

БЕЛЯКОВА  
Наталья Александровна

ВЛИЯНИЕ МОРФИНА ГИДРОХЛОРИДА НА РЕПРОДУКТИВНУЮ  
ФУНКЦИЮ САМОК КРЫС И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ  
ВЫЯВЛЕННЫХ НАРУШЕНИЙ

14.03.04 – токсикология

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Автореферат диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург  
2021

Диссертационная работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России)

<b>Научные руководители:</b>	<b>Бонитенко Евгений Юрьевич</b> доктор медицинских наук
	<b>Носов Андрей Викторович</b> доктор медицинских наук, доцент
<b>Официальные оппоненты:</b>	<b>Башарин Вадим Александрович</b> доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное военное образовательное учреждение высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации, начальник кафедры военной токсикологии и медицинской защиты – главный токсиколог–радиолог Министерства обороны Российской Федерации
	<b>Звартау Эдвин Эдуардович</b> доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой фармакологии
<b>Ведущая организация:</b>	Федеральное государственное бюджетное учреждение «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации (ФГБУ «ГНИИИ ВМ» МО РФ)

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета 68.1.005.01 (Д 208.030.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» (192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке и на сайте (<http://www.toxicology.ru>) Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства».

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2021 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор медицинских наук,  
профессор



**Луковникова Любовь Владимировна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.** В последние годы в Российской Федерации существенно возросло число обращений за медицинской помощью пациентов с нарушениями репродуктивной функции (РФ), возникшими после предшествовавшего длительного приема опиатных наркотических анальгетиков (ОНА). Это связано, с одной стороны, со все более широким использованием ОНА и, в частности, морфина при лечении хронического болевого синдрома как у онкологических [Верткин А.П. и др., 2003; Абузарова Г.Р. и др., 2015; Zech D.F. et al., 1995; Schrijvers D., 2010; Mystakidou K. et al., 2004], так и у неонкологических больных [Осипова Н.А., 2005; Штрибель Х.В. и др., 2005; Звартау М.В. и др., 2007; Ананьева Л.П., 2008, Nicholson B., 2003] любого возраста, включая детский [Машфорт М.Л. и др., 2004; Штрибель Х.В. и др., 2005; Савва Н.А. и др., 2013], а с другой – с увеличением числа реконвалесцентов после комплексного лечения наркотической зависимости у лиц репродуктивного возраста [Васечкин В.Б., 2000; Richardson E. et al., 2018].

В клинических исследованиях было показано, что морфин, так же как и другие ОНА, часто провоцирует гормональный дисбаланс у постоянных пользователей обоих полов [Сивочалова О.В. и др., 2002]. Этот побочный эффект зависит от дозы и наблюдается как у тех, кто использует морфин в терапевтических целях, так и у наркоманов, применяющих его рекреационно, кроме того, он наблюдается после отмены ОНА [Арутюнян А.В. и др., 1990; Smith C.G. et al., 1987].

В научной литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что у большинства (около 90%) постоянных потребителей ОНА мужчин наблюдается вызванный ими гипогонадизм, который проходит после их отмены. В свою очередь, при применении ОНА у женщин значительно снижается возможность наступления беременности, причиной чего, как правило, является нарушение выработки гормонов, что приводит к возникновению вторичной дисфункции яичников [Hollister L.E., 1973]. Развитие гормонального дисбаланса у женщин и, в частности, снижение синтеза лютеинизирующего гормона, проявляется отсутствием месячных и бесплодием [Иванец Н.Н. и др. 2000; Фридман Л.С. и др., 2000]. Причинами подобных сбоев могут быть самые разнообразные расстройства соматического и психического здоровья [Кулаков В.И. и др., 2005; Weller Y. et al., 2001], вызванные приемом ОНА. Однако, по мнению большинства специалистов, их основой являются нарушения, возникающие в гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси [Smith C.G. et al., 1987; Scott G. et al., 1999], которые, судя по всему, непосредственно связаны с механизмом действия ОНА и, в первую очередь, с их угнетающим действием на гипоталамические нервные пути, контролирующие секрецию гонадотропинов как у мужчин, так и женщин [Арутюнян А.В. и др., 2003].

В настоящее время за медицинской помощью по поводу бесплодия обращаются, как правило, женщины. Лечение репродуктивных расстройств, вызванных применением ОНА, основано на синдромальном подходе, основным компонентом которого является длительная заместительная гормональная терапия [Назаренко Т.А., 1998; Корнеева И.Е., 2003; Овсянникова Т.В., 2004]. Эффективность подобной терапии, как правило, не очень велика, кроме того, ее применение вызывает стойкое угнетение выработки собственных гормонов [Кулаков В.И. и др., 2011; Радзинский В.Е. и др., 2019].

Учитывая то, что расстройства репродуктивной функции, вызванные длительным применением ОНА, обусловлены центральными эффектами этих токсикантов, вполне обоснованным является использование для коррекции этих нарушений препаратов, обладающих способностью регулировать функцию ЦНС. Одной из таких групп являются нейропептиды и, в частности, лекарственные препараты, содержащие дельта-сон индуцирующий пептид (ДСИП) и аналог фрагмента 4–10 адренкортикотропного гормона (4–10АКТГ). Указанные выше пептидные препараты (ПП) обладают широким спектром физиологической активности, направленной на восстановление функциональной активности структур головного мозга, нарушенной при различных патологических процессах [Каплан А.Я. и др., 1992; Федоров А.Б. и др., 1999; Левицкая Н.Г. и др., 2003; Шабанов П.Д., 2008].

Исследования по поиску средств коррекции функции ЦНС при поражениях различной этиологии продемонстрировали положительное влияние ДСИП и 4–10АКТГ на течение заболеваний, а также определили их место в комплексной терапии этой патологии [Глоба О.В. и др., 2008; Иванова Н.Е., 2012; Евтушенко И.С., 2013]. ДСИП и 4–10АКТГ оказывают ноотропное, нейропротекторное, антиоксидантное, адаптогенное воздействие на организм, находящийся в патологическом состоянии, однако данных по их влиянию на здоровый организм и, в частности, на женскую РФ в доступной литературе нам обнаружить не удалось.

**Цель исследования:** На основании изучения механизмов формирования нарушений репродуктивной функции у самок крыс, вызванных длительным воздействием морфина гидрохлорида, предложить пути их фармакологической коррекции.

Для достижения цели исследования необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Изучить влияние на организм и РФ самок крыс хронического воздействия морфина гидрохлорида (МГХ) в зависимости от дозы и возраста при начале его введения.
2. Оценить физическое (ФР) и сенсорно-двигательное развитие (СДР) в постнатальном периоде у потомства самок крыс, подвергшихся хроническому воздействию МГХ до беременности в зависимости от возраста при начале его введения.
3. Изучить влияние пептидных препаратов (ПП), содержащих ДСИП и 4–10АКТГ, на РФ самок крыс, а также физическое и сенсорно-двигательное развитие их потомства.
4. Оценить влияние ПП, содержащих ДСИП и 4–10АКТГ, на РФ самок крыс после хронического воздействия МГХ, а также на физическое и сенсорно-моторное развитие их потомства.

**Научная новизна.** Установлена зависимость между нарушениями РФ самок крыс и возрастом начала 3-х месячного введения МГХ, в соответствии с которой чем младше возраст, тем более выражены нарушения. Показано, что 3-х месячное введение МГХ в десятикратной эффективной терапевтической дозе (10,0ЭТД) самкам крыс вызывало нарушения: плодовитости (снижение показателей фертильности и беременности), репродуктивных показателей (увеличение пред- и постимплантационной гибели эмбрионов и снижение количества живых плодов), состояния плацент (увеличение плацентарно-плодового коэффициента) и зародышей (отечность плодов, увеличение краниокаудального размера (ККР) и массы, количества случаев кровоизлияний в головной мозг, уменьшение длин зачатков костей передних и задних конечностей). Помимо указанных выше нарушений для плодов, полученных от животных, которым с неполовозрелого (месячного) возраста вводился, в течение 3-х месяцев, МГХ в 10,0ЭТД были, характерны гидроцефалия (расширение желудочков головного мозга) и гидронефроз, вызванные нарушением функции почек у беременных самок.

Впервые показано, что длительное введение МГХ в 10,0ЭТД самкам крыс до беременности вызывает отставание в физическом и сенсорно-моторном развитии их потомства. Отставание в ФР проявляется дефицитом массы тела, задержкой появления таких признаков, как отлипание ушных раковин, формирование первичных покровов, прорезывание резцов, открытие глаз, опускание семенников, открытие влагалища. Отставание СДР характеризуется задержкой появления и формирования рефлексов (переворачивания на плоскости, отрицательного геотаксиса, избегания обрыва, поднимания головы и передних лап, ползания, опоры на задние конечности и подъема всего тела, избегания обрыва, вызванного визуальным стимулом), а также изменениями двигательной и исследовательской активности (увеличением количества горизонтальных передвижений и груминга, и снижением числа вертикальных передвижений и заглядываний).

Впервые установлено, что ПП, содержащие ДСИП или 4–10АКТГ, оказывают влияние на РФ самок крыс: снижают показатели плодовитости (фертильность и беременность), изменяют характеристики плаценты (уменьшают ее диаметр и увеличивают массу), оказывают влияние на внутриутробное развитие плодов (уменьшают массу и ККР) и процессы формирования скелета (уменьшают длины закладок костей передних и задних конечностей и количества точек оксификации позвонков и мелких костей).

Впервые показано, что применение препарата, содержащего 4–10АКТГ, до беременности приводило в постнатальном периоде развития к дефициту массы тела у

потомства и некоторому отставанию в физическом и сенсорно-моторном развитии в периоде раннего молочного вскармливания.

Впервые показано, что ПП, содержащие ДСИП или 4–10АКТГ, вводимые после длительного предшествовавшего применения МГХ в 10,0ЭТД, нивелируют нарушения РФ у самок крыс: уменьшают нарушения плодовитости, репродуктивных показателей (увеличение количества мест имплантаций и живых плодов, уменьшение общей эмбриональной гибели), оказывают положительное влияние на состояние плодов (увеличивая их морфометрические характеристики и массу, предотвращая появление отклонений в развитии и нарушений формирования скелета).

Впервые показано, что ПП, содержащие ДСИП или 4–10АКТГ, вводимые после длительного применения МГХ самкам крыс до беременности предотвращают нарушения физического и сенсорно-моторного развития, а также поведения у потомства.

Впервые продемонстрирована возможность комплексной оценки показателей физического и сенсорно-моторного развития, а также соответствия физического развития сенсорно-моторному у потомства мелких лабораторных животных в постнатальном периоде после воздействия химических веществ.

**Теоретическая и практическая значимость.** Показано, что изучение нарушений РФ у самок крыс после длительного применения ОНА целесообразно проводить на неполовозрелых особях в связи с их наибольшей чувствительностью к подобному воздействию.

Показано, что ПП, содержащие ДСИП или 4–10АКТГ, вызывают нарушение РФ и должны с осторожностью применяться в периоде планирования беременности у женщин.

Установлено, что эффективными средствами фармакотерапии нарушений РФ у женщин после длительного применения МГХ могут являться ПП, содержащие ДСИП либо 4–10АКТГ.

Установлено, что ПП, содержащие ДСИП либо 4–10АКТГ, корректируют отставание физического и сенсорно-моторного развития у потомства, материнские особи которого до беременности длительно принимали МГХ.

Показано, что коэффициенты и индексы физического и сенсорно-моторного развития могут быть использованы при проведении комплексной доклинической оценки влияния фармакологических средств на развитие потомства в постнатальном периоде.

**Методология и методы исследования.** Исследование было выполнено в два этапа. Общая методология исследования представлена в схематическом виде на рисунке 1.

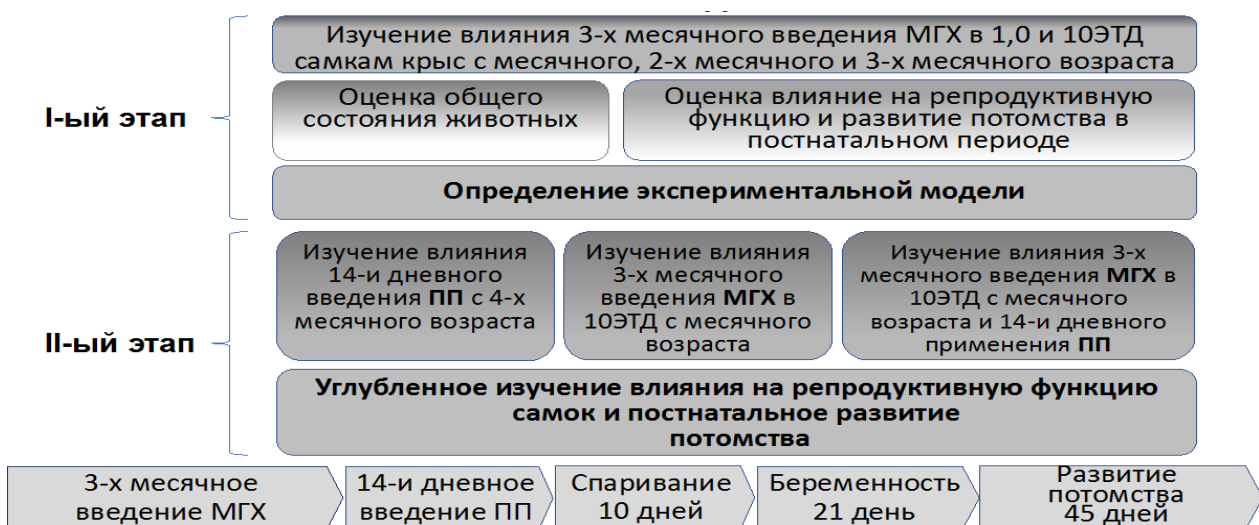


Рисунок 1 – Дизайн исследования

Набор использованных методов соответствует современному методическому уровню экспериментальных и лабораторных исследований. Примененные методы статистической обработки данных отвечают поставленной цели и задачам исследования. Исследования выполнены с соблюдением всех правил доказательной медицины.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. При 3-х месячном введении в 1,0 и 10,0ЭТД МГХ не оказывает существенного влияния на общее состояние самок крыс различных возрастных групп. 3-х месячное ведение МГХ в 10,0ЭТД до беременности оказывает влияние на РФ подопытных самок крыс. Наиболее выраженные расстройства РФ наблюдаются в группе животных получавших МГХ до беременности с месячного возраста.

2. 3-х месячное введение МГХ в 10,0ЭТД самкам крыс до беременности оказывает влияние на физическое и сенсорно-моторное развитие их потомства. Выраженность нарушений физического и сенсорно-моторного развития у потомства, материнские особи которого получали в течение 3-х месяцев МГХ до беременности, непосредственно зависит от возраста при начале его введения, причем, чем младше возраст, тем более выражены нарушения.

3. 14-и дневное введение ПП, содержащих ДСИП и 4–10АКТГ, до беременности не оказывает значительного влияния, как на РФ крыс самок, так и на физическое и сенсорно-моторное развитие их потомства.

4. 14-и дневное введение ПП, содержащих ДСИП и 4–10АКТГ, после 3-х месячного воздействия МГХ неполовозрелым самкам крыс в 10ЭТД до беременности уменьшает степень выраженности нарушений РФ, а также физического и сенсорно-моторного развития их потомства.

**Реализация и внедрение полученных результатов.** Рекомендации, разработанные на основании полученных в процессе исследований данных, используются в научной и практической деятельности ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт прикладных проблем» ФСТЭК России. Полученные в процессе работы материалы использованы при подготовке методических рекомендаций «Оценка морфофункциональных нарушений у потомства как результата воздействия экотоксикантов на организмы родительских особей» (МР ФМБА России 21.45-17).

**Степень достоверности.** Степень достоверности результатов определяется достаточным и репрезентативным объемом выборки, рандомизацией и формированием экспериментальных и контрольных групп, выбором адекватной экспериментальной модели, использованием современных методов оценки клинических и лабораторных показателей, комплексным подходом к оценке нарушений РФ, физического и сенсорно-моторного развития потомства, а также достаточными сроками наблюдения. Используемые методы математической обработки результатов соответствуют поставленным задачам.

**Апробация работы и публикация материалов исследования.** Основные положения диссертации доложены на IV Съезде токсикологов России (Москва, 2013); конференции «Актуальные проблемы диагностики, профилактики и лечения профессионально обусловленных заболеваний» (Сочи, 2014); III Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики, профилактики и лечения профессионально обусловленных заболеваний» (Сочи, 2015); II Всероссийской научной конференции «Современная лекарственная токсикология: фундаментальные и прикладные аспекты» (Томск, 2017), научно-практической конференции «Преимственность и последовательность GXP как гарантия безопасности» (Санкт-Петербург, 2020).

По теме диссертации опубликованы 8 статей в изданиях, определенных перечнем ВАК Министерства науки и высшего образования России.

**Личный вклад автора.** Самостоятельно или при непосредственном участии были получены экспериментальные результаты, которые подвергались статистической обработке, систематизации и оформлению в рукописи диссертации автором лично. Постановка задач, интерпретация полученных результатов осуществлялись совместно с научными руководителями.

**Связь темы диссертации с тематикой научно-исследовательской работы учреждения.** Настоящее исследование было выполнено в рамках доклинического изучения безопасности препаратов «Морфина гидрохлорид, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг и 10 мг», разработанных ФГУП «Московский эндокринный завод» во исполнение пп. 2 п. I раздела III «Плана мероприятий...» введенного в действие

распоряжением Правительства Российской Федерации от 01 июля 2016 г. № 1403-р «Об утверждении плана мероприятий («дорожная карта») «Повышение доступности наркотических средств и психотропных веществ для использования в медицинских целях».

Разработка и внедрение указанных выше препаратов осуществляется в рамках реализации стратегии импортозамещения (обеспечения фармацевтического рынка отечественными лекарственными препаратами и повышения доступности обезболивающих наркотических средств для использования в медицинских целях), а также реализации программы по обеспечению онкологических больных обезболивающими лекарственными препаратами и улучшению качества жизни пациентов паллиативного профиля.

**Структура и объем работы.** Диссертация включает введение, обзор литературы, 3 главы, посвященные собственным исследованиям (общей характеристике материалов и методов, влияния хронического введения МГХ на общее состояние и репродуктивную функцию самок, а также развитие потомства, влияние ПП на РФ самок и развитие потомства после хронического введения МГХ), заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы. Работа изложена на 190 страницах машинописного текста, иллюстрирована 26 рисунками и 45 таблицами. Список литературы содержит 240 источников (161 отечественных и 79 иностранных).

### **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

Первая глава диссертации посвящена обзору литературы, в котором представлена токсикологическая характеристика МГХ, влияние ОНА на женскую РФ, а также описаны существующие подходы к лечению указанных нарушений. Дана характеристика ПП и профиль их фармакологической активности.

Во второй главе описаны методы исследования, включающие оценку общего состояния животных, РФ самок крыс и развития их потомства, а также статистическую обработку полученных данных.

В третьей и четвертой главах изложены результаты собственных исследований и их обсуждение. В заключении подводятся итоги выполненных исследований, приведены выводы и практические рекомендации.

### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

В экспериментах использовано 386 нелинейных белых самок крыс, находящихся в различных периодах онтогенеза: одно-, двух- и трехмесячных, средней массой 50, 140 и 200 г. Кроме того, в динамике был клинически обследован 541 родившийся детеныш, а также морфометрически 509 20-дневных эмбрионов по методу Вильсона-Дыбана и 484 по методу Доусона.

Во время карантина и в процессе исследования животные содержались в соответствии с требованиями ГОСТ 33215-2014 и ГОСТ 33216-2014 на стандартном водном и пищевом рационе в отдельном помещении. Исследования на животных проводились в соответствии с требованиями «Правил лабораторной практики» [Приказ МЗСР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н]. При рандомизации групп в качестве основного критерия использовали массу тела (отклонение массы тела в группе не более 10%).

Для проведения исследования был использован препарат Морфин производства ФГУП «Московский эндокринный завод», действующее вещество (7,8-дегидро-4,5-альфа-эпокси-17-метилморфинан-3,6-альфа-диол) гидрохлорид в лекарственной форме таблетки, покрытые пленочной оболочкой по 5,0 и 10,0 мг. МГХ вводили внутривенно (в/в) в виде водной суспензии с помощью атравматического зонда в объеме 0,5 мл/100 г массы тела животного.

Оборот МГХ в ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России осуществлялся в соответствии с лицензией на осуществление деятельности по обороту наркотических средств, психотропных веществ и их прекурсоров, культивированию наркосодержащих растений № ЛО-78-04-000022 от 05 апреля 2014 г.

При выборе исследуемых доз МГХ, режима и способа введения исходили из принятых в клинической практике дозировок и схем применения у соответствующих возрастных категорий пациентов. Для расчета доз вводимых различным возрастным группам были изучены показатели острой токсичности МГХ при однократном в/в введении белым

нелинейным крысам самкам. Расчет параметров острой токсичности производили методом наименьших квадратов пробит-анализа кривых летальности по Финни [Finney D.J., 1952; Прозоровский В.Б., 1962].

Широту терапевтического действия МГХ характеризовали значением его терапевтического индекса (ТИ), который рассчитывали как соотношение ЛД<sub>50</sub> и ЭТД при в/ж введении крысам [Гуськова Т.А., 2003]. Расчет величин тестируемых доз производился в соответствии с «Руководством...» [Мионов А.Н. и др., 2012], с учетом коэффициентов пересчета (КП) для разных возрастных групп (таблице 1). Полученные значения ТИ позволили отнести выбранные дозы к малоопасным в соответствии с классификацией степеней опасности токсического действия лекарственных средств.

Таблица 1

Расчет доз для хронического введения крысам самкам в зависимости от возраста при начале применения МГХ

Группа животных	ЛД <sub>50</sub> , мг/кг	КП	ЭТД, мг/кг		ТИ
			1,0	10,0	
Крысы-самки месячного возраста	929,7	4,1	6,0	60,0	155,9
Крысы-самки 2-х месячного возраста	1080,6	4,8	7,2	72,0	150,1
Крысы-самки 3-х месячного возраста	525,7	6,0	5,0	50,0	105,1

С учетом того, что исследования были выполнены в рамках доклинического изучения безопасности препарата МГХ в соответствии с «Руководством...» нами для исследований были выбраны две дозы кратные 1,0 и 10,0 ЭТД. Следует отметить, что использованная нами 10,0 ЭТД соответствует дозам применяемым другими исследованиями для моделирования нарушений репродуктивной функции вызванных длительным приемом ОНА [Ali R.A. et al., 2018]. В свою очередь длительность введения МГХ была определена на основании проекта инструкции по применению, в которой была указана продолжительность равная 30 дням, а также требований «Руководства...» в соответствии с которыми при указанном курсе – изучение хронической токсичности должно осуществляться в течение 90 или более дней.

Эвтаназию животных для забора биологического материала осуществляли ингаляционным воздействием СО<sub>2</sub>.

В работе были использованы препараты Семакс® (СМС®) производства ЗАО «ИНПЦ "Пептоген"» и Дельтаферокс® (ДФС®) производства ООО «ИЦ "Комкон"». Дельтаферокс® – воспроизведенный лекарственный препарат, референтным для которого является Дельтаран® (ЛП 003849-200916). Отличительной особенностью ДФС® является присутствие в его составе вспомогательного вещества карнозина. Основные характеристики ПП представлены в таблице 2.

Таблица 2

Общая характеристика пептидных препаратов, использованных в исследовании

Характеристики	Препараты	
	Семакс®	Дельтафирокс®
Фарм. группа	Ноотроп	Антигипоксическое средство
Состав	Семакс – 1 мг/мл; метиловый эфир параоксibenзойной кислоты – 1 мг/мл; вода очищенная – до 1,0 мл	Пептид дельта-сна – 0,3 мг; глицин – 3,0 мг; карнозин – 1,0 мг
Форма выпуска	Капли назальные 0,1% во флаконах с пробкой-пипеткой, дозирующей по 3,0 мл	Лиофилизат для приготовления р-ра для интраназального введения в ампулах по 1,0 мл.
Действующее вещество	Синтетический аналог фрагмента 4-10АКТГ (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro), лишенный гормональной активности	Синтетический аналог ДСИП (Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu)
Фармакологическое действие	Нейрометаболическое, антиоксидантное, антигипоксическое, церебропротективное, ноотропное	
Фармакодинамика	Имеет разнообразные механизмы действия	

Учитывая результаты собственных исследований, а также литературные данные, выбранные нами ПП вводились однократно и/н в дозе 300 мкг/кг/сутки (по ДСИП или 4–



10 АКТГ) в течение 14 дней [Левицкая Н.Г. и др., 2010; Башарин В.А., 2011].

В работе были использованы методы исследования, применяемые при оценке общего состояния животных при проведении доклинических исследований хронической токсичности новых лекарственных препаратов, а также при изучении РФ самок и развития их потомства, характеристика последних представлена в таблице 3.

Таблица 3

Методы исследования, использованные для оценки репродуктивной функции самок крыс и развития их потомства

№	Метод исследования	Изучаемые показатели
1.	Изучение структуры эстрального цикла (ЭЦ)	Продолжительность ЭЦ, течкового и межтечкового периодов. Рассчитывали коэффициент проэструса – эструса и метаэструса – диэструса.
2.	Изучение показателей репродуктивной функции	Количество оплодотворенных и беременных самок. Рассчитывали индексы фертильности и беременности. Учитывали изменение массы тела беременных самок в динамике. На 20-й день беременности определяли: количество желтых тел, мест имплантации, резорбций, количество живых и погибших плодов, Рассчитывали индексы пред- и постимплантационной гибели. Макроскопически оценивали: аномалии развития, состояние эмбрионов, внутренних органов и скелета, морфометрические характеристики эмбрионов и состояние плацент, рассчитывали плацентарно-плодовый коэффициент.
3.	Оценка физического развития эмбрионов	Рассчитывали индексы Кетле I, Кетле II, Бонгарда, Вервека (модификация), Пинье, Эрисмана, Ливи, Рорера
4.	Оценка развития внутренних органов и скелета эмбрионов	Морфометрическое исследование эмбрионов осуществлялось по методу Вильсона в модификации А.П. Дыбана. Состояние скелета эмбрионов оценивали по методике Доусона. Степень развития скелета эмбрионов и оссификацию костной ткани оценивали согласно Current Protocols in Toxicology, Teratology (2006).
5.	Изучение физического развития потомства	Параметры потомства: пол, масса тела. Физическое развитие: отлипание ушной раковины, появление первичного волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, открытие влагалища.
6.	Изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов	Тесты: переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, избегание обрыва, открытое поле-1 (показатели: поднимание головы и передних лап, ползание, опора на задние конечности и подъем всего тела, двигательная активность (число пересеченных квадратов), умывания, обнюхивания, стойки, карабканье на стенки, прыжки, время отсутствия активности, возможные аномалии походки), избегание обрыва (вызванное визуальным стимулом)
7.	Открытое поле	Латентный период выхода, горизонтальная и вертикальная (стойки) активность, груминг, болюсы, скорость движения животных и расстояние, пройденное животным в течение эксперимента, общая двигательная активность, количество движений в центре площадки и на периферии.
8.	Приподнятый крестообразный лабиринт	Латентный период; время полного обхода; количество возвратов; количество поворотов; количество диаметральных переходов; количество стоек.
9.	Биохимическое исследование сыворотки крови	Содержание лютеинизирующего гормона (ЛГ), фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и прогестерона (ПГ)

Методы статистической обработки результатов исследований. За единицу наблюдения при статистической обработке полученных результатов принимали одну самку или один помет. Статистическая обработка результатов производилась с использованием пакета программа Statistica 6,0 для Windows. Расчет средних величин регистрируемых показателей проводился общепринятыми статистическими методами.

В случае нормального распределения показателей в экспериментальных группах и равенства дисперсий использовались методы параметрической статистики (сравнения

показателей с использованием t-критерия Стьюдента). Для сравнения средних величин при отсутствии признаков нормального распределения использовали непараметрические методы (Вилкоксона для связанных и Манна–Уитни для несвязанных выборок). Различия считали достоверными, если P составлял 95 и более процентов ( $p < 0,05-0,01$ ). В отношении данных, принадлежащих к распределению, отличному от нормального, применяли непараметрический метод Манна–Уитни [Бейли Н., 1963; Реброва О.Ю., 2002].

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

При выполнении первого этапа исследования решались 1 и 2 задачи. В рамках оценки общего состояния животных нами было изучено влияние хронического применения МГХ на: поведение, двигательную и исследовательскую активность, динамику массы тела, потребление корма и воды, сердечно-сосудистую систему, функциональное состояние почек, морфологические показатели периферической крови, биохимические показатели крови, морфологическую картину внутренних органов.

В результате решения первой задачи должна была быть определена оптимальная экспериментальная модель, позволяющая оценить возможность использования ПП для коррекции нарушений репродуктивной функции, вызванных длительным введением МГХ.

В связи с тем, что неблагоприятные эффекты химических веществ могут существенно зависеть от степени зрелости организма, исследования нами были выполнены на животных трех возрастных групп – месячных, 2-х и 3-х месячных, что при экстраполяции полученных результатов на человека соответствует детскому, подростковому и взрослому (половозрелому) возрасту [Миронов А.Н. и др., 2012].

На основании показателей токсикометрии при однократном в/ж введении были рассчитаны дозы МГХ для хронического введения животным различных возрастных групп эквивалентные 1,0 и 10,0ЭТД (таблица 1). Выбор был обусловлен тем обстоятельством, что указанные дозы являются общепринятыми при проведении доклинической оценки безопасности новых лекарственных средств [Миронов А.Н. и др., 2012].

Результаты изучения общего состояния животных свидетельствовали о том, что:

- в процессе 3-х месячного введения МГХ во всех экспериментальных группах формировались стойкие дозозависимые стереотипные реакции, непосредственно связанные с введением ксенобиотика, не сочетавшиеся с нарушениями двигательной и ориентировочно-исследовательской активности;

- снижение набора массы тела самками крыс происходило за счет уменьшения потребления корма, обусловленного изменениями пищевого поведения, сохранявшимися в группах получавших МГХ в 10,ЭТД в течение всего периода наблюдения;

- 3-х месячное введение МГХ во всем диапазоне исследуемых доз крысам самкам всех возрастных групп не оказывало значимого влияния на сердечно-сосудистую систему;

- наиболее выраженные нарушения функции печени и почек наблюдались в группе, получавшей МГХ с месячного возраста в 10,0ЭТД. Так, в этой группе было зарегистрировано достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение активности аспартат (с  $173 \pm 6$  до  $234 \pm 14$  ЕД/л) и аланинаминотрансферазы ( $44 \pm 4$  до  $68 \pm 5$  ЕД/л), концентрации мочевины (с  $5,9 \pm 0,4$  до  $7,7 \pm 0,5$  ммоль/л) и уменьшение содержания общего белка (с  $68,8 \pm 1,0$  до  $64,9 \pm 1,2$  г/л), альбумина (с  $31,0 \pm 0,7$  до  $28,1 \pm 0,7$  г/л) и холестерина (с  $1,5 \pm 0,1$  до  $1,0 \pm 0,1$  ммоль/л.) Однако, выявленные изменения были незначительными, свидетельствовали о развитии у животных начальной стадии гепаторенальной дисфункций и могли быть квалифицированы как гепато-нефропатия легкой степени. Подобные изменения являются типичными для длительного применения МГХ даже в низких дозах и связаны с особенностями биотрансформации и кинетики последнего [Лелевич С.В., 2015], а также с катаболическими процессами, обусловленными алиментарным фактором (снижением потребления корма и, как следствие этого, замедлением прироста массы тела). С развитием выделительного нефроза также связано увеличение массовых коэффициентов головного мозга, у животных, получавших МГХ в 10,0ЭТД с месячного и 2-х месячного возраста, вследствие недостаточного выделения жидкости из организма, особенно на фоне ее избыточного потребления.

Введение МГХ во всем диапазоне доз в течение трех месяцев 2-х и 3-х месячным

животным приводило к незначительным и невоспроизводимым изменениям отдельных параметров белой крови, вероятно, связанных с нарушением нормального состава влагалищной флоры, обусловленных расстройствами эстрального цикла.

Со стороны других органов и систем после 3-х месячного введения МГХ животным всех возрастных групп во всем диапазоне доз ни функциональных, ни морфологических (макро- и микроскопических) нарушений выявлено не было.

По результатам проведенных исследований по влиянию длительного введения ксенобиотика нами для изучения РФ самок была выбрана доза МГХ равная 10,0 ЭТД, не оказывавшая существенного влияния на общее состояние экспериментальных животных.

При изучении влияния 3-х месячного введения МГХ в 10,0 ЭТД на РФ самок крыс определялись следующие показатели: прирост массы тела беременных самок, плодовитость, репродуктивные показатели, состояние плацент и плодов (особенности развития внутренних органов и формирования скелета эмбрионов).

Было установлено, что хроническое введение МГХ в 10,0 ЭТД приводило к достоверному ( $p < 0,05$ ) снижению прироста массы тела на 3-ей неделе беременности у самок, начинавших получать ксенобиотик с месячного, 2-х и 3-х месячного возраста в 1,33, 1,87 и 1,53 раза по сравнению с контрольными группами, соответственно.

Достоверные нарушения плодовитости ( $p < 0,05$ ) были зарегистрированы только в группе животных, получавших МГХ с месячного возраста, в которой 80% самок, посаженных к самцам, были оплодотворены, но из них только 50% были беременными. Что свидетельствовало как о расстройствах полового поведения у этих животных, так и о серьезных нарушениях способности к зачатию потомства. Нарушения репродуктивных показателей после применения МГХ были наиболее выраженными в группах, получавших ксенобиотик с месячного и 2-х месячного возраста (таблица 4). Для этих групп характерным было, с одной стороны, достоверное увеличение эмбриональной смертности, как за счет пред-, так и постимплантационной гибели, а с другой, значительное уменьшение количества живых плодов ( $p < 0,05$ ), сочетавшееся с увеличением массы и ККР. Обращало на себя внимание наличие закономерности, в соответствии с которой, чем младше был возраст начала введения МГХ самкам, тем более значимыми были изменения репродуктивных показателей, что, вероятно, было связано с более выраженными нарушениями гормональной регуляции, начиная с препубертатного периода онтогенеза.

При внешнем осмотре плодов от животных, получавших в течение 3-х месяцев МГХ вне зависимости от возраста начала его применения, обращала на себя внимание их отечность, бледность покровных тканей, околоплодные воды были зеленоватыми в отличие от прозрачных в контроле. При внешнем осмотре плодов, как в опытных, так и в контрольных группах, не было выявлено анатомических пороков развития.

При изучении показателей ФР значимых отличий ККР, а также массы плодов во всех опытных группах, по сравнению с контрольными, выявлено не было. Обращало на себя внимание достоверное снижение суммарной массы плодов помёта у самок, получавших МГХ с неполовозрелого возраста, по сравнению с контролем, что связано с низкой численностью плодов в помете (таблица 4).

В группе, получавшей МГХ с месячного возраста, также было зарегистрировано увеличение плацентарно-плодового коэффициента, что свидетельствовало о нарушении циркуляторно-метаболического равновесия в фетоплацентарной системе [Савельева Г.М. и др., 1991; Глуховец Б.И. и др., 2006] и о развитии компенсированной стадии хронической плацентарной недостаточности [Иванова Л.А. и др., 2009, Глуховец Б.И. и др., 2012]. Было установлено, что хроническое воздействие МГХ не оказывало влияние на частоту встречаемости отклонений в развитии внутренних органов плодов крыс во всех опытных группах. Следует отметить, что у потомства самок, получавших МГХ с 2-х месячного и 3-х месячного возраста, наблюдалось уменьшение ( $p < 0,05$ ) длин зачатков костей передних и задних конечностей, которые тем не менее свидетельствуют о незначительных нарушениях минерального обмена у материнских особей. В свою очередь отсутствие изменений у потомства самок получавших МГХ с месячного возраста может быть объяснено небольшим количеством плодов в помете.

Влияние хронического введения МГХ на репродуктивные показатели самок крыс, состояние плацент и плодов ( $M \pm m$ )

Показатели	Группы животных (возраст начала применения МГХ)						
	месячные		2-х месячные		3-х месячные		
	Контроль (n = 8)	МГХ (n = 8)	Контроль (n = 8)	МГХ (n = 8)	Контроль (n = 9)	МГХ (n = 9)	
Продолжительность беременности, дни	22,5 ± 0,5	22,7 ± 0,4	22,3 ± 0,5	22,5 ± 0,5	22,3 ± 0,5	22,7 ± 0,5	
Количество желтых тел, шт	11,63 ± 0,75	11,50 ± 0,98	12,63 ± 0,73	12,43 ± 1,46	11,44 ± 0,69	14,56 ± 1,10	
Количество мест имплантации, шт	10,13 ± 0,81	6,00 ± 1,45*	10,88 ± 0,61	7,57 ± 1,45*	10,44 ± 0,80	10,56 ± 1,55	
Количество живых плодов, гол.	9,88 ± 0,85	5,63 ± 1,40*	10,50 ± 0,50	6,29 ± 1,39*	10,22 ± 0,85	9,33 ± 1,46	
Резорбции, шт	0,25 ± 0,16	0,38 ± 0,18	0,25 ± 0,16	1,29 ± 0,64	0,22 ± 0,15	0,78 ± 0,30	
Индекс предимплантационной гибели, %	12,94 ± 3,87	42,46 ± 14,34*	12,67 ± 4,94	31,00 ± 13,12	9,78 ± 2,59	28,30 ± 8,53*	
Индекс постимплантационной гибели, %	2,83 ± 1,93	6,71 ± 3,09	3,10 ± 1,54	17,63 ± 3,11*	3,48 ± 1,94	18,72 ± 11,62	
Индекс эмбриональной гибели, %	15,77	49,17	15,77	48,63	13,26	47,02	
Количество плодов в помете, гол.	мужской	4,83 ± 0,55	3,17 ± 1,52*	5,67 ± 1,34	3,17 ± 1,52*	5,00 ± 1,00	4,29 ± 0,95
	женский	5,00 ± 1,10	2,50 ± 0,55*	5,00 ± 1,64	3,50 ± 1,52	5,33 ± 1,14	5,43 ± 1,62
Краниокаудальный размер, мм	мужской	37,65 ± 0,30	38,18 ± 0,46	39,43 ± 0,72	38,80 ± 0,71	37,54 ± 0,48	35,52 ± 1,46
	женский	36,24 ± 0,47	37,65 ± 0,34	36,79 ± 0,08	37,20 ± 0,64	36,25 ± 0,84	35,21 ± 1,14
Масса плода, г	мужской	3,87 ± 0,13	4,05 ± 0,07	4,01 ± 0,18	4,24 ± 0,17	4,08 ± 0,15	3,99 ± 0,05
	женский	3,65 ± 0,04	4,01 ± 0,10	3,87 ± 0,11	4,05 ± 0,23	4,05 ± 0,14	3,87 ± 0,14
Диаметр плаценты, мм	мужской	13,51 ± 0,37	13,31 ± 0,11	14,20 ± 0,23	14,20 ± 0,53	13,26 ± 0,46	13,03 ± 0,34
	женский	13,12 ± 0,36	14,11 ± 0,57	13,85 ± 0,29	13,99 ± 0,23	12,94 ± 0,51	13,37 ± 0,12
Масса плаценты, г	мужской	0,59 ± 0,05	0,68 ± 0,02	0,66 ± 0,07	0,66 ± 0,07	0,58 ± 0,04	0,52 ± 0,05
	женский	0,56 ± 0,05	0,62 ± 0,05	0,62 ± 0,03	0,65 ± 0,07	0,55 ± 0,04	0,55 ± 0,05
Суммарная масса плодов помета, г	41,64 ± 2,06	30,91 ± 5,85*	42,67 ± 2,38	30,30 ± 4,77*	41,89 ± 2,46	40,26 ± 1,98	
Плацентарно-плодовый коэффициент	0,15	0,185	0,16	0,16	0,14	0,14	
Примечание: * – отличие от контроля значимо, $p < 0,05$							

Подводя итог влиянию 3-х месячного введения МГХ на РФ самок крыс, с учетом всего комплекса выявленных нарушений, можно расположить животных различных возрастных групп по степени увеличения негативного действия ксенобиотика в 10,0 ЭТД в следующей последовательности: 3-х месячные < 2-х месячные < месячные.

При решении второй задачи – оценке физического и сенсорно-двигательного развития в постнатальном периоде у потомства самок крыс, подвергшихся хроническому воздействию МГХ до беременности в зависимости от возраста начала его введения, нами были изучены: динамика массы тела; ФР; скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов; двигательная и исследовательская активность.

Для оценки динамики прироста массы тела в опытных группах по сравнению с контрольными и между собой нами был введен показатель – индекс дефицита/избытка массы тела (Ид/иМТ), который рассчитывался по формуле (1):

$$\text{Ид/иМТ} = \frac{P_1 - P_2}{P_1} \times 100\% \quad \text{где } P_1 - \text{среднее значение массы тела потомства контрольной группы; } P_2 - \text{среднее значение массы тела потомства опытной группы.}$$

Полученные индексы свидетельствовали о том, что у потомства крыс, получавших МГХ с месячного возраста, дефицит массы тела составлял  $-22,9 \dots -9,3\%$  в течение всего периода наблюдения. В то время как, в группе потомства, материнские особи которой получали МГХ с 2-х месячного возраста, в первые 14 дней дефицит составлял  $-38,8 \dots -27,0\%$ , а на 21-й день наблюдался уже избыток массы равный  $8,6\%$ . Наименее выраженными были изменения у потомства, рожденного от самок, получавших МГХ с 3-х месячного возраста у которого дефицит массы тела наблюдался только в течение первой недели и в эти сроки не превышал  $15,7\%$ . Развитие дефицита массы тела, во всех группах, судя по всему, было связано с нарушением питания.

В связи со сложностью количественной оценки различий между опытными группами, имеющими разные контроли, а также различной значимостью изучаемых признаков нами для оценки ФР потомства в постнатальном периоде был введен показатель – среднее отставание/опережение сроков физического развития (Со/оСФР) выраженное в сутках, который рассчитывался по общей формуле (2) на основании данных приведенных в таблице 5:

$$\text{Со/оСФР} = \frac{\sum (F_{n1} - F_{n1к}) + (F_{nx} - F_{nxк})}{N_x} \quad \text{где } F_n \text{ и } F_{nk} - \text{среднее сроки появления признака } n \text{ в опытной и контрольной группе; } N_x - \text{количество изучавшихся признаков.}$$

Среднее отставание/опережение сроков ФР рассчитывалось для двух периодов Со/оСФР1 для периода раннего молочного вскармливания и Со/оСФР2 для периода появления первичных половых признаков (таблица 5). На основании Со/оСФР рассчитывались индексы физического развития (ИФР) по формуле (3):

$$\text{ИФР}_{1,2} = \frac{\text{Со/оСФР}_{1,2}}{P_{1,2}} \times 100\% \quad \text{где } P_1 - \text{сроки регистрации открытия глаз в контрольной группе для расчета ИФР1, \%}; P_2 - \text{сроки открытия влагалища в контрольной группе для расчета ИФР2, \%}.$$

Полученные ИФР позволяют расположить потомство крыс, по степени выраженности задержки ФР в зависимости от сроков начала введения МГХ материнским особям в следующей последовательности: месячные > 2-х месячные > 3-х месячные.

С целью сравнения отставания в СДР потомства крыс, получавших МГХ в различные периоды онтогенеза, нами было рассчитано среднее отставание/опережение сроков сенсорно-двигательного развития (Со/оССДР) выраженное в сутках, по формуле (4) на основании данных приведенных в таблице 6:

$$\text{Со/оССДР} = \frac{\sum (S_{n1} - S_{n1к}) + \dots (S_{nx} - S_{nxк})}{N_x} \quad \text{где } S_n \text{ и } S_{nk} - \text{средние сроки появления признака } n \text{ в опытной и контрольной группе; } N_x - \text{количество изучавшихся признаков.}$$

Влияние МГХ на физическое развитие потомства белых нелинейных крыс в постнатальном периоде ( $M \pm m$ )

№ <sup>1</sup> п/п	Показатели		Группы животных (возраст начала применения МГХ)					
			месячные		2-х месячные		3-х месячные	
			Контроль	МГХ	Контроль	МГХ	Контроль	МГХ
Число детенышей в помете	ед	9,90 ± 0,43	5,67 ± 0,78*	10,56 ± 0,47	6,40 ± 0,91*	10,22 ± 0,33	9,33 ± 0,33	
	% от контроля	–	57,0	–	60,6	–	91,3	
1.	Отлипание ушной раковины	сутки	2,06 ± 0,11	4,05 ± 0,19*	2,60 ± 0,18	4,19 ± 0,22*	2,75 ± 0,22	3,57 ± 0,26*
		отставание ФР, сутки	–	1,99	–	1,59	–	0,82
2.	Первичный покров	сутки	5,13 ± 0,18	6,00 ± 0,18*	5,44 ± 0,18	5,62 ± 0,15	5,42 ± 0,22	5,94 ± 0,23
		отставание ФР, сутки	–	0,87	–	0,18	–	0,52
3.	Прорезыван ие резцов	сутки	8,75 ± 0,21	10,14 ± 0,23*	8,69 ± 0,15	10,00 ± 0,18*	8,54 ± 0,23	9,38 ± 0,22*
		отставание ФР, сутки	–	1,39	–	1,31	–	0,84
4.	Открытие глаз	сутки	13,05 ± 0,33	16,10 ± 0,28*	13,19 ± 0,53	15,19 ± 0,65*	13,42 ± 0,55	14,75 ± 0,77
		отставание ФР, сутки	–	3,05	–	2,00	–	1,33
Со/оСФР1, сутки			1,83		1,27		0,88	
ИФР1, %			14,0		9,63		6,54	
5.	Опускание семенников	сутки	24,89 ± 0,27	29,67 ± 0,50*	25,38 ± 0,34	26,84 ± 0,32*	25,68 ± 0,19	26,50 ± 0,32*
		отставание ФР, сутки	–	4,78	–	1,46	–	0,82
6.	Открытие влагалища	сутки	36,26 ± 0,29	40,10 ± 0,42*	36,75 ± 0,52	40,81 ± 0,75*	36,38 ± 0,44	39,44 ± 0,32*
		отставание ФР, сутки	–	3,84	–	4,06	–	3,06
Со/оСФР2, сутки		–	4,31	–	2,76	–	1,96	
ИФР2, %			11,9		7,5		5,4	

Примечание: <sup>1</sup> – номер признака (n) по порядку для расчета Со/оСФР в соответствии с формулой 2; \* – отличие от контроля значимо,  $p < 0,05$

Влияние МГХ на скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов у потомства белых нелинейных крыс в постнатальном периоде в тесте «Открытое поле – 1» ( $M \pm m$ )

№ <sup>1</sup> п/п	Показатели		Группы животных (возраст начала применения МГХ)					
			месячные		2-х месячные		3-х месячные	
			Контроль	МГХ	Контроль	МГХ	Контроль	МГХ
1.	Переворачивание на плоскости	сутки	4,38 ± 0,18	6,09 ± 0,61*	4,38 ± 0,15	5,78 ± 0,28*	4,94 ± 0,20	5,65 ± 0,29*
		отставание в СДР, сутки	–	1,71	–	1,40	–	0,71
2.	Отрицательный геотаксис	сутки	6,24 ± 0,23	8,87 ± 0,60*	6,86 ± 0,30	8,70 ± 0,63*	6,48 ± 0,25	8,35 ± 0,44*
		отставание в СДР, сутки	–	2,63	–	1,84	–	1,87
3.	Избегание обрыва	сутки	7,38 ± 0,29	10,17 ± 0,96*	7,05 ± 0,30	9,26 ± 0,99*	7,24 ± 0,24	8,43 ± 0,38*
		отставание в СДР, сутки	–	2,79	–	2,21	–	1,19
4.	Поднимание головы и передних лап	сутки	8,43 ± 0,22	10,43 ± 0,81*	8,29 ± 0,10	10,00 ± 0,63*	8,76 ± 0,14	9,00 ± 0,32
		отставание в СДР, сутки	–	2,00	–	1,71	–	0,24
5.	Ползание	сутки	10,00 ± 0,20	11,22 ± 0,41*	10,67 ± 0,14	10,83 ± 0,15	10,05 ± 0,20	10,30 ± 0,29
		отставание в СДР, сутки	–	1,22	–	0,16	–	0,25
6.	Опора на задние конечности, подъем всего тела	сутки	14,52 ± 0,31	18,04 ± 0,31*	14,33 ± 0,26	17,04 ± 0,65*	14,24 ± 0,37	14,22 ± 0,57
		отставание в СДР, сутки	–	3,52	–	2,71	–	- 0,02
7.	Избегание обрыва, вызванное визуальным стимулом	сутки	14,95 ± 0,37	17,91 ± 0,34*	14,67 ± 0,28	16,61 ± 0,54*	14,57 ± 0,34	15,04 ± 0,54
		отставание в СДР, сутки	–	2,96	–	1,94	–	0,47
Со/оСДР, сутки		–	2,40	–	1,71	–	0,67	
ИСДР, %		–	16,05	–	11,67	–	4,60	
ИСФСДР, %		–	0,87	–	0,83	–	1,42	
Примечание: <sup>1</sup> – номер признака (n) по порядку для расчета Со/оСДР в соответствии с формулой 4; * – отличие от контроля значимо, p < 0,05								

На основании Со/оСФР рассчитывались индексы сенсорно-двигательного развития (ИСДР) по формуле (5):

$$\text{ИСДР} = \frac{\text{Со/оССДР}}{P} \times 100\%$$

где P – сроки формирования рефлекса избегания обрыва, вызванного визуальным стимулом в контрольной группе, в сутках.

На основании ИСДР по степени отставания в сенсорно-двигательном развитии потомство, материнские особи которого получали МГХ, можно расположить в следующей последовательности: месячные > 2-х месячные > 3-х месячные.

Следует также отметить, что отставание в ФР у потомства в постнатальном периоде сочеталось с задержкой СДР для количественной оценки которого нами были рассчитаны индексы соответствия физического и сенсорно-двигательного развития (ИСФСДР) по формуле (6):

$$\text{ИСФСДР} = \frac{\text{ИФР1}}{\text{ИСДР}}$$

ИСФСДР свидетельствуют о том, что у потомства, материнские особи которого получали МГХ с месячного и 2-х месячного возраста, в периоде раннего молочного вскармливания ФР и СДР отставало от контроля пропорционально.

В то время как у потомства самок крыс, получавших МГХ с 3-х месячного возраста, наблюдалось отставание в сроках ФР при относительной сохранности динамики сенсорно-двигательного (таблица 6). Указанные выше тенденции сохранялись и в более поздние сроки постнатального развития потомства.

Подводя итог первому этапу исследований можно говорить о том, что наиболее выраженные нарушения общего состояния и репродуктивной функции самок крыс, ФР и СДР у их потомства в постнатальном периоде возникали у животных, получавших МГХ в 10,0ЭТД с месячного возраста.

В ходе выполнения второго этапа исследования решались 3 и 4 задачи.

При изучении влияния на РФ самок крыс, а также физическое и сенсорно-двигательное развитие их потомства 2-х недельного введения ПП, содержащих ДСИП или 4–10АКТГ, в выбранных дозах интактным животным было установлено, что они:

– не оказывали значимого влияния, как на структуру, так и длительность ЭЦ (рис. 2), а также концентрацию ЛГ и ФСГ и прогестерона в сыворотке крови (таблица 7).

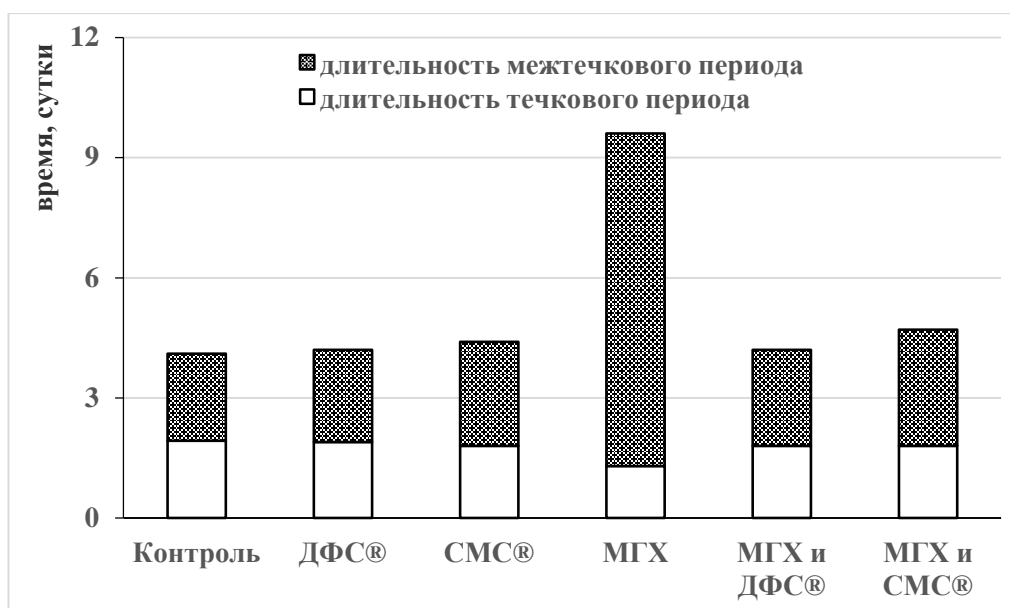


Рисунок 2 – Влияние МГХ, ПП и последовательного их применения на структуру эстрального цикла



Влияние МГХ, ПП и последовательного их применения на содержание гормонов в сыворотке крови

Группы животных	Содержание в сыворотке крови, МЕ/л		
	ФСГ (n = 10)	ЛГ (n = 10)	Прогестерон (n = 10)
Контрольная	2,92 ± 0,31	3,57 ± 0,18	7,6 ± 0,6
Получавшая:			
ДФС®	3,08 ± 0,45	3,61 ± 0,24	7,4 ± 0,5
СМС®	2,87 ± 0,28	3,38 ± 0,33	7,2 ± 0,6
МГХ	1,08 ± 0,52*	1,44 ± 0,56*	6,4 ± 0,6
МГХ и ДФС®	2,76 ± 0,52#	3,45 ± 0,31#	7,4 ± 0,5
МГХ и СМС®	2,68 ± 0,63#	3,28 ± 0,45#	7,1 ± 0,7

Примечание: \* – различие с контролем значимо (p < 0,05); # – различие с группой получавшей МГХ значимо (p < 0,05).

– уменьшали плодовитость крыс (рисунок 3), что проявлялось снижением количества оплодотворенных самок для СМС® (p < 0,05) вследствие выраженного активирующего действия [Себенцова Е.А., 2005, Самотруева М.А. и др., 2015, Ясенявская А.Л. и др., 2017] и беременных для ДФС® (p < 0,05) из-за выраженного транквилизирующего эффекта [Рахманова Э.И., 2004, Войтенков В.Б., 2009].

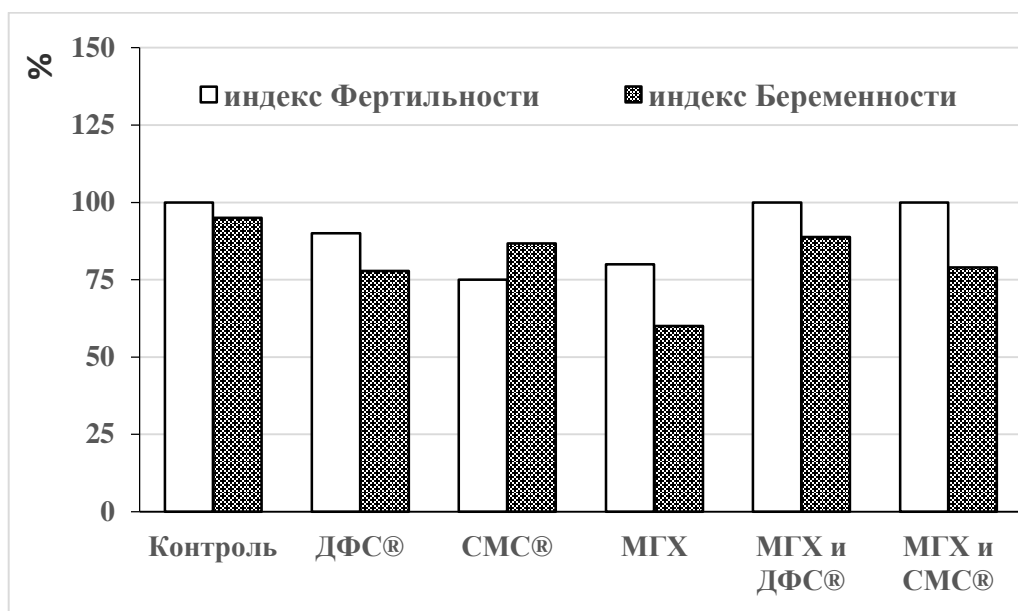


Рисунок 3 – Влияние МГХ, ПП и последовательного их применения на плодовитость и репродуктивные показатели

– не оказывали значимого влияния на такие репродуктивные показатели (таблица 9) как продолжительность беременности, количество желтых тел и мест имплантации, а также имплантационную гибель, за исключением ДФС®, применение которого увеличивало последнюю за счет постимплантационной составляющей (p < 0,05), однако снижали (p < 0,05) темпы прироста массы тела беременных самок (для ДФС® на 2-ой и 3-ей неделе, а для СМС® на 3-ей неделе беременности).

– не оказывали влияние на количество плодов, частоту встречаемости отклонений в развитии внутренних органов (таблица 9), в то время как масса тела и ККР (таблица 8) при применении ДФС® имели тенденцию к снижению, а при использовании СМС® были ниже (p < 0,05), что могло быть обусловлено развитием плацентарной недостаточности. В соответствии с индексами физического развития плоды были гармонично развитыми, однако имели астеническое телосложение.

– уменьшали (p < 0,05) длины закладок костей передних и задних конечностей, а

Влияние ПП, МГХ и их последовательного применения на репродуктивные показатели самок крыс, состояние плацент и плодов ( $M \pm m$ )

Показатели	Группы						
	Контроль (n = 7/82)	Получавшие					
		ДФС® (n = 6/61)	СМС® (n = 6/69)	МГХ (n = 10/75)	МГХ и ДФС® (n = 5/58)	МГХ и СМС® (n = 7/70)	
Продолжительность беременности, дни	22,67 ± 0,55	22,40 ± 0,55	22,17 ± 0,45	22,60 ± 0,55	22,00 ± 0,71	22,20 ± 0,84	
Количество желтых тел, шт.	13,57 ± 0,59	12,70 ± 0,81	12,86 ± 1,03	13,17 ± 0,67	12,71 ± 0,94	14,86 ± 0,96	
Количество мест имплантации, шт.	12,14 ± 0,48	11,20 ± 1,02	11,43 ± 0,69	7,94 ± 0,99*	11,86 ± 0,74#	11,57 ± 1,00#	
Количество живых плодов, гол.	11,71 ± 0,55	10,40 ± 1,06	11,14 ± 0,74	7,44 ± 0,96*	11,43 ± 0,87#	10,00 ± 0,72#	
Индекс предимплантационной гибели, %	9,98 ± 1,90	11,89 ± 6,61	9,74 ± 3,63	38,73 ± 7,37*	6,20 ± 2,53#	20,09 ± 8,53	
Индекс постимплантационной гибели, %	3,70 ± 1,80	8,12 ± 2,62	2,81 ± 1,90	6,86 ± 1,91	3,96 ± 2,89	12,03 ± 3,68	
Индекс эмбриональной гибели, %	13,68	20,01	12,55	45,59	10,16	32,12	
Количество плодов в помете, гол.	мужской	5,67 ± 1,10	4,80 ± 1,10	6,17 ± 2,61	3,83 ± 1,10*	5,83 ± 2,51	5,40 ± 2,51
	женский	6,00 ± 0,84	5,40 ± 1,52	5,33 ± 1,82	3,67 ± 0,84*	5,67 ± 1,34#	4,60 ± 1,67
Краниокаудальный размер, мм	мужской	35,23 ± 1,33	32,18 ± 1,61	30,57 ± 0,61*	31,39 ± 1,33*	29,90 ± 0,55*	31,80 ± 0,92*
	женский	34,12 ± 1,20	31,04 ± 1,39	30,21 ± 0,69*	29,82 ± 0,88*	29,10 ± 0,55*	31,08 ± 0,70*
Масса плода, г	мужской	2,99 ± 0,31	2,84 ± 0,35	2,54 ± 0,07*	2,75 ± 0,30	2,28 ± 0,04*,#	2,79 ± 0,23
	женский	2,84 ± 0,29	2,65 ± 0,27	2,43 ± 0,07*	2,50 ± 0,23	2,21 ± 0,15*	2,61 ± 0,18
Диаметр плаценты, мм	мужской	13,79 ± 0,22	12,61 ± 0,54*	12,96 ± 0,79	12,71 ± 0,33*	13,32 ± 0,76	13,66 ± 0,23
	женский	13,71 ± 0,15	12,26 ± 0,62*	12,29 ± 0,55*	12,10 ± 0,35*	13,31 ± 0,36#	13,28 ± 0,44#
Масса плаценты, г	мужской	0,51 ± 0,01	0,56 ± 0,04	0,53 ± 0,01	0,59 ± 0,02*	0,52 ± 0,01#	0,57 ± 0,02*
	женский	0,50 ± 0,01	0,54 ± 0,03	0,55 ± 0,01*	0,57 ± 0,02*	0,51 ± 0,01#	0,56 ± 0,02*
Плодово-плацентарный индекс	мужской	0,18 ± 0,02	0,21 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,02*	0,23 ± 0,005*	0,21 ± 0,01
	женский	0,19 ± 0,02	0,21 ± 0,01	0,23 ± 0,01*	0,24 ± 0,01*	0,23 ± 0,01*	0,22 ± 0,01*
Примечание: * – отличие от контроля значимо, $p < 0,05$ ; # – различия с группой, получавшей МГХ, значимы, $p < 0,05$ .							

также количество оссифицированных позвонков хвоста и мелких костей конечностей.

Таблица 9

Влияние ПП, МГХ и их последовательного применения на частоту отклонений в развитии внутренних органов плодов

Параметры	Группа животных					
	Контроль (n = 64)	Получавшие				
		ДФС® (n = 39)	СМС® (n = 43)	МГХ (n = 50)	МГХ + ДФС® (n = 60)	МГХ + СМС® (n = 51)
Кровоизлияния в:						
головной мозг	1 (1,6)	2 (5,1)	1 (2,3)	17 (34,0)*	0#	1 (2,0)
грудную полость	0	0	7 (16,3)	4 (8,0)	0	2 (3,9)
Полнокровие:						
предсердий	7 (10,9)	4 (10,3)	6 (14,0)	18 (36,0)*	2 (3,3) #	7 (13,7)
желудочков сердца	1 (1,6)	3 (7,7)	1 (2,3)	9 (18,0)	2 (3,3)	7 (13,7)
Расширение желудочков ГМ	0	0	0	9 (18,0)*	0#	0#
Гидронефроз	1 (1,6)	3 (7,7)	5 (11,6)	14 (28,0)*	0#	5 (9,8)

Примечание: \* – отличие от контроля значимо, при  $p < 0,05$ ; # – различия с группой получавшей МГХ значимо, при  $p < 0,05$ .

– не оказывали влияния на прирост массы тела у потомства крыс в течение всего периода наблюдения, за исключением СМС®, применение которого сопровождалось достоверным его снижением ( $p < 0,05$ ).

– вызывали незначительное отставание физического (таблица 10) и сенсорно-двигательного развития (таблица 11) у детенышей в периоде раннего молочного вскармливания, в то время как в периоде появления первичных половых признаков отставание нивелировалось. В группе получавшей ДФС® до беременности физическое развитие соответствовало сенсорно-двигательному, в то время как в группах получавших СМС® сенсорно-двигательное развитие несколько отставало от физического (рисунок 4).

Представленные выше данные получены впервые и свидетельствуют о том, что ДФС® и СМС® при курсовом применении в высоких дозах оказывают сходное пролонгированное влияние [Geber, W.F. et al., 1975] на РФ самок крыс, а также физическое и сенсорно-двигательное развитие их потомства. Основным механизмом, через который реализуется действие ДФС® и СМС® на репродуктивную функцию самок, судя по всему, является влияние на гипоталамо-гипофизарную систему [Бондаренко Т.И. и др., 2010, Белых А.Е. и др. 2017].

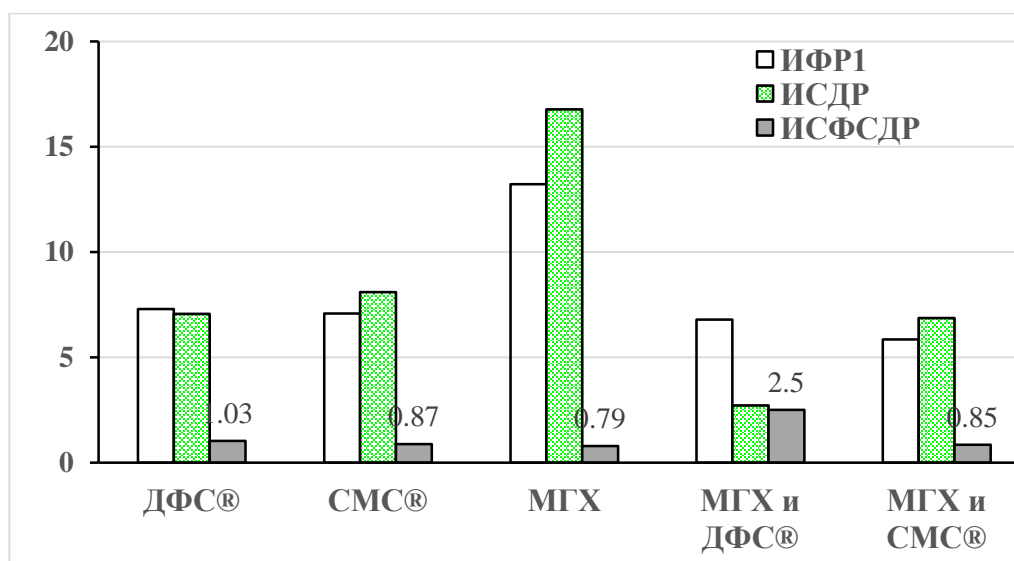


Рисунок 4 – Влияние ПП, МГХ и их последовательного применения на физическое и сенсорно-моторное развитие потомства в постнатальном периоде

Влияние пептидных препаратов, МГХ и их последовательного применения на ФР потомства белых нелинейных крыс в постнатальном периоде ( $M \pm m$ )

№ <sup>1</sup> п/п	Показатели		Группы животных					
			Контроль, (n=25)	Потомство самок получавших				
				ДФС®, (n=51)	СМС®, (n=67)	МГХ, (n=31)	МГХ и ДФС®, (n=34)	МГХ и СМС®, (n=39)
1	Число детенышей в помете	ед	10,88 ± 0,48	10,00 ± 0,95	13,40 ± 0,93	5,78 ± 0,62*	8,50 ± 1,71	9,75 ± 0,85?
		% от контроля	–	91,91	123,16	53,13	78,13	89,61
2	Отлипание ушной раковины	сутки	2,12 ± 0,07	2,57 ± 0,07	2,69 ± 0,06	4,03 ± 0,14*	2,74 ± 0,08?	2,93 ± 0,07?
		Отставание в ФР, сутки	–	0,45	0,57	1,91	0,62	0,87
3	Первичный покров	сутки	4,28 ± 0,11	4,80 ± 0,06	4,90 ± 0,04	5,74 ± 0,09*	4,91 ± 0,05?	4,88 ± 0,12?
		Отставание в ФР, сутки	–	0,52	0,62	1,46	0,63	0,6
4	Прорезывание резцов	сутки	8,32 ± 0,10	9,38 ± 0,12	9,88 ± 0,05	10,06 ± 0,24*	9,47 ± 0,11	8,63 ± 0,28?
		Отставание в ФР, сутки	–	1,06	1,56	1,74	1,15	0,31
5	Открытие глаз	сутки	13,84 ± 0,47	15,84 ± 0,15	15,00 ± 0,11	16,06 ± 0,27*	15,21 ± 0,42?	15,29 ± 0,46?
		Отставание в ФР, сутки	–	2,00	1,16	2,22	1,37	1,45
Со/оСФР <sub>1</sub> , сутки				1,01	0,98	1,83	0,94	0,81
ИФР <sub>1</sub> , %				7,30	7,08	13,22	6,79	5,85
6	Опускание семенников	сутки	24,04 ± 0,30	23,65 ± 0,19	23,22 ± 0,26	29,35 ± 0,36*	24,13 ± 0,26?	22,25 ± 1,03?
		Отставание в ФР, сутки	–	– 0,39	– 0,82	5,31	0,09	– 1,79
7	Открытие влагалища (ОВ)	сутки	35,44 ± 0,41	35,56 ± 0,50	36,84 ± 0,47	39,36 ± 0,25*	34,16 ± 0,68?	29,32 ± 1,67*,?
		Отставание в ФР, сутки	–	0,12	1,40	3,92	– 1,28	– 6,12
Со/оСФР <sub>2</sub> , сутки			–	– 0,14	0,29	4,62	– 1,19	– 3,96
ИФР <sub>2</sub> , %			–	– 0,38	0,82	13,02	– 3,36	– 11,16
Примечание: <sup>1</sup> – номер признака (n) по порядку для расчета Со/оСФР в соответствии с формулой 3; * – отличие от контроля значимо, p < 0,05; ? – отличие от группы, получавшей МГХ, значимо, p < 0,05.								

Влияние ПП, МГХ и последовательного их применения на скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов у потомства белых нелинейных крыс в постнатальном периоде ( $M \pm m$ )

№ <sup>1</sup> п/п	Показатели		Группы животных					
			Контроль, (n=31)	Потомство самок получавших				
				ДФС®, (n=51)	СМС®, (n=67)	МГХ, (n=32)	МГХ и ДФС®, (n=34)	МГХ и СМС®, (n=39)
1	Переворачивание на плоскости	сутки	4,38 ± 0,09	4,41 ± 0,11	4,33 ± 0,11	6,06 ± 0,18*	4,50 ± 0,17?	5,49 ± 0,25
		Отставание в СДР, сутки	–	0,03	- 0,05	1,68	0,12	1,11
2	Отрицательный геотаксис	сутки	6,44 ± 0,20	7,41 ± 0,14	8,25 ± 0,12	8,91 ± 0,16*	6,91 ± 0,19?	7,62 ± 0,33
		Отставание в СДР, сутки	–	0,97	1,81	2,47	0,47	1,18
3	Избегание обрыва	сутки	7,25 ± 0,16	7,69 ± 0,12	8,30 ± 0,11	9,97 ± 0,29	7,88 ± 0,17?	8,10 ± 0,07
		Отставание в СДР, сутки	–	0,44	1,05	2,72	0,63	0,85
4	Поднимание головы и передних лап	сутки	8,84 ± 0,28	10,75 ± 0,28	10,58 ± 0,07	10,22 ± 0,12*	9,00 ± 0,21?	9,59 ± 0,34
		Отставание в СДР, сутки	–	1,91	1,74	1,38	0,16	0,75
5	Ползание	сутки	10,06 ± 0,04	12,20 ± 0,34	11,87 ± 0,33	12,88 ± 0,43*	10,85 ± 0,39	10,95 ± 0,36
		Отставание в СДР, сутки	–	2,14	1,81	2,82	0,79	0,89
6	Опора на задние конечности, подъем всего тела	сутки	13,94 ± 0,12	14,65 ± 0,15	15,22 ± 0,15	17,28 ± 0,38*	13,97 ± 0,37?	15,49 ± 0,20
		Отставание в СДР, сутки	–	0,71	1,28	3,34	0,03	1,55
7	Избегание обрыва, вызванное визуальным стимулом	сутки	14,66 ± 0,15	15,81 ± 0,10	15,33 ± 0,07	17,47 ± 0,34*	15,26 ± 0,08?	15,38 ± 0,18?
		Отставание в СДР, сутки	–	1,15	0,67	2,81	0,6	0,72
Со/оСДР, сутки		–	1,04	1,19	2,46	0,40	1,01	
ИСДР, %		–	7,06	8,10	16,78	2,72	6,87	
Примечание: <sup>1</sup> – номер признака (n) по порядку для расчета Со/оСДР в соответствии с формулой 4; * – отличие от контроля значимо, p < 0,05; ? – отличие от группы, получавшей МГХ, значимо, p < 0,05.								

При решении четвертой задачи было установлено, что длительное применение МГХ приводило к серьезным нарушениям репродуктивной функции самок крыс, а также физического и сенсорно-двигательного развития их потомства, что проявлялось:

- существенным изменением длительности и структуры ЭЦ: увеличением его общей продолжительности ( $p < 0,05$ ) в 2,34 раза и межтечкового периода в 3,86 раза, а также уменьшением длительности течкового [Packman P.M. et al., 1976, Pang, C.N. et al., 1977]; снижением ( $p < 0,05$ ) концентрации в сыворотке крови ЛГ и ФСГ в 2,48 и 2,70 раза при неизменной концентрации прогестерона [Daniell H.W., 2008, Colameco S. et al., 2009, Katz N. et al., 2009, Marwa, A.A. et al., 2014] (таблица 7);

- снижением ( $p < 0,05$ ) как количества оплодотворенных, так и беременных самок, о чем свидетельствовало уменьшение индексов фертильности и беременности на 20 и 40%, соответственно (рисунок 3);

- серьезными нарушениями РФ, что проявлялось снижением ( $p < 0,05$ ) количества мест имплантации в 1,53 и живых плодов в 1,57 раза, и, как следствие этого, увеличением индексов пред- и постимплантационной гибели в 3,9 и 1,8 раза (таблица 8);

- снижением всех изучавшихся показателей ФР плодов, причем если для количества и ККР эти изменения были достоверными ( $p < 0,05$ ), то для массы носили характер тенденции и сочетались со снижением в 1,2 раза ( $p < 0,05$ ) прироста массы тела на последней неделе беременности, а также к достоверным ( $p < 0,05$ ) изменениям плаценты – уменьшению диаметра и увеличению массы (таблица 8);

- уменьшением ( $p < 0,05$ ) морфометрических показателей эмбрионов, таких как длина тела и окружность грудной клетки. В соответствии с индексами физического развития плоды были гармонично развитыми, однако имели астеническое телосложение;

- статистически значимым ( $p < 0,05$ ) аномалиям внутренних органов плодов крыс: кровоизлиянием в головной мозг в 34,0%; расширением желудочков головного мозга в 18,0%; гидронефрозом в 28,0% (таблица 9);

- значимым ( $p < 0,05$ ) уменьшением длины зачатков костей, количества точек окостенения мелких костей дистальных отделов передних и задних конечностей, а также позвонков хвоста у эмбрионов;

- существенной ( $p < 0,05$ ) задержкой ФР, как в периоде раннего молочного вскармливания ( $Co/oCФP_1$  – 1,83 сутки;  $ИФP_1$  – 13,22%), так и появления первичных половых признаков ( $Co/oCФP_2$  – 4,62 сутки;  $ИФP_2$  – 13,02%), сочетавшейся с достоверным снижением массы тела потомства в течение всего периода наблюдения (таблица 10);

- увеличением ( $p < 0,05$ ) сроков появления всех изучавшихся признаков сенсорно-двигательного развития ( $Co/oCCDP$  – 2,46 сутки,  $ИССР$  – 16,78%), при этом СДР отставало от физического (таблица 11, рисунок 4).

Подводя итоги, следует заключить, что длительное применение МГХ вызывает серьезные нарушения РФ у самок крыс, сохраняющиеся даже после его отмены, а также задержку физического и сенсорно-двигательного развития их потомства. В соответствии с представленными выше данными МГХ обладает выраженным гонадотропным и эмбриотоксическим действием, в основе которого лежат нарушения в гипоталамо–гипофизарно–гонадной оси, вызванные угнетающим действием ксенобиотика на гипоталамические нервные пути, контролирующие секрецию релизинг–гормонов и гонадотропинов [Ching M., 1983, Howlett, T.A., 1986].

При изучении влияния ПП на нарушения репродуктивной функции самок крыс, вызванные длительным введением МГХ, а также физического и сенсорно-моторного развития их потомства было установлено, что применение ПП после МГХ:

- оказывало существенное влияние на поведение животных и не отличалось от групп, которым вводили только ДФС® или СМС®;

- приводило к нормализации структуры и длительности ЭЦ (рисунок 2), а также концентрации ЛГ, ФСГ и прогестерона в сыворотке крови у самок крыс, нарушенных МГХ (таблица 8);

- восстанавливало темпы прироста массы тела у беременных самок по сравнению с животными, получавшими только МГХ ( $p < 0,05$ );

– нивелировало вызванные МГХ нарушения плодovitости у крыс увеличивая ( $p < 0,05$ ) количество оплодотворенных и беременных самок, в сравнении с группой, получавшей только МГХ (рисунок 2);

– приводило к восстановлению таких показателей РФ, как количество мест имплантации и живых плодов, а для ДФС® и имплантационной гибели до контрольных величин, в то время как для СМС® последняя была выше, как за счет пред-, так и постимплантационной составляющей, но ниже, чем в группе, получавшей только МГХ ( $p < 0,05$ ) (таблица 8);

– характеризовалось нормальным количеством плодов в помете, однако их масса и ККР были ниже, чем у животных контрольной группы. В то время как параметры плаценты при использовании ДФС® были сравнимы с показателями контрольной группы, при СМС® – выше, чем в контроле ( $p < 0,05$ ) (таблица 8);

– характеризовалось отсутствием аномалий развития при использовании ДФС® и снижением количества при использовании СМС® (таблица 9). Не предотвращали нарушения формирования скелета у плодов, вызванные трансгенерационно МГХ, и процессов оссификации, за исключением СМС®;

– сопровождалось разнонаправленными изменениями, характеризующими ФР потомства. Так, при использовании ДФС® наблюдался, как менее выраженный дефицит массы тела  $-8,59 \dots -4,05\%$ , который на 21-е сутки сменялся его избытком  $+2,29\%$ , так и степень отставание в ФР в периоде раннего молочного вскармливания ( $Co/oCFP_1$ , 0,94 суток,  $IFP_1$  6,79%). В то время как в периоде появления первичных половых признаков наблюдалась тенденция к опережению ФР ( $Co/oCFP_2$ ,  $-1,19$  суток,  $IFP_2$   $-3,36\%$ ) (таблица 10). В свою очередь у потомства самок получавших СМС® в течение всего периода отмечался избыток массы тела  $+1,46 \dots +20,8\%$  (наиболее выраженный на 4-е сутки) который сочетался с наименее выраженным отставанием в темпах ФР в периоде раннего молочного вскармливания ( $Co/oCFP_1$ , 0,81 суток,  $IFP_1$  5,85%) и его существенным опережением в периоде появления первичных половых признаков ( $Co/oCFP_2$ ,  $-3,96$  суток,  $IFP_2$   $-11,16\%$ );

– предотвращало отставание в темпах СМР у потомства самок, причем для ДФС® достоверно ( $p < 0,05$ ) ( $Co/oCDP$  – 0,40 суток,  $ISDP$  – 2,72%) (таблица 11). При оценке гармоничности развития потомства в постнатальном периоде было установлено, что в группе, получавшей СМС®, ФР соответствовало сенсорно-моторному, а в группе с ДФС® СДР опережало физическое (рисунок 4);

– оказывало существенное влияние на структуру поведения их потомства. Так при использовании ДФС® наблюдалось улучшение пространственной ориентации и краткосрочной памяти, снижение уровня тревожности и повышение эффективности исследовательской деятельности в сравнении с потомством животных, получавших до беременности МГХ. Применение СМС® сопровождалось уменьшением уровня тревожности у потомства и стимуляцией исследовательской активности в сравнении с группой, получавшей только МГХ, однако указанные выше изменения являлись лишь тенденциями и не носили достоверного характера.

Подводя итоги применению ПП после длительного предшествовавшего введения МГХ можно говорить о том, что ДФС® и СМС® способны полностью или частично устранять нарушения РФ у самок, а также предупреждать нарушения физического и сенсорно-моторного развития у их потомства.

Учитывая механизмы формирования нарушений репродуктивной функции у самок, физического и сенсорно-двигательного развития у их потомства, при длительном применении МГХ, а также результаты, полученные при изучении влияния ДФС® и СМС® на указанные выше показатели, можно говорить о том, что изучавшиеся нами пептидные препараты, оказывают непосредственное влияние на нейро-эндокринную систему и могут быть отнесены к средствам этиопатогенетической терапии нарушений репродуктивной функции, вызванных длительным применением ОНА.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важной задачей проведения доклинических исследований эффективности лекарственных препаратов является разработка адекватной модели экспериментальной патологии. В качестве классического биообъекта для моделирования изучаемых нарушений в экспериментальной токсикологии и фармакологии являются крысы, что обусловлено схожестью с человеком анатомического строения репродуктивных органов, плаценты, а также процессов гормональной регуляции функции воспроизводства потомства.

При разработке адекватной модели патологии репродуктивной системы, вызванной длительным применением ОНА, необходимо было воспроизвести максимально выраженные репродуктивные расстройства при минимальных нарушениях со стороны внутренних органов и систем. Такое требование к модели диктовалось тем обстоятельством, что при слабо выраженных расстройствах сложнее выявить причину возникающих нарушений, в связи с большой эластичностью компенсаторных реакций нейро-эндокринной системы. Моделью, соответствующей предъявляемым требованиям, по результатам проведенных исследований являлось длительное 3-х месячное введение МГХ неполовозрелым животным в 10,0 ЭТД.

В доступной литературе не удалось найти сведения о влиянии изучаемых ПП на РФ интактных животных, что послужило причиной проведения соответствующего исследования, результаты которого в дальнейшем были использованы в качестве отрицательного контроля. В процессе исследований было установлено, что 2-х недельное введение ПП, содержащих ДСИП или 4–10АКТГ, в выбранных дозах интактным животным не оказывало существенного влияния на РФ самок, а также развитие их потомства в постнатальном периоде.

Изменения, обнаруженные при выполнении первого этапа исследования на животных, получавших МГХ с месячного возраста, подтвердились при выполнении второго этапа и свидетельствовали, как о хорошей воспроизводимости результатов моделирования патологии репродуктивной системы самок и постнатального развития потомства, так и о соответствии экспериментальной модели заданным требованиям.

После 3-х-месячного введения МГХ в 10,0 ЭТД самкам до беременности были зарегистрированы значимые ( $p < 0,05$ ) нарушения ЭЦ, концентрации половых гормонов в сыворотке крови, плодовитости, репродуктивных показателей, циркуляторно-метаболического равновесия в фетоплацентарной системе, аномалии развития и формирования скелета у плодов, а также нарушения физического и сенсорно-двигательного развития потомства.

Применение ПП, содержащих ДСИП или 4–10АКТГ, после длительного предшествовавшего введения МГХ приводило к нормализации структуры ЭЦ и концентрации половых гормонов в сыворотке крови, нивелировало нарушения плодовитости, изменения репродуктивных показателей и аномалий развития эмбрионов, а также улучшало показатели физического и сенсорно-двигательного развития потомства.

В рамках исследования нами была экспериментально апробирована система комплексной оценки физического и сенсорно-двигательного развития потомства в постнатальном периоде, основанная на принятой в настоящее время в неонатологии системе оценки развития детей первого года жизни, включающая в себя определение дефицита /избытка массы тела, отставания/опережения физического и нервно-психического развития.

При изучении указанных выше показателей в качестве отправной точки для оценки конкретного ребенка, как правило, используются средние показатели по популяции. Однако подобное сравнение, как правило, не позволяет определить влияние конкретного фактора на изменение соответствующих показателей. Это обусловлено, с одной стороны, отсутствием связанной выборки, а с другой, с тем, что подобные сравнения носят в большей степени индивидуальный характер по причине того, что у людей достаточно редко одновременно рождается более одного ребенка.

В свою очередь, учитывая то обстоятельство, что моделирование позволяет создавать однофакторные модели, а в помете мелких лабораторных животных насчитывается до десятка sibсов и более, возникают предпосылки объективизации указанных показателей с



помощью статистических методов анализа, что позволяет наполнить указанные выше термины новым содержанием. На основании вышеизложенного нами были разработаны индексы и коэффициенты, позволяющие не только давать количественную оценку изменениям массы тела, степени физического и сенсорно-двигательного развития в опытных группах по сравнению с контрольными и между собой, но и определять соответствие одних видов развития другим при воздействии различных факторов, т.е. делать заключение о гармоничности развития потомства в целом. Использование подобного подхода существенно упрощает экстраполяцию полученных результатов с животных на человека.

Подводя итог проведенным исследованиям, с учетом механизмов формирования нарушений РФ у самок, физического и сенсорно-моторного развития у их потомства при длительном применении МГХ, а также результатов, полученных при изучении влияния ДФС® и СМС® на указанные выше показатели, можно заключить, что изучавшиеся нами ПП оказывают непосредственное влияние на нейро-эндокринную систему и могут быть отнесены к средствам этиопатогенетической терапии нарушений РФ, вызванных длительным применением ОНА.

### ВЫВОДЫ

1. 3-х месячное введение МГХ в 1,0 и 10,0ЭТД не оказывало существенного влияния на общее состояние самок крыс различных возрастных групп. Наиболее выраженными были изменения в группе животных, получавшей МГХ с месячного возраста в максимальной дозе, со стороны показателей характеризующих функцию печени и почек, однако они были не значительными и свидетельствовали о развитии у животных начальной стадии гепаторенальной дисфункции.

2. Наиболее выраженные нарушения репродуктивной функции самок после 3-х месячного введения МГХ в 10,0ЭТД были выявлены в группе получавшей ксенобиотики с месячного возраста. Так, в этой группе были зарегистрированы достоверные ( $p < 0,05$ ) нарушения плодовитости, репродуктивных показателей, циркуляторно-метаболического равновесия в фетоплацентарной системе, а также формирования скелета у плодов. По степени выраженности нарушений репродуктивной функции самок получавших МГХ до беременности можно расположить в следующей последовательности: месячные > 2-х месячные > 3-х месячные.

3. Наиболее выраженные нарушения развития в постнатальном периоде, наблюдались у потомства материнские особи которого получали МГХ с месячного возраста, о чем свидетельствовал достоверный ( $p < 0,05$ ) дефицит массы, а также задержка физического и сенсорно-моторного развития потомства. По степени отставания в физическом и сенсорно-моторном развитии потомство можно расположить в следующей последовательности: месячные > 2-х месячные > 3-х месячные.

4. 2-х недельное введение ПП, содержащих ДСИП и 4–10АКТГ, в выбранных дозах оказывало влияние на репродуктивную функцию самок, что проявлялось значимым ( $p < 0,05$ ) уменьшением плодовитости, постимплантационной гибелью для ДФС®, снижением темпов прироста массы тела беременных самок, а также массы тела и кранеокаудального размера плодов, плацентарной недостаточностью, уменьшением длины закладок костей передних и задних конечностей, а также количеством оссифицированных позвонков хвоста и мелких костей конечностей.

5. 2-х недельное введение ПП, содержащих ДСИП и 4–10АКТГ, в выбранных дозах оказывало влияние на потомство: снижало прирост массы тела при использовании СМС®, вызывало незначительное отставание физического и сенсорно-моторного развития у детенышей в периоде раннего молочного вскармливания.

6. Применение ПП, содержащих ДСИП и 4–10АКТГ, после длительного предшествовавшего введения МГХ оказывало положительное влияние на репродуктивную функцию самок крыс. Так, применение ДФС® и СМС® приводило к нормализации структуры эстрального цикла и концентрации половых гормонов в сыворотке крови, нивелировало нарушения плодовитости и изменения показателей РФ (количество мест имплантации, живых плодов и имплантационной гибели), характеризовалось нормальным количеством плодов в помете (с меньшей массой и ККР) и уменьшением количества

аномалий развития эмбрионов, однако, не предотвращало нарушения формирования скелета у плодов.

7. Введение ПП, содержащих ДСИП и 4–10АКТГ, самкам крыс до беременности после длительного предшествовавшего применения МГХ улучшало показатели физического и сенсорно-моторного развития их потомства. Так, применение ДФС® и СМС® приводило к менее выраженному отставанию в ФР в периоде раннего молочного вскармливания, сменявшегося его существенным опережением в периоде появления первичных половых признаков, предотвращало отставание в темпах СДР у потомства.

### ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Разработанную модель целесообразно использовать при проведении доклинических исследований по оценке эффективности средств терапии нарушений женской репродуктивной системы, вызванных длительным приемом наркотических анальгетиков, а также нейроэндокринных механизмов действия пептидных препаратов.

2. После проведения необходимых клинических испытаний препараты Дельтафинокс® и Семакс® могут быть рекомендованы в качестве средств этиопатогенетической терапии нарушений репродуктивной функции у женщин, вызванных длительным приемом наркотических анальгетиков.

3. Показано, что ПП, содержащие ДСИП и 4–10АКТГ, вызывают нарушения репродуктивной функции и должны с осторожностью применяться в периоде планирования беременности у женщин.

4. Предложенная система оценки физического и сенсорно-моторного развития потомства может быть использована, как при проведении доклинических исследований репродуктивной токсичности новых лекарственных средств, так и при оценке влияния различных факторов окружающей среды на РФ родительских особей.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. **Белякова, Н.А.** Репродуктивная токсичность морфина / Н.А. Белякова, Е.Ю. Бонитенко, А.В. Носов [и др.] // Российский биомедицинский журнал Medline.ru.– 2017.– Т.18, Ст.27. – С.395–408.

2. **Белякова, Н.А.** Влияние нейропептидов на нарушения эстрального цикла у крыс, вызванные морфином / Н.А. Белякова, Е.Ю. Бонитенко, А.В. Носов // Токсикологический вестник. – 2019. – №5. – С.33–38.

3. **Белякова, Н.А.** Влияние нейропептидов на репродуктивную функцию самок неинбредных крыс / Н.А. Белякова, Е.Ю. Бонитенко, А.В. Носов [и др.] // // Российский биомедицинский журнал Medline.ru.– 2019.– Т.20, Ст.1. – С.1–16.

4. **Белякова, Н.А.** Коррекция пептидными препаратами нарушений репродуктивной функции самок крыс, вызванных длительным применением морфина / Н.А. Белякова, Е.Ю. Бонитенко, А.В. Носов, К.Е. Бонитенко // Российский биомедицинский журнал Medline.ru.– 2019.– Т.20, Ст.9. – С.81–93.

5. **Белякова, Н.А.** Влияние пептидных препаратов на сенсорно-двигательное развитие потомства самок неинбредных крыс / Н.А. Белякова, Е.Ю. Бонитенко, А.В. Носов // Российский биомедицинский журнал Medline.ru.– 2020.– Т.21, Ст.9. – С.100–106.

6. **Белякова, Н.А.** Развитие потомства, новые подходы к оценке в экспериментальной биологии и медицине / Н.А. Белякова, Е.Ю. Бонитенко, А.В. Носов // Российский биомедицинский журнал Medline.ru.– 2020.– Т.21, Ст.87. – С.1115–1133.

7. **Белякова, Н.А.** Влияние нейропептидов, содержащих фрагменты 4–10 адренкортикотропного гормона и дельта-сон индуцирующий пептид, на развитие потомства в постнатальном периоде / Н.А. Белякова, Е.Ю. Бонитенко, Д.С. Лисицкий, Л.В. Горбунова // Российский биомедицинский журнал Medline.ru.– 2020. – Т.21, Ст.93. – С.1196–1209.

8. **Белякова, Н.А.** Влияние длительного применения морфина гидрохлорида и последующего введения нейропептидов материнским особям до беременности, на развитие потомства в постнатальном периоде / Н.А. Белякова, Е.Ю. Бонитенко, А.В. Носов [и др.] // Российский биомедицинский журнал Medline.ru.– 2021. – Т.22, Ст.1. – С.1–20.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

4–10АКТГ	– фрагмент 4–10 адренотропного гормона
в/ж	– внутривенно
ДСИП	– дельта-сон индуцирующий пептид
ДФС®	– Дельтафирокс®
и/н	– интраназально
Ид/иМТ	– индекс дефицита/избытка массы тела
ИСДР	– индекс сенсорно-двигательного развития
ИСФСДР	– индекс соответствия физического и сенсорно-двигательного развития
ИФР	– индекс физического развития
ККР	– краниокаудальный размер
КП	– коэффициент пересчета
ЛГ	– лютеинизирующий гормон
ЛД <sub>50</sub>	– доза, вызывающая гибель 50% животных
МГХ	– морфин гидрохлорид
ОНА	– опиатные наркотические анальгетики
РФ	– репродуктивная функция
СДР	– сенсорно-двигательное развитие
СМС®	– Семакс®
Со/оССДР	– среднее отставание/опережение сенсорно-двигательного развития
Со/оСФР	– среднее отставание/опережение физического развития
ТИ	– терапевтический индекс
ФР	– физическое развитие
ФСГ	– фолликулостимулирующий гормон
ЭТД	– эквивалентная терапевтическая доза
10,0ЭТД	– десятикратная эквивалентная терапевтическая доза
ЭЦ	– эстральный цикл