

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФГБНУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ,  
РАДИАЦИОННОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»

УДК 619:615.7:591.1:569.323.4

«УТВЕРЖДАЮ»

Заведующий сектором № 8  
ФГБНУ «ФЦТР-ВНИВИ»



Л.Р. Валиуллин

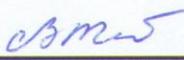
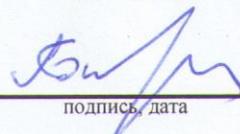
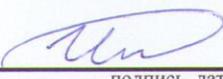
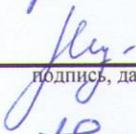
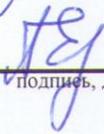
2019 г.

ОТЧЕТ

по НИР «Исследование алергизирующих и мутагенных свойств  
препарата бисфенол-5 на животных»

Казань 2019

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

ст. науч. сотр., докт. мед. наук	 _____	И.С. Рагинов
вед. науч. сотр., канд. биол. наук	 _____	В.Ю. Титова
ст. науч. сотр., канд. биол. наук	 _____	Е.В. Скворцов
вед. науч. сотр., канд. биол. наук	 _____	В.В. Бирюля
ст. науч. сотр., канд. биол. наук	 _____	И.И. Идиятов
ст. науч. сотр., канд. биол. наук	 _____	А.В. Софронова
науч. сотр., канд. биол. наук	 _____	Риш.С. Мухаммадиев
науч. сотр., канд. биол. наук	 _____	Рин.С. Мухаммадиев
млад. науч. сотр.	 _____	А.И. Ерошин

## РЕФЕРАТ

Отчет: 45 страниц, 19 таблиц, 2 рисунка, 12 литературных источников.  
БИСФЕНОЛ-5, КРОЛИКИ, КРЫСЫ, МОРСКИЕ СВИНКИ, МЕСТНО-РАЗДРАЖАЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ, АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА, МУТАГЕННОСТЬ, КУММУЛЯЦИЯ

Объектом исследования являлся препарат бисфенол-5.

Цель работы: изучение алергизирующих и мутагенных свойств препарата бисфенол-5 на животных.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- исследование местно-раздражающего действия препарата бисфенол-5 на слизистой оболочке глаза кроликов;
- исследование анафилактической активности в реакции общей анафилаксии препарата бисфенол-5 на морских свинках;
- изучение сенсibiliзирующего действия препарата бисфенол-5 на морских свинках и кроликах;
- исследование мутагенных свойств - выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической (кластогенной) активности вещества в клетках костного мозга млекопитающих;
- изучение кумулятивных свойств препарата бисфенол-5 на белых лабораторных крысах.

Методы исследования. Для изучения местно-раздражающего действия (сенсibiliзирующей характеристики фармакологического вещества или лекарственного препарата, выражающей его способность вызывать гиперчувствительность замедленного типа у животных при однократном введении) препарат наносили на слизистую оболочку глаза подопытных кроликов.

Анафилактическую активность на морских свинках изучали следующим образом: исследуемое соединение использовали в эффективной терапевтической дозе и в дозе, в 10 раз ее превышающей: первая инъекция осуществлялась подкожно, две последующие – внутримышечно через день в

области бедра. Разрешающая инъекция – внутривенно на 14 и 21 дни после сенсibilизирующей инъекции. Разрешающая доза была равна суммарной сенсibilизирующей дозе. Разрешающая инъекция на 14 и 21 дни вводилась и контрольной группе животных, которые получали только растворитель (негативный контроль) или овальбумин (позитивный контроль).

Изучение сенсibilизирующего действия препарата бисфенол-5 осуществляли методом аппликаций на кожу и конъюнктивальной пробой на морских свинках и кроликах. В первой серии исследований проводилось 20 повторных накожных аппликаций препарата в дозе 2, 5, 20 мг/кг на участки боковой поверхности туловища, ближе к середине туловища, размером 2×2 см у морских свинок и 5×5 см у кроликов по 5 раз в неделю.

Определение сенсibilизирующего действия препарата осуществляли на слизистой оболочке правого глаза морских свинок и кроликов, нанося одну каплю пробы глазной пипеткой с вытянутым тонким концом под верхнее веко, на передний сегмент глаза. Контрольным животным во второй глаз наносили растительное масло. Реакцию слизистой оболочки опытного глаза, века и роговицы регистрировали через 15 минут (быстрая реакция) после воздействия препарата в дозе 2, 5, 20 мг/кг и через 24, 48 часов наблюдения (гиперчувствительность замедленного типа).

Исследование мутагенных свойств препарата бисфенол-5 проведено на белых крысах посредством его внутрижелудочного введения в дозах, соответствующих суточной терапевтической и субтоксической (максимальной) дозам, однократно и ежедневно на протяжении 5 суток с последующей фиксацией клеточного материала и регистрацией видимых структурных нарушений хромосом в клетках костного мозга на стадии метафазы.

Эксперименты по изучению кумулятивных свойств проведены на 20 белых крысах, живой массой 150-250 г. Животные содержались при следующих параметрах окружающей среды: температура + 22±2°C, 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 – животные получали полноценный рацион, животные второй группы дополнительно к рациону получали антиоксидант «Бисфенол-5» в дозировке 200 мг/кг (1/10 от ЛД<sub>50</sub>), далее количество препарата увеличивали в 1,5 раза через каждые четыре дня. Конечная дозировка составила 2000 мг/кг живой массы.

В ходе экспериментов установлено отсутствие местно-раздражающего действия препарата бисфенол-5 на слизистую оболочку глаза кроликов. В результате клинических исследований состояния организма кроликов после нанесения препарата бисфенол-5 на слизистую оболочку глаза не наблюдали изменений температуры тела, частоты пульса и количества дыхательных движений

При постановке реакции общей анафилаксии (анафилактического шока) свидетельствуют об отсутствии анафилактогенных свойств препарата бисфенол-5, как в терапевтической дозе, так и дозе в 10 раз ее превышающей.

Изучение сенсibilизирующего действия препарата после 10 и 20 повторных кожных аппликаций показало, что видимых изменений в виде гиперемии, инфильтрации, шелушения не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии сенсibilизации организма. Реакция кожи в опытных группах животных не отличалась от контрольных. После кожного применения морским свинкам и кроликам препарата бисфенол-5 общее состояние животных было удовлетворительным, масса животных соответствовала возрастной физиологической норме, изменений поведения и аппетита животных не выявлено. Не обнаружено достоверных различий также в температуре тела и живой массе в контрольных и опытных группах животных. Участки кожи после стрижки и бритья одинаково быстро зарастали молодой шерстью, не отличающейся по густоте у опытных и контрольных групп животных.

В ходе постановки конъюнктивных проб опытными и контрольными животными установлено отсутствие признаков гиперчувствительности как немедленного, так и замедленного типа в отношении препарата бисфенол-5. Отсюда следует, что исследуемый препарат не токсичен при постановке конъюнктивных проб лабораторным животным.

Изучение мутагенных свойств показало, что частота установленных хромосомных aberrаций в клетках костного мозга белых крыс подвергнутых однократному и длительному воздействию препарата бисфенол-5 в испытываемых дозах не имеет достоверных отличий с частотой спонтанных aberrаций. Следовательно, препарат в исследуемых дозах не вызывает индукцию хромосомных нарушений и не представляет мутагенной опасности.

Изучение кумулятивных свойств препарата бисфенол-5 на крысах показало, что коэффициент кумуляции составил 3,96, что больше 1, а следовательно бисфенол-5 не обладает кумуляцией.

## СОДЕРЖАНИЕ

	ВВЕДЕНИЕ.....	8
1	Материалы и методы.....	10
2	Результаты исследований.....	18
2.1	Исследование местно-раздражающего действия препарата бисфенол-5 на кроликах.....	18
2.2	Изучение алергизирующих свойств препарата бисфенол-5 на животных.....	18
2.2.1	Оценка анафилактической активности в реакции общей анафилаксии препарата бисфенол-5 на морских свинках.....	22
2.2.2	Изучение сенсibilизирующего действия препарата бисфенол-5 на морских свинках и кроликах .....	24
2.3	Исследование мутагенных свойств препарата бисфенол-5 на крысах.....	36
2.4	Изучение кумулятивных свойств препарата бисфенол-5 на крысах.....	39
3	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	43
4	ЛИТЕРАТУРА.....	45

## ВВЕДЕНИЕ

Полноценное и здоровое питание – одно из наиболее важных и необходимых условий для сохранения ветеринарного благополучия. На сегодняшний день, одним из ведущих направлений является изучение антиоксидантов как потенциальных компонентов в продуктах функционального кормления, благодаря их многочисленным положительным воздействиям на здоровье животных и профилактику заболеваний. Антиоксиданты работают как функциональные добавки, они замедляют процессы окисления, а также предотвращают возникновение патологий в желудочно-кишечном тракте.

Антиоксиданты (антиокислители, ингибиторы окисления) – химические соединения, предотвращающие или замедляющие окисление молекулярным кислородом многих веществ (жиры, витамины и др.), входящих в состав природных кормов, повышая их сохранность.

Бисфенол-5 обладает ярко выраженной антиокислительной активностью и превосходит другие аналоги пространственно затрудненных фенолов. Бисфенол-5 используется в качестве антиоксиданта для стабилизации каучуков, пластмасс, минеральных, синтетических и пищевых масел, а также в качестве исходного компонента для получения 4,4'-бифенилдиола. Бисфенол-5 является пространственно затрудненным фенолом как и ионол, который относится к классу малотоксичных соединений, не обладает тератогенным и мутагенным свойствами, не влияет на размножение животных. Он используется в различных отраслях медицины для предотвращения нарушений, вызванных развитием окислительного стресса, в терапевтических целях. После длительного приема бисфенола-5 не обнаруживаются нарушения гемопоеза и морфологических изменений в органах животных. М. Şentürk и др. установили, что бисфенол-5 ингибирует карбоангидразу II человека – цитозольный фермент эритроцитов, участвующий в гидратации диоксида углерода (кислотно-щелочном балансе, транспорте диоксида углерода, дыхании). Бисфенол-5 подобно 5-метилendisалициловой кислоте способен блокировать ДНК-связывающую

активность белка регулятора транскрипции MgrA у бактерии *Staphylococcus aureus* (золотистого стафилококка). Он ингибирует экспрессию  $\alpha$ -токсина, стимулируемого MgrA, и активирует транскрипцию гена белка A, который в норме подавляется MgrA. На модели инфекции мышей установлено, что бисфенол-5 подавляет болезнетворные свойства бактерии. По данным Гарвардской Медицинской Школы, благодаря своей антибиотической активности, бисфенол-5 может активировать  $\gamma$ -глутамилтранс-пептидазу.

Целью настоящих исследований являлось изучение аллергизирующих и мутагенных свойств препарата бисфенол-5 на животных. Задачи исследований включали изучение местно-раздражающего действия; аллергизирующих свойств; оценку анафилактического и сенсibilизирующего действия препарата бисфенол-5 и выяснение причин наступления гибели животных с анализом клинической картины интоксикации животных; исследование мутагенных свойств - выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической (кластогенной) активности вещества в клетках костного мозга млекопитающих; определение кумулятивных свойств – выявление коэффициента кумуляции фармакологического вещества, отношение ЛД50 при однократном введении к ЛД50 при кратном введении.

## 1 Материалы и методы

Работа осуществлялась в соответствии с требованиями следующих регламентирующих нормативных документов:

– Приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики».

– Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронова. - М.: Гриф и К, 2012. - 944 с.

– Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. В.П. Фисенко. – М.: Ремедиум, 2000. - 398 с.

– Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ / Всемирная организация здравоохранения, Женева, 1989. – 212 с. (перевод с английского В.В. Соколовского).

Подопытные животные находились в одинаковых условиях содержания и кормления в соответствии с общеевропейскими требованиями к животным, используемым в эксперименте (Страсбург, 1986), а также правилами лабораторной практики, применяемыми на территории Российской Федерации (приказ МЗ РФ №199н от 2016 г.). Параметры окружающей среды соответствовали санитарно-гигиеническим нормам, установленным для биоклиник (вивариев).

Крыс, морских свинок и кроликов содержали в индивидуальных клетках со свободным доступом к пище и воде. На передней стенке клетки были установлены кормушка и автопоилка. В качестве подстилки применяли древесные опилки. Подстилку заранее автоклавировали. Кормление животных проводили в соответствии с зоотехническими нормами. Корма хранили в специально отведенном для этой цели помещении (складе). Снабжение питьевой водой производилось из водопровода, качество воды соответствует ГОСТ «Вода питьевая». Животных содержали в

контролируемых условиях окружающей среды (15-18 °С и 50-65 % относительная влажность). Чистку клеток осуществляли ежедневно. Время адаптации перед началом эксперимента составляло не менее 21 дня.

Группы животных формировали по принципу аналогов с учетом возраста, живой массы и пола.

Местно-раздражающее действие препарата бисфенол-5 оценивали в опыте на кроликах. Для постановки пробы готовили масляные растворы препарата в дозах 2, 5 и 20 мг/кг живой массы. Исследование предполагало однократное закапывание одной капли испытуемого раствора на конъюнктиву под верхнее веко правого глаза. Контрольным животным наносили растительное масло. Устанавливали наличие и выраженность гиперемии и отека конъюнктивы, инъекцию сосудов склеры, состояние роговицы и радужной оболочки, количество и качество выделений из глаза через 1, 6, 24, 48 и 96 часов после нанесения препарата.

Оценку анафилактической активности соединения бисфенол-5 проводили реакцией общей анафилаксии (анафилактический шок). В качестве подопытных животных использовали 32 лабораторные морские свинки с исходной массой тела 350-400 г., полученные из вивария лабораторных животных ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Количество животных в опытных и контрольной группах составляло по 6 особей. Среди животных одной группы максимальная разница в массе не превышала 10%. В опыт брали клинически здоровых животных, содержащихся на стандартном рационе и прошедших до начала эксперимента 14-ти дневный карантин.

Экспериментальные животные были разделены на 4 группы:

1. Группа 1 - животных сенсibilизировали 2%-ным раствором спирта (отрицательный контроль).

2. Группа 2 - животных сенсibilизировали 0,6% раствором белка куриного яйца, основным аллергическим компонентом которого является овальбумин (положительный контроль).

3. Группа 3 - морских свинок сенсibilизировали препаратом бисфенол-5, растворенным в 2%-ом спирте, в дозе эквивалентной одной терапевтической дозе (2 мг/кг).

4. Группа 4 - животных сенсibilизировали препаратом бисфенол-5 в дозе эквивалентной десяти терапевтическим дозам (20 мг/кг).

Морским свинкам вводили исследуемое соединение в эффективной терапевтической дозе и в дозе, в 10 раз ее превышающей: первая инъекция подкожно, две последующие внутримышечно через день в области бедра. Разрешающая инъекция – внутривенно на 14 и 21 дни после сенсibilизирующей инъекции. Разрешающая доза была равна суммарной сенсibilизирующей дозе. Разрешающая инъекция на 14 и 21 дни вводилась и контрольной группе животных, которые получали только растворитель (негативный контроль) или овальбумин (позитивный контроль).

Учет интенсивности анафилактического шока (в индексах по Weigle) проводили по формуле:

$$\frac{(N \times 4) + (N_1 \times 3) + (N_2 \times 2) + (N_3 \times 1) + (N_4 \times 0)}{N + N_1 + N_2 + N_3 + N_4},$$

где N – число морских свинок, у которых наступила смерть;

N<sub>1</sub> – число морских свинок, у которых развился тяжелый шок;

N<sub>2</sub> – число морских свинок, у которых развился умеренный шок;

N<sub>3</sub> – число морских свинок, у которых развился слабый шок;

N<sub>4</sub> – морские свинки, у которых шок не наступил.

Интенсивность анафилактического шока животных на воздействие препарата оценивали в индексе по Weigle.

Таблица 1 – Шкала оценки интенсивности анафилактического шока в индексе по Weigle

Результат реакции	Условное обозначение	Описание реакции
Отсутствие шока	-	Отсутствие анафилактоидных реакций

Результат реакции	Условное обозначение	Описание реакции
Слабый шок	+	Некоторое беспокойство, учащенное дыхание, почесывание мордочки, непроизвольное мочеиспускание, дефекация, шерсть взъерошена
Умеренный шок	++	Небольшие судороги, выраженные явления бронхоспазма
Тяжелый шок	+++	Общие судороги, асфиксия, животное теряет способность удерживаться на лапах, падает на бок, не погибает
Шок со смертельным исходом	++++	Гибель всех животных

Эксперименты по изучению сенсibiliзирующего (местно-раздражающего) действия вещества, приготовленного на вазелиновом масле, проводили на 24 морских свинок с массой тела 350-400 г. и на 24 кроликах массой 1,8-2,0 кг, методом кожных аппликаций и конъюнктивальной пробой. Количество животных в опытной и контрольной группах составляло по 6 особей.

В первой серии исследований проводилось 20 повторных кожных аппликаций препарата в дозах 2, 5, 20 мг/кг на участки боковой поверхности туловища, ближе к середине туловища, размером 2×2 см у морских свинок и 5×5 см у кроликов по 5 раз в неделю. Исследуемый препарат наносили равномерным слоем в количестве 3 капель на весь участок аппликации с помощью глазной пипетки. Морским свинкам и кроликам контрольной группы наносили вазелиновое масло. Животных содержали в индивидуальных клетках и крепили на шею воротники из пластика, предотвращающие слизывание препарата.

Реакцию кожи на воздействие препарата оценивали после 10-й и 20-й аппликации в баллах по шкале оценки кожных проб.

Таблица 2 – Оценочная шкала кожной реакции

Реакция кожи (визуально)	Оценка реакции в баллах
1. Видимой реакции нет	0
2. Очаговая эритема по всему участку и по его периферии	1
3. Сплошное бледно-розовое пятно или сливающаяся очаговая эритема (красные пятна на розовом фоне)	2
4. Красная эритема по всему участку	3
5. Инфильтрация и отек кожи	4
6. Эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления	5

Величину отека определяли путем измерения толщины кожной складки (в мм) при помощи толщиномера ТР-1-10.

Таблица 3 – Шкала оценки интенсивности отека кожи

Интенсивность отека (увеличение толщины кожной складки, мм)	Оценка отека (в баллах)		
	Морские свинки	Кролики	
Отсутствие	0	0	0
Слабый	до 0,3	до 0,5	1
Умеренный	0,4-0,6	0,6-1,0	2
Выраженный	0,7-1,0	1,1-2,0	3
Резко выраженный	>2,0	>1,0	4

Во второй серии экспериментов определение сенсibiliзирующего действия препарата осуществляли на слизистой оболочке правого глаза морской свинки и кролика, нанося одну каплю пробы глазной пипеткой с вытянутым тонким концом под верхнее веко, на передний сегмент глаза. Контрольным животным во второй глаз наносили растительное масло. Реакцию слизистой оболочки опытного глаза, века и роговицы

регистрировали через 15 минут (быстрая реакция) после воздействия препарата в дозах 2, 5, 20 мг/кг и через 24, 48 часов наблюдения (гиперчувствительность замедленного типа).

Результаты оценивали по следующей шкале (в баллах):

0 – реакции нет;

1 - легкое покраснение слезного протока;

2 - покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;

3 - покраснение всей конъюнктивы и склеры. Реакция сопровождается зудом и при расчесывании лапками возможно развитие гнойного офтальмита.

Сенсибилизирующее действие препарата бисфенол-5 также оценивали по следующим показателям: изменение поведения и общего состояния животных, их аппетита, температуры и массы тела; состояние шерстного и кожного покровов, появление воспаления кожи – измерением толщины кожной складки кутиметром; интенсивности отрастания шерсти путем острига под корень пучков шерсти и измерения их длины в миллиметрах.

Определение мутагенных свойств препарата проводили на 40 белых крысах обоего пола живой массой 180-200 г, разделенных на группы по 5 животных в каждой. Кормление животных проводили в соответствии с зоотехническими нормами. Корма хранили в специально отведенном для этой цели помещении (складе). Снабжение питьевой водой производилось из водопровода, качество воды соответствует ГОСТ Р 51232-98 «Вода питьевая». Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды 15-18 °С и относительной влажности 50-65%. Чистку клеток осуществляли ежедневно. Время адаптации перед началом эксперимента составляло не менее 14 дней.

Эксперимент проводили в два этапа. В первой серии препарат бисфенол-5 в дозах, соответствующих суточной терапевтической (2 мг/кг живой массы) и субтоксической (максимальной - 2000 мг/кг живой массы), вводили однократно только самцам. Во второй серии испытуемое вещество в тех же дозах вводили самцам и самкам ежедневно на протяжении 5 суток. Вещество вводили перорально с помощью атравматического зонда в виде

масляной суспензии, которую готовили непосредственно перед введением животным.

В качестве позитивного контроля использовали циклофосфан в дозе 20 мг/кг (внутрибрюшинно, растворяли физиологическим раствором), негативным контролем служило растительное масло, используемое в качестве растворителя испытуемого вещества, интактным животным вводили физиологический раствор.

Фиксацию клеточного материала осуществляли через 24 ч после последнего введения вещества.

Для блокирования митоза на стадии метафазы (для накопления метафаз) за 2,5 ч до забоя животным внутрибрюшинно вводили 0,025% раствор колхицина в дозе 0,01 мг/г живой массы.

Костный мозг извлекали из бедренной кости, вымывая его раствором Хенкса в отдельные центрифужные пробирки, клетки центрифугировали в течение 5 минут при 1000 об./мин., надосадочную жидкость удаляли и медленно добавляли среду, разбавленную дистиллированной водой (1:1) спустя 30 минут клетки центрифугировали, диспергировали и фиксировали смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1. Фиксацию проводили трехкратно, в промежутках между сменой фиксатора клетки центрифугировали, пробирки выдерживали в холодильнике при  $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$  в течение 10 минут. Клеточную суспензию наносили на предметные стекла, высушивали на воздухе, окрашивали азур-эозином в течение 10 минут. Окрашенные препараты промывали дистиллированной водой, высушивали на воздухе, осветляли в ксилоле. Препараты просматривали при малом увеличении для отбора метафаз, пригодных для анализа. Затем используя большое увеличение (под иммерсией) анализировали отдельные метафазные пластинки без наложений хромосом. От каждого животного анализировали по 100 метафаз. Учитывали число одиночных и парных фрагментов, обменов, ахроматических пробелов, клеток с множественными повреждениями и полной фрагментацией хромосом.

Доказательством цитогенетической активности исследуемого препарата является статистически значимое превышение доли аберрантных клеток в опыте по сравнению с негативным контролем.

Кумулятивные свойства препарата бисфенол-5 изучали методом субхронической токсичности [5] на белых крысах путем многократного введения препарата. Преимуществом 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 ЛД<sub>50</sub>, 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 ЛД<sub>50</sub>), 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;

ЛД<sub>50</sub> (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].

Обработку цифрового материала проводили методом вариационной статистики с применением критерия достоверности по Стьюденту с использованием программ Excel.

## 2 Результаты исследований

### 2.1 Исследование местно-раздражающего действия препарата бисфенол-5 на кроликах

Изучение влияния на слизистую глаза кроликов показало, что препарат бисфенол-5 в испытуемых дозах не вызывает раздражения конъюнктивы, как после инстилляций, так и на протяжении всего периода наблюдения. Покраснения (гиперемии) конъюнктивы, отека века, выделений, слезотечения, помутнения роговицы не отмечали. Результаты изучения местно-раздражающего действия препарата бисфенол-5 на глаза кроликов представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты изучения местно-раздражающего действия препарата бисфенол-5 на глаза кроликов

Группы животных	Время, ч	Конъюнктура			Роговица	
		Покраснение века	Отек века	Выделения	Помутнение	Площадь поражения
Группа 1 (контроль)	1	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	6	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	24	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	48	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	72	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	96	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Группа 2 (2 мг/кг)	1	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	6	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	24	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	48	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	72	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	96	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Группа 3 (5 мг/кг)	1	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	6	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	24	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	48	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	72	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	96	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	1	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	6	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Группы животных	Время, ч	Конъюнктура			Роговица	
		Покраснение века	Отек века	Выделения	Помутнение	Площадь поражения
Группа 4 (20 мг/кг)	24	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	48	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	72	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	96	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

Результаты клинических исследований состояния организма кроликов после нанесения препарата бисфенол-5 на слизистую оболочку глаза представлены в таблице 5.

В результате клинических исследований состояния организма кроликов после нанесения препарата бисфенол-5 на слизистую оболочку глаза не наблюдали изменений температуры тела, частоты пульса и количества дыхательных движений (таблица 5).

Общее состояние животных удовлетворительное, поведение соответствует данному виду животного, интенсивные двигательные движения, активные передвижения по клетке, судороги отсутствуют, движения животных скоординированы, реакция на звуковые, тактильные и болевые, звуковые раздражители сохранена. Шерстный покров гладкий, блестящий, волос прочно удерживается в волосяной луковице. Слизистые оболочки бледно-розового цвета, без кровоизлияний и изъязвлений.

Таким образом, в результате исследования установлено отсутствие местно-раздражающего действия препарата бисфенол-5 на глаза кроликов.

Таблица 5 Результаты клинических исследований состояния организма кроликов после нанесения препарата бисфенол-5 на глаза кроликов

Время, через	Препарат, доза											
	Контроль			2 мг/кг			5 мг/кг			20 мг/кг		
	Т, °С	Пульс	Дыхание	Т, °С	Пульс	Дыхание	Т, °С	Пульс	Дыхание	Т, °С	Пульс	Дыхание
До нанесения	39,1±0,4	138,0±2,4	54,8±1,2	38,9±0,2	134,4±3,9	52,1±0,8	39,3±0,2	143,2±1,8	57,5±1,7	39,2±0,3	141,7±2,1	56,9±1,4
15 мин	39,0±0,2	137,8±3,6	55,5±0,8	38,9±0,3	133,9±2,3	52,6±0,5	39,2±0,2	143,4±2,3	57,2±0,9	39,1±0,4	142,1±1,6	57,4±1,0
30 мин	39,0±0,3	137,5±1,9	53,9±1,3	39,0±0,3	133,2±3,5	53,3±0,6	39,2±0,3	143,0±1,4	56,8±1,7	39,2±0,4	141,4±1,3	56,7±1,6
1 ч	38,9±0,2	136,7±2,5	54,2±0,7	39,0±0,2	135,0±2,7	53,8±1,1	39,1±0,4	141,7±2,6	55,4±1,4	39,3±0,2	141,8±1,8	56,0±1,3
2 ч	39,0±0,3	138,3±1,8	55,1±0,9	39,1±0,4	134,7±2,9	54,1±0,7	39,1±0,3	141,5±1,3	56,9±1,9	39,3±0,3	140,4±1,5	55,8±0,9
4 ч	39,1±0,3	136,6±3,0	54,7±1,4	39,0±0,3	134,1±3,4	53,8±0,9	39,4±0,2	142,2±2,0	57,4±1,3	39,0±0,2	142,0±1,1	56,3±1,1
8 ч	38,9±0,2	137,1±2,7	54,4±1,0	39,1±0,3	133,8±2,9	52,7±1,0	39,2±0,3	142,8±2,3	56,2±2,1	39,1±0,3	141,2±1,7	57,1±1,5
24 ч	39,2±0,2	137,9±3,2	55,8±0,8	39,1±0,2	133,2±2,6	52,0±0,8	39,3±0,2	143,1±1,1	56,7±1,7	39,1±0,2	139,7±2,0	56,6±1,2
48 ч	39,0±0,3	138,2±2,8	54,3±1,6	39,0±0,3	135,3±3,3	52,4±0,6	39,1±0,2	142,7±1,5	57,6±1,2	39,2±0,2	140,9±1,4	55,5±1,4

## 2.2 Изучение алергизирующих свойств препарата бисфенол-5 на животных

### 2.2.1 Оценка анафилактической активности в реакции общей анафилаксии препарата бисфенол-5 на морских свинках

Оценку анафилактического действия препарата бисфенол-5 проводили в реакциях общей анафилаксии (анафилактический шок) у морских свинок. Морские свинки после карантирования по принципу аналогов были разделены на 4 группы – опытную (2, 20 мг/кг) и контрольную по 8 голов в каждой. Экспериментальных животных первой серии экспериментов сенсибилизировали введением исследуемого соединения в дозе 2 мкг/кг (терапевтическая доза) – первая инъекция подкожно, вторая и третья внутримышечно через день. Подопытных животных второй серии экспериментов сенсибилизировали введением препарата дозе 20 мг/кг (в 10 раз превышающей терапевтическую) по той же схеме. Разрешающую инъекцию препарата вводили внутривенно на 21-й день от начала сенсибилизации. Животным контрольной группы по идентичной методике вводили 2 %-ный раствор спирта (негативный контроль) или 0,26%-ный раствор белка куриного яйца (позитивный контроль). Оценку реакции проводили в индексах по Weigle.

Оценка анафилактической активности в реакции общей анафилаксии показала, что тестируемое вещество не вызывает анафилактической реакции у морских свинок опытных и контрольных (негативный контроль) групп. Признаков беспокойства, учащенного дыхания, почесывания мордочки, непроизвольного мочеиспускания, дефекации, а также признаков одышки или судорог, выраженных явлениями бронхоспазма, отмечаемых в случае развития анафилаксии, не наблюдалось.

Общее состояние животных было удовлетворительным, масса животных соответствовала возрастной физиологической норме, изменений поведения и аппетита животных не выявлено. Не обнаружено достоверных различий

также в температуре тела и живой массе в контрольных и опытных группах животных. Шерсть не взъерошена, контактного дерматита не выявлено. Морские свинки не теряли способность удерживаться на лапах, все животные остались живы.

Результаты действия препарата бисфенол-5 на интенсивность анафилактического шока у морских свинок представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Оценка реакции общей анафилаксии у морских свинок после введения препарата бисфенол-5

Группы животных	Количество животных	Индекс реакции по Weigle
Группа 1 (отрицательный контроль)	8	0
Группа 2 (положительный контроль)	8	$3,3 \pm 0,2$
Группа 3 (2 мг/кг)	8	0
Группа 4 (20 мг/кг)	8	0

В группах 3 и 4 инъекция исследуемого вещества в дозах 2 и 20 мг/кг, соответственно, не вызвала проявления анафилактической реакции ни у одного из животных. Индексы по Вейглю для каждого животного были равны 0. Средний индекс по Вейглю в группах 3 и 4 составил 0. Отсутствие анафилактогенной активности наблюдали и в группе 1 (отрицательный контроль), где средний индекс по Вейглю составил 0.

В группе 2 (положительный контроль) у всех морских свинок сенсibilизированных раствором белка куриного яйца развивалась анафилактическая реакция. Средний индекс по Вейглю в группе 2 составил  $3,3 \pm 0,2$ .

Таким образом, результаты постановки реакции общей анафилаксии (анафилактического шока) свидетельствуют об отсутствии анафилактогенных свойств препарата бисфенол-5 как в терапевтической дозе, так и дозе в 10 раз ее превышающей.

### 2.2.2 Изучение сенсibiliзирующего действия препарата бисфенол-5 на морских свинок и кроликах

В первой серии опыта сенсibiliзирующее (раздражающее) действие препарата бисфенол-5 определяли методом кожных аппликаций. Морские свинки и кролики после карантинирования по принципу аналогов были разделены на 4 группы – опытные (2, 5, 20 мг/кг) и контрольную по 6 голов в каждой. Кожно-сенсibiliзирующее действие препарата изучали путем его многократного нанесения на выстриженные участки спины морских свинок опытной группы. За два дня до начала эксперимента готовили участки спины, избегая механических повреждений кожных покровов. На эпилированную поверхность препарат наносили ежедневно в течение 2-х недель в количестве 2, 5, 20 мг на кг массы тела животного, равномерно распределяя его по всей поверхности. Сенсibiliзирующее действие образца сравнивали с контрольной группой морских свинок или кроликов, которым аналогично применяли вазелиновое масло. Реакцию кожи учитывали по шкале оценки кожных проб, отмечая время, характер и степень изменения кожного покрова.

Исследуя сенсibiliзирующее действие на кожу препарата бисфенол-5 при однократном и многократном использовании на морских свинок или кроликах в дозах 2, 5, 20 мг/кг учитывали, что функциональные нарушения кожи характеризуются появлением различной степени выраженности эритемы, отека, трещин, изъязвлений. Кроме того, для установления выраженности воспалительной реакции, до и после нанесения разрешающей дозы вещества проводилось определение изменения температуры кожи,

массы животных, а так же толщины кожной складки и состояния кожных покровов в месте нанесения препарата.

Оценка степени эритемы и отека суммировалась для каждого подопытного животного, после чего вычислялась средняя оценка выраженности раздражающего эффекта для группы экспериментальных животных.

В результате исследований по изучению сенсibiliзирующего эффекта препарата бисфенол-5 при однократной аппликации на кожные покровы животных не было выявлено признаков эритемы, отека и других патологических изменений кожного покрова, температура тела в месте нанесения соединения не изменялась. Между контрольной и опытной группами животных отличий не выявлено (таблицы 7 и 8).

Таблица 7 – Характеристика сенсibiliзирующего действия препарата бисфенол-5 при однократной аппликации на кожные покровы морских свинок и кроликов после 6-часовой экспозиции

Группы животных	Оценка в баллах		Раздражающий эффект	
	Морские свинки	Кролики	Морские свинки	Кролики
Группа 1 (контроль)	0	0	Отсутствует	Отсутствует
Группа 2 (2 мг/кг)	0	0	Отсутствует	Отсутствует
Группа 3 (5 мг/кг)	0	0	Отсутствует	Отсутствует
Группа 4 (20 мг/кг)	0	0	Отсутствует	Отсутствует

Таблица 8 – Влияние препарата бисфенол-5 при однократной аппликации на толщину кожной складки морских свинок и кроликов (в мм)

Группы животных	Толщина кожной складки, мм	
	Морские свинки	Кролики
Группа 1 (контроль)	2,31±0,04	3,17±0,09
Группа 2 (2 мг/кг)	2,34±0,05	3,11±0,07
Группа 3 (5 мг/кг)	2,30±0,03	3,14±0,07
Группа 4 (20 мг/кг)	2,37±0,04	3,18±0,08

Опираясь на полученные результаты, обнаружено, что однократное накожное нанесение препарата бисфенол-5 в дозах 2, 5, 20 мг/кг морским свинкам и кроликам не приводит к повреждению их кожи в виде эритемы или отеков.

Результаты исследований по изучению сенсibiliзирующего эффекта препарата бисфенол-5 при многократном применении на кожные покровы животных были аналогичными данным, полученным при изучении раздражающего действия препарата при многократном применении (рисунок 1).



1



2



3



4

Рисунок 1. Оценка сенсibiliзирующего (раздражающего) действия препарата бисфенол-5 на кожу морских свинок. 1 - вазелиновое масло (контроль); 2 - препарат 2 мг/кг (опыт); препарат 5 мг/кг (опыт); препарат 20 мг/кг (опыт)

Изучение сенсibiliзирующего действия препарата после 10 и 20 повторных на­кожных аппликаций показало, что видимых изменений в виде гиперемии, инфильтрации, шелушения не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии сенсibiliзации организма. Реакция кожи в опытных группах

животных не отличалась от контрольных. Полученные результаты по шкале оценки кожных проб соответствуют 0 баллов (таблица 9).

Таблица 9 – Характеристика сенсibiliзирующего действия препарата бисфенол-5 при многократной аппликации на кожные покровы морских свинок и кроликов

Группы животных	После 10 повторных накожных аппликаций				После 20 повторных накожных аппликаций			
	Оценка в баллах		Раздражающий эффект		Оценка в баллах		Раздражающий эффект	
	Морские свинки	Кролики	Морские свинки	Кролики	Морские свинки	Кролики	Морские свинки	Кролики
Группа 1 (контроль)	0	0	Отсутствует	Отсутствует	0	0	Отсутствует	Отсутствует
Группа 2 (2 мг/кг)	0	0	Отсутствует	Отсутствует	0	0	Отсутствует	Отсутствует
Группа 3 (5 мг/кг)	0	0	Отсутствует	Отсутствует	0	0	Отсутствует	Отсутствует
Группа 4 (20 мг/кг)	0	0	Отсутствует	Отсутствует	0	0	Отсутствует	Отсутствует

Толщина кожной складки на выстриженных и выбритых участках у морских свинок и кроликов опытных групп также достоверно не отличалась от контрольных животных на протяжении двухнедельного срока наблюдения (таблица 10).

Таблица 10 – Влияние препарата бисфенол-5 при многократной аппликации на толщину кожной складки морских свинок и кроликов (в мм)

Группы животных	Толщина кожной складки, мм	
	Морские свинки	Кролики
Группа 1 (контроль)	2,45±0,06	3,36±0,08
Группа 2 (2 мг/кг)	2,41±0,08	3,38±0,06
Группа 3 (5 мг/кг)	2,48±0,07	3,32±0,09

Группы животных	Толщина кожной складки, мм	
	Морские свинки	Кролики
Группа 4 (20 мг/кг)	2,43±0,05	3,38±0,08

После накожного применения морским свинкам и кроликам препарата бисфенол-5 общее состояние животных было удовлетворительным, масса животных соответствовала возрастной физиологической норме, изменений поведения и аппетита у животных не выявлено. Не обнаружено достоверных различий также в температуре тела и живой массе в контрольных и опытных группах животных. Участки кожи после стрижки и бритья одинаково быстро зарастали молодой шерстью, не отличающейся по густоте у опытных и контрольных групп животных.

Таким образом, состояние кожи кроликов, получавших препарат бисфенол-5 в дозах 2, 5, 20 мг/кг, не изменялось (отсутствие реакции), признаков гиперемии и других изменений состояния кожных покровов не отмечалось. Толщина кожной складки на месте нанесения вещества не увеличилась от исходного состояния. Следовательно, препарат бисфенол-5 не обладает аллергизирующим действием на ткани в зоне его применения, что позволяет отнести вещество к 1 классу веществ по степени выраженности раздражающих кожу свойств.

Во второй серии экспериментов сенсibiliзирующее (раздражающее) действие препарата бисфенол-5 определяли методом конъюнктивальных проб.

Изучение влияния препарата бисфенол-5 на конъюнктиву глаз морских свинок показало, что исследуемое средство не вызывает раздражения конъюнктивы, как сразу после инстилляций, так и на протяжении всего исследования. Через 15 минут после закапывания исследуемого средства в глаз не отмечали покраснения (гиперемии) конъюнктивы, слезотечения, помутнения роговицы; радужная оболочка без видимых изменений, химотоз

(отек конъюнктивы) отсутствовал. Через 24-48 часов также не наблюдали помутнений роговицы, радужная оболочка без видимых изменений, отек конъюнктивы отсутствует. Результаты конъюнктивальной реакции представлены в таблице 11 и на рисунке 2.

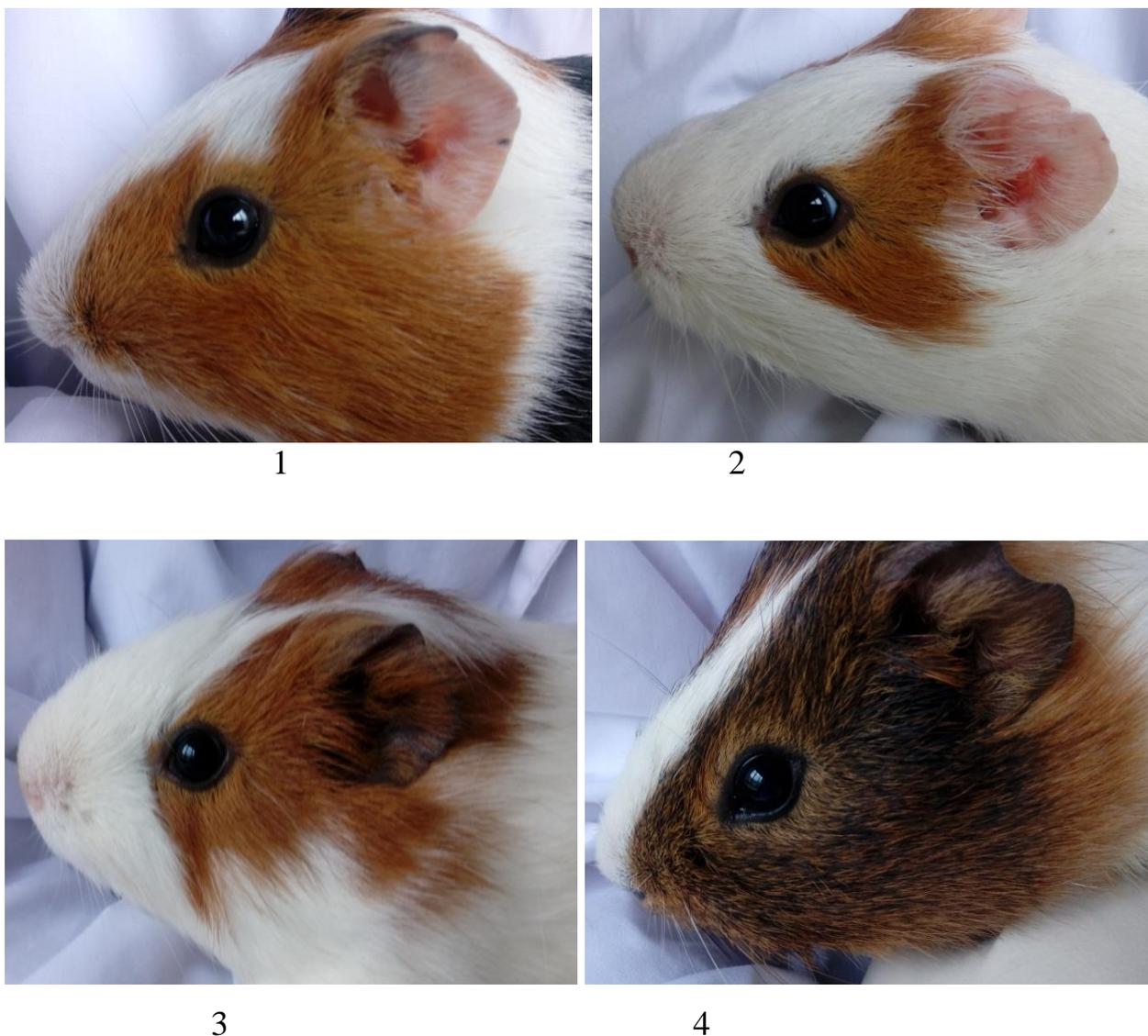


Рисунок 2. Оценка сенсibiliзирующих свойств препарата бисфенол-5 методом конъюнктивальных проб: 1 - вазелиновое масло (контроль); 2 - препарат 2 мг/кг (опыт); препарат 5 мг/кг (опыт); препарат 20 мг/кг (опыт)

Как видно из данных таблицы 11, нанесение исследуемого препарата опытными и контрольными животными не выявило различий в проявлении конъюнктивальной реакции, как немедленного, так и замедленного типа.

Результаты проведенного тестирования подтверждают отсутствие реакции конъюнктивы у кроликов через 15 минут и 24-48 часов на закапывание изучаемого препарата (таблица 12).

После визуальной оценки состояния конъюнктивы, роговицы и век глаз животных установлено, что отличий между контрольной и опытной группами не имеется. На протяжении всего исследования не наблюдали гиперемии, отека век и выделений из глаз, покраснений и отека слезного протока, конъюнктивы и склеры; случаев помутнения роговицы глаз также не выявлено. В ходе эксперимента отмечали нормальное состояние сосудов век (не расширены), бульбарной конъюнктивы и роговицы глаз подопытных животных.

В результате клинических исследований состояния организма морских свинок и кроликов после нанесения препарата бисфенол-5 не наблюдали изменений температуры тела, частоты пульса и количества дыхательных движений (таблица 13 и 14).

Таблица 11 – Результаты проявления конъюнктивальной реакции, как немедленного, так и замедленного типа при воздействии препарата бисфенол-5 на морских свинок

Время, через	Препарат, доза							
	Контроль		2 мг/кг		5 мг/кг		20 мг/кг	
	Оценка в баллах	Раздражающий эффект						
До нанесения	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
15 мин	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
30 мин	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
1 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
2 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
4 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
8 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
24 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
48 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует

Таблица 12 – Влияние препарата бисфенол-5 на конъюнктиву кроликов

Время, через	Препарат, доза							
	Контроль		2 мг/кг		5 мг/кг		20 мг/кг	
	Оценка в баллах	Раздражающий эффект						
До нанесения	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
15 мин	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
30 мин	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
1 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
2 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
4 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
8 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
24 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует
48 ч	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует	0	Отсутствует

Таблица 13 – Данные о клиническом состоянии организма морских свинок

Время, через	Препарат, доза											
	Контроль			2 мг/кг			5 мг/кг			20 мг/кг		
	Т, °С	Пульс	Дыхание	Т, °С	Пульс	Дыхание	Т, °С	Пульс	Дыхание	Т, °С	Пульс	Дыхание
До нанесения	38,3±0,8	283,7±7,2	116,4±3,6	37,8±0,4	268,8±6,0	104,1±2,5	39,0±0,5	291,6±8,5	126,2±3,6	38,0±0,7	275,4±7,8	108,9±2,3
15 мин	38,2±0,5	281,5±6,6	116,8±2,9	38,0±0,6	268,2±6,8	103,7±2,1	38,8±0,7	293,3±7,8	126,0±3,2	38,2±0,9	276,6±8,4	110,0±2,9
30 мин	38,2±0,9	284,1±7,8	114,6±4,0	37,8±0,4	270,4±5,4	104,0±2,7	38,9±0,4	293,9±8,4	128,6±4,1	38,1±0,6	277,2±7,2	109,6±2,1
1 ч	38,4±0,7	282,3±7,0	115,1±3,5	37,9±0,3	269,7±6,2	105,1±3,2	38,8±0,6	292,0±7,7	128,1±3,9	37,9±0,4	274,8±7,5	107,6±2,7
2 ч	38,2±0,8	283,4±6,3	115,9±3,1	37,9±0,5	267,9±5,7	104,8±2,6	39,1±0,3	289,8±8,2	126,5±2,4	37,8±0,6	273,6±6,9	107,1±2,6
4 ч	38,1±0,6	284,2±6,4	116,7±3,8	37,6±0,3	267,3±7,1	105,6±3,1	38,8±0,5	290,6±9,1	125,8±3,6	38,2±0,7	275,9±7,1	108,4±3,0
8 ч	38,3±0,9	283,9±7,1	117,3±4,2	37,8±0,5	270,6±5,3	103,4±2,4	39,0±0,3	291,5±8,9	126,3±4,5	38,2±0,4	277,1±6,7	107,8±1,8
24 ч	38,4±0,4	282,5±8,1	116,0±3,3	37,7±0,4	269,1±6,1	102,3±1,9	39,1±0,4	293,7±8,3	128,1±2,8	38,1±0,5	275,7±6,6	108,2±2,4
48 ч	38,3±0,9	284,6±7,5	117,6±3,0	37,9±0,6	268,4±5,9	104,9±2,3	39,0±0,4	292,2±9,0	127,4±3,3	37,9±0,3	274,3±8,0	107,9±1,9

Таблица 14 – Данные о клиническом состоянии организма кроликов

Время, через	Препарат, доза											
	Контроль			2 мг/кг			5 мг/кг			20 мг/кг		
	Т, °С	Пульс	Дыхание	Т, °С	Пульс	Дыхание	Т, °С	Пульс	Дыхание	Т, °С	Пульс	Дыхание
До нанесения	39,1±0,4	138,0±2,4	54,8±1,2	38,9±0,2	134,4±3,9	52,1±0,8	39,3±0,2	143,2±1,8	57,5±1,7	39,2±0,3	141,7±2,1	56,9±1,4
15 мин	39,0±0,2	137,8±3,6	55,5±0,8	38,9±0,3	133,9±2,3	52,6±0,5	39,2±0,2	143,4±2,3	57,2±0,9	39,1±0,4	142,1±1,6	57,4±1,0
30 мин	39,0±0,3	137,5±1,9	53,9±1,3	39,0±0,3	133,2±3,5	53,3±0,6	39,2±0,3	143,0±1,4	56,8±1,7	39,2±0,4	141,4±1,3	56,7±1,6
1 ч	38,9±0,2	136,7±2,5	54,2±0,7	39,0±0,2	135,0±2,7	53,8±1,1	39,1±0,4	141,7±2,6	55,4±1,4	39,3±0,2	141,8±1,8	56,0±1,3
2 ч	39,0±0,3	138,3±1,8	55,1±0,9	39,1±0,4	134,7±2,9	54,1±0,7	39,1±0,3	141,5±1,3	56,9±1,9	39,3±0,3	140,4±1,5	55,8±0,9
4 ч	39,1±0,3	136,6±3,0	54,7±1,4	39,0±0,3	134,1±3,4	53,8±0,9	39,4±0,2	142,2±2,0	57,4±1,3	39,0±0,2	142,0±1,1	56,3±1,1
8 ч	38,9±0,2	137,1±2,7	54,4±1,0	39,1±0,3	133,8±2,9	52,7±1,0	39,2±0,3	142,8±2,3	56,2±2,1	39,1±0,3	141,2±1,7	57,1±1,5
24 ч	39,2±0,2	137,9±3,2	55,8±0,8	39,1±0,2	133,2±2,6	52,0±0,8	39,3±0,2	143,1±1,1	56,7±1,7	39,1±0,2	139,7±2,0	56,6±1,2
48 ч	39,0±0,3	138,2±2,8	54,3±1,6	39,0±0,3	135,3±3,3	52,4±0,6	39,1±0,2	142,7±1,5	57,6±1,2	39,2±0,2	140,9±1,4	55,5±1,4

Общее состояние животных удовлетворительное, поведение соответствует данному виду животного, интенсивные двигательные движения, активные передвижения по клетке, судороги отсутствуют, движения животных скоординированы, реакция на звуковые, тактильные и болевые, звуковые раздражители сохранена. Шерстка гладкая, блестящая, волос прочно удерживается в волосяной луковице. Слизистые оболочки бледно-розового цвета, без кровоизлияний и изъязвлений.

Таким образом, в ходе постановки конъюнктивальных проб опытными и контрольными животными установлено отсутствие признаков гиперчувствительности как немедленного, так и замедленного типа в отношении препарата бисфенол-5. Отсюда следует, что исследуемый препарат не токсичен при постановке конъюнктивальных проб лабораторным животным.

### 2.3 Исследование мутагенных свойств препарата бисфенол-5 на крысах

Клиническое состояние крыс, получавших перорально препарат бисфенол-5, не отличалось от животных контрольных групп. Внешнее состояние подопытных в первые минуты после внутрижелудочного введения суспензии характеризовалось небольшим угнетением, вызванным механическим воздействием на животных, восстановление состояния наблюдалось спустя 5-10 минут. В течение всего эксперимента падежа животных в контрольных и опытных группах не отмечалось.

Результаты цитогенетического анализа костного мозга белых крыс, подвергнутых однократному воздействию препарата бисфенол-5, представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Частота и типы хромосомных aberrаций (на 100 клеток) в костном мозге белых крыс при однократном воздействии препарата бисфенол-5

Группа	Гены, %	Одиночные фрагменты, %	Двойные фрагменты, %	Обмены, %	Клетки с множественными повреждениями, %	Количество клеток с хромосомными повреждениями, %
Интактный контроль	0,61 ±0,10	0,48 ±0,07	-	-	-	1,09 ±0,17
Отрицательный контроль (растворитель)	0,59 ±0,13	0,48 ±0,19	-	-	-	1,07 ±0,33
Положительный контроль (циклофосфан)	4,97 ±0,46*	37,00 ±12,08*	0,84 ±0,11*	8,47 ±0,36*	4,67 ±0,41*	55,94 ±11,65*
Препарат бисфенол-5 в дозе 2 мг/кг	0,61 ±0,12	0,43 ±0,15				1,04 ±0,26
Препарат бисфенол-5 в дозе 2000 мг/кг	0,62 ±0,13	0,47 ±0,11				1,09 ±0,24

Примечание: \* - различия с контролем достоверны с точностью  $p \leq 0,05$

Как следует из таблицы 15, частота и типы хромосомных повреждений клеток костного мозга у интактных животных и животных, получавших растительное масло (служившее растворителем препарата бисфенол-5), не имели различий и не превышали 1,52%.

Исследование препаратов костного мозга белых крыс после однократного воздействия циклофосфана в дозе 20 мг/кг показало, что значения изучаемых показателей достоверно превышали контрольные значения, а препарат обладал мутагенной активностью. Так, доля поврежденных клеток составила 55,94%, что превысило контроль на 54,87%. При этом основным типом aberrаций являлись одиночные фрагменты хромосом (на 36,52% больше в сравнении с контролем), появившиеся вследствие хроматидного разрыва, отмечена высокая частота обменов

(8,47%). Количество клеток с ахроматическими пробелами составило 4,97%, что больше контроля на 4,38%. Обнаружены клетки с множественными повреждениями (4,67%).

Цитогенетический анализ влияния препарата бисфенол-5 на клетки костного мозга крыс при однократном его введении в дозах 2 и 2000 мг/кг живой массы показал, что процент клеток с абберациями хромосом составил 1,04 и 1,09%, соответственно. Типы аббераций были представлены одиночными фрагментами и ахроматическими пробелами. Парные фрагменты и абберации обменного типа не выявлены. Статистический анализ полученных результатов не показал достоверных различий в сравнении с контрольными значениями. Следовательно, частота возникновения абберантных метафаз клеток костного мозга белых крыс, на фоне однократного воздействия препарата бисфенол-5 не превышает частоту спонтанно возникающих хромосомных повреждений, а препарат является не способным индуцировать какие-либо структурные нарушения клеток.

Результаты цитогенетического анализа костного мозга белых крыс, подвергнутых длительному воздействию (в течение 5 суток) препарата бисфенол-5 представлены в таблице 16.

Анализ метафазных клеток костного мозга крыс на фоне длительного перорального введения препарата бисфенол-5 в дозах 2 и 2000 мг/кг живой массы показал, что частота встречаемости клеток со структурными абберациями хромосом составила 1,21 и 1,25%, соответственно, против 1,20% в контроле. Повреждения хромосом характеризовались ахроматическими пробелами и одиночными фрагментами и также не имели достоверных отличий с контрольными значениями.

Таблица 16 – Частота и типы хромосомных aberrаций (на 100 клеток) в костном мозге белых крыс при длительном воздействии препарата бисфенол-5

Группа	Гепы, %	Одиночные фрагменты, %	Двойные фрагменты, %	Обмены, %	Клетки с множественными повреждениями, %	Количество клеток с хромосомными повреждениями, %
Отрицательный контроль (растворитель)	0,62 ±0,06	0,58 ±0,11	-	-	-	1,20 ±0,17
Препарат бисфенол-5 в дозе 2 мг/кг	0,65 ±0,15	0,56 ±0,06				1,21 ±0,19
Препарат бисфенол-5 в дозе 2000 мг/кг	0,68 ±0,12	0,57 ±0,08				1,25 ±0,19

Примечание: \* - различия с контролем достоверны с точностью  $p \leq 0,05$

Таким образом, частота установленных хромосомных aberrаций в клетках костного мозга белых крыс подвергнутых однократному и длительному воздействию препарата бисфенол-5 в испытуемых дозах не имеет достоверных отличий с частотой спонтанных aberrаций. Следовательно, препарат в исследуемых дозах не вызывает индукцию хромосомных нарушений и не представляет мутагенной опасности.

#### 2.4 Изучение кумулятивных свойств препарата бисфенол-5 на крысах

В результате ежедневного введения изучаемой лекарственной формы в дозировке 2000 мг/кг живой массы не выявлено изменений общего состояния и поведения у подопытных крыс.

Введение препарата не отразилось статистически значимым образом на текущих значениях роста. В таблице 17 приведены результаты мониторинга динамики прироста живой массы тела у крыс в сравнении с контролем.

Таблица 17 – Изменение живой массы тела у крыс, получавших препарат 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 ЛД<sub>50</sub> при однократном введении к ЛД<sub>50</sub> при кратном введении. Схема изучения кумуляции методом субхронической токсичности по Lim'у представлена в таблице 18.

Таблица 18 – Кумулятивные свойства препарата бисфенол-5

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

Случаев гибели среди животных контрольной и опытных групп не наблюдали. Поскольку ЛД<sub>50</sub> при однократном введении препарата составляет

2000 мг/кг живой массы, по формуле Ю.С. Кагана, В.В. Станкевича [5], коэффициент кумуляции составил 3,96, следовательно 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. 19).

Таблица 19 – 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 препарат 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 препарат 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.

Результаты опытов по изучению кумулятивного действия показали, что коэффициент кумуляции составил 3,96. Это свидетельствует об отсутствии кумулятивных свойств препарата в организме животных.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе экспериментов установлено отсутствие местно-раздражающего действия препарата бисфенол-5 на слизистую оболочку глаза кроликов. В результате клинических исследований состояния организма кроликов после нанесения препарата бисфенол-5 на слизистую оболочку глаза не наблюдали изменений температуры тела, частоты пульса и количества дыхательных движений.

При постановке реакции общей анафилаксии (анафилактического шока) было установлено отсутствие анафилактогенных свойств препарата бисфенол-5, как в терапевтической дозе, так и дозе в 10 раз ее превышающей.

Изучение сенсibiliзирующего действия препарата после 10 и 20 повторных накожных аппликаций показало, что видимых изменений в виде гиперемии, инфильтрации, шелушения не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии сенсibiliзации организма. Реакция кожи в опытных группах животных не отличалась от контрольных. После накожного применения морским свинкам и кроликам препарата бисфенол-5 общее состояние животных было удовлетворительным, масса животных соответствовала возрастной физиологической норме, изменений поведения и аппетита животных не выявлено. Не обнаружено достоверных различий также в температуре тела и живой массе в контрольных и опытных группах животных. Участки кожи после стрижки и бритья одинаково быстро зарастали молодой шерстью, не отличающейся по густоте у опытных и контрольных групп животных. В ходе постановки конъюнктивальных проб опытным и контрольным животным установлено отсутствие признаков гиперчувствительности как немедленного, так и замедленного типа в отношении препарата бисфенол-5. Отсюда следует, что исследуемый препарат не токсичен при постановке конъюнктивальных проб лабораторным животным.

При оценке мутагенных свойств в опыте по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих было установлено, что препарат бисфенол-5 в терапевтической (2 мг/кг живой массы) и субтоксической (максимальной – 2000 мг/кг) дозах не вызывает индукции хромосомных aberrаций и следовательно, не обладает цитогенетической (кластогенной) активностью. Следовательно, изучаемый препарат в исследуемых дозах не вызывает индукцию хромосомных нарушений и не представляет мутагенной опасности. Изучение кумулятивных свойств препарата бисфенол-5 на крысах показало, что коэффициент кумуляции составил 3,96, что больше 1, следовательно бисфенол-5 не обладает кумуляцией.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ахмадуллин Р.М. Эффективность 4,4-бис(2,6-ди-трет-бутилфенол)а при стабилизации изопренового каучука и полипропилена / Р.М. Ахмадуллин, Д.Р. Гатиятуллин, Л.А. Васильев, А.Г. Ахмадуллина, Н.А. Мукменёва, Е.Н. Черезова, Мингшу Йанг (Mingshu Yang) // Журнал прикладной химии, 2015.-Т. 88.-Вып. 5.-С. 792-797.
2. Гуськова, Т.А. Токсикология лекарственных средств / Т.А. Гуськова – Москва, 2008. – 196 с.
3. Зенков Н. К., Фенольные биоантиоксиданты / Н.К. Зенков, Н.В. Кандалинцева, В.З. Ланкин, Е.Б. Меньщикова, А.Е. Просенко. – Новосибирск: СО РАМН, 2003. – 328 с.
4. МУ 1.2.1105-02 «Оценка токсичности и опасности дезинфицирующих средств».
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Хабриева Р.Ю. – М: Медицина, 2005 – 829 с.
6. Липперт, Г. Международная система единиц в медицине / Г. Липперт // – М.: Медицина, 1980. – 208 с.
7. Меньшиков, В. В. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. проф. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
8. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н.Миронов, Н.Д. Бунятян, А.Н. Васильев, и др. – Гриф и К, Москва 2012. – ISBN 978-5 – 944 с.
9. Derelanko, M. J. Handbook of Toxicology / Second Edition, Ed. by M.J. Derelanko, M.A. Hollinger. – CRC Press, 2002.
10. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986.

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. Şentürk M. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of human erythrocyte isozymes I and II with a series of antioxidant phenols. / M. Şentürk, İ. Gülçin, A. Daştan, Ö.İ. Küfrevioğlu, C.T. Supuran // Bioorganic and Medicinal Chemistry, 2009.-No 17.-C. 3207–3211.