)
Для таких веществ уровни факторов выражаются величинами 0; 0,5; $ЛД_{50}$; $ЛД_{50}$

б) $ЛД_{50}$ вещества В (с выраженной степенью наклона прямой доза-эффект)— 4 мг/кг
0,5 $ЛД_{50}$ вещества В — 2 мг/кг (не вызывает летального эффекта)
Для таких веществ уровни факторов выражаются вероятностными величинами $ЛД_0$; $ЛД_{25}$; $ЛД_{50}$.

ких случаях целесообразно рекомендовать принцип использования вероятностных величин в качестве уровней факторов и их интервал варьирования. Например, $ЛД_0$; $ЛД_{25}$ и $ЛД_{50}$ (соответственно $ЕД_0$, $ЕД_{25}$, $ЕД_{50}$) — интервал варьирования $ЛД_{25}$.

Величины $ЛД_0$, $ЛД_{25}$, $ЛД_{50}$ определяются графически методом пробит — анализа или аналитически с помощью вариационно-статистического метода *, который одновременно позволяет устанавливать стандартную ошибку и доверительный интервал доз, вызывающих любую частоту эффекта, в том числе $ЛД_0$ и $ЛД_{100}$.

Ход статистического анализа в обоих случаях идентичен.

Пример: Изучалось комбинированное действие веществ А и В при однократном введении в желудок белым крысам. С целью постановки опытов согласно матрицы ортогонального планирования эксперимента, дозы веществ кодировались как (—1), (0) и (+1).

Как видно из данных таблицы 3, опыты проводились на смертельном уровне доз. План и результаты опытов приведены в табл. 4.

Каждый из 9-ти опытов проводился на 6 животных, учитываемый показатель y_i — гибель животных в %.

На основе результатов эксперимента с помощью таблицы 2 по формуле 2 рассчитываем коэффициенты уравнения регрессии:

$$b_0 = \frac{0 \cdot (-1) + 33{,}2 \cdot (-1) + 50{,}0 \cdot (-1) + 100 \cdot (-1) + 66{,}6 \cdot 5 + 83{,}2 \cdot 2 + 16{,}6 \cdot 2 + 100 \cdot 2 + 33{,}2}{9} = 68{,}4$$

$$\ldots b_{12} = \frac{0 \cdot 1 + 33{,}2\,(-1) + 50{,}0\,(-1) + 100 \cdot 1}{4} = 4{,}2$$

Отсюда, искомое уравнение примет вид:

$$y = 68{,}4 + 25{,}0x_1 + 30{,}5x_2 - 2{,}7x_1^2 - 19{,}4x_2^2 + 4{,}2x_1x_2 \quad (3)$$

Рассчитываем по данному уравнению проценты гибели животных y_{pi}, подставляя в уравнение кодированные условия каждого опыта:

$y_1 = 68{,}4 + 25(-1) + 30{,}5(-1) - 2{,}7(-1)^2 - 19{,}4(-1)^2 + 4{,}2(-1)(-1) = -5$ и так далее $y_2, \ldots, y_n$.

Ошибка $\Delta_i = y_i - y_{pi}$ ни в одном случае не превысила 10%.

Средняя ошибка определяется по формуле:

---

* Павлов С. Д. Доклады ВАСХНИЛ, 1981, № 5, 37—39.

$$\bar{\Delta} = \frac{\Sigma\,|\Delta_i|}{n};$$

где Δ_i — ошибка каждого опыта, взятая по модулю, т. е. без учета знака;

n — число опытов.

В рассматриваемом случае $\bar{\Delta} = 4{,}5\%$. Такая точность апроксимации позволяет рассматривать уравнение (3) как математическую модель комбинированного действия веществ А и В на смертельном уровне доз на белых крысах.

Интерпретация данной модели свидетельствует, что действие веществ является взаимозависимым ($b_{12} \neq 0$), однако взаимодействие выражено сравнительно слабо.

Таблица 5.3

Уровни факторов и интервалы варьирования

Вещества	Символы факторов	Уровень факторов			Интервал варьирования
		−1	0	+1	
А	x_1	0	1/2 $ЛД_{50}$	$ЛД_{50}$	1/2 $ЛД_{50}$
В	x_2	0	1/2 $ЛД_{50}$	$ЛД_{50}$	1/2 $ЛД_{50}$

Таблица 5.4

План и результаты изучения острого комбинированного воздействия А и В

№ опыта	Факторы		Результаты		Ошибка $\Delta_i = y_i - y_{p_i}$
	x_1	x_2	фактический y_i	расчетный y_{p_i}	
1	—1	—1	0	—5	5,0
2	1	—1	33,2	36,6	—3,4
3	—1	1	50,0	47,6	2,4
4	1	1	100,0	106,0	—6,0
5	0	0	66,6	68,4	—1,8
6	0	1	83,2	79,5	3,7
7	0	—1	16,6	18,5	—1,9
8	1	0	100,0	90,7	9,3
9	—1	0	33,2	40,7	—7,5

$$\Sigma\,|\Delta_i| = 41{,}0$$

$$\bar{\Delta} = \frac{\Sigma\,|\Delta_i|}{n} = 4{,}5$$

Действие обоих веществ однонаправлено — синергизм, при этом линейные эффекты несколько уменьшаются за счет нелинейных. Это особенно выражено для вещества В.

Изолированное введение вещества А при увеличении дозы от 1/2 $ЛД_{50}$ до $ЛД_{50}$ вызывает увеличение гибели животных на 22,3% (b_1—b_{11}), вещества В — на 11,1%, при совместном действии — на 37,6%. Таким образом, можно заключить, что эффект комбинированного действия веществ А и В — взаимозависимый, синергический, несколько более аддитивного (тенденция к потенцированию).

Б. При многократном комбинированном действии

Особенностью хронических опытов по изучению комбинированного действия токсических веществ является ограниченное число групп животных и, соответственно, испытываемых доз (концентраций). При исследовании многократного комбинированного воздействия двух веществ необходимо использовать, как минимум, четыре группы животных: 1— контрольная, 2— подвергающаяся воздействию вещества А, 3— то же вещества В, 4— комбинированному действию обоих веществ в тех же дозах, что и при изолированном воздействии. Основываясь на современной теории математического планирования эксперимента, указанные четыре опыта могут в совокупности рассматривать как матрицу полного факторного эксперимента вида 2^2 (табл. 5.5).

Таблица 5.5

Матрица планирования двухфакторного эксперимента

№ п/п	Факторы		Ответная реакция y_j		
	x_1	x_2	y_1	y_2 ...	y_n
1	—1	—1	y_1		y_1
2	1	—1	y_2		y_2
3	—1	1	y_3		y_3
4	1	1	y_4		y_4

В матрице дозы вещества А (фактор x_1) и В (фактор x_2) даны в кодированном виде. Кодирование факторов, т. е. их приведение к безразмерному виду, осуществляется по формуле:

$$x_i = \frac{Z_i - Z_{io}}{\Delta_i} \qquad (5.1)$$

где Z_i — фактическая доза i-го вещества (фактор x_i);

$Z_{i0} = 0{,}5\ (Z_{i\max} + Z_{i\min})$ — середина диапазона колебаний фактора x_i

$\Delta_i = 0{,}5\ (Z_{i\max} - Z_{i\min})$ — интервал варьирования фактора x_i.

В нашем случае минимальный уровень $Z_{i\min}$ обоих факторов — отсутствие вещества (—1), максимальный — испытываемая доза (+1). Ответная реакция —y_j, где j = 1, 2, ...,.

Результаты определения j-того показателя во всех четырех видах опытов подвергаются регрессионному анализу. Получаем уравнение вида:

$$y_j = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \qquad (5.2)$$

где j — величина изучаемого показателя;

b_i — коэффициенты регрессии.

Соответствующие коэффициенты b_i вычисляются по следующим формулам:)

$$b_0 = \frac{y_1 + y_2 + y_3 + y_4}{4}; \qquad (5.3)$$

$$b_1 = \frac{-y_1 + y_2 - y_3 - y_4}{4}; \qquad (5.4)$$

$$b_2 = \frac{-y_1 - y_2 - y_3 - y_4}{4}; \qquad (5.5)$$

$$b_{12} = \frac{y_1 - y_2 - y_3 - y_4}{4} \qquad (5.6)$$

где y_1 — усредненный результат определения j-того показателя в 1-м опыте, y_2 — то же во 2-м опыте и т. д.

Для получения расчетных значений $У_j$ в уравнение (5.2) подставляем кодированные значения факторов, испытанные в соответствующем опыте. Точность апроксимации результатов эксперимента оценивается по величине различий между фактическим и расчетным значением показателя:

$$\bar{\Delta}_i = \frac{\Sigma\, /y_i - y_{P_i}/}{n} \qquad (5.7)$$

где $\Delta_i = /y_i - y_{P_i}/$ — разница между фактическим и расчетным значением показателя, взятая по модулю без учета знака.

Величина Δ_i сравнивается с ошибкой определения показателя.

В ответственных случаях с целью характеристики адекватности математической модели и возможности прогноза на ее основе характера комбинированного действия при различных сочетаниях факторов ставится 5-й опыт — при

уровнях обоих факторов, составляющих 1/2 от испытанных при изолированном воздействии. Полученная в этом опыте величина показателя сравнивается с величиной коэффициента b_0, отражающего расчетный эффект при средних значениях (в кодированном виде —0) обоих факторов. Разница должна находиться в пределах ошибки определения показателя.

Характер и степень выраженности эффекта комбинированного действия факторов оценивается по уравнению (5.2) следующим образом: по увеличению или уменьшению величины b_0, по сравнению с контролем (результатом 1-го опыта), можно судить об общей направленности совместного действия. Линейные коэффициенты b_1 и b_2 характеризуют влияние данного фактора (x_1 или x_2 на величину y при изменении уровня фактора на интервал варьирования. Коэффициент b_{12} отражает влияние одного фактора в зависимости от уровня другого, т. е. эффект взаимодействия факторов. Знаки при коэффициентах указывают на направленность влияния.

Таким образом, на основе анализа уравнения возможно дать оценку комбинированного эффекта: менее аддитивного, аддитивного или более аддитивного (потенцирование). Последний эффект регистрируется, когда все коэффициенты уравнения значимы и однонаправлены. В случае потенцирования эффекта вычисляется соответствующий коэффициент:

$$K_P = \frac{b_1 + b_2 + b_3}{b_1 + b_2} \qquad (5.8)$$

Пример: Изучалось многократное комбинированное воздействие пестицидов А (фактор x_1) и В (фактор x_2). В столбце y_{on} табл. 5.6 приведены усредненные результаты процента снижения активности холинэстеразы сыворотки крови белых крыс через месяц после начала воздействия. Регрессионный анализ этих данных (расчет коэффициентов по формулам 5.2—5.6) позволил получить уравнение:

$$y = 19 + 13x_1 + 0{,}5x_2 - 5{,}5x_1x_2 \qquad (5.9)$$

Коэффициент $b_2 = 0{,}5$ близок к нулю и значительно менее ошибки эксперимента. Этот член исключается из уровня как незначимый, что не влечет за собой необходимости пересчета остальных коэффициентов:

$$y = 19 + 13x_1 - 5{,}5x_1x_2 \qquad (5.10)$$

Полученное уравнение позволяет с высокой точностью аппроксимировать результаты эксперимента: средняя ошибка

Таблица 5.6

Анализ комбинированного действия пестицидов $A_{(x_1)}$ и $B_{(x_2)}$ на активность холинэстеразы сыворотки крови белых крыс

№ опытов	x_1	x_2	Характеристика опытов	$y_{оп}$	$y_{расч.}$	$\Delta_i = y_i - y_{pi}$
1	—1	—1	Контроль	0	0,5	—0,5
2	1	—1	Воздействие в-ва А	37	37,5	—0,5
3	—1	1	Воздействие в-ва В	12	11,5	0,5
4	1	1	Действие А+В	27	26,5	0,5
				$\Delta_i = \frac{\Sigma (y_i - y_{pi})}{4} = 0{,}5$		
5	0	0	Действие 1/2А+1/2В	23	19	4,0

составила 0,5%. Был поставлен 5-й опыт, результат которого сравниваем с величиной в $b_0 : 5 = 4\%$, что менее ошибки эксперимента. Это подтверждает возможность рассмотрения уравнения (5.10) как математической модели комбинированного воздействия веществ А и В.

Анализ данной модели позволяет отметить следующее:

1. Комбинированное действие веществ А и В является взаимозависимым, поскольку оно обусловленно веществом А и его взаимодействием с веществом В (изолированное действие вещества В незначимо).

2. Эффект комбинированного воздействия обоих веществ (снижение активности фермента на 27%) менее изолированного эффекта вещества А (снижение на 37%), поскольку влияние вещества А и его взаимодействие с веществом В разнонаправлены. Следовательно, в данном опыте наблюдается антагонический эффект.

Для характеристики эффекта многократного комбинированного воздействия, естественно, необходимо проводить учет ответной реакции организма через определенные временные промежутки, устанавливаемые в зависимости от общей продолжительности опыта. В общем случае можно рекомендовать постановку двухмесячного эксперимента с определением показателей в исходном периоде, через 2, 4, 6, 8 недель. Наряду с описанной выше математической обработкой результатов в отдельные моменты времени, представляется целесообразным проведение регрессионного анализа результатов для каждой группы животных на всем протяжении опыта. Такой подход позволяет охарактеризовать динамику развития эффекта и повысить обоснованность заключения.

Сдано в набор 5.06.87. Подписано в печать 12.08.87. Л56320. Формат 84×108$^{1}/_{32}$.
Бумага тип. № 3. Физ. печ. л. 3,5. Тираж 1250. Заказ № 1604. Бесплатно.

Уфимский полиграфкомбинат Госкомиздата Башкирской АССР,
Уфа-1, проспект Октября, 2

gost.e-ecolog.ru