

УДК 615.2:547

ВЛИЯНИЕ НЕЙРОПЕПТИДОВ НА НАРУШЕНИЯ ЭСТРАЛЬНОГО ЦИКЛА У КРЫС, ВЫЗВАННЫЕ МОРФИНОМ

Н.А. Белякова¹, Е.Ю. Бонитенко²,
А.В. Носов¹

¹ФГБУН ИТ ФМБА России Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», 192019, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

²ФГБНУ НИИ МТ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова», 105275, г. Москва, Российская Федерация

Цель исследования – оценить влияние дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) или аналога фрагмента АКТГ4-10 (ФАКТГ) на изменения эстрального цикла крыс, вызванные длительным назначением морфина. Установлено, что интраназальное введение ДСИП либо ФАКТГ в течение 14 дней не приводило к значимым изменениям эстрального цикла у половозрелых самок инбредных крыс. Введение морфина в дозе 60 мг/кг в течение 60-и дней сопровождалось статистически значимым изменением длительности и структуры эстрального цикла у подопытных животных: уменьшением длительности течкового периода до $1,50 \pm 0,17$ суток и увеличением межтечкового до $8,30 \pm 0,80$ суток, а также общей продолжительности эстрального цикла до $9,60 \pm 0,65$ суток. В свою очередь, применение ДСИП и ФАКТГ в течение 14 дней после введения морфина в дозе 60 мг/кг в течение 60-и дней приводило к нормализации структуры и длительности эстрального цикла у половозрелых самок инбредных крыс.

Ключевые слова: морфин, нейропептиды, дельта-сон индуцирующий пептид, фрагмент адренкортикотропного гормона, эстральный цикл, репродуктивная функция.

Введение. В последние годы в Российской Федерации, с одной стороны все более широко стали использоваться опиаты при лечении хронического болевого синдрома у не онкологических больных [2], а с другой, в связи с успехами в лечении наркотической зависимости существенно возросло число обращений за медицинской помощью женщин с нарушениями репродуктивной функции, возникшими после предшествовавшего длительного приема наркотических анальгетиков.

Причинами подобных нарушений у данных контингентов пациентов могут быть самые разнообразные расстройства соматического и психического здоровья возникающие, в том числе и на фоне соматических заболеваний [2,3,4]. В клинических исследованиях было показано, что морфин также как и другие опиаты, часто провоцирует гормональный дисбаланс у женщин, выраженность которого зависит от дозы и наблюдается как у тех, кто использует

морфин в терапевтических целях, так и у наркоманов, применяющих его рекреационно, а также после отмены наркотических анальгетиков. Причиной развития гормонального дисбаланса является нарушение выработки гормонов в гипоталамо-гипофизарной системе и как следствие этого развитие вторичной дисфункции яичников, что в свою очередь проявляется отсутствием месячных и бесплодием.

Учитывая механизмы развития нарушений репродуктивной функции возникающих после длительного применения наркотических анальгетиков в качестве перспективных средств их коррекции могут быть рассмотрены нейропептиды, и, в частности, препараты дельта-сон индуцирующего пептида (ДСИП) и аналога фрагмента 4–10 адренкортикотропного гормона (ФАКТГ) [5].

Цель исследования – оценить влияние ДСИП и ФАКТГ на изменения эстрального цикла крыс вызванные длительным приемом морфина.

Белякова Наталия Александровна (Belyakova Nataliya Alexandrovna), старший научный сотрудник, ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства», bla3316@mail.ru

Бонитенко Евгений Юрьевич (Bonitenko Evgeniy Yur'evich), доктор медицинских наук, руководитель проекта ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицины труда им. академика Н.Ф. Измерова»

Носов Андрей Викторович (Nosov Andrey Victorovich), доктор медицинских наук, доцент, ФГБУН «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

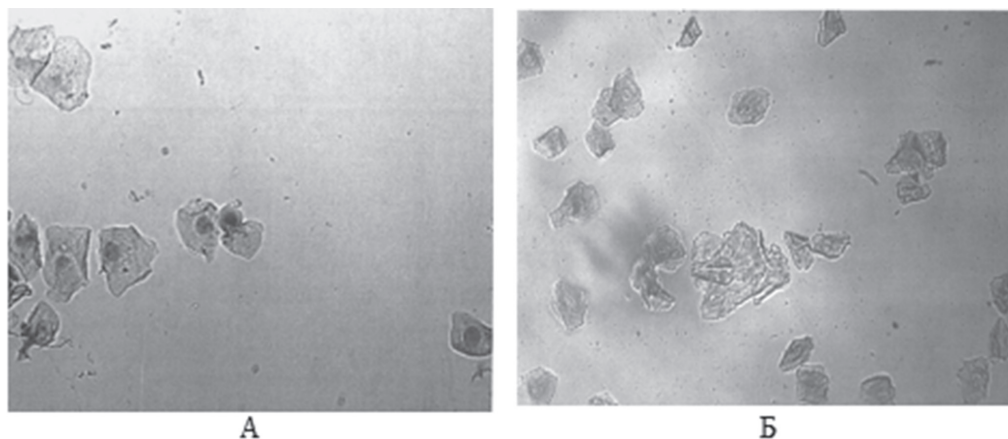


Рис. 1. Влагалищные мазки соответствующие течковому периоду: фаза проэструса (А) и фаза эструса (Б)

В рамках настоящего исследования для оценки влияния длительного приема наркотических анальгетиков, а также последующего применения нейропептидов на репродуктивную функцию крыс была выбрана оценка структуры и длительности эстрального цикла основанная на определении клеточной картины влагалищного мазка. Указанная методика позволяет оценить интенсивность обменных процессов связанных с регуляцией и функционированием репродуктивной системы [5].

Материалы и методы исследования. Эксперименты выполнены в весенне-летний период на белых нелинейных самках крыс разведения ФГУП «ПЛЖ «Рапполово», средней массой $200,0 \pm 10,0$ г. Перед проведением исследования животные подвергались карантину в течение 14 дней. Во время карантина и в процессе исследования животные содержались на стандартном водном и пищевом рационе в отдельном помещении.

Исследование было выполнено в три этапа. На первом этапе осуществлялось формирование групп животных с синхронизированными эстральными циклами. Для этого у половозрелых инбредных крыс самок оценивали ритмичность функционирования яичников. Оценку фаз эстрального цикла производили при помощи цитологического анализа влагалищных мазков животных, основываясь на определении клеточной картины влагалищных выделений, соответствующих определенной стадии полового цикла. Забор материала для исследования производили с помощью прикосновения ватно-марлевым тампоном к боковой стенке влагалища крысы. Взятый материал переносили на предметное стекло и анализировали с помощью светового микроскопа, после окраски 0,5% спиртовым раствором метиленового синего.

Как известно, для каждой стадии полового цикла самок крыс присуща определенная клеточная картина влагалищного мазка. Так, в стадии проэструса при микроскопии влагалищных выделений определяются расположенные поодиночке или небольшими группами многоугольные или округлые эпителиальные клетки с зернистой цитоплазмой и крупным ядром (рис. 1А). В фазе эструса в мазке определяются скопления крупных ороговевших безъядерных клеток, имеющих вид чешуек неправильной формы. При этом лейкоциты и эпителиальные клетки в мазке отсутствуют (рис. 1Б). В стадии метаэструса мазок содержит, кроме ороговевших чешуек, лейкоциты и единичные эпителиальные клетки. В конце стадии преобладают лейкоциты, появляется слизь и исчезают чешуйки (рис. 2А). В свою очередь диэструс характеризуется значительным количеством слизи и множеством лейкоцитов (рис. 2Б).

На основании цитологического анализа влагалищных мазков определяли общую длительность эстрального цикла, длительность течкового и межтечкового периодов. Кроме того, рассчитывали коэффициент проэструса – эструса ($K(p+э)$) и метаэструса – диэструса ($K(m+d)$) по формуле (1):

$$K = a/b \times 100\% \quad (1),$$

где K – коэффициент периода цикла (%), a – количество дней, приходящихся на данный период цикла за время наблюдения, b – общая длительность полных циклов в сутках.

На втором этапе изучалось влияние нейропептидов ДСИП и ФАКТГ на длительность эстрального цикла у интактных животных. Участвующие в эксперименте животные были распределены по группам. При рандомизации групп в качестве основного критерия использовали массу тела (отклонение массы тела в группы не более 10%):

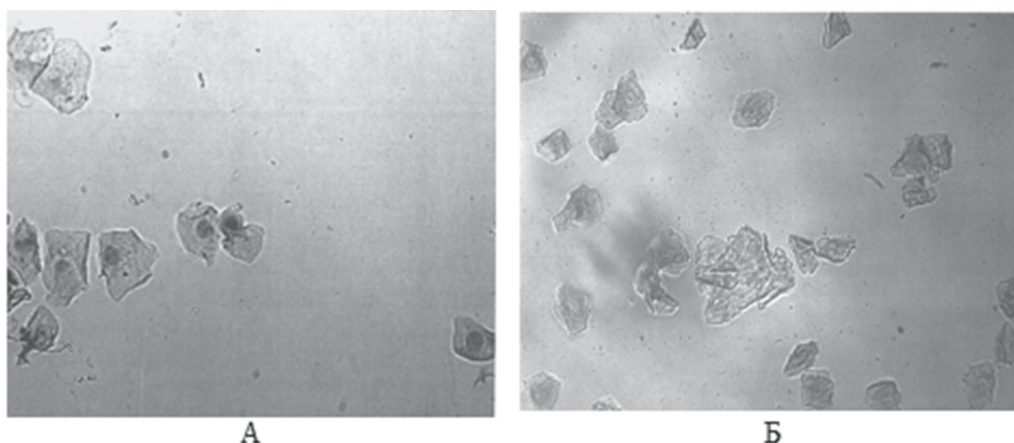


Рис. 2. Влагищные мазки соответствующие межтечковому периоду: фаза диэструса (А) и метаэструса (Б)

Таблица 1

Влияние нейропептидов на эстральный цикл инбредных половозрелых крыс самок ($M \pm m$)

Показатели	Группы животных		
	Контроль (n = 20)	ДСИП (n = 19)	ФАКТГ (n = 15)
Общая длительность эстрального цикла, сутки	4,10 ± 0,09	4,20 ± 0,13	4,40 ± 0,16
Длительность течкового периода, сутки	1,95 ± 0,05	1,90 ± 0,10	1,80 ± 0,13
Длительность межтечкового периода, сутки	2,15 ± 0,08	2,30 ± 0,19	2,60 ± 0,17
К(п+э), %	48,00 ± 1,27	46,00 ± 2,74	41,50 ± 2,80
К(м+д), %	52,00 ± 1,27	54,00 ± 3,03	58,50 ± 2,80
Отношение межтечкового/течковому периоду	1,10	1,21	1,44

1. Контрольную;
2. Опытную, получавшую интраназально в течение 14-и дней ДСИП в дозе 300 мкг/кг;
3. Опытную, получавшую интраназально в течение 14-и дней ФАКТГ в виде 0,1% раствор в дозе 300 мкг/кг.

После окончания введения препаратов у самок повторно брали мазки для определения стадии эстрального цикла.

На третьем этапе изучалось длительность эстрального цикла у самок крыс получавших в течение 3-х месяцев (90-и дней) перорально морфин в дозе 60 мг/кг и влияние на него введения ДСИП и ФАКТГ в течение 14 дней после окончания введения морфина. Рандомизации групп так же проводилась по массе тела животных.

Были сформированы следующие группы:

4. Контрольная, получавшая морфин в дозе 60 мг/кг в течение 3-х месяцев;
5. Опытная, получавшая в течение 3х месяцев морфин в дозе 60 мг/кг и после чего ин-

траназально в течение 14-и дней ДСИП в дозе 300 мкг/кг;

6. Опытная, получавшая в течение 3-х месяцев 60-и морфин в дозе 60 мг/кг и после чего интраназально в течение 14-и дней ФАКТГ в дозе 300 мкг/кг.

Животным контрольных групп вводили интраназально воду для инъекций в эквивалентном объеме.

После окончания введения препаратов у самок так же повторно брали мазки для определения стадии эстрального цикла.

Статистическая обработка результатов производилась с использованием критерия t Стьюдента (для параметров, распределение которых соответствовало нормальному) и критериев Уилкоксона и Манна-Уитни (в случае не нормального распределения).

Результаты и обсуждение. При исследовании длительности и структуры эстрального цикла на I-ом этапе было установлено, что 80,0% самок крыс имели устойчивый 4-х дневный цикл,

Таблица 2

Влияние морфина и пептидных препаратов на эстральный цикл инбредных половозрелых крыс самок ($M \pm m$)

Показатели	Группы животных			
	Контроль (n = 23)	Морфин (n = 16)	Морфин+ ДСИП (n = 15)	Морфин+ ФАКТГ (n = 16)
Общая длительность эстрального цикла, сутки	4,10 ± 0,09	9,60 ± 0,65*	4,20 ± 0,13#	4,70 ± 0,26#
Длительность течкового периода, сутки	1,93 ± 0,05	1,30 ± 0,17*	1,80 ± 0,13#	1,80 ± 0,13#
Длительность межтечкового периода, сутки	2,17 ± 0,07	8,30 ± 0,80*	2,40 ± 0,12#	2,90 ± 0,21#
К (п+э),%	48,00 ± 1,27	16,89 ± 2,80	43,00 ± 2,31	39,17 ± 2,67
К (м+д),%	52,00 ± 1,27	84,77 ± 3,14	57,00 ± 2,31	60,83 ± 2,67
Отношение межтечкового / течковому периоду	1,12	5,53	1,33	1,61

Примечание: * – различие с контролем достоверно ($p < 0,05$); # – различие с группой получавшей морфин достоверно ($p < 0,05$).

в то время как у 5,0 и 15,0% он составлял в среднем 3 и 5 дней соответственно. Для проведения исследования были отобраны животные с синхронизированным эстральным циклом. Эстральный цикл отобранных крыс составлял 4-е дня и состоял из 4-х фаз: проэструса (предтечки), эструса (течки), метаэструса (послетечки) и диэструса (межтечки или стадия покоя). При 4-х дневном эстральном цикле (на течковый (проэстру и эструс), и межтечковый (метаэструс и диэструс) периоды приходилось по 2-е суток, что соответствовало данным, полученным другими авторами [8].

Результаты, полученные при выполнении II-ого этапа исследования, изучении влияния пептидных препаратов на длительность и структуру эстрального цикла у интактных животных, представлены в таблице 1.

Так в группе №2, получавшей ДСИП было выявлено 84,2% самок с 4-х и 15,8% с 5-и дневным эстральным циклом. В свою очередь у крыс, получавших ФАКТГ (группа №3) 4-х дневный цикл был зарегистрирован в 73,3%, а 5-и дневный в 26,7% случаев соответственно. Обращало на себя внимание уменьшение коэффициентов проэструса–эструса и увеличе-

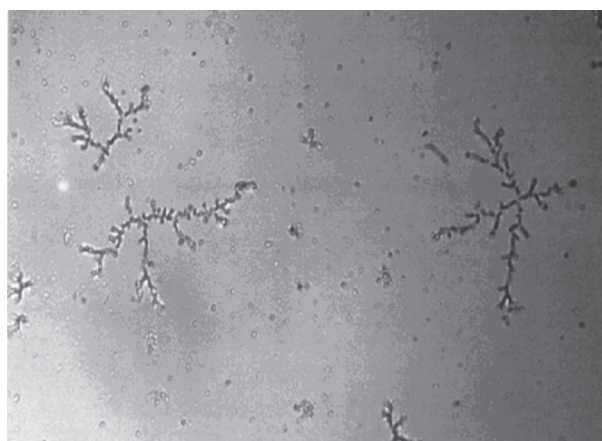


Рис. 3. Влагалищный мазок взятый в межтечковый период у животных длительно получавших морфин

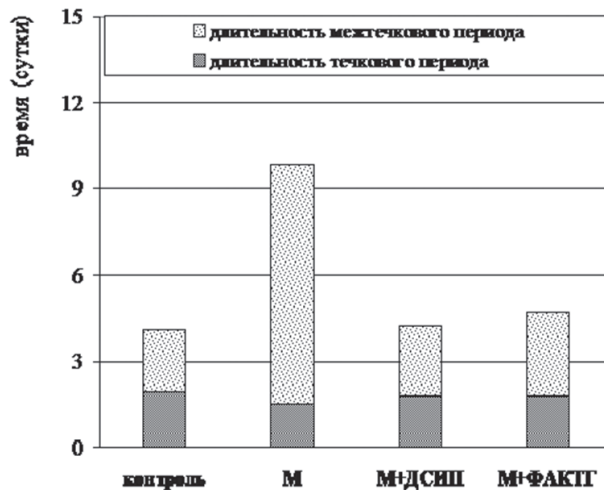


Рис. 4. Структура эстрального цикла у животных получавших пептидные препараты после длительного введения морфина (M)

ние метаэструса–диэструса, а также отношения межтечкового/течковому периоду в группе получавшей ФАКТГ по сравнению с контролем (группа №1), однако указанные изменения не носили значимого характера ($p > 0,05$).

Полученные при выполнении II-ого этапа результаты в целом свидетельствуют о том, что использованные нейропептиды не оказывали значимого влияния на структуру и длительность эстрального цикла у интактных животных.

На III-ем этапе изучались изменения эстрального цикла вызванные длительным введением морфина, а также возможность использования пептидных препаратов для их коррекции. Было установлено, что длительное введение морфина приводило к существенному изменению как длительности, так и структуры эстрального цикла, а также влагиалищного содержимого в межтечковой стадии эстрального цикла (рис. 3).

После введения морфина в дозе 60 мг/кг в день в течение 2-х месяцев, эстральный цикл у самок составлял от 4 до 12 дней (группа №4). В этой группе только в 18,8% животных был зарегистрирован 4-х дневный эстральный цикл, у остальных 81,2% он составил в среднем 9,6 суток. Для этой группы было характерно уменьшение длительности течкового периода полового цикла до $1,50 \pm 0,17$ суток и увеличение межтечкового до $8,30 \pm 0,80$ суток ($p < 0,05$). В свою очередь последнее было обусловлено как увеличением длительности метаэструса, так и диэструса (табл. 2, рис. 4). О выраженности изменений свидетельствовали как значения коэффициентов проэструса–эструса и метаэструса–диэструса, которые составили

$16,89 \pm 2,80$ и $84,77 \pm 3,14\%$ соответственно, а также увеличение отношения межтечкового/течковому периоду до 5,53, что в 4,94 раза выше, чем в контрольной группе.

В свою очередь применение пептидных препаратов после хронического введения морфина оказывало существенное влияние на длительность и структуру эстрального цикла измененного применением последнего. Так, было установлено, что применение ДСИП и ФАКТГ уменьшало продолжительность полового цикла у крыс до 4-х суток в 86,7 и 68,8% случаев соответственно. За счет чего длительность эстрального цикла в этих группах стала сопоставима с показателями полученными в контроле (рис. 4). В свою очередь отношение межтечкового к течковому периоду эстрального цикла у животных получавших ДСИП и ФАКТГ составили 1,33 и 1,63 по сравнению с контрольной группой соответственно.

Выводы. 1. Интранозальное введение ДСИП и ФАКТГ в течение 14 дней в выбранных дозах не приводило к значимым изменениям эстрального цикла у половозрелых самок инбредных крыс.

2. Введение морфина в дозе 60 мг/кг в течение 3-х месяцев приводило к существенным изменениям длительности и структуры эстрального цикла у подопытных животных: уменьшение длительности течкового периода до $1,50 \pm 0,17$ суток и увеличение межтечкового до $8,30 \pm 0,80$ суток и общей продолжительности полового цикла до $9,60 \pm 0,65$ суток.

3. Применение ДСИП и ФАКТГ в течение 14 дней после введения морфина в дозе 60 мг/кг в течение 3-х месяцев приводило к нормализации структуры и длительности эстрального цикла у половозрелых самок инбредных крыс.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schrijvers D., van Fraeyenhove F. (2010). Emergencies in palliative care. *Cancer J.* 2010; Vol.16, № P. 514–520.
 2. Поллова К. М., ред. Введение в репродуктивную эндокринологию. М: Меридиан, 2000.
 3. Кулаков В.И., Леонова В.Б., Кузьмичева Л.Н., ред. Лечение женского и мужского бесплодия. М.: МИА, 2005.

4. Weller Y., Theis M., Zawta B. Useful facts about reproductive medicine fertility testing. question and answers. Dresden: Roshe Diagnostics GmbH, 20
 5. Белякова Н.А., Бонитенко Е.Ю., Носов А.В., Генералова К.Р., Лисицкий Д.С. Влияние нейропептидов на репродуктивную функцию самок неинбредных крыс. Биомедицинский журнал

Medline. ru. 2019 .Т.20, №С.1–16.
 6. Котельников А.В., Котельникова С. В. Характеристика эстрального цикла белых крыс на разных этапах онтогенеза при введении витамина Е. Вестник Астраханского государственного технического университет. 2012 , №С. 25 – 27.
 7. Савченко О.Н., Арутюнян Н.А., Степанов М.Г. Экспериментальное

бесплодие. СПб.: Наука, 19
 8. Зарубина Е.Г., Лысова А.Н. Роль кисспептина в нормализации эстрального цикла взрослых половозрелых самок крыс. Электронный научный журнал ISSN2070-74Раздел «Медицинские науки». 20

REFERENCES:

1. Schrijvers D., van Fraeyenhove F. (2010). Emergencies in palliative care. *Cancer J.* 2010; Vol.16, No. P. 514–520.
 2. Pollova K. M., ed., Introduction to reproductive endocrinology. M: Meridian, 2000 (in Russian).
 3. Kulakov V. I., Leonova V. B., Kuzmicheva L. N., ed. Treatment of female and male infertility. M.: MIA, 2005 (in Russian).

4. Weller Y., Theis M., Zawta B. Useful facts about reproductive medicine fertility testing. The question and answers. Dresden: Roshe Diagnostics GmbH, 20
 5. Belyakova N. A., Bonitenko E. Yu., Nosov A.V., Generalova K. R., Lisitsky D. S. Influence of neuropeptides on reproductive function in female noninbred rats. Biomedical journal Medline. ru. 2019, Vol.

20, No. 1, Pp. 1-16 (in Russian).
 6. Kotelnikov A.V., Kotelnikova S. V. Characteristics of the estrous cycle in white rats at different stages of ontogenesis with the introduction of vitamin E. Bulletin of the Astrakhan State Technical University. 2005, T2, No. Pp. 25 – 27 (in Russian).
 7. Savchenko O. N., Arutyunyan N. A.,

Stepanov M. G. Experimental infertility. SPb.: Science, 1992 (in Russian).
 8. Zarubina E. G., Lysova A. N. Role of kisspeptin in the normalization of the estrous cycle in adult mature female rats. The electronic scientific journal ISSN2070-74The category of «Medical science», 2015 (in Russian).

N.A. Belyakova¹, E.Yu. Bonitenko², A.V. Nosov¹

NEUROPEPTIDES EFFECTS ON RAT ESTROUS CYCLE DISORDERS CAUSED BY MORPHINE

¹Institute of Toxicology of the Federal Medical-Biological Agency, 192019, Saint Petersburg, Russian Federation

²N.F. Izmerov Research Institute of Occupational Health, 105275, Moscow, Russian Federation

The aim of the study was to evaluate the influence of the Delta sleep-inducing peptide (DSIP) or the analogue of the adrenocorticotropin4-10 fragment (FACTH) on changes in the estrous cycle of rats caused by long-term administration of morphine. It has been found that the intranasal administration of DSIP or FACTH for 14 days did not lead to significant changes in the estrous cycle in mature female inbred rats. The introduction of morphine at a dose of 60 mg/kg for 60 days was accompanied by a statistically significant change in the duration and structure of the estrous cycle in experimental animals: a decrease in the duration of the estrus period to $1,50 \pm 0,17$ days and an increase in interintegration to $8,30 \pm 0,80$ days, as well as the total duration of the estrous cycle up to $9,60 \pm 0,65$ days. In turn, the use of DSIP and FACTH for 14 days after the administration of morphine at a dose of 60 mg/kg for 60 days led to the normalization of the structure and duration of the estrous cycle in mature female inbred rats.

Keywords: morphine, neuropeptides, Delta sleep-inducing peptide, adrenocorticotropic hormone fragment, estrous cycle, reproductive function.

Материал поступил в редакцию 17.06.2019 г.

