

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора медицинских наук, профессора Звартау Эдвина Эдуардовича на диссертационную работу Беляковой Наталии Александровны «Влияние морфина гидрохлорида на репродуктивную функцию самок крыс и фармакологическая коррекция выявленных нарушений», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.04 – токсикология (медицинские науки) и 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки)

Актуальность избранной темы

Два аспекта современного применения опиоидных препаратов имеют отношение к актуальности темы рецензируемой диссертации. Первый аспект связан с немедицинским применением опиоидов, социальная значимость которого была наиболее ярко продемонстрирована недавним «опиоидным кризисом» в США. Хроническое потребление опиоидов, в частности женщинами детородного возраста, сопряжено с риском нарушения репродуктивных функций и неблагоприятных последствий для потомства.

Второй аспект связан с медицинским применением опиоидов и мерами Правительства РФ по повышению доступности болеутоляющей терапии с применением опиоидных анальгетиков при хронических болевых синдромах умеренной и сильной интенсивности. Важной задачей в реализации этой программы является импортозамещение, обеспечение рынка опиоидных болеутоляющих средств отечественными препаратами и современными лекарственными формами. Примером результативности усилий в указанном направлении является создание ФГУП «Московский эндокринный завод» препаратов «Морфина гидрохлорид, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 5 мг и 10 мг», в рамках доклинического изучения безопасности которых была выполнена работа Н.А.Беляковой.

Особенно актуально применение опиоидных анальгетиков в паллиативной медицине и при онкологическом болевом синдроме. Однако в этих случаях возможность влияния на генеративную функцию не рассматривается как приоритетный вопрос безопасности лечения. Вместе с тем, решение о применении опиоидной анальгезии при неонкологической боли у женщин детородного возраста должно приниматься с учетом возможного риска нарушения репродуктивной функции при планировании беременности.

Дополнительным аргументом в пользу актуальности темы диссертации является выбор в качестве средств экспериментальной терапии отечественных нейротропных соединений с потенциальной возможностью влияния на регуляцию функций гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси, а не оказания заместительного гормонального эффекта.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Работа выполнена в два этапа. На первом этапе была определена оптимальная экспериментальная модель для оценки влияния морфина гидрохлорида (МГХ) на репродуктивную функцию в зависимости от дозы и возраста экспериментальных животных (крыс). Соответственно, на этом этапе решались две из четырех задачи работы: 1) изучить влияние на организм и на РФ самок крыс хронического воздействия МГХ в зависимости от дозы и возраста при начале его введения и 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.

На втором этапе изучали влияние пептидных препаратов ДСИП (торговое название «Дельтафирокс») и 4-10АКТГ («Семакс») на репродуктивную функцию и оценивали их

Вх. № 166

«26» сентября 2021 г.

ФГБУ НКЦГТ им. С.Н. Голикова ФМБА России
Диссертационный совет

эффективность как средств экспериментальной фармакотерапии последствий хронической опиоидной интоксикации. Соответственно, решались 3-я и 4-я задачи, сформулированные в диссертации: 3) изучить влияние пептидных препаратов, содержащих ДСИП и 4-10АКТГ, на репродуктивную функцию самок крыс, а также ФР и СДР их потомства и 4) оценить влияние указанных препаратов на репродуктивную функцию самок крыс после хронического воздействия МГХ, а также на ФР и СДР их потомства.

Автором вынесены на защиту четыре положения, а результаты проведенного исследования суммированы в семи выводах.

Положение 1 гласит, что трехмесячное введение МГХ не оказывает существенного влияния на общее состояние самок крыс различных возрастных групп, но оказывает влияние на репродуктивную функцию подопытных самок крыс, причем наиболее выраженные расстройства последней наблюдаются в группе животных получавших МГХ до беременности с месячного возраста. Данные, обоснующие положение 1 и выводы 1-2, изложены в разделах 3.1 и 3.2 диссертации.

При сравнительном рассмотрении текстов *положения 1* и *вывода 1*, указывающих на незначительное влияние опиоидной нагрузки на «общее состояние» самок крыс трех возрастных групп, было бы желательно более подробно пояснить указанную незначительность. Данные, изложенные в тексте главы, указывают на формирование стойких стереотипных поведенческих реакций по ходу опиатной экспозиции. Кроме того, наблюдались снижение набора массы тела, которое связывают с уменьшением потребления корма, а также начальные признаки печеночной (увеличение АЛТ, АСТ) и почечной дисфункции, выраженные преимущественно в младшей возрастной группе. Иначе говоря, оценка незначительности влияния трехмесячного воздействия большой дозы опиата требует более точного обоснования и некоей «калибровки» значительности/незначительности сдвигов.

Значимые изменения репродуктивной функции после трехмесячного введения до беременности МГХ в суточных дозах 1,0 и 10,0ЭТД по таким показателям как снижение прироста массы тела на 3-й неделе беременности, количество мест имплантации, количество живых плодов, индексы предимплантационной, постимплантационной и эмбриональной гибели, количество плодов в помете и суммарная масса плодов были отмечены у неполовозрелых к моменту начала введения опиата особей, особенно в группе крыс месячного возраста к началу курса. В группе, получавшей МГХ с месячного возраста только у половины самок развивалась беременность. В этой же группе было отмечено увеличение плацентарно-плодового коэффициента, что трактуется как нарушение циркуляторно-метаболического равновесия в фетоплацентарной системе.

Положение 2 и *вывод 3* указывают на то, что трехмесячная опиатная интоксикация самок крыс до беременности оказывает отрицательное влияние на ФР и СДР их потомства, причем выраженность отставания в ФР и СДР обратно пропорциональна возрасту начала введения МГХ. Данные в пользу указанного положения и выводов представлены в главе 3.3.

Указанные положение и вывод обоснованы объемной работой по количественному учету и анализу показателей ФР и СДР в постнатальном периоде. Введен показатель «индекс дефицита/избытка массы тела», объективно подтвердивший наибольшее отставание в приросте массы тела у потомства материнских особей младшей возрастной группы начала опиатной нагрузки (1 месяц). Был также введен показатель «среднее отставание/опережение» сроков ФР в сутках с учетом 6 стандартных показателей (отлипание ушной раковины, прорезывание резцов, открытие глаз и т.д.) отдельно для периодов раннего молочного вскармливания и появления первичных половых признаков. Полученные индексы ФР позволили 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.

Аналогичным образом для объективизации оценки отставания СДР потомства использовали «среднее отставание/опережение сроков СДР» в сутках по таким тестам как переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, избегание обрыва и т.д. (всего 7 тестов). Проведенные расчеты индексов отставания сроков СДР также показали наибольшее отставание в группе потомков от материнских особей, которые получали МГХ с месячного возраста.

На основе этого объемного экспериментального материала достаточно обоснованным представляется выбор экспериментальной модели для второй части работы с началом введения МГХ в десятикратной ЭТД самкам крыс месячного возраста.

Положение 3, сформулированное на основе данных, представленных в главе 4.1, указывает на то, что ДСИП и 4-10АКТГ при двухнедельном интраназальном введении в дозе 300 мкг/кг/сутки не оказывают значительного влияния как на РФ самок крыс, так и на ФР и СДР их потомства.

Действительно, оба препарата не влияли на характеристики эстрального цикла, концентрации половых гормонов (ЛГ, ФСГ и прогестерона) в сыворотке крови. Вместе с тем, наблюдали снижение индексов фертильности (4-10АКТГ) и беременности (ДСИП), снижением темпов прироста массы тела беременных самок, признаками антенатальных (снижение массы тела и кранеокаудального размера плодов, признаки плацентарной недостаточности, уменьшением длины закладок костей передних и задних конечностей, количества оссифицированных позвонков хвоста и мелких костей конечностей, *вывод 4*) и постнатальных (отставание ФР и СДР в периоде раннего молочного вскармливания, *вывод 5*) влияний.

Таким образом, в этом разделе также желательна большая определенность в калибровке значительности/незначительности фармакогенных влияний и их критериев. Тем более, что в разделе «Практические рекомендации» на основании приведенных данных автор указывает «Показано, что ПП, содержащие ДСИП и 4–10АКТГ, вызывают нарушения репродуктивной функции и должны с осторожностью применяться в периоде планирования беременности у женщин».

Положение 4 и выводы 6 и 7 сформулированы на основе результатов экспериментов, изложенных в разделах 2 и 3 главы 4, и декларируют положительный эффект экспериментальной двухнедельной терапии до наступления беременности в отношении неблагоприятных последствий предшествовавшей трехмесячной нагрузки МГФ в десятикратной ЭТД как в отношении нарушения РФ, так и антенатального развития плодов и постнатального развития потомства.

Обоснованность данных положения и выводов базируется на обширном экспериментальном материале, который подтвердил выявленную в первом разделе работы способность МГХ при длительном применении вызывать серьезные нарушения РФ, задержку ФР и СДР их потомства. Были установлены факты экспериментально-терапевтического влияния изученных пептидных препаратов в отношении последствий длительной опиатной интоксикации, которое, в частности, проявлялось нормализацией эстрального цикла и уровня половых гормонов в сыворотке крови, восстановлением прироста массы тела у беременных самок, нормализацией индексов фертильности и беременности, количества мест имплантации и живых плодов, частичным восстановлением массы и кранио-каудального размера (ККР) плодов, снижением аномалий развития, предотвращением отставания в темпах СДР, улучшением поведенческих показателей в тестах памяти, пространственной ориентации, исследовательской активности и др.

Достоверность и новизна научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Сформулированные в диссертационном исследовании научные положения, выводы и рекомендации можно оценить как *достоверные*. Основанием для данной оценки являются:

- продуманный и четкий дизайн работы
- большой объем материала и трудоемкость работы: исследовано около 400 крыс в разных периодах онтогенеза (1-2-3 месячные), около 550 детенышей и более 500 двадцатидневных эмбрионов.
- дисциплина научного эксперимента (стандартизация содержания животных, рандомизация групп, выполнение требований по надлежащей лабораторной практике, а также следование правилам учета, хранения и использования в научных целях наркотических средств и психотропных веществ).
- разнообразие методов исследования: токсикологические методы, методы изучения гонадо- и эмбриотропного действия химических веществ, инструментальные, гематологические, биохимические, патоморфологические и другие методы исследований, указывающие на профессиональные квалификационные характеристики исполнителя работы.
- адекватный статистический аппарат.

В тех разделах исследования, где было много показателей (например, касающихся ФР и СДР) автор предлагал интегральные показатели типа среднего отставания/опережения, индекс СДР, индекс соответствия СДР и ФР, индекс ФР.

Следует отметить, что в рамках исследования была экспериментально апробирована система комплексной оценки физического и сенсорно-моторного 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.

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 репродуктивную функцию родительских особей.

Большинство *новых фактов, научных положений, выводов и рекомендаций*, представленных в работе, отличаются новизной.

Научно-практическая ценность результатов работы

Существенная теоретическая ценность работы состоит в усовершенствовании методологии доклинических исследований в области оценки репродуктивной токсичности, в частности, в демонстрации возможности использования коэффициентов и индексов ФР и СДР при проведении комплексной доклинической оценки влияния фармакологических средств на развитие потомства в постнатальном периоде.

Практическая ценность состоит в установлении факта терапевтического действия нейропептидных препаратов ДСИП и 4-10АКТГ для корректировки неблагоприятного действия длительной опиатной интоксикации на РФ самок крыс, а также на ФР и СДР их потомства.

Практическая ценность работы состоит также в выявлении потенциальной возможности нарушения репродуктивной функции при приеме пептидных препаратов ДСИП и 4010АКТГ, что должно учитываться при ревизии ИМП препаратов.

Общая характеристика работы. Оценка содержания работы, ее завершенности и оформления.

Работа составлена по хорошо сформулированному плану, основанному на анализе состояния проблемы, определении перспективного направления исследования, четкой формулировке цели и задач и разработке оптимального дизайна исследования.

Диссертация изложена на 190 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, 3 главы, посвященные собственным исследованиям, заключение, выводы, практические рекомендации и список литературы. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 45 таблицами. Список литературы содержит 240 источников (161 отечественных и 79 иностранных публикаций).

Во *введении* автор обосновывает актуальность выбранной темы исследования, формулирует цель и задачи исследования, описывает научную новизну, степень разработанности проблемы, практическую значимость, степень достоверности полученных результатов, собственный вклад в работу. Как уже отмечалось, благоприятное впечатление оставляют конкретность и четкость постановки цели и задач диссертации и связанный с ними дизайн исследования.

В компактном двадцатистраничном обзоре литературы (*глава 1*) автор представляет токсикологическую характеристику морфина гидрохлорида (раздел 1.1) и влияние опиоидных наркотических анальгетиков на репродуктивную функцию (1.2). Характеристика морфина гидрохлорида представлена, скорее, в формате справочника, чем обзора литературы, так как содержит всего три ссылки на публикации по данному вопросу. В этом плане раздел 1.2 выглядит более содержательным и интересным. Подходы к лечению нарушений репродуктивной функции суммированы в разделе 1.3 главы. Достаточно информативен раздел 1.4, посвященный фармакологической активности нейропептидов вообще и ДСИП и 4-10АКТГ, в частности. В целом, обзор хорошо построен методически и отражает достаточную ориентированность автора в проблеме.

В *главе 2* дана характеристика исследованных веществ, других материалов и методов исследования. Детально изложены характеристики исследованных препаратов, способов их введения и пояснения по определению дозировок. Обоснованность использованных методов и полученных результатов в существенной степени базируется на следовании методическим рекомендациям ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России в части выбора доз, оценки влияния веществ на репродуктивную функцию, протоколов токсикологических исследований. Кроме того, автор сделал попытку внедрить принципы клинической оценки ФР плодов, применяемых в неонатологии, в практику доклинического исследования, а также разработал систему индексов, позволяющих в одном показателе объединить сумму частных индикаторов, характеризующих ФР и СДР потомства.

Представлены также набор статистических критериев и обоснование их выбора.

Глава 3 в разделе 3.1 содержит описание эффектов хронического введения МГХ на общее состояние, репродуктивную функцию самок крыс и развитие потомства. Последовательно рассмотрены влияние хронического введения МГХ на общее состояние самок крыс, в том числе на поведение животных, двигательную и исследовательскую активность, потребление воды, корма и динамику массы тела, сердечно-сосудистую систему, функциональное состояние почек, морфологические и биохимические показатели крови. Описаны результаты макро- и микропатоморфологических исследований.

Раздел 3.2 посвящен собственно результатам исследования хронического введения МГХ на репродуктивную функцию по всем показателям, представленным в главе 2, а раздел 3.3 отражает наблюдения за постнатальным развитием потомства крыс, подвергавшихся до беременности хронической опиатной интоксикации.

Глава 4 посвящена оценке эффекта изученных пептидных препаратов на РФ и постнатальное развитие потомства у самок крыс после хронического введения МГХ. Материал главы касается двух фрагментов исследования: собственно влиянию пептидных препаратов на репродуктивную функцию, ФР и СДР потомства (разделы 4.1-4.2) и экспериментально-терапевтическому действию изученных пептидных препаратов на пренатальное и постнатальное развитие плодов и потомства крыс, подвергнутых с 1 месяца жизни трехмесячной экспозиции МГХ в десятикратной средней эффективной дозе.

Материал изложенных глав представлен лаконично и конкретно. Таблицы, несмотря на насыщенность цифровыми данными, облегчают восприятие большого экспериментального материала, а рисунки повышают наглядность изложения.

В *заключении* подводятся итоги выполненных исследований, приведены *выводы и практические рекомендации*.

В целом, можно дать положительную оценку содержания диссертации, ее завершенности и оформления.

Публикация результатов

Материалы диссертации опубликованы в 8 статьях в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ. Материалы диссертации использованы при подготовке методических рекомендаций «Оценка морфофункциональных нарушений у потомства как результата воздействия экотоксикантов на организмы родительских особей» (МР ФМБА России 21.45-17).

Автореферат и опубликованные работы в достаточной степени отражают основные положения диссертации.

Замечания и вопросы

В процессе знакомства с работой возникли некоторые вопросы и замечания.

Замечания:

1. Работа написана хорошим языком, легко читается, но имеются небрежности и ошибки. Например: рис. 1 – «II-ый этап» вместо «II-ой этап», стр. 5 - «в частотности» вместо «в частности», стр. 10 «3-х трехмесячное введение», стр. 29 – «ДельтафЕрокс вместо Дельтафирокс», стр. 89 - табл.3.15. «гидроуртер» вместо «гидроуретер», стр. 99 - заголовок «Влияние на сенсорно-двигательное развитие потомство в постнатальном периоде», стр. 111: «в ходе двухнедельного интранОзального введения», стр. 144 - «Для сравнения результатов, полученных при изучении влияния ПП, МГХ и их последовательного назначения самкам до беременности, на нами были рассчитаны коэффициенты..».

2. При описании результатов статистического анализа правильнее говорить не о достоверных изменениях, а о значимых изменениях. В тексте оба эти обозначения чередуются как равноправные.

3. В рисунках 1 и 2 нет ссылки на издание, в котором они были опубликованы, или отметки, что это рисунки автора.

Вопросы:

1. Автор указывает, что в течение первых 3-х дней после прекращения введения МГХ у всех животных наблюдалась выраженная «нервозность», которая постепенно уменьшалась к концу первой недели, скачкообразные перемещения, а со 2 недели – апатия. К 4 неделе поведение восстанавливалось. Можно ли оценить поведенческие изменения, связанные с хронической интоксикацией МГХ, как признаки формирования состояния опийной зависимости? Если да, то можно ли как-то разделить эффекты, связанные с опийной интоксикацией и ее отменой? В частности, как оценить состояние животного в этом

контексте при отмене морфина после трехмесячного введения на период подсадки (спаривания)?

2. Предусматривал ли дизайн раздела экспериментальной терапии нейропептидами контрольную группу, получающую растворитель в двухнедельный период после отмены морфина и до подсадки?

Вышеперечисленные вопросы и замечания не влияют на положительную оценку работы в целом.

Заключение


Диссертационная работа Беляковой Наталии Александровны «Влияние морфина гидрохлорида на репродуктивную функцию самок крыс и фармакологическая коррекция выявленных нарушений» является законченной научно-квалификационной работой, содержащей решение актуальной задачи повышения безопасности противоболевой терапии с помощью опиоидных анальгетиков, имеющей существенное значение для развития фармакологии и клинической фармакологии. По актуальности темы, методическому подходу к решению поставленных задач, новизне полученных результатов, их научно-практической значимости и качеству публикаций диссертация соответствует требованиям п. 9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор, Белякова Наталия Александровна, заслуживает присуждения искомой степени кандидата медицинских наук по специальностям 14.03.04 – токсикология (медицинские науки) и 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология (медицинские науки).

Официальный оппонент
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой фармакологии
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ
им. И.П. Павлова Минздрава России


Звартау Эдвин Эдуардович

Подлинность подписи Э.Э. Звартау заверяю

Учёный секретарь Ученого совета
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ
им. И.П. Павлова Минздрава России,
профессор


Беженарь Виталий Федорович

Звартау Эдвин Эдуардович
Тел.: 8 (812) 338 7023
Электронная почта zvartau@spb-gmu.ru
ФГБОУ ВО ПСПбГМУ им.И.П.Павлова Минздрава России
197022, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8,
rector@lspbgmu.ru
+7 (812) 338-67-99