

Изучение токсикологической безопасности наполнителя и опилок на основе древесной стружки хвойных пород для крыс

Н.В. Данилевская, А.А. Дельцов (Deltsov-81@mail.ru)

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВО МГАВМиБ — МВА им. К.И. Скрябина) (Москва).

Токсикологические исследования позволяют объективно выявить наличие или отсутствие повреждающего действия изучаемых ингредиентов на организм экспериментальных животных с целью оценки безопасности. Результаты наших исследований показали, что содержание животных на наполнителе в виде древесных гранул (далее — гранулят) и опилках из материала на основе древесной стружки деревьев хвойных пород, производимых ООО «Идеал» под торговой маркой «Зверё Моё», является безопасным для крыс. Наиболее эффективно и удобно в применении — одновременное использование гранулята и опилок. Объем впитывания и удерживания жидкости гранулятом и опилками составляет 20...25 мл на 5,0 г материала.

Ключевые слова: безопасность, древесные гранулы, крысы, наполнитель, опилки, токсичность

Сокращения: АЛАТ — аланинаминотрансфераза, АсАТ — аспаратаминотрансфераза, ГГТ — гамма-глутамилтранспептидаза, ЖКТ — желудочно-кишечный тракт, ЛДГ — лактатдегидрогеназа, ЩФ — щелочная фосфатаза

Введение

Известно, что каждый лекарственный препарат или биологически активная добавка для домашних животных при регистрации обязательно проходит в установленном порядке токсикологическое исследование, которое позволяет объективно выявить наличие или отсутствие повреждающих воздействий на организм животных, установить их характер и выраженность с целью оценки безопасности для последующего рационального применения продукта.

Однако таким исследованиям не подвергают предметы ухода, в первую очередь наполнители, с которыми животные имеют длительный контакт. На наш взгляд, подобные исследования весьма актуальны. Животные могут испытывать существенные воздействия в случае присутствия в наполнителях веществ, которые при прямом контакте через кожу, при попадании в организм через ЖКТ или респираторную систему при вдыхании выделяющихся летучих примесей могли бы обладать той или иной степенью токсичности.

В настоящем исследовании была изучена безопасность для крыс наполнителя в виде гранулята и опилок на основе древесной стружки хвойных пород. Известно, что у древесины хвойных пород есть особенность: она содержит гораздо большее количество смол, эфирных масел, чем древесина лиственных пород. Специфический хвойный аромат древесины обусловлен высоким содержанием ароматических веществ — природных фенолов, терпенов, пиненов и т. д. Хвойные растения выделяют большое количество противобактериальных и противовирусных веществ, в том числе фитонцидов. В связи с этим в последние годы были разработаны и широко используются в медицинской и ветеринарной практике лекарственные препараты из

сырья деревьев хвойных пород, которые обладают, согласно опубликованным данным, прямым противомикробным, антимикробным, антигельминтным, иммуномодулирующим действием. Они также улучшают обмен веществ из-за высокого содержания антиоксидантов и витаминов, в первую очередь аскорбиновой кислоты, а также микроэлементов.

Однако из-за особенностей анатомического строения дыхательной системы грызунов возникает вопрос: достаточно ли продукты из древесины хвойных пород безопасны для этого вида животных? У владельцев возникают сомнения — не воздействуют ли указанные продукты на общее состояние животных, их внутренние органы, не влияют ли на нервную систему, изменяя поведение, не раздражают ли кожные покровы, вызывая конъюнктивиты, чихание и слезотечение.

Цель и задачи исследования

Изучить токсикологическую безопасность наполнителя и опилок на основе древесной стружки хвойных пород для крыс. В связи с этим были поставлены следующие задачи: 1) изучить объем впитывания наполнителя и опилок на основе древесной стружки хвойных пород; 2) изучить острую токсичность веществ в составе наполнителя и опилок на основе древесной стружки хвойных пород; 3) изучить токсичность веществ в составе наполнителя и опилок на основе древесной стружки хвойных пород при содержании крыс в течение 3-х недель.

Материалы и методы

При изучении *объема впитывания наполнителя* и опилок для эксперимента отвешивали по 5,0 г наполнителя и опилок, помещали в мерную колбу и постепенно доливали воды до полного насыщения материала. Не удержанную часть воды сливали в мерную колбу. Измеряли количество жидкости, удерживаемое материалом (метод Кобба).

Острую токсичность веществ в составе наполнителя и опилок на основе древесной стружки хвойных пород исследовали согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фар-



Рис. 1. Зонд для внутрижелудочного введения



Рис. 2. Техника внутрижелудочного введения

макологических веществ» [8] и ГОСТ Р 53434-2009 — Принципы надлежащей лабораторной практики. Работа с животными проходила в соответствии с общими этическими принципами проведения экспериментов на животных и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 2003).

Объектом исследования служили белые крысы массой 180...195 г, обоего пола, разделенные по принципу пар аналогов на 4 группы по 10 животных в каждой. Первые 3 группы являлись опытными, четвертая группа — контрольной (вводили дистиллированную воду). За 10 дней до начала исследований животных поместили в карантин. Их содержали в одинаковых условиях вивария. Корм крысы получали в соответствии с рационом для данного вида лабораторных животных. Доступ к воде был свободным.

Испытуемые биологически активные вещества вводили утром натощак, в виде водного извлечения (1:10) per os с помощью зонда (рис 1, 2), имеющего на конце булавовидное утолщение (оливу).

Водные извлечения из гранулята и опилок получали в соответствии с фармацевтическими правилами изготовления экстенпоральных лекарственных форм; 1-й опытной группе вводили водное извлечение из гранулята (1:10); 2-й — водное извлечение из опилок (1:10); 3-й — равную смесь водных извлечений из гранулята и опилок. Контрольной группе вводили дистиллированную воду.

При выборе доз руководствовались максимально возможным объемом введения в соответствии с методическими указаниями по изучению токсикологических свойств, изложенными в руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева [8] (табл. 1). Как видно из таблицы, максимально возможный объем введения для белых крыс составил 5 мл.

Вид животного	Масса тела, г	Путь введения			
		В желудок	Под кожу	В мышцу	В брюшную полость
Мышь	20...24	0,5	1,0	0,5	1,0
	25...30	0,8			
	>30	3,0			
Крыса	100...190	3,0	5,10	5,0	5,0
	200...240	4,0...5,0			
	250...300	6,0			

За подопытными животными наблюдали в течение 14 дней, причем первый день после введения животные находились под непрерывным наблюдением. Регулярно фиксировали их общее состояние, особенности поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, реакцию на болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, количество и консистенцию фекальных масс, потребление корма и воды. Для расчета параметров острой токсичности использовали метод пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксоу [1], который основан на учете смертности животных от вводимых доз изучаемого препарата. Класс опасности препарата определяли согласно ГОСТ 12.1.007-76.

В конце опыта животных подвергали эвтаназии для патолого-анатомического исследования.

Токсичность веществ в составе наполнителя и опилок на основе древесной стружки хвойных пород при содержании экспериментальных животных в течение 3-х недель изучали на белых крысах, подобранных по принципу аналогов, массой 180...200 г, сформированных в 4 группы по 10 животных в каждой. В соответствии с поставленной целью, животных содержали на разных наполнителях: 1-ю опытную группу — на грануляте; 2-ю — на опилках; 3-ю — на грануляте и опилках; 4-ю, или контрольную, группу — на стандартной подстилке.

Продолжительность эксперимента составила 21 день. На протяжении этого периода регулярно фиксировали общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, реакцию на болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, количество и консистенцию фекальных масс, потребление корма и воды. Особое внимание обращали на нарушение дыхания животных (кашель, чихание), поражение верхних дыхательных путей (истечение, покраснение и т. д.) мелкими частицами подстилки. Отмечали время и степень загрязнения подстилки, особенности поведения на ней животных. Учитывали частоту смены подстилки, удобство ее применения и способность удерживать мочу и запахи.

В конце эксперимента исследовали кровь животных (клинический и биохимический анализы) на автоматическом гематологическом анализаторе «Abacus Junior Vet» и автоматическом биохимическом анализаторе «BioSystems A25». В конце опыта животных подвергали эвтаназии для патолого-анатомического и патогистологического исследований. Материалом для гистологического исследования служили образцы легких и печени. Органы, извлеченные в процессе патолого-анатомического вскрытия трупов животных, помещали в 10%-й раствор нейтрального формалина, соблюдая общепринятые методики фиксации и дальнейших обработок патологического материала [6]. Гистологические срезы толщиной 5...7 мкм изготавливали на микротоме МПС-2 по общепринятым методикам. Парафиновые срезы перед окрашиванием освобождали от парафина с помощью ксилола. Гистологические срезы для обзорных целей окрашивали гематоксилином и эозином, изучали под биологическим микроскопом

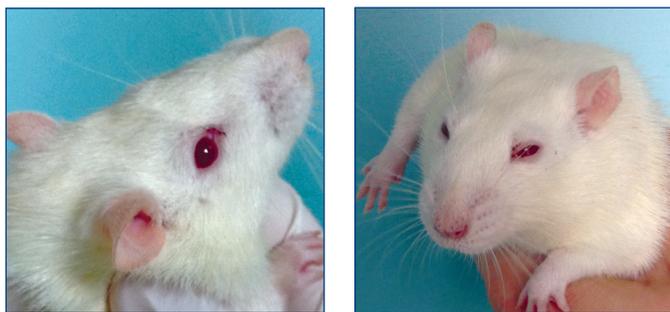


Рис. 3. Скопление пыли возле внутреннего угла глаза при содержании крыс на подстилке, состоящей только из гранулята

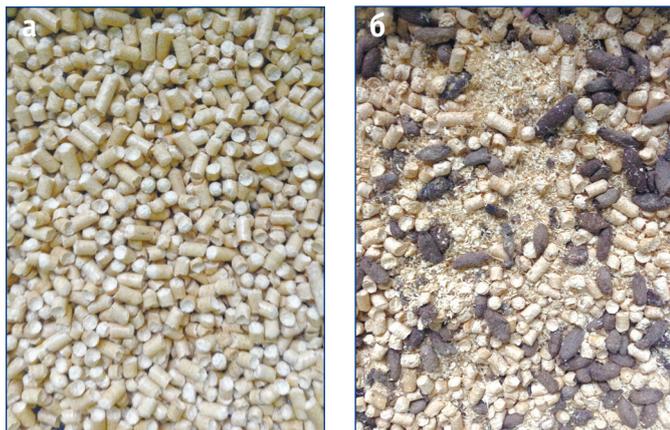


Рис. 4. Вид подстилки из гранулята: а — до посадки животных, б — через 7 дней содержания (смена подстилки)



Рис. 5. Вид подстилки из опилок: а — до посадки животных, б — через 5 дней содержания (смена подстилки)



Рис. 6. Вид подстилки из опилок и гранулята: а — до посадки животных, б — через 9 дней содержания (смена подстилки)

«ScienOpBP-52» при увеличении окуляров $\times 7$, $\times 10$ и объективов $\times 4$, $\times 10$ и $\times 40$. Фотографировали цифровой камерой-окуляр для микроскопа «DCM800» (8000 pixels, USB2.0).

Все полученные цифровые данные обрабатывали методами математической статистики, принятой в биологии и медицине, с использованием программы Microsoft Excel на PC.

Результаты и обсуждение

В результате исследований установлено, что 5,0 г гранул впитывают и удерживают 25 мл воды, а 5,0 г опилок — 23 мл воды. Разница в удерживаемом объеме, очевидно, вызвана тем, что гранулят, представляя собой спрессованные мелкие частицы, более гигроскопичен.

Острая токсичность — вредное действие вещества, проявляющееся после его однократного применения или повторного введения через короткие (не менее 4...6 ч) интервалы в течение суток. Известно, что цель изучения острой токсичности — определение переносимых, токсических и летальных доз химического вещества и причин наступления гибели животных.

Исследования показали, что введение водной вытяжки из гранулята (1:10), опилок (1:10) и смеси гранулята и опилок крысам в дозах по 5 мл не вызывает видимых клинических признаков токсикоза. После введения во всех группах общее состояние животных было удовлетворительным, аппетит не нарушался, поведение и реакция на внешние раздражители не изменялись. Видимые слизистые оболочки были розовые, животные имели гладкий, блестящий шерстный покров, эластичную кожу. Температура тела в пределах нормы, акт дефекации без отклонений. Гибели животных не отмечено.

В результате патолого-анатомического исследования установлено, что органы и ткани животных опытных и контрольных групп имели следующие общие характеристики: тела животных умеренно упитанные с неповрежденными слизистыми оболочками; оболочки головного мозга влажные, блестящие, серого цвета, извилины хорошо выражены, на разрезе — симметричный рисунок; органы брюшной и грудной полостей правильно расположены, полости свободны от спаек и от жидкости; слизистая оболочка пищевода и ЖКТ розовая, влажная, блестящая, без повреждений и воспалительных явлений; печень дольчатая, с гладкой поверхностью, на разрезе серовато-коричневого цвета, умеренно кровенаполненная; легкие воздушные, серо-розового цвета; сердце округлой формы, эндокард гладкий, блестящий, без спаек. Почки гладкие, блестящие, на разрезе рисунок четкий. Таким образом, видимых патолого-анатомических изменений при вскрытии животных всех групп не отмечено, все органы соответствуют здоровому организму.

Дальнейшее увеличение доз было физически не осуществимо и не целесообразно. В результате проведенных исследований установлено, что химические вещества, содержащиеся в грануляте и опилках, по степени воздействия на организм в соответствии с нормативами ГОСТ 12.1.007-76. относятся к 4-му классу опасности — вещества незначительно опасные.

При решении третьей поставленной в ходе исследований задачи нами было установлено, что содержание крыс на всех видах подстилки не влияет на клиническое состояние животных. Все животные были без

2. Результаты клинического анализа сыворотки крови крыс при содержании на разных видах подстилки* (M±m, n=10)

Показатель	Опытные группы			Контрольная группа
	1-я	2-я	3-я	
Гемоглобин, г/л	138,4±6,3	137,3±4,9	138,8±5,7	139,4±5,4
Эритроциты, ·10 ¹² /л	6,62±0,11	6,58±0,15	6,51±0,16	6,72±0,14
Тромбоциты, ·10 ⁹ /л	762,5±41,8	784,7±36,5	746,3±36,1	749,3±37,9
Лейкоциты, ·10 ⁹ /л	8,2±0,19	8,5±0,28	8,4±0,26	8,3±0,19
Средний объем эритроцита, мкм ³	52,6±1,15	52,5±1,35	52,3±1,58	53,6±1,21
Гематокрит, %	37,3±1,34	36,4±1,26	36,7±1,23	37,9±1,34
Среднее содержание гемоглобина в одном эритроците, Пг	19,5±0,24	19,5±0,26	19,2±0,28	19,5±0,32
Лимфоциты, %	52,3±2,4	51,8±2,7	53,4±2,5	51,8±2,5
Эозинофилы, %	6,4±0,21	6,5±0,22	6,4±0,18	6,7±0,21
Моноциты, %	3,6±0,18	3,7±0,27	3,4±0,12	3,3±0,16
Сегментоядерные, %	34,2±1,22	35,6±1,22	35,2±1,21	36,7±1,33

Примечание. *p<0,05.

признаков токсикоза, клинически здоровы, шерсть у них оставалась чистой.

Однако при использовании подстилки, состоящей только из опилок, в момент посадки на чистые опилки животные принюхиваются, изредка чихают, попадающиеся крупные щепки обгрызают.

При использовании подстилки, состоящей только из гранулята, установлено, что мелкие частицы распадающегося гранулята скапливаются около слезно-носового канала и возле носовых ходов, которые крысы очищают при умывании (рис. 3). На свежей подстилке животные изредка чихают, активно копают.

При использовании подстилки, состоящей из гранулята и опилок, никаких негативных последствий для животных не отмечалось.

Загрязнение и смена подстилки быстрее всего происходила при использовании опилок. В среднем подстилку требовалось менять один раз в пять дней. Подстилка из опилок выглядела грязнее, чем подстилки других видов, а также хуже всех удерживала влагу и запах аммиака (рис. 4...6). Подстилка, состоящая из гранулята, загрязнялась чуть медленнее, и менять подстилку приходилось в среднем один раз в 7...8 дней. Подстилка, состоящая из гранулята и опилок, загрязнялась достоверно медленнее, чем в других группах животных, выглядела чище остальных, лучше впитывала запах аммиака и влагу. Смена подстилки один требовалась раз в 9...10 дней.

Результаты клинического и биохимического анализов сыворотки крови крыс, содержащихся на различных видах подстилки, приведены в таблицах 2 и 3.

Как видно из представленных данных, содержание крыс на различных видах подстилки в течение 21 дня, не вызывает статистически значимых изменений показателей крови. Исследуемые показатели остаются в пределах референтных значений, характерных для физиологической нормы как в опытных, так и в контрольной группе животных. Это говорит об отсутствии негативного влияния химических веществ в составе подстилок на обмен веществ крыс и функции их внутренних органов и систем. Стабильный уровень активности ферментов — маркеров целостности гепатоцитов свидетельствует об отсутствии гепатотоксичности.

В результате макроскопического исследования внутренних органов установлено отсутствие патологических изменений всех органов у животных всех групп, включая крыс контрольной группы. У всех животных наблю-

3. Результаты биохимического анализа сыворотки крови крыс при содержании на различных видах подстилки* (M±m, n=10)

Показатель	Опытные группы			Контрольная группа
	1-я	2-я	3-я	
Общий белок, г/л	84,7±3,6	85,3±4,1	83,5±4,5	84,6±3,3
ГГТ, Е/л	1,3±0,045	1,2±0,072	1,2±0,068	1,3±0,045
ЛДГ, Е/л	1630,6±44,8	1747,7±47,6	1747,7±51,3	1726,8±38,6
Мочевина, моль/л	7,9±0,35	7,8±0,21	7,7 ±0,28	7,9±0,24
Креатинин, моль/л	62,4±2,2	63,1±1,9	63,5±1,8	61,9±1,8
АлАТ, Е/л	41,4±2,1	42,4±3,4	40,5±2,7	39,3±3,2
АсАТ, Е/л	219,8±8,6	222,5±7,8	215,5±7,7	218,3±9,3
ЩФ, Е/л	84,3±3,1	81,3±4,2	83,1±2,1	82,8±3,9

Примечание. *p<0,05.

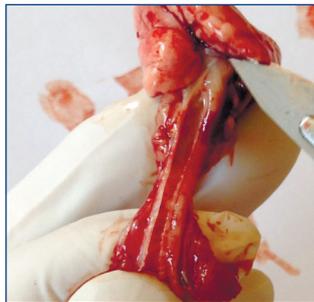


Рис. 7. Макропрепарат. Внешний вид трахеи крыс



Рис. 8. Макропрепарат. Верхние дыхательные пути крыс

дали картину, характерную для здорового организма. Особое внимание уделяли дыхательным путям животных: в них также не отмечено патологических процессов, слизистая верхних дыхательных путей животных светло-розового цвета, умеренно влажная, без кровоизлияний, наложений и экссудата (рис. 7, 8). Легкие воздушные, серо-розового цвета.

При гистологическом исследовании тканей легких животных всех групп, была отмечена картина, соответствующая физиологической норме (рис 9). Форма и размер альвеол варьируется, большая их часть мелкого и среднего размера с небольшой неравномерно округлой формы полостью, межальвеолярная стенка не утолщена. По периферии гистологического среза легких отмечены небольшого размера участки эмфиземы в виде расширения альвеол, истончения их стенок с разрывом межальвеолярных перегородок и слиянием альвеолярных полостей.

В срезах представлены крупного, среднего и мелкого размера бронхи без признаков склероза стенок. Слизистая оболочка бронхов не утолщена, ровная. Эпителий слизистой оболочки крупных бронхов высокий призматический, без признаков повреждения. Эпителий сред-

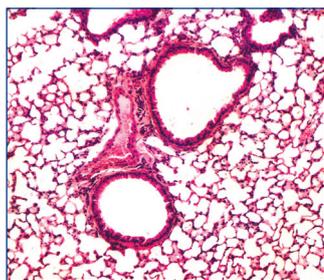


Рис. 9. Гистоархитектура легких.
Гематоксилин и эозин.
Ок. х10, об. х10

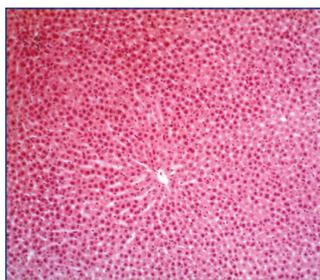


Рис. 10. Гистоархитектура печени.
Гематоксилин и эозин.
Ок. х10, об. х10

них и мелких бронхов вытянутой пальцевидной формы, апикальная часть некоторых реснитчатых эпителиоцитов в состоянии деструкции, иногда отпадает в просвет бронха, ворсинчатая каемка на апикальной части большинства клеток хорошо выражена. Просвет бронхов обычно пуст, лишь в некоторых встречается небольшое количество слизи и десквамированного эпителия. В эпителиальном слое слизистой оболочки встречаются немногочисленные бокаловидные клетки. Базальная мембрана эпителия бронхов не утолщена.

Перибронхиальные лимфатические узлы не увеличены, часто встречаются диффузные скопления лейкоцитов в перибронхиальной ткани.

Наблюдали неравномерное кровенаполнение крупных и мелких сосудов с преобладанием умеренного их кровенаполнения и скопления в просвете большого количества форменных элементов крови с явлениями эритростаза. Кровенаполнение одинаково встречается в сосудах артериального и венозного типов.

При гистологическом исследовании тканей печени также не установлено патологических изменений, структура органа соответствует здоровому организму (рис. 10). Дольчатость печени выражена, строма органа представлена тонкими прослойками междольковой соединительной ткани с хорошо выраженными междольковыми венами и артериями. Балочное строение органа сохранено, печеночные балки располагаются относительно близко друг к другу. Гепатоциты округлой формы, границы между клетками хорошо очерчены, цитоплазма окрашена равномерно. Ядра гепатоцитов четкие, располагаются преимущественно в центре клеток, окрашены неравномерно, глубьки хроматина располагаются преимущественно по периферии ядра. Диаметр центральных вен не увеличен, просвет их обычно пуст. Диаметр портальных вен немного увеличен, их эндотелий не поврежден, а просвет заполнен большим количеством эритроцитов. Синусные капилляры не расширены.

Таким образом, клиническими, гематологическими, патолого-анатомическими и гистологическими исследованиями установлено, что содержание животных на наполнителе и опилках на основе древесной стружки хвойных пород в течение трех недель безопасно для крыс.

Однако следует подчеркнуть, что данные результаты получены только для данного вида продукции, выпускаемой под торговой маркой «Зверьё Моё». Производитель гарантирует, что древесные наполнители и опилки производятся только из специально отобранной, тщательно просушенной древесины. В процессе производства из сырья с помощью специальной тех-

ники удаляют пыль, кору и посторонние включения, проводят дополнительную термическую обработку, в ходе которой удаляется значительное количество эфирных масел и фенолы, в производстве исключено использование топливных гранул. Именно поэтому опилки и древесные гранулы гипоаллергенны и безвредны, что подтверждено проведенными исследованиями.

Хочется отметить, что ответственный подход производителей предметов ухода и результаты прямых исследований по их токсикологической безопасности подчеркивают добросовестное отношение к заботе о питомцах, и в значительной степени обеспечивают их хорошее здоровье.

Выводы

1. Химические вещества, содержащиеся в грануляте и опилках, по степени воздействия на организм в соответствии с нормативами ГОСТ 12.1.007-76. относятся к 4-му классу опасности — вещества незначительно опасные.
2. Содержание на наполнителе и опилках на основе древесной стружки хвойных пород безопасно для крыс.
3. Наиболее эффективным и удобным в применении является одновременное использование гранулята с опилками.
4. Объем впитывания и удерживания жидкости гранулятом и опилками составляет 20...25 мл на 5,0 г материала.

Библиография

1. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький. — М.: Гос. изд. мед. литературы, 1963. — 152 с.
2. ГОСТ 12.1.007-76* . ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. — Введ. 01.01.1997 — Постановление Госкомстандарта СССР от 10.03.1976 г. № 579. — Переиздан с изменениями (ИУС № 12-81 и № 6-1990).
3. Западнюк, И.П. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк. — К.: Вища школа, 1983. — 383 с.
4. Кибл, Э. Грызуны и хорьки. Болезни и лечение / Э. Кибл, А. Мередит. — М.: Аквариум-Принт, 2013. — 392 с.
5. Куропаткина, М.В. Декоративные мыши и крысы / М.В. Куропаткина. — М.: Зооклуб, 2008. — 129 с.
6. Меркулов, Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов — Л.: Медицина, 1969. — 339 с.
7. Ноздрачев, А.Д. Анатомия крысы: учебно-практическое руководство / А.Д. Ноздрачев. — СПб.: Лань, 2001. — 464 с.
8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.

SUMMARY

N.V. Danylevskaia, A.A. Deltsov.

Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K.I. Scryabin (FGBOU VO MGAVMIB — MVA named after K.I. Scryabin) (Moscow).

Studying of Toxicological Safety of a Filler and Sawdust on Basis of Wood Shaving of Coniferous Breeds for Rats. Toxicological researches allow to reveal objectively existence or lack of the damaging effect of the studied ingredients on an organism of experimental animals for the purpose of a safety assessment. Results of our researches showed that the maintenance of animals on a filler in the form of wood granules and sawdust from material on the basis of wood shaving of trees of the coniferous breeds made by «Ideal» is safe for rats. The most effective and convenient in application is simultaneous use of wood granules and sawdust. The volume of absorption and keeping of liquid granulate and sawdust makes 20...25 ml on 5,0 g of material.

Key words: safety, toxicity, filler, wood granules, sawdust, rats.