

РЕПРОДУКТИВНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ МОРФИНА

¹Белякова Н.А., ³Бонитенко Е.Ю., ¹Носов А.В., ⁴Фахардо А.Ф., ²Котельникова И.Г.

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

²Федеральное государственное унитарное предприятие
«Московский эндокринный завод»

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова»

⁴Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего
образования «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет
информационных технологий, механики и оптики»

192019, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д.1
Телефон/факс: (812) 365-06-80
e-mail: institute@toxicology.ru

Резюме. В экспериментах на самках белых беспородных крыс, находящихся в разных периодах онтогенеза проведена оценка репродуктивной токсичности препарата «Морфин гидрохлорид, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг и 10 мг». Выявлены эмбрио- и фетотоксические эффекты исследуемого препарата, нарушение способности к зачатию и вынашиванию плода у самок крыс, наиболее ярко выраженные у животных, получавших препарат, начиная с препубертатного периода онтогенеза.

Ключевые слова. Морфин гидрохлорид, репродуктивная токсичность, фетотоксичность, доклинические исследования, безопасность.

REPRODUCTIVE TOXICITY OF MORPHINE

¹Belyakova N.A., ³Bonitenko E.Y., ¹Nosov A.V., ⁴Fakhardo A.F., ²Kotelnikova I.G.

1 Federal State Budgetary Institution of Science

"Institute of Toxicology of the Federal Medical and Biological Agency"

2Federal State Unitary Enterprise

"Moscow Endocrine Plant"

3Federal State Budget Scientific Institution

"Scientific Research Institute of Occupational Health. Academician N.F. Izmerov »

4Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "St. Petersburg National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics"

Summary. The reproductive toxicity of the medication "Morphine hydrochloride, tablet, film-coated, 5 mg and 10 mg" was investigated in experiments on different ontogenesis periods white rats females. The test medication embryotoxic and fetotoxic effects were revealed, the malfunction of fertility and gestation in female rats, the most manifested in animals treated with the drug, starting from the prepubertal period of ontogenesis.

Ключевые слова. Морфин гидрохлорид, репродуктивная токсичность, фетотоксичность, доклинические исследования, безопасность.

Keywords. Morphine hydrochloride, reproductive toxicity, fetotoxicity, preclinical studies, safety.

Введение. Важным направлением лекарственной токсикологии является выявление неблагоприятных эффектов фармакологических средств на репродуктивную функцию. Репродуктивная функция представляет собой совокупность сложноорганизованных последовательно протекающих физиологических процессов в организмах отца, матери и плода. Лекарственные препараты способны оказывать патогенное воздействие в любом звене и на любом этапе реализации репродуктивной функции. В свою очередь, сложность процессов, лежащих в основе репродукции, делает ее уязвимой для лекарств. Нарушение функции воспроизводства потомства вследствие токсического действия ксенобиотиков, в том числе лекарств, на организм одного из родителей может проявляться по прошествии многих месяцев дефектами зачатия, вынашивания, развития плода и инвалидизацией растущего организма [1].

Настоящее исследование было выполнено в рамках доклинического (предрегистрационного) изучения безопасности препаратов «Морфин гидрохлорид, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг и 10 мг» (далее – препараты), разработанных Федеральным государственным унитарным предприятием «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. С учетом того, что препараты предназначены для неинвазивной терапии, их внедрение позволит не только расширить возможности оказания паллиативной медицинской помощи в амбулаторных условиях (в том числе и на дому) у пациентов с хроническим болевым синдромом в терминальной стадии онкологических заболеваний, но и значительно повысит их качество жизни.

Цель исследования: Изучить в антенатальном периоде развития эмбрио- и фетотоксическое действие препаратов «Морфин гидрохлорид, таблетки, покрытые

пленочной оболочкой, 5 мг и 10 мг» для перорального приема при их хроническом внутрижелудочном введении подопытным самкам крыс различных возрастных групп.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на белых нелинейных самках крыс, находящихся в различных периодах онтогенеза: одно, двух и трехмесячных, средней массой 50, 140 и 210 г соответственно. Перед проведением исследования животные карантинировались в течение 14 дней. Во время карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние) и дважды в день животных наблюдали в клетках (заболеваемость и смертность). Весь экспериментальный период животных содержали на стандартном рационе. Наблюдение и оценку состояния животных проводили ежедневно (осмотр, регистрация среднего потребления воды и пищи), один раз в неделю взвешивали. Клетки с животными были помещены в отдельную комнату. Световой режим: 12 час – свет, 12 час – темнота. Температура воздуха поддерживалась в пределах 20 – 22 °С, относительная влажность – 60 – 70%. Был установлен режим проветривания, обеспечивающий циркуляцию воздуха около 15 объемов помещения в час, концентрацию CO₂ < 0,15 объемных %, аммиака < 0,001 мг/л.

Животных распределяли по группам, используя при рандомизации в качестве основного критерия массу тела (отклонение значений массы тела в пределах группы не более 10%). Каждая экспериментальная группа состояла из 10 животных.

Исследуемые препараты вводили внутривентрикулярно в течение 3-х месяцев в дозах в соответствии с коэффициентом пересчета, определяемым в зависимости от возраста животных. Так, месячным самкам препарат вводился в дозе 60, двухмесячным – 72 и трехмесячным – 50 мг/кг соответственно. Животным контрольных групп вводили через зонд внутривентрикулярно воду для инъекций в эквивалентном объеме.

Характеристика групп животных и вводимых препаратов представлена в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика групп животных и вводимых препаратов

Номер группы	Животные		Препарат		
	Количество	Возраст начала введения (мес)	Название	Доза (мг/кг)	Длительность введения (день)
1	10	1	вода для инъекций	60	90
2	10	1	препарат 5 мг	60	90
3	10	2	вода для инъекций	72	90
4	10	2	препарат 10 мг	72	90
5	10	3	вода для инъекций	50	90
6	10	3	препарат 10 мг	50	90

Через 24 часа после заключительного введения препарата (воды для инъекций) самок подсаживали к соответствующей группе интактных самцов сроком на 10 дней (2 эстральных

цикла). На 20 день беременности самок подвергали эвтаназии ингаляцией CO₂. После чего самок вскрывали, подсчитывали количество желтых тел, мест имплантации, количество живых и погибших плодов. Макроскопически оценивали состояние внутренних органов и скелета эмбрионов, а также регистрировали все случаи пре- и постимплантационной гибели.

Массу эмбрионов и выявленные аномалии развития органов и тканей фиксировали в протоколе вскрытия. После чего половину эмбрионов помещали в раствор Буэна для фиксации и последующего морфометрического исследования по методу Вильсона [2] в модификации А.П. Дыбана (1970) [3, 4]. Остальные эмбрионы фиксировали в 96° этиловом спирте, обрабатывали 1% раствором КОН и промывали водой, после чего окрашивали ализарином и обезжизивали в смеси глицерина с 96° этанолом для оценки состояния скелета по методике Доусона [5].

Индекс фертильности (ИФ) рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{ИФ} = \frac{\text{Число оплодотворенных самок}}{\text{Число самок, подсаженных к самцам}} \times 100\% \quad (1)$$

Индекс беременности (ИБ) рассчитывали по следующей формуле:

$$\text{ИБ} = \frac{\text{Число беременных самок}}{\text{Число оплодотворенных самок}} \times 100\%. \quad (2)$$

Индекс предимплантационной гибели (ИПредИГ) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИПредИГ} = \frac{\text{Кол-во желтых тел} - \text{Кол-во мест имплантации}}{\text{Кол-во желтых тел}} \times 100\%. \quad (3)$$

Индекс постимплантационной гибели (ИПостИГ) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИПостИГ} = \frac{\text{Кол-во мест имплантации} - \text{Кол-во живых плодов}}{\text{Кол-во мест имплантации}} \times 100\%. \quad (4)$$

За единицу наблюдения при статистической обработке полученных результатов принимали одну самку или один помет. Статистическая обработка результатов производилась с использованием критерия t Стьюдента (для параметров, распределение которых соответствовало нормальному) и критериев Уилкоксона и Манна-Уитни.

Результаты и их обсуждение

В ходе трехмесячного хронического введения препаратов были отмечены следующие особенности поведения и клинической картины у экспериментальных животных. У животных всех экспериментальных групп к исходу первого месяца эксперимента через 15 – 20 минут после введения препарата наблюдалось: возбуждение, сопровождающееся повышенной двигательной активностью, сохраняющейся в течение часа; отмечен повышенный аппетит (суточная норма корма потреблялась в течение 10 – 15 минут). По истечении двух месяцев от начала исследования у самок всех возрастов, получавших препараты, отмечено снижение двигательной активности после его введения, заторможенность, «сонливость», снижение реакции на внешние раздражители. Вышеописанные изменения в клинической картине и поведении подопытных животных сохранялись до конца эксперимента.

Во всех экспериментальных группах животных, получавших препараты на протяжении трех месяцев до наступления беременности, выявлено достоверное снижение темпов прироста массы тела на третьей неделе беременности (таблица 2).

Таблица 2

Влияние хронического введения препарата Морфин на динамику массы тела беременных крыс

Номер группы	Прирост массы тела беременных самок (%)		
	1-я неделя	2-я неделя	3-я неделя
1	7,26±0,58	11,04±1,25	26,90±1,88
2	13,79±1,16*	7,67±1,01	20,25±2,37*
3	7,60±0,90	14,75±0,88	20,23±1,30
4	9,77±2,50	11,92±1,71	10,79±3,53*
5	12,21±0,85	12,30±0,82	26,28±1,98
6	9,73±1,72	14,22±2,29	17,21±1,68*
Примечание – * – отличия от контроля достоверно, при p<0,05			

При изучении влияния хронического приема препаратов на плодовитость крыс было установлено, что индекс фертильности был снижен на 20 и 8,3% в группах, получавших препараты с месячного и двухмесячного возраста соответственно. В свою очередь индекс беременности был снижен во всех группах животных получавших препараты. Причем обращало на себя внимание наличие зависимости – чем младше был возраст самок при начале приема исследуемых препаратов, тем ниже был и индекс беременности (таблица 3).

Таблица 3

Влияние хронического (в течение 90 дней) введения препарата Морфин
на плодовитость крыс

Показатели	Группы					
	1	2	3	4	5	6
Количество самок, посаженных с самцами	12	15	12	12	10	10
Количество оплодотворенных самок	12	12	12	11	10	10
Количество беременных самок	12	6	12	9	10	9
Индекс фертильности, %	100,0	80,0	100,0	91,7	100,0	100,0
Индекс беременности, %	100,0	50,0	100,0	81,8	100,0	90,0

Результаты влияния препаратов на репродуктивные показатели крыс самок, представлены в таблицах 4 и 5. Как видно из представленных данных препараты не оказывали статистически значимого влияния на продолжительность беременности и количество желтых тел во всех экспериментальных группах. Однако было зарегистрировано достоверное снижение количества мест имплантации и живых эмбрионов в группах, получавших препараты с месячного и двухмесячного возраста (таблица 4).

Таблица 4

Влияние хронического (в течение 90 дней) введения препарата Морфин
на репродуктивные показатели белых нелинейных крыс

Показатели	Группы					
	1	2	3	4	5	6
Количество желтых тел, (M ± m)	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, (M ± m)	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, (M ± m)	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, (M ± m)	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

Примечание – * – отличия от контроля достоверно, при p<0,05

Индексы пред- и постимплантационной гибели были превышены во всех экспериментальных группах по сравнению с контрольными в 2,44 – 3,28 и 2,37 – 5,38 соответственно. Следует отметить прослеживающуюся тенденцию нарастания индекса постимплантационной и снижения индекса предимплантационной гибели в зависимости от

возраста начала приема препаратов самками. Так, индекс предимплантационной гибели значительно превышен в группе, начавшей получать препарат в месячном возрасте, по сравнению с контролем и группами получавшими препарат с двух и трехмесячного возраста. В то же время индекс постимплантационной гибели значительно превышен у самок, начавших получать препарат в половозрелом (трехмесячном) и двухмесячном возрасте по сравнению с контролем и группой, получавшей препарат с месячного возраста.

В таблице 5 представлены данные по влиянию препаратов на показатели состояния плацент и зародышей крыс. Значительного влияния исследуемых препаратов на физическое развитие плодов не было выявлено. Однако, в группе самок, получавших препарат с трехмесячного возраста независимо от пола, наблюдалась тенденция к уменьшению краниокаудальных размеров и массы плодов. Исследуемые плоды на вид были отечны; ткани бледные, околоплодные воды зеленоватые. Следует обратить внимание на достоверное снижение суммарной массы плодов помёта у самок, начавших получать препарат в неполовозрелом возрасте (месячные и двухмесячные) по сравнению с контролем. Внешний осмотр исследованных плодов, как в опытных, так и в контрольных группах, не выявил каких-либо анатомических пороков их развития.

Влияние хронического (в течение 90 дней) введения препарата Морфин на состояние плацент и плодов крыс

Показатели	Пол эмбрионов	Группа животных					
		1	2	3	4	5	6
Краниокаудальный размер, мм	муж.(38,61)	37,65±0,30	38,18±0,46	39,43±0,72	38,80±0,71	37,54±0,48	35,52±1,46
	жен.(37,69)	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	муж.(2,81)	3,87±0,13	4,05±0,07	4,01±0,18	4,24±0,17	4,08±0,15	3,99±0,05
	жен. (2,71)	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	муж.(14,38)	13,51±0,37	13,31±0,11	14,20±0,23	14,20±0,53	13,26±0,46	13,03±0,34
	жен.(14,08)	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	муж.(0,62)	0,59±0,05	0,58±0,02	0,66±0,07	0,66±0,07	0,58±0,04	0,52±0,05
	жен.(0,59)	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
Примечание – * – отличия от контроля достоверны, при p<0,05							

Результаты исследования влияния препаратов на частоту развития аномалий внутренних органов плодов крыс по методу Вильсона–Дыбана представлены в таблице 6.

Таблица 6

Влияние хронического (в течение 90 дней) введения препарата Морфин на частоту развития аномалий внутренних органов плодов крыс по методу Вильсона–Дыбана

Параметры	Контроль (по лит.[6])	Группа животных					
		1	2	3	4	5	6
Кровоизлияния в:							
– левую половину шеи	0	0	0	0	0	0	0
– щитовидную железу	0	0	0	0	0	0	0
– головной мозг	0	0	7	4	12	1	26
– грудную полость	0	0	0	0	0	0	0
– брюшную полость	1	0	0	1	1	0	0
– надпочечники	0	0	0	0	0	0	0
Полнокровие:							
– предсердий	5	0	0	0	1	0	1
– желудочков сердца	0	1	0	0	1	0	0
– сагиттальных синусов	4	0	0	0	0	0	0
– сосудов вестибулярного аппарата	0	0	0	0	0	0	0
– сосудов легких	0	0	0	0	0	0	0
– сосудов тела	4	0	1	0	0	0	0
Дефект желудочков головного мозга	0	0	0	0	0	0	0
Гидронефроз	3	0	0	2	0	0	1
Гидроуртер	1	0	0	0	0	0	0
Дистопия мочевого пузыря	0	0	0	0	0	0	0
Гидроцефалия	0	0	0	0	0	0	0
Дефект диафрагмы	0	0	0	0	0	0	0
Гипоплазия внутренних органов	0	0	0	0	0	0	0
Дефект твердого неба	0	0	0	0	0	0	0
Кол-во эмбрионов (м/ж)	12/13	12/14	13/9	18/23	11/9	23/25	25/20

При оценке по методу Вильсона–Дыбана были выявлены единичные случаи полнокровия предсердий, сосудов тела, кровоизлияний в брюшную полость, а также гидронефроза в опытных группах. Аналогичные аномалии с равной частотой имели место и в контрольных группах. Следует обратить внимание, что у эмбрионов подопытных групп, (2, 4 и 6) было выявлено достоверное увеличение количества случаев кровоизлияний в головной

мозг, превышающих контрольные значения. Других органных нарушений у эмбрионов во всех группах не наблюдалось.

Нарушений формирования скелета плодов крыс по методу Доусона ни в одной из исследуемых групп не было выявлено (таблица 7).

Таблица 7

Влияние хронического (в течение 90 дней) введения препарата Морфин на развитие скелетов эмбрионов белых нелинейных крыс

Параметры		Группа животных					
		1	2	3	4	5	6
Длина зачатков костей, мм	локтевой	3,54±0,04	3,10±0,02*	3,13±0,04	3,21±0,08	3,34±0,06	3,20±0,04
	бедренной	2,55±0,04	2,31±0,03*	2,28±0,05	2,46±0,08	2,58±0,04	2,39±0,03*
	плечевой	3,39±0,03	3,09±0,02*	3,09±0,04	3,14±0,06	3,52±0,04	3,05±0,03*
	большеберцовой	2,88±0,03	2,83±0,02	2,89±0,02	2,97±0,07	2,95±0,04	2,87±0,02
	малоберцовой	2,68±0,04	2,72±0,02	2,78±0,03	2,89±0,06	2,75±0,05	2,76±0,02
Количество точек окостенения	запястья	3,67±0,07	3,59±0,09	3,44±0,09	3,43±0,13	3,35±0,13	3,43±0,09
	стопы	3,98±0,02	4,03±0,03	4,09±0,05	4,05±0,05	4,00±0,06	4,02±0,68
Примечание — * – отличия от контроля достоверны, при $p < 0,05$							

Изменения в длинах зачатков костей и количестве точек окостенения отмечены у потомства самок, начавших получать препарат в месячном возрасте и в трехмесячном возрасте (группа 2 и 6). В обеих подопытных группах наблюдалось достоверное уменьшение длин зачатков локтевой, бедренной и плечевой костей. В остальных группах изменений не было выявлено.

Заключение

Изучено влияние препаратов «Морфин гидрохлорид, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 и 10 мг» на репродуктивную функцию самок крыс различных возрастных групп. Установлено, что длительное (в течение 90 дней) введение препаратов в исследуемых дозах оказывало существенное влияние на общее состояние и поведение экспериментальных животных всех возрастных групп. Также выявлено достоверное снижение прироста массы тела у беременных крыс всех подопытных групп на 3-й неделе беременности.

При изучении плодовитости крыс было установлено, снижение индекса беременности во всех подопытных группах, наиболее выраженное (до 50%) в группе, получавшей препарат с месячного возраста. В той же экспериментальной группе наблюдалось снижение индекса фертильности на 20 %, по сравнению с контролем.

В свою очередь при изучении влияния препаратов на репродуктивные показатели обращало на себя внимание, что в группах самок, начавших получать препараты с месячного и двухмесячного возраста, было отмечено значимое уменьшение количества мест имплантации и живых плодов, а индексы пред- и постимплантационной гибели были превышены во всех экспериментальных группах по сравнению с контролем. Также у эмбрионов всех подопытных групп отмечено значительно большее число случаев кровоизлияний в головной мозг по сравнению с контролем.

Таким образом, хроническое трехмесячное воздействие препарата «Морфин гидрохлорид, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 и 10 мг» в исследуемых дозах оказывало существенное влияние на репродуктивную функцию подопытных самок крыс. Наиболее выраженные расстройства репродуктивной функции наблюдались в группе животных получавших препарат с месячного возраста.

Использованная литература

1. Сивочалова О.В., Фесенко М.А. Действие ксенобиотиков на процессы репродукции / В кн.: Общая токсикология /Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. – М.: Медицина, 2002. – С. 445-468.
2. Wilson, J. Embriological consideration in teratology methods administering agents and detecting malformations in experimental animals. // Technigues. Univ. Chicago Press, 1962. – P. 231–262.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. В.П.Фисенко – М.: ЗАО «ИИА «Ремедиум». – 2000. – 398 с.
4. Смольникова Н.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств №98/304 (утв. Минздравом РФ 29.04.1998). [Электронный ресурс] / Н.М.Смольникова, Е.М.Чиркова, И.В.Голованова и др. // Москва, 1998. Режим доступа: <http://www.alppp.ru/law/hozjajstvennaja-dejatelnost/promyshlennost/35/metodicheskie-rekomendacii-po-doklinicheskomu-izucheniyu-reproduktivnoj-toksichnosti-farma.html>).
5. Dawson A.B. Note on the staining of the sceleton cleared specimens with alizarin reds. // Stain Tecno1. – 1926. – №1. – P. 123–128.
6. Хавизьянова, Р. Х. Методология оценки репродуктивной безопасности лекарственных веществ / Р. Х. Хавизьянова // Рациональное использование лекарств : материалы Рос. науч.-практ. конф. (10-12 марта, г. Пермь). Пермь, 2004. - С. 3-14.