

УТВЕРЖДАЮ

Директор ИП АХМАДУЛЛИНА А.Г.

Ахмадуллина А.Г. Ахмадуллина

"14" января 2019 г.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

«ИССЛЕДОВАНИЕ КУМУЛЯТИВНЫХ СВОЙСТВ АНТИОКСИДАНТА

«БИСФЕНОЛ – 5» НА БЕЛЫХ КРЫСАХ»

Казань 2019

РЕФЕРАТ

В отчете 11 страниц, таблиц 3

Изучены кумулятивные свойства антиоксиданта Бисфенол - 5 на белых лабораторных крысах.

Эксперименты проведены на 20 белых крысах, живой массой 150-250 г. Животные содержались при следующих параметрах окружающей среды: температура $+ 22 \pm 2$ °С, относительная влажность 50 ± 20 %, воздухообмен 12–15 объемов помещения в час, световой режим – 12:12 ч. Содержание животных и уход за ними осуществлялись в соответствии с правилами, изложенными в Европейской конвенции по защите позвоночных животных [1]. Грызуны были разделены на 2 группы, по 10 голов в каждой группе, из них 5 самок и 5 самцов. Первая группа была контрольная, они получали полноценный рацион, животные второй группы дополнительно к рациону получали антиоксидант «Бисфенол-5» в дозировке 200 мг/кг (1/10 от ЛД₅₀), далее количество препарата увеличивали в 1,5 раза через каждые четыре дня. Конечная дозировка составила 2000 мг/кг живой массы.

По результатам исследований установлено, что «Бисфенол – 5» в дозировке 2000 мг/кг живой массы не оказывает кумулятивного действия на организм белых крыс.

СОДЕРЖАНИЕ

	стр.
ВВЕДЕНИЕ.....	4
Материалы и методы.....	6
Результаты исследований.....	7
Заключение.....	10
Список литературы.....	11

ВВЕДЕНИЕ

В развитии токсикологии, как и всякого научного знания, важным аспектом является методология исследования, которая в традиционном понимании представляет собой учение о методах и процедурах научной деятельности, а также раздел общей теории познания, в особенности теории научного познания (эпистемологии) и философии науки. Методология профилактической токсикологии и, в частности, учения о кумуляции базируется на широком круге медико-биологических дисциплин, позволяющих понимать природу интоксикации, ее симптомы, выявлять преимущественно реагирующие системы, оценивать влияние вещества на взаимодействие организма с окружающей средой [2].

Кумуляция – накопление вещества в организме при повторном воздействии (материальная кумуляция). Прогрессирующее нарастание изменений в органах и тканях организма при повторном воздействии вещества (функциональная кумуляция).

Целью исследования кумулятивности является выяснение характера действия вещества на организм при повторных введениях и подбор доз для проведения хронических экспериментов. Подбор проводится на основании сравнения доз вещества, вызывающих гибель животных при однократном и повторном воздействии. Под кумулятивным действием понимают *усиление* действия яда при повторном его воздействии [3].

Кумулятивные свойства веществ зависят от их физических и химических свойств. Накопление препаратов в жировых депо может способствовать тому, что химические вещества могут в дальнейшем включаться в обменные процессы, что часто приводит к токсическим эффектам. Другим важным показателем при оценке хронической токсичности является суммирование эффектов. Кроме кумулятивных ядов имеются вещества с "суммационным" токсическим действием. Сущность суммационного действия заключается в том, что попавшее в организм вещество разлагается или выводится, а вызванная им реакция остается и

вызывает в организме необратимое изменение. Последующий эффект суммируется с предыдущим [4].

Поэтому изучение кумулятивных свойств новых химических соединений с целью установления доз для исследования их хронической токсичности является одним из основных критериев оценки их токсикологических свойств. Как известно, до проведения хронических токсикологических экспериментов рекомендуется определить коэффициент кумуляции фармакологического вещества, т.е. отношение ЛД₅₀ при однократном введении к ЛД₅₀ при кратном введении [5].

В связи с вышеизложенным в лаборатории НТЦ «AhmadullinS - Наука и технологии» был проведен опыт по изучению кумулятивных свойств антиоксиданта Бисфенол-5 [6-9].

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Кумулятивные свойства антиоксиданта Бисфенол-5 изучали методом субхронической токсичности [5] на белых крысах путем многократного введения препарата. Преимущество этого метода является несложность проведения опытов и возможность оценить не только кумулятивные свойства химических веществ, но и привыкание.

Для проведения опытов использовали 20 белых крыс с живой массой 150-250 г. Животных разделили на опытную и контрольную группы по 10 голов в каждой, из них 5 самок и 5 самцов. Согласно руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [10], если из-за низкой токсичности фармакологического вещества нельзя определить ЛД₅₀, следует указывать максимальную дозу, которая была введена животным, но не менее 2 г/кг. Лекарственную форму вводили непосредственно в корм животным ежедневно в течение 28 суток. В первый день препарат вводили в дозе 200 мг/кг (1/10 от ЛД₅₀), далее дозировку увеличивали в 1,5 раза через каждые четыре дня [11].

В течение всего периода наблюдали за общим состоянием и поведением животных, приемом корма и воды, видимыми физиологическими функциями, состоянием шерстного покрова, возможной гибелью и т.п. Перевеску проводили через каждые четыре дня. В конце опыта через одни сутки после последнего введения препарата проводили убой животных. Определяли массу основных органов и рассчитывали массовые коэффициенты. Функциональное состояние центральной нервной системы оценивали по визуальным наблюдениям за двигательной активностью и реакциями на внешние раздражители.

Коэффициент кумуляции определяли по формуле:

$$K = \text{ЛД}_{50}(n) / \text{ЛД}_{50}(1), [5]$$

где K - коэффициент кумуляции;

ЛД₅₀ (n) – дозировка при n-кратном введении вещества;

ЛД₅₀(1)- дозировка при однократном введении вещества.

Если коэффициент кумуляции больше единицы, то это говорит об отсутствии кумулятивных свойств у исследуемого препарата [12, 13].

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Ежедневное введение лекарственной формы в дозировки 2000 мг/кг живой массы не привело к изменению общего состояния и поведения у подопытных крыс.

Введение антиоксиданта не отразилось статистически значимым образом на текущих значениях роста. В таблице 1 приведены результаты мониторинга динамики прироста живой массы тела у крыс в сравнении с контролем.

Таблица 1 - Изменение живой массы тела у крыс, получавших антиоксидант Бисфенол-5 в течение 28 дней, г

Дни введения антиоксиданта	Группа			
	Контрольная		Опытная	
	Самки	Самцы	Самки	Самцы
1-4	191,7	180,3	214,5	234,5
5-8	185,9	177,4	225,6	231,1
9-12	186,7	180,5	224,6	229,9
13-16	188,3	185,3	228,3	230,3
17-20	198,8	191,1	234,3	232,1
20-24	198,4	195,3	233,6	225,6
25-28	196,3	183,9	227,8	217,8
Перед убоем	194,5	180,5	260,4	215,6

Примечание * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; e = 0,02 г

При выборе доз для исследования хронической токсичности вещества следует учитывать его кумулятивные свойства. Поэтому до проведения хронических токсикологических экспериментов рекомендуется определить коэффициент кумуляции вещества, т.е. отношение ЛД₅₀ при однократном

введении к ЛД₅₀ при кратном введении. Схема изучения кумуляции методом субхронической токсичности по Lim'у представлена в таблице 2.

Таблица 2 - Кумулятивные свойства антиоксиданта Бисфенол-5

Вещество	ЛД ₅₀ при однократном введении вещества	ЛД ₅₀ при n-кратном введении вещества	Коэффициент кумуляции
Бисфенол-5	2000 мг/кг	7920 мг/кг	3,96

Случаи гибели среди контрольной и опытной групп не наблюдали. Поскольку ЛД₅₀ при однократном введении препарата составляет 2000 мг/кг живой массы, то по формуле Ю.С. Кагана, В.В. Станкевича [5], коэффициент кумуляции составит 3,96. Что свидетельствует о том, что препарат не обладает кумулятивным свойством.

Ежедневное введение антиоксиданта не привело к изменению относительной массы органов у крыс, получавших дозу 2000 мг/кг живой массы (табл. 3).

Таблица 3 - Влияние препарата Бисфенол-5 на массовые коэффициенты органов крыс, г

Орган	Группа	
	Контрольная	Опытная
Сердце	0,68	0,74
Печень	4,33	6,30
Легкие	1,50	1,60
Почки	1,07	1,36
Мышечная ткань	6,47	7,40
Селезенка	0,50	0,59
Кости	1,72	1,99

Примечание * - $P \leq 0,05$; ** - $P \leq 0,01$; *** - $P \leq 0,001$; e = 0,02 г

По результатам исследования по выявлению кумулятивного действия введение препарата не отразилось на общем состоянии и поведении крыс; они охотно потребляли корм и воду, прибавляли в массе тела, адекватно реагировали на внешние раздражители и т.п. На протяжении всего эксперимента гибели опытных животных не регистрировали.

Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что антиоксидант Бисфенол-5 в виде порошка не обладает кумулятивными свойствами. Перед эвтаназией внешний осмотр животных показал, что все они нормально упитаны, имеют правильное телосложение, гладкий и блестящий шерстный покров, очагов облысения не отмечается. Зубы сохранены.

При вскрытии расположение внутренних органов правильное. Свободной жидкости в плевральной и брюшной полостях не обнаружено. При осмотре брюшины патологического выпота не обнаружено, брюшная полость чистая, блестящая, розового цвета. Печень, почки и селезенка полнокровные, без признаков отека.

При макроскопическом исследовании печени, легких, почек, сердца, селезенки и мышечной ткани, получавших антиоксидант Бисфенол-5 в течение 28 дней, отмечено следующее:

- печень контрольной группы имеет молочно-шоколадный цвет, у опытной группы цвет печени отличается, он более светлый из-за накопления антиоксиданта, кровеносные сосуды не видны;
- легкие имеют вид пористой, губчатой структуры бело-розового цвета;
- почки темно-красного цвета, плотные на ощупь. По форме и величине не изменены. Поверхность гладкая, на разрезе органа хорошо различимы корковое и мозговое вещество, почечные лоханки свободны. Капсула почки снимается легко;
- сердце темно-красного цвета в форме неправильного конуса. Хорошо видны протоки артериальных и венозных вен. Клапаны сердца тонкие, блестящие, гладкие. Признаков отека и гипотрофии нет;

- селезенка имеет блестящую поверхность темно-красного цвета с сероватым оттенком. Наружная поверхность селезенки гладкая и выпуклая;
- мышечная ткань розового цвета, волокнистого строения, поверхность гладкая и ровная, без шероховатостей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с отсутствием гибели животных не удалось определить среднесмертельную дозу вещества, поэтому в результате изучения острой токсичности в опытах на лабораторных животных можно сделать следующие заключение, что антиоксидант Бисфенол-5 относится к IV классу опасности. Результаты опытов по изучению кумулятивного действия показали, что его коэффициент кумуляции составил 3,96. Это свидетельствует об отсутствии кумуляции препарата в организме животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. - Strasbourg, 1986. – P. 52.
2. Куликов С.Б. Основы философского анализа науки: методология, смысл и цель / С.Б. Куликов – Томск, 2005 – 184 с.
3. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия) / Под ред. И. В. Саноцкого. – М.: Медицина, 1970. – 345 с.
4. Лазарев Н.В. Эволюция фармакологии. - Л., 1938 - С. 119-121.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Хабриева Р.Ю. – М: Медицина, 2005 – 829 с.
6. Ахмадуллин Р.М., Каримов И.А., Ахметшин И.Ф., Котырев Е.А., Алиманов Д.В., Надеяев К.Л. Исследование стабилизирующей эффективности термостабилизаторов бисфенол-5 и вулканокс ВКФ при производстве бутадиен-нитрильного каучука. Каучук и резина, 2017. Т. 76, 4: 210-213.
7. Ахмадуллин Р.М., Гатиятуллин Д.Р., Васильев Л.А., Ахмадуллина А.Г., Мукменёва Н.А., Черезова Е.Н., Мингшу Ёанг (Mingshu Yang). Эффективность 4,4'-бис(2,6-ди-трет-бутилфенол) а при стабилизации изопренового каучука и полипропилена. Журнал прикладной химии, 2015. Т. 88. Вып. 5: 792-797.
8. Ахмадуллин Р.М., Нугуманова Г.Н., Мукменева Н.А., Бухаров С.В. и др. Особенности стабилизирующего действия фенольного антиоксиданта 4,4'-бис(2,6-ди-трет-бутилфенол) в процессе старения каучуков. Каучук и резина, 2006, 10: 12-14.
9. Characteristics of the stabilising action of phenolic antioxidant 4,4'-bis(2,6-di-tert-butylphenol) in the ageing process of rubbers. Akhmadullin, R. M. Mukmeneva, N. A. etc. INTERNATIONAL POLYMER SCIENCE AND TECHNOLOGY. 2007, VOL 34; NUMB 1, pp T/41-T/44.

10. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н.Миронов, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильев, О.Л. Верстакова, М.В. Журавлева, В.К. Лепяхин, Н.В. Коробов, В.А. Меркулов, С.Н. Орехов, И.В. Сакаева, Д.Б. Утешев, А.Н. Яворский. – Гриф и К, Москва 2012. – ISBN 978-5 – 944 с.
11. Lim R.K., Rink K.G., Glass H.G., Soaje–Ehagye E.A. Method for the evaluation of cumulation and tolerans by the determination of acute and subchronic median effective doses // Arch. Intern. Pharm. Ther. – 1961 – V. 130 – P. 336–352.
12. Третьяков А.Д. и др. Ветеринарные препараты. - М., 1988 - С. 201-216.
13. Тритэк В. С., Гуляев А. Е. Способ определения коэффициента кумуляции в токсикологическом исследовании // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2011 – № 3 – С. 35–36.