

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра – Главный  
Государственный санитарный врач  
Республики Беларусь



И.В. Гаевский

2015 г.

Регистрационный № 023-1215

ОЦЕНКА ХАРАКТЕРА КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ  
ВЕЩЕСТВ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ РАЗРАБОТЧИК: Республиканское унитарное предприятие  
«Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: Богданов Р.В., к.м.н. Соболев Ю.А., к.м.н., доцент Бондаренко Л.М.

Минск, 2015

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель министра –  
Главный государственный  
санитарный врач  
Республики Беларусь

\_\_\_\_\_ И.В. Гаевский  
16.12.2015  
Регистрационный № 023-1215

**ОЦЕНКА ХАРАКТЕРА КОМБИНИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ  
ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ВОЗДУХЕ РАБОЧЕЙ ЗОНЫ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: РУП «Научно-практический центр гигиены»

АВТОРЫ: Р.В. Богданов, канд. мед. наук Ю.А. Соболев, канд. мед. наук, доц.  
Л.М. Бондаренко

Минск 2015

## ГЛАВА 1 ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Загрязнение воздуха рабочей зоны, как правило, многокомпонентно, что обуславливает поступление в организм работающего одновременно нескольких химических веществ. Вместе с тем потенциально возможно изменение биологического ответа организма на совместное поступление нескольких химических веществ по сравнению с их изолированным воздействием. При гигиеническом нормировании химических веществ, обладающих однонаправленным действием, при их одновременном присутствии в воздухе рабочей зоны необходимо учитывать характер комбинированного действия, который отражает степень изменения токсичности и опасности (или токсикометрических параметров) веществ в смеси по сравнению с их изолированным действием.

В первую очередь необходимо определять характер комбинированного действия тех химических веществ (смеси), которые:

- наиболее часто встречаются в различных отраслях промышленности;
- даже при их наличии лишь в условиях отдельных производств воздействуют на численно значительные контингенты работающих;
- воздействуют на работающих, как в условиях производства, так и в быту.

2. В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложены унифицированные методы токсикологических исследований по экспериментальной оценке характера (типа) комбинированного действия химических веществ (далее — токсикологические исследования), которые могут быть использованы при обосновании их предельно допустимых концентраций в воздухе рабочей зоны.

3. Настоящая инструкция предназначена для врачей-специалистов организаций, осуществляющих государственный санитарный надзор, иных специалистов учреждений, осуществляющих обоснование гигиенических нормативов химических веществ в воздухе рабочей зоны (далее — исследователь).

## ГЛАВА 2 ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

4. Для целей настоящей инструкции используются следующие термины и определения:

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

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

вредные вещества — вещества, которые при контакте с организмом человека могут вызвать профессиональные заболевания или отклонения в состоянии здоровья, обнаруживаемые современными методами, как в процессе воздействия

вещества, так и в отдаленные сроки жизни настоящего и последующих поколений;

комбинированное действие — одновременное или последовательное действие на организм нескольких химических веществ при одном и том же пути поступления;

коэффициент кумуляции ( $K_{cum.}$ ) — отношение суммарной дозы вещества при многократном введении, вызвавшей гибель 50% животных, взятых в эксперимент, к  $DL_{50}$ , установленной при однократном введении;

коэффициент комбинированного действия ( $K_{kd.}$ ) — количественный критерий оценки характера комбинированного действия химических веществ, который отражает степень изменения токсичности и опасности (параметров токсикометрии) химических веществ в смеси по сравнению с их изолированным действием;

критические органы или системы — те органы или системы, в которых при возрастании уровня дозы возникает первый вредный эффект или его известный предвестник;

кумулятивные свойства вещества — способность вещества при повторном поступлении накапливаться в организме и оказывать неблагоприятное действие на уровне проявления смертельных эффектов (материальная кумуляция) или на функциональное состояние ряда органов и систем лабораторных животных (функциональная кумуляция);

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

опасность — способность вызывать острые и (или) хронические отравления (интоксикации);

порог вредного действия — минимальная концентрация (доза) вещества в воздушной среде, при воздействии которой в организме (при конкретных условиях поступления вещества) возникают изменения, выходящие за пределы физиологических приспособительных реакций, или скрытая патология;

предельно допустимая концентрация в воздухе рабочей зоны — концентрация вредного вещества, которая при ежедневной (кроме выходных дней) работе в течение 8 не более 40 ч в неделю в течение всего рабочего стажа не должна вызывать заболеваний или отклонений в состоянии здоровья, обнаруживаемых современными методами исследований в процессе работы или в отдаленные сроки жизни настоящего и последующего поколений;

смесь — смесь или раствор в составе двух или более веществ, в котором или которых они не вступают в реакцию друг с другом.

среднесмертельная доза ( $DL_{50}$ ) вещества (мг/кг) — статистически установленная однократная доза вещества, которая может вызвать гибель 50% лабораторных животных, подвергшихся воздействию (перорально, накожно).  $DL_{50}/LD_{50}$  выражается в отношении единицы массы испытываемого вещества к единице массы подопытного животного, мг/кг;

среднесмертельная концентрация ( $CL_{50}$ ) вещества (мг/м<sup>3</sup>) — обусловленная временем статистически выверенная оценка концентрации исследуемого вещества, которая предположительно может являться причиной смерти 50% лабораторных животных, подвергшихся определенному воздействию препарата во время экспозиции или в течение определенного промежутка времени после экспозиции.

Продолжительность выдержки всегда должна быть установлена (например, 4-часовая  $CL_{50}$ ).

токсичность — мера несовместимости вещества с жизнью; величина, обратная абсолютному значению среднесмертельной дозы ( $1/DL_{50}$ ) или ( $1/CL_{50}$ ).

### ГЛАВА 3 ОБЩИЕ УСЛОВИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

5. Обязательным условием определения характера комбинированного действия химических веществ является наличие методов количественного определения компонентов смеси в соответствующих средах.

6. Токсикологические исследования проводят на следующих видах лабораторных животных: белые мыши (масса тела 16–24 г), белые крысы (масса тела 160–220 г) или лабораторные животные иных биологических видов (с учетом наибольшей чувствительности к соответствующим химическим веществам), при этом необходимо указать вид, линию (популяцию), питомник, из которого получены животные, пол, исходную массу тела, пищевой рацион, сезон в котором проводилась каждая серия экспериментов.

Комбинированное действие химических веществ должно исследоваться на том же виде животных и при той же экспозиции, что и при изучении токсичности каждого химического вещества в отдельности. При этом как внутрижелудочное, так и внутрибрюшинное введения каждого из химических веществ осуществляется последовательно с интервалом не более 5 мин, не допуская смешения химических веществ смеси между собой.

Подбор животных и формирование из них опытных и контрольных экспериментальных групп осуществляют из числа визуально здоровых половозрелых животных с ровным, гладким шерстным покровом, без видимых повреждений кожи хвоста и слизистой глаз, с учетом пола и массы тела (разница в массе животных одной и сравниваемых групп не должна превышать 10%), отсутствия различий в поведении, общем состоянии, содержании лейкоцитов в крови, иных морфофункциональных показателей.

Условия содержания лабораторных животных должны соответствовать требованиям Санитарных правил и норм 2.1.2.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь № 131 от 31.10.2006. Условия обращения, проведения экспериментов и выведения лабораторных животных из опыта должны соответствовать гуманистическим принципам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в эксперименте (Хельсинки, 1986) и международной концепции трех R (reduction, refinement, replacement) в отношении использования лабораторных животных в экспериментах.

7. Токсикологические исследования проводятся в помещениях, оснащенных приточно-вытяжной вентиляцией и водопроводной водой.

Приготовление растворов, подготовка проб к токсикологическим исследованиям и токсикологические исследования осуществляют при следующих условиях:

- температура окружающего воздуха —  $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ ;
- относительная влажность воздуха — не более 80% при  $t = 25^\circ\text{C}$ ;
- атмосферное давление 84,0–106,7 кПа (630–800 мм рт. ст.).

8. Работы с химическими веществами, лабораторными животными и агрессивными реактивами должны проводиться работниками в соответствии с требованиями охраны труда, в спецодежде с использованием индивидуальных средств защиты кожи, органов дыхания и зрения.

## ГЛАВА 4 СХЕМА ИССЛЕДОВАНИЙ

9. Объем токсикологических исследований планируется таким образом, чтобы на каждом последующем этапе исследователь мог принять решение о целесообразности последующих исследований. Токсикологические исследования предполагают определение:

на первом этапе — параметров токсикометрии  $DL_{50}$ ,  $CL_{50}$ , а также токсических эффектов при изолированном воздействии (внутрижелудочное, внутрибрюшинное, ингаляционное (интраназальное) и др. способы введения, нанесения) каждого компонента смеси. Этап реализуется общепринятыми методами;

на втором этапе — характера комбинированного действия химических веществ в смеси при однократном (остром) воздействии;

на третьем этапе — характера комбинированного действия химических веществ в смеси и токсического действия ее компонентов при субхроническом воздействии (кумулятивные свойства);

на четвертом этапе — характера комбинированного действия химических веществ в смеси и токсического действия ее компонентов при хроническом воздействии;

на пятом этапе — в случае неопределенности полученных результатов необходимость дополнительных исследований по выявлению механизмов комбинированного действия химических веществ смеси;

на шестом этапе — рекомендация величины коэффициента комбинированного действия.

На втором этапе, как правило, используют внутрижелудочное или парентеральное введение, на следующем этапе — внутрижелудочное введение или ингаляционное воздействие. На четвертом этапе ингаляционное воздействие является обязательным.

10. Токсикологические исследования по оценке комбинированного действия смеси при однократном (остром) воздействии.

Основной целью первого этапа является предварительное ориентирование в характере комбинированного действия изучаемой комбинации.

Исследования при однократном воздействии при внутрижелудочном (внутрибрюшинном, ингаляционном) введении (общепринятыми методами) на уровне смертельных доз и концентраций с последующим расчетом параметров острой токсичности для химических веществ.

Оценку характера комбинированного действия смеси в острых экспериментах осуществляют по вызываемым эффектам либо по изоэффективной концентрации. При этом необходимо учитывать, что результаты оценки характера комбинированного действия одной и той же смеси по эффекту и по концентрации могут не совпадать из-за того, что кривые зависимости доза-эффект имеют чаще всего нелинейный вид.

10.1. Оценка характера комбинированного действия химических веществ в смеси в острых экспериментах по вызываемым эффектам

10.1.1. Для постановки эксперимента по оценке характера комбинированного действия двух химических веществ в смеси используется ортогональный план 2-го порядка (таблица 1), для трех химических веществ — план 3-го порядка и т. д.

Таблица 1. — План эксперимента по изучению острого комбинированного воздействия двух химических веществ ( $x_1, x_2$ )

№ эксперимента	Химическое вещество		Результат		Ошибки $\Delta_i = y_i - y_{pi}$
	$x_1$	$x_2$	фактический, $y_i$	расчетный, $y_{pi}$	
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			

10.1.2. На основе результатов  $y_i$  девяти экспериментов (для трех химических веществ плана 3-го порядка — 27 экспериментов и т. д.) определяют зависимость  $y = f(x_1, x_2)$  в виде многочлена 2-го (3-го и т. д.) порядка:

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

Для двух химических веществ коэффициенты  $b_0, b_1, b_2, b_{11}, b_{22}, b_{12}$  квадратического полинома находят при помощи формулы:

$$b_i = \frac{y_i \times a_i}{c_i}. \quad (2)$$

Векторы  $a_i$  и коэффициенты  $c_i$  приведены в таблице 2.

Таблица 2. — Векторы для вычисления коэффициентов  $b_i$  зависимости  $y = f(x_1, x_2)$

$c_i$	9	6	6	6	6	4
№ эксперимента, $a_i$	$a_0$	$a_1$	$a_2$	$a_{11}$	$a_{22}$	$a_{12}$
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

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

Аналитическое описание искомой зависимости признаётся адекватным, когда величины  $\Delta_i = y_i - y_{pi}$  не превышают 5%.

10.1.4. Математическая модель при оценке характера комбинированного действия двух химических веществ в смеси интерпретируется следующим образом:

- коэффициент  $b_0$  соответствует величине конкретного показателя морфофункционального состояния лабораторного животного при среднем значении обоих химических веществ в смеси, т. е. при введении обоих химических веществ в смеси в средних дозах (концентрациях). 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 конкретного показателя морфофункционального состояния лабораторного животного к воздействию химического вещества в смеси;

- коэффициенты  $b_1$  и  $b_{11}$  отражают линейный и нелинейный компоненты эффекта 1-го химического вещества, соответственно,  $b_2$  и  $b_{22}$  — 2-го химического вещества. Поскольку максимальные уровни обоих химических веществ в смеси заданы в кодированном обозначении как (+1), указанные выше коэффициенты непосредственно характеризуют эффект от воздействия каждого химического вещества в смеси на величину «у» при изменении величины воздействия соответствующего химического вещества на интервал варьирования. При этом, чем больше абсолютная величина каждого из коэффициентов ( $b_1$ ,  $b_{11}$ ,  $b_2$ ,  $b_{22}$ ), тем большее влияние на величину эффекта оказывает соответствующее химическое вещество в смеси, независимо от другого;

- коэффициент  $b_{12}$  характеризуют изменение влияния на величину эффекта одного химического вещества в зависимости от другого, т. е. эффект взаимодействия химических веществ в смеси;

- знаки при линейных коэффициентах указывают на направленность сдвига показателя при независимом действии химических веществ в смеси. Знак «+» обозначает усиление эффекта на верхнем уровне воздействия (доза, концентрация) по сравнению с таковым при среднем уровне химического вещества и снижение на нижнем, знак «-» — противоположное действие химических веществ в смеси;

- характеристика направленности эффекта взаимодействия: в случае двух химических веществ в смеси знак «+» при коэффициенте  $b_{12}$  означает увеличение величины показателя «у» при одноименных знаках, характеризующих оба химических вещества; знак «-» свидетельствует об уменьшении эффекта при одноименных знаках, характеризующих оба химических вещества в смеси, и о его увеличении — при разноименных.

Таким образом, путем интерпретации уравнения регрессии математической модели изучаемого процесса (результат влияния токсиканта (смесь) на мишень (морфофункциональные показатели лабораторных животных)) может быть дана качественная оценка характера комбинированного действия химических веществ в смеси с высказыванием предположения (гипотезы) о характеристике комбинированного действия химических веществ в смеси как «менее чем аддитивное», «аддитивное» или «более чем аддитивное».

10.1.5. В качестве уровней факторов следует использовать величины, выражаемые в долях от  $DL_{50}$  ( $CL_{50}$ ), так, чтобы их интервал варьирования был одинаков. Например,  $0 DL_{50}$  ( $CL_{50}$ ) — отсутствие эффекта;  $0,5 DL_{50}$  ( $CL_{50}$ );  $1,0 DL_{50}$  ( $CL_{50}$ ) — интервал варьирования  $0,5 DL_{50}$  ( $CL_{50}$ ). При этом необходимо учитывать, что вещества с выраженной степенью наклона прямой доза-эффект в дозе  $0,5 DL_{50}$  ( $CL_{50}$ ) могут не вызывать соответствующего эффекта. В таких случаях целесообразно применять принцип использования вероятностных величин в качестве уровней воздействия химических веществ в смеси и их интервал варьирования. Например, использовать интервал варьирования  $0,25$ .

Величины  $DL_0$  ( $CL_0$ ),  $DL_{25}$  ( $CL_{25}$ ),  $DL_{50}$  ( $CL_{50}$ ) и т. д. определяются графически с помощью вариационно-статистического метода, который одновременно позволяет устанавливать стандартную ошибку и доверительный интервал доз (концентраций), вызывающих любую частоту эффекта, в т. ч.  $DL_0$  ( $CL_0$ ) и  $DL_{100}$  ( $CL_{100}$ ). Ход статистического анализа в обоих случаях идентичен.

*10.2. Оценка характера комбинированного действия химических веществ в смеси в острых экспериментах по их изоэффективной дозе*

Ответная реакция организма лабораторных животных на внутрижелудочное введение химических веществ может определяться на пороговом, токсическом или смертельном уровне. Пороговые уровни индивидуальны для каждого химического вещества и пути поступления, поэтому представляется целесообразным постановка острого эксперимента на смертельном уровне воздействия веществ.

10.2.1. Определяем  $DL_{50}$  соответствующих химических веществ при однократном внутрижелудочном введении с последующим расчетом общепринятыми методами параметров острой токсичности для изучаемых химических веществ. Стандартная ошибка определяется по формуле:

$$S_{DL_{50}} = 1,25 \times \frac{(DL_{84} - DL_{16})/2}{\sqrt{n}}, \quad (3)$$

где  $n$  — число животных в группах с эффектами между 16 и 84%.

10.2.2. В качестве токсического уровня воздействия химического вещества принимаются значения доз от  $1/16 DL_{50}$  до  $1,0 DL_{50}$  ( $1/16$ ;  $1/8$ ;  $1/4$ ;  $1/2$ ;  $3/4$ ;  $1,0 DL_{50}$ ) каждого из них. Гибель животных регистрируется на протяжении 14 сут после внутривенного введения (таблица 3).

Таблица 3 — Летальность животных при одновременном введении химических веществ

Доза 1-го химического вещества в частях от $DL_{50}$	Доза $i$ -го химического вещества в частях от $DL_{50}$	Суммарная доза в частях от $DL_{50}$ фактическая	% летальности
1/16	1/16		
1/8	1/8		
1/4	1/4		
1/2	1/2		
3/4	3/4		
1	1		

10.2.3. По результатам экспериментов общепринятыми методами рассчитывается  $DL_{50}$  смеси химических веществ, при этом количественная оценка комбинированного действия химических веществ в смеси может быть дана на основе любого градуированного показателя, характеризующего морфофункциональное состояние организма лабораторных животных. Если изучаемая смесь является двухкомпонентной, для этого находят дозу 1-го химического вещества, изменяющую выбранный показатель на 50% (как правило, это  $DL_{50}$ ), аналогичную дозу для 2-го химического вещества и для суммарной дозы обоих химических веществ, а экспериментальные (фактические) данные сравнивают с расчетными.

10.2.4. Полученная экспериментальная (фактическая)  $DL_{50}$  смеси сравнивается с расчетной  $DL_{50}$  и, если значение меньше расчетной  $DL_{50}$ , то необходимы дальнейшие токсикологические исследования в хронических экспериментах по выявлению основного типа комбинированного действия химических веществ в смеси.

11. Определение характера комбинированного действия химических веществ в смеси и токсического действия ее компонентов при субхроническом воздействии (кумулятивные свойства).

11.1. Изучение токсических свойств при субхроническом внутривенном и ингаляционном воздействии, накожном нанесении (выбор пути (путей) поступления смеси (компонентов смеси) определяется задачами, стоящими перед

исследователем) позволяет определить в эксперименте способность изучаемой комбинации химических веществ накапливаться в организме и оказывать неблагоприятное действие на уровне смертельных эффектов (материальная кумуляция) или на уровне изменений клинико-биохимических показателей лабораторных животных (функциональная кумуляция).

Параллельно проводится изучение токсического действия (материальной и функциональной кумуляции) при многократном (субхроническом) изолированном введении каждого из компонентов смеси.

Оценка характера комбинированного действия химических веществ в смеси при субхроническом воздействии проводится путем сопоставления токсических эффектов, вызываемых ею, в сравнении с изолированным действием химических веществ, составляющих смесь, на основании чего дается прогноз о возможности развития хронического отравления.

11.2. Изучение кумулятивных свойств химических веществ в смеси (ее компонентов) при внутрижелудочном введении проводится в соответствии с Инструкцией 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ», утвержденной постановлением Главного государственного врача Республики Беларусь № 131 от 14.12.2004;

11.3. Изучение кумулятивных (кожно-резорбтивных) свойств химических веществ в смеси (ее компонентов) при накожном нанесении проводится в соответствии с Инструкцией 1.1.10-13-56-2005 «Оценка воздействия вредных химических веществ на кожные покровы и обоснование предельно допустимых уровней загрязнений кожи», утвержденной постановлением Главного государственного врача Республики Беларусь № 174 от 14.11.2005;

11.4. Изучение подострой токсичности химических веществ в смеси при ингаляционном поступлении проводится общепринятыми методами в течение 4-недельного периода (5 раз в неделю, продолжительность «затравки» для белых мышей составляет 2 ч, для белых крыс — 4 ч).

Выбранные концентрации должны идентифицировать органы-мишени и соблюдаться соотношение концентрация-эффект:

- высокий уровень концентрации должен показывать токсический эффект, но не вызывать устойчивые проявления летальности, препятствующие эффективной оценке результатов;

- средний уровень (средние уровни) концентрации подбирается таким образом, чтобы получить градицию токсических эффектов между низким и высоким уровнями;

- низкий уровень концентрации должен показывать слабые признаки токсичности или полное их отсутствие.

Изучение подострой токсичности смеси химических веществ проводится аналогично изучению токсичности компонентов смеси.

12. При изучении ингаляционного воздействия химических веществ на организм лабораторных животных возможно использовать модель интраназального дробного введения химических веществ на вдохе животного.

Расчетные ингаляционные концентрации определяются по формуле:

$$K = D / V, \quad (4)$$

где  $K$  — концентрация вещества в  $\text{м}^3$  воздуха рабочей зоны;

$D$  — вводимая доза вещества в мг;

$V$  — объем вдыхаемого воздуха, который равен произведению легочной вентиляции белых крыс —  $0,65 \text{ см}^3/\text{г}/\text{мин}$  (белых мышей —  $1,24 \text{ см}^3/\text{г}/\text{мин}$ , морских свинок —  $0,33 \text{ см}^3/\text{г}/\text{мин}$ ) на массу животных в граммах и время ингаляционной экспозиции.

13. Определение характера комбинированного действия химических веществ в смеси и токсического действия ее компонентов при хроническом воздействии.

Определение характера комбинированного действия смеси и токсического действия ее компонентов при хроническом воздействии целесообразно, если на третьем этапе токсикологических исследований определение характера комбинированного действия смеси и токсического действия ее компонентов при субхроническом воздействии предположен более чем аддитивный эффект.

13.1. Определение характера комбинированного действия химических веществ в смеси при хроническом воздействии осуществляется при ингаляционном пути поступления в течение 4 мес. (5 раз в неделю, продолжительность «затравки» для белых мышей составляет 2 ч, для белых крыс — 4 ч). Выбор концентраций для «затравки» каждого компонента, входящего в комбинацию, осуществляется с учетом информации о параметрах токсикометрии химических веществ в смеси, полученной на предыдущих этапах токсикологических исследований, а также данных литературы, таким образом, чтобы:

- первый уровень концентраций соответствовал пороговой концентрации по лимитирующему показателю вредного действия, определенной при изолированном хроническом поступлении;

- второй уровень концентраций соответствовал 0,5 (половине) пороговой концентрации по лимитирующему показателю вредного действия, определенной при изолированном хроническом поступлении;

- третий уровень концентраций соответствовал 0,25 (четверти) пороговой концентрации по лимитирующему показателю вредного действия, определенной при изолированном хроническом поступлении.

*Справочно. В зависимости от ранее полученных результатов и задач, стоящих перед исследователем, могут быть выбраны иные уровни концентраций (выше или ниже пороговой концентрации по лимитирующему показателю вредного действия, определенной при изолированном хроническом поступлении).*

Параллельное изучение токсического действия при многократном (хроническом) изолированном введении каждого из компонентов смеси проводится аналогично таковому при исследовании химических веществ в смеси.

Оценку характера комбинированного действия смеси химических веществ в хронических экспериментах можно проводить на основе математического планирования эксперимента или с учетом вероятностных аспектов дивизивным методом.

13.2. Оценка характера комбинированного действия химических веществ в смеси на основе математического планирования эксперимента

13.2.1. При исследовании двухкомпонентной смеси формируют четыре группы лабораторных животных на каждом из уровней (концентраций) воздействия, указанных в подпункте 13.1. настоящего пункта: контрольную (интактные лабораторные животные, помещенные в «затравочную» камеру, куда подается воздух лабораторного помещения), 1-ю опытную (лабораторные животные подвергаются воздействию 1-го химического вещества ( $x_1$ ), 2-ю опытную (лабораторные животные подвергаются воздействию 2-го химического вещества ( $x_2$ ), 3-ю опытную (лабораторные животные подвергаются воздействию обоих химических веществ смеси);

- при исследовании трехкомпонентной смеси формируют семь групп лабораторных животных на каждом из уровней (концентраций) воздействия, указанных в подпункте 13.1. настоящего пункта: контрольную (интактные лабораторные животные, помещенные в «затравочную» камеру, куда подается воздух лабораторного помещения), 1-ю опытную (лабораторные животные подвергаются воздействию 1-го химического вещества ( $x_1$ ), 2-ю опытную (лабораторные животные подвергаются воздействию 2-го химического вещества ( $x_2$ ), 3-ю опытную (лабораторные животные подвергаются воздействию 3-го химического вещества ( $x_3$ ), 4-ю опытную (лабораторные животные подвергаются воздействию 1 и 2-го химических веществ ( $x_{12}$ ), 5-ю опытную (лабораторные животные подвергаются воздействию 1 и 3-го химических веществ ( $x_{13}$ ), 6-ю опытную (лабораторные животные подвергаются воздействию 2 и 3-го химического вещества ( $x_{23}$ ), 7-ю опытную (лабораторные животные подвергаются воздействию всех трех химических веществ смеси);

- таким же образом формируют количество групп лабораторных животных при четырех-, пяти- и т. д. компонентной смеси на каждом из уровней (концентраций) воздействия, указанных в подпункте 13.1. настоящего пункта исходя из формулы (5):

$$n = i^2 - 1, \quad (5)$$

где  $n$  — количество формируемых групп лабораторных животных на каждом из уровней (концентраций) воздействия;

$i$  — количество химических веществ в изучаемой смеси (компонентов смеси).

13.2.2. При исследовании двухкомпонентной смеси модель эксперимента, указанная в первом абзаце подпункта 13.2.1 настоящего пункта с учетом теории математического планирования эксперимента, рассматривается как матрица двухфакторного эксперимента (таблица 4).

Таблица 4. — Планирование двухфакторного эксперимента

Группа животных	Химические вещества		Ответная реакция $y_i$
	$x_1$	$x_2$	
Контрольная	-1	-1	$y_1$
1-я опытная	1	-1	$y_2$
2-я опытная	-1	1	$y_3$
3-я опытная	1	1	$y_4$

Примечание —  $i$  — показатель, характеризующий изменение морфофункционального состояния организма лабораторных животных;  $y_2, y_3, y_4$  — статистически значимое значение показателя, характеризующего изменение морфофункционального состояния организма лабораторных животных соответствующей опытной группы в сравнении с контрольной группой.

- при исследовании трехкомпонентной смеси модель эксперимента, указанная в абзаце втором подпункта 12.2.1. настоящего пункта с учетом теории математического планирования эксперимента, рассматривается как матрица трехфакторного эксперимента (таблица 5).

Таблица 5 — Планирование трехфакторного эксперимента

Группа животных	Химические вещества			Ответная реакция $y_i$
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	
Контрольная	-1	-1	-1	$y_1$
1-я опытная	1	-1	-1	$y_2$
2-я опытная	-1	1	-1	$y_3$
3-я опытная	-1	-1	1	$y_4$
4-я опытная	1	1	-1	$y_5$
5-я опытная	1	-1	1	$y_6$
6-я опытная	-1	1	1	$y_7$
7-я опытная	1	1	1	$y_8$

Примечание —  $i$  — показатель, характеризующий изменение морфофункционального состояния организма лабораторных животных;  $y_2, y_3, \dots, y_7$  — статистически значимое значение показателя, характеризующего изменение морфофункционального состояния организма лабораторных животных соответствующей опытной группы в сравнении с контрольной группой.

Кодирование факторов, т. е. их приведение к безразмерному виду, осуществляется по формуле (6):

$$x_i = \frac{Z_n - Z_{no}}{\Delta_n}, \quad (6)$$

где  $Z_n$  — фактическая доза  $n$ -го вещества (фактор  $x_1$ );

$Z_{no}$  — середина диапазона колебания фактора ( $Z_{n \max} + Z_{n \min}$ );

$\Delta_n$  — интервал варьирования фактора  $x_n$ .

В матрице многофакторного эксперимента 1-е химическое вещество в смеси (фактор  $x_1$ ), 2-е химическое вещество в смеси (фактор  $x_2$ ), ...,  $n$ -е химическое вещество даны в кодированном виде, при этом минимальный уровень ( $Z_{n \min}$ ) всех факторов — отсутствие воздействия соответствующего химического вещества (-1), максимальный — воздействие соответствующего химического вещества (+1), ответная реакция —  $y_i$ .

13.2.3. Результаты определения  $i$ -го показателя во всех группах лабораторных животных на каждом из уровней (концентраций) воздействия, указанных в подпункте 12.1. настоящего пункта, подвергаются регрессионному анализу.

Планирование позволяет получить уравнение, характеризующее изучаемое биологическое действие и содержащее коэффициенты линейных эффектов и коэффициенты линейных факторов.

13.2.4. При плане двухфакторного анализа (в случае двухкомпонентной смеси) используют уравнение следующего вида (7):

$$y_j = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2, \quad (7)$$

где  $i$  — величина изучаемого показателя;

$b_j$  — коэффициент регрессии.

Представленное уравнение является полиномом второй степени с эффектом взаимодействия. Уравнение такого вида является наиболее распространённой моделью и отвечает требованиям поставленной задачи.

Коэффициенты регрессии вычисляют по следующим формулам (8–11):

$$b_0 = \frac{y_1 + y_2 + y_3 + y_4}{4}, \quad (8)$$

$$b_1 = \frac{-y_1 + y_2 - y_3 + y_4}{4}, \quad (9)$$

$$b_2 = \frac{-y_1 - y_2 + y_3 + y_4}{4}, \quad (10)$$

$$b_{12} = \frac{y_1 - y_2 - y_3 + y_4}{4}, \quad (11)$$

где  $y_1$  — усредненный результат  $i$ -того показателя в контрольной группе;

$y_2$  — то же в 1-й опытной группе и т. д.

Для получения расчетных значений значение  $y_i$  в уравнение (7) подставляют кодированные значения факторов, испытанные в соответствующем опыте.

13.2.5. При плане двухфакторного анализа (в случае двухкомпонентной смеси) характер и выраженность эффекта комбинированного действия факторов (соответствующих химическим веществ) оценивается по уравнению (7) следующим образом:

- величина (количественное значение) коэффициента  $b_0$  соответствует величине изучаемого показателя при среднем значении обоих факторов. По

увеличению или уменьшению величины  $b_0$  по сравнению с величиной показателя в контроле ( $y_1$ ) можно судить об общей направленности совместного действия;

- величины (количественные значения) линейных коэффициентов  $b_1$  и  $b_2$  характеризуют влияние каждого фактора ( $x_1$  или  $x_2$ ) на величину показателя при изменении уровня фактора на интервал варьирования. Чем больше абсолютная величина коэффициента ( $b_1$  или  $b_2$ ), тем большее влияние оказывает соответствующий фактор, независимо от другого. Знаки («+» или «-») при коэффициентах  $b_1$  и  $b_2$  указывают на направленность сдвига показателя «у» при независимом действии факторов: знак «+» обозначает усиление эффекта на верхнем уровне воздействия по сравнению с таковым при среднем уровне фактора и снижение на нижнем, знак «-» противоположное действие;

- величина (количественное значение) коэффициента  $b_{12}$  отражает влияние одного фактора ( $x_1$  или  $x_2$ ) в зависимости от другого, т. е. эффект взаимодействия факторов или характеристику направленности эффекта взаимодействия. Знак «+» при коэффициенте  $b_{12}$  означает увеличение величины показателя «у» при одноименных знаках факторов ( $x_1$  или  $x_2$ ); знак «-» при коэффициенте  $b_{12}$  свидетельствует об уменьшении эффектов при одноименных знаках факторов ( $x_1$  или  $x_2$ ) и об его увеличении при разноименных.

13.2.6. В зависимости от значимости коэффициентов регрессии, их знака и величины возможны следующие варианты:

- статистически значим только один из линейных коэффициентов. В этом случае эффект определяется ведущим веществом.

- значимы два линейных коэффициента. Характер определяется как суммация при одновременных знаках и менее чем аддитивное действие – при разноименных, с учетом знака при коэффициенте  $b_{12}$ .

Количественно эффект может быть охарактеризован соответствующим коэффициентом ( $K_{кд}$ ):

$$K_{кд} = \frac{b_1 + b_2 + b_{12}}{b_1 + b_2} \quad (12)$$

13.2.7. На основе анализа уравнения дается оценка комбинированного действия веществ: менее чем аддитивное, аддитивное или более чем аддитивное (потенцирование).

Если коэффициент комбинированного действия ( $K_{кд}$ ) менее 0,8, то комбинированное действие оценивается как менее чем аддитивное, 0,8–1,2 — как аддитивное, более 1,2 — как более чем аддитивное (потенцирование).

*13.3. Оценка характера комбинированного действия химических веществ в смеси с учетом вероятностных аспектов дивизивным методом*

13.3.1. Для оценки характера комбинированного действия химических веществ из всех изученных показателей, отражающих изолированное и комбинированное действие изучаемых веществ, выбирают только те показатели, которые статистически значимо отличаются в опытных группах в сравнении с контрольной группой.

13.3.2. На начальном этапе рассчитывают коэффициент комбинированного действия как отношение эффекта, вызванного смесью химических веществ, к усредненной сумме эффектов, наблюдавшихся при изолированном действии каждого компонента смеси.

13.3.3. В качестве математического критерия оценки служит единица с соответствующим доверительным интервалом:  $K_{\text{кд}} = 1 \pm \text{ДИ}$  (доверительный интервал). Одновременно учитывают направленность изменения исследуемого показателя: увеличение или снижение показателя относительно контрольной группы:

- при увеличении показателя в случае, если  $K_{\text{кд}} > 1 + \text{ДИ}$  смесь обладает более чем аддитивным действием, при  $K_{\text{кд}} < 1 - \text{ДИ}$  — действие смеси менее чем аддитивное;

- при снижении показателя в случае, если  $K_{\text{кд}} > 1 + \text{ДИ}$  — действие смеси менее чем аддитивное, при  $K_{\text{кд}} < 1 - \text{ДИ}$  — более чем аддитивное;

- если значение  $K_{\text{кд}}$  находится в пределах  $1 \pm \text{ДИ}$ , то наблюдается аддитивное действие химических веществ.

14. При более чем аддитивном действии химических веществ в смеси гигиеническую оценку воздуха рабочей зоны необходимо проводить с учетом установленного коэффициента комбинированного действия.