

# БИОМЕДИЦИНА

№ 2 2008

Научный журнал. Основан в 2005 году  
Научным центром биомедицинских  
технологий РАМН

## Главный редактор

Н.Н. Каркищенко,  
академик РАН, член-корреспондент РАМН

## Редакционный совет:

Hans-W. Askermann, профессор (Канада)  
Iorgen Backmen, профессор (Германия)  
В.А. Быков, академик РАМН и РАСХН (Россия)  
Витан Влахов, профессор (Болгария)  
Ralf Edwards, профессор (Швеция)  
Moineao S.-F. D'Herelle, профессор (Канада)  
С.И. Колесников, академик РАМН (Россия)  
А.А. Кубатиев, академик РАМН (Россия)  
В.Г. Кукес, академик РАМН (Россия)  
А.И. Мирошников, академик РАН (Россия)  
Michael Orme, профессор (Великобритания)  
М.А. Пальцев, академик РАН и РАМН (Россия)  
В.И. Петров, академик РАМН (Россия)  
Ю.Л. Перов, член-корреспондент РАМН (Россия)  
К.В. Судаков, академик РАМН (Россия)  
Solemene Umberto, профессор (Италия)  
В.П. Фисенко, академик РАМН (Россия)  
Д.Ф. Хритинин, член-корреспондент РАМН (Россия)  
Б.Д. Цыганков, профессор (Россия)  
В.Н. Ярыгин, академик РАМН (Россия)

## Редакционно-издательская группа:

Б.М. Бороденков, Г.Д. Капанадзе, Н.В. Касинская,  
Ю.С. Макляков, Е.Л. Матвеевко, В.А. Михайлов,  
А.О. Ревякин, Д.С. Сахаров, Х.Х. Семенов,  
О.И. Степанова, Д.А. Сычев, Г.В. Раменская, В.В. Хоронько

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати  
Свидетельство о регистрации:  
ПИ № ФС77-21324, 09.06.2005 г.

---

Охраняется Законом Российской Федерации № 5351-1  
«Об авторском праве и смежных правах» от 9 июля 1993 года и  
иными нормативно-правовыми актами. Воспроизведение  
всего издания, а равно его части (частей) без письменного  
разрешения издателя влечет ответственность в порядке,  
предусмотренном действующим законодательством.

---

## Адрес редакции:

105064, Москва,  
Малый Казенный пер. 5, стр. 1  
matveyenkoel@mail.ru  
Тел.: 561-52-64, 917-32-17

© 2008, Научный центр биомедицинских технологий РАМН

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

- Д.А. Сычев, В.Г. Кукес., Н.Н. Каркищенко.* Проект рекомендаций по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных и внесение информации в инструкции по применению ..... 5

### ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

- И.Н. Кравченко, О.Н. Хохлова, Н.Н. Кравченко, А.Н. Пужалин, И.А. Дьяченко, А.Н. Мурашев.* Гематологические показатели свободных от патогенной флоры крыс CD (*Sprague-Dawley*) и мышей CD-1 в норме ..... 20
- Е.Л. Матвеевко, Л.Г. Дубакина, К.В. Афонин.* Экономическая эффективность развития лабораторного животноводства в филиале «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН ..... 31

### БИОМОДЕЛИРОВАНИЕ

- Н.Н. Вейко, А.М. Малащенко, Е.В. Соколова, Н.Л. Тишкина.* Нелинейные мыши Kv:SHK как адекватная модель для исследования эффекта противораковых препаратов (пилотный опыт с альфа-аманитином) ..... 37

### ГЕНЕТИКА

- Р.Е. Казаков, И.В. Игнатьев, И.Э. Коман, Д.А. Сычев, В.Г. Кукес.* Сравнение частот встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *G1846A* гена *CYP2D6* в трех этнических группах Чукотского АО ..... 40
- А.Г. Пирицелани, Н.А. Пирицелани, Н.В. Мамаладзе, Г.А. Пирицелани, Н.Г. Джаджанидзе, Г.Д. Капанадзе.* Влияние интерферона на мутагенное и цитотоксическое действие вируса гриппа у белых мышей и их эмбрионов ..... 45

### ФАРМАКОЛОГИЯ

- С.П. Матуа, В.Н. Каркищенко, В.П. Омельченко.* Особенности количественной фарм-ЭЭГ при действии новерила и пипразидола в эксперименте ..... 50
- В.Н. Каркищенко, С.П. Матуа, В.П. Омельченко.* Поиск информативных показателей биоэлектрической активности функционального состояния головного мозга при действии некоторых антидепрессантов ..... 53
- Э.А. Манвелян, В.А. Батурин.* Особенности действия амитриптилина на плавательное поведение интактных и овариоэктомированных самок крыс в разное время суток ..... 59

### ФАРМАКОЭПИДЕМИОЛОГИЯ

- М.В. Пчелинцев, Э.Э. Звартау, А.Н. Кубынин, Т.Е. Артеева.* Мониторинг использования опиоидных анальгетиков у амбулаторных пациентов, как способ оптимизации лечения интенсивной хронической боли ..... 63
- В.А. Батурин, Е.В. Шетинин, И.Ф. Демиденко, С.А. Ерофеев, М.В. Батурина.* Микробиологические и фармакоэпидемиологические аспекты антибиотикотерапии при микоплазмозах ..... 73

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- О.И. Степанова, Н.А. Онищенко, Н.Н. Каркищенко, О.В. Баранова, Т.В. Галахова.* Использование клеток разных фракций аллогенного костного мозга для терапии сахарного диабета типа II на генетической модели ..... 78
- Н. Пирцхелани, Е. Абзианидзе, В. Бершвили, Т. Ткемаладзе, Б. Парцхаладзе, Г. Капанадзе.* Изучение влияния агонистов и антагонистов дофаминергических рецепторов на толерантность опиатной анальгезии ..... 81

## CONTENTS

### REVIEWS

- D.A. Sychev, V.G. Kukes.* Draft recommendations for studying biotransformation and drug transporters: study design, data analysis and entering information into application instructions ..... 5

### LABORATORY ANIMALS

- I.N. Kravchenko, O.N. Khokhlova, N.N. Kravchenko, A.N. Puzhalin, I.A. Dyachenko, A.N. Murashev.* Hematological characters of normal specific pathogen-free CD (Sprague-Dawley) rats and CD-1 mice ..... 20
- E.L. Matveenko, L.G. Dubakina, K.V. Afonin.* Cost efficiency of laboratory animals husbandry in the branch "Andreevka" of the Research Center for Biomedical Technologies ..... 31

### BIOMODELING

- N.N. Veiko, A.M. Malashenko, E.V. Sokolova, N.L. Tishkina.* Non-inbred mice KV:SHK as adequate model for study of anticarcinogenic preparations effect (pilot experiments with the  $\alpha$ -amanitin) ..... 37

### GENETICS

- R.E. Kazakov, I.V. Ignatiev, I.E. Koman, D.A. Sychev, V.G. Kukes.* Comparison of occurrences of the alleles and genotypes of polymorphous marker G1846A of gene *CYP2D6* in three ethnic groups of Chukotka ..... 40
- A. Pirtskhelani, N. Pirtskhelani, N. Mamaladze, G. Pirtskhelani, N. Jajanidze, G. Kapanadze.* The influence of interferon on the mutagenic and cytotoxic action of influenza virus in white mice and embryos ..... 45

### PHARMACOLOGY

- S.P. Matua, V.N. Karkischenko, V.P. Omel'chenko.* Evaluation of quantitative characteristics of pharm-EEG under exposure to noveril and pirazidol in experiment ..... 50
- V.N. Karkischenko, S.P. Matua, V.P. Omel'chenko.* Searching for informative indicators of brain functional state bioelectrical activity under some antidepressant ..... 53
- E.A. Manvelyan, V.A. Baturin.* Specific effect of amitriptilins on swimming behaviour of intact and ovariectomized female rats at different time of the day ..... 59

## PHARMACOEPIDEMIOLOGY

- M.V. Pchelintsev, E.E. Zvartau, A.N. Kubynin, T.E. Arteeva.* Monitoring of using opiod analgetics in ambulatory patients as an optimization method of intensive chronic pain treatment ..... 63
- V.A. Baturin, E.V. Schetinin, I.F. Demidenko, S.A. Erofeev, M.V. Baturina.* Microbiological and pharmacoepidemiological aspects of antibioticotherapy in mycoplasmosis ..... 73

## BRIEF REPORTS

- O.I. Stepanova, N.A. Onischenko, N.N. Karkischenko, O.V. Baranova, T.V. Galakhova.* The relevance of various fractions of allogenic bone marrow cells to the type II diabetes correction ..... 78
- N. Pirskhelani, E. Abzianidze, V. Berishvili, T. Tkemaladze, B. Partskhaladze, G. Kapanadze.* Study of agonists and antagonists of dofaminergic receptors influence on tolerance to opiate analgesia ..... 81



## Проект рекомендаций по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных и внесение информации в инструкции по применению

Д.А. Сычев, В.Г. Кукес, Н.Н. Каркищенко

Филиал «Клиническая фармакология» НЦБМТ РАМН, Москва

Институт клинической фармакологии ФГУ «НЦ ЭСМП», Москва

Очевидно, что врачу необходима информация о возможных межлекарственных взаимодействиях новых лекарственных средств, что должно быть отражено в инструкции по применению и типовой клинико-фармакологической статье. Для получения подобной информации необходимо проведения исследований биотрансформации и транспортеров лекарственных средств *in vivo* и *in vitro*. В представленном проекте рекомендаций изложена методология проведения подобных исследований, подходы к анализу результатов и принципы их изложения в инструкции к применению лекарственного средства и типовой клинико-фармакологической статьей. Разработанные рекомендации гармонизированы с аналогичным руководством Управления по контролю за лекарствами и продуктами США (FDA).

**Ключевые слова:** биотрансформация лекарственных средств, изоферменты цитохрома Р-450, гликопротеин-Р, исследования *in vitro*, исследования *in vivo*, индукция, ингибирование.

### 1. ВВЕДЕНИЕ

Рекомендации предназначены для фармацевтических компаний, которые регистрируют новые лекарственные средства (ЛС) и проводят изучение их биотрансформации для оценки межлекарственного взаимодействия. Потребность в подобных исследованиях соответствует статье 16 Федерального закона о лекарственных средствах, регламентирующей состав и содержание данных о межлекарственном взаимодействии, включаемых в инструкции по применению ЛС [1]. Данный проект отражает мнение о том, что пути биотрансформации нового ЛС должны быть изучены в ходе его разработки, и что его взаимодействия с другими ЛС на уровне биотрансформации должны исследоваться на предмет возможных клинических последствий

в виде снижения эффективности или развития нежелательных лекарственных реакций (НЛР) при межлекарственном взаимодействии. Кроме того, следует отметить, что в последнее время стало известно, что межлекарственное взаимодействие может происходить на уровне транспортеров, участвующих в процессах всасывания, распределения и выведения. Поэтому в ходе разработки нового ЛС необходимо рассматривать возможность развития межлекарственного взаимодействия и на уровне транспортеров. Мнение о необходимости изучения биотрансформации и транспортеров новых ЛС основано на международном опыте снятия с регистрации ряда ЛС в связи с многочисленными случаями развития серьезных НЛР, причиной которых были межлекарственные взаимодействия на уровне биотрансформации и транспор-

теров. Подобные исследования перед регистрацией новых ЛС проводятся в США и ЕС. Целью представленных рекомендаций является также гармонизация российских требований к регистрации новых ЛС с международными нормами и правилами. Исследования биотрансформации и транспортеров необходимы для регистрации всех новых лекарственных средств, содержащих новую молекулу (для синтетических и иммунобиологических ЛС) или новые компоненты (для ЛС природного происхождения). Исследования биотрансформации и транспортеров необходимы для перерегистрации ЛС, если такие данные отсутствовали. Данные рекомендации гармонизированы с аналогичными рекомендациями Управления по контролю за лекарствами и продуктами США (FDA).

## II. ПРЕДПОСЫЛКИ

### A. Биотрансформация

Известно, что эффективность и безопасность ЛС в большинстве случаев зависят от концентрации ЛС в области молекул-мишеней, которая чаще всего связана с концентрацией ЛС в плазме крови. В свою очередь, концентрация ЛС в плазме крови зависит от процессов всасывания, распределения и элиминации. Элиминация ЛС происходит путем биотрансформации (чаще всего в печени и/или слизистой кишечника) и/или экскреции ЛС (чаще почками с мочой и/или печенью с желчью). Кроме того, белковые ЛС могут элиминироваться вследствие специфического взаимодействия с клеточными поверхностными рецепторами, последующей интернализации и лизосомальной деградации в клетках-мишенях. Биотрансформация в печени происходит в основном при участии изоферментов цитохрома P-450 (СYP) в эндоплазматическом ретикулуме гепатоцитов (I фаза биотрансформации), но может также происходить с участием ферментных систем, не связанных с P-450, таких, как

N-ацетил- и глюкуронозилтрансферазы (II фаза биотрансформации). Многие факторы могут изменять биотрансформацию ЛС. К таким факторам относятся:

- наличие заболеваний;
- сопутствующее применение других ЛС;
- прием определенных пищевых продуктов, например, грейпфрутового сока;
- генетические особенности человека в виде носительства определенных аллельных вариантов гена фермента биотрансформации.

В то время как большинство факторов являются относительно стабильными, сопутствующее применение других ЛС может резко изменять биотрансформацию ЛС, а через нее и концентрацию ЛС в плазме крови, что может иметь клинические последствия в виде неэффективности ЛС (при снижении концентрации ЛС в плазме крови) или развития НЛР (при повышении концентрации ЛС в плазме крови). Таким образом, сопутствующее применение других ЛС может быть опасным. Межлекарственное взаимодействие усложняется, если взаимодействующее ЛС является пролекарством или подвергается биотрансформации с образованием одного или более активных метаболитов. В этом случае эффективность и безопасность ЛС определяется не только действием исходного ЛС, но и действием активных метаболитов.

Таким образом, адекватная оценка эффективности и безопасности ЛС включает описание его биотрансформации, а также вклада биотрансформации в процесс элиминации ЛС. По этой причине разработка высокочувствительных и специфических методов определения концентрации ЛС и его важнейших метаболитов в биологических жидкостях (чаще всего в плазме крови) является особо важной для исследования путей биотрансформации ЛС и межлекарственных взаимодействий на уровне биотрансформации.

## **Б. Межлекарственные взаимодействия**

### ***1. Межлекарственные взаимодействия на уровне биотрансформации***

Многие реакции биотрансформации ЛС, осуществляемые изоферментами цитохрома Р-450, могут быть индуцированы или ингибированы сопутствующим применением других ЛС. Это может приводить к увеличению или уменьшению концентрации ЛС или его метаболитов (включая активные или токсические метаболиты) в плазме крови, а следовательно в области молекул-мишеней, что может приводить к изменению профиля эффективности и безопасности ЛС. Это имеет наибольшее клиническое значение при применении ЛС с узким терапевтическим диапазоном, однако может касаться и ЛС с широким терапевтическим диапазоном (например, статинов).

В ходе исследований межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации важно установить вероятность возникновения влияния изучаемого ЛС на биотрансформацию уже зарегистрированных и применяемых ЛС, совместное применение которых с ним наиболее вероятно в клинической практике. Также необходимо оценить вероятность возникновения влияния уже зарегистрированных и применяемых ЛС на биотрансформацию изучаемого ЛС. Следует отметить, что даже те ЛС, которые не подвергаются биотрансформации, могут оказывать влияние на биотрансформацию других ЛС. По этой причине межлекарственные взаимодействия на уровне биотрансформации должны исследоваться, даже если исследуемое ЛС не подвергается значительной биотрансформации.

Специфическая цель исследования межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации — определить, достаточно ли значимо взаимодействие для того, чтобы требовать изменения дозировки самого ЛС или ЛС, с которыми оно мо-

жет быть использовано, а также может ли взаимодействие потребовать дополнительного контроля эффективности и безопасности, включая терапевтический лекарственный мониторинг.

В некоторых случаях понимание того, как изменять дозировку или режим дозирования при применении взаимодействующего ЛС, или того, каким образом можно избежать межлекарственных взаимодействий на уровне биотрансформации, может позволить вывести на рынок ЛС, применение которого в противном случае было бы связано с развитием серьезных НЛР. В редких случаях высокая значимость межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации, вызванного ЛС, или степень изменения его биотрансформации под влиянием другого ЛС может привести к невозможности выпуска препарата на рынок по соображениям безопасности.

### ***2. Межлекарственные взаимодействия на уровне транспортеров***

К настоящему времени накоплено большое количество данных о существовании клинически значимых взаимодействий ЛС на уровне транспортеров. Примерами подобных взаимодействий могут служить ингибирование или индукция таких транспортеров, как Р-гликопротеин (Р-gp), транспортеры органических анионов (ОАТ), полипептид, транспортирующий органические анионы (ОАТР), транспортеры органических катионов (ОСТ), протеины, ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью (MRP), а также белок резистентности к раку молочной железы (BCRP). Примеры взаимодействий на уровне транспортеров включают взаимодействие между дигоксином и хинидином, фексофенадином и кетоконазолом (или эритромицином) и т.д. Из всех известных к настоящему моменту транспортеров наиболее хорошо изученным является Р-gp, и оценка межлекарственного взаимодействия на его уровне может быть осуществлена в ходе разработ-

ки новых ЛС. Поэтому в представленных рекомендациях изложена методология изучения новых ЛС в качестве субстратов, ингибиторов и индукторов Р-гр. Исследование транспортеров новых ЛС, и особенно Р-гр, не является в настоящее время обязательным, но желательно.

### III. ОБЩИЕ СТРАТЕГИИ

Изучение биотрансформации и транспортеров ЛС должно соответствовать определенной последовательности. Сначала необходимо провести исследования *in vitro*. Если по данным исследования *in vitro* ЛС окажется субстратом и/или ингибитором/индуктором изоферментов цитохрома Р-450 и/или транспортеров, то затем, для подтверждения этих фактов, необходимо провести исследования *in vivo* у человека<sup>1</sup>. Если ЛС, исходя из своих фармакологических эффектов, может часто применяться в комбинации с другими ЛС (например, в составе комбинированных схем лечения онкологических заболеваний, ВИЧ-инфекции, туберкулеза и т.д.), и при этом возможно межлекарственное взаимодействие на уровне биотрансформации и транспортеров, то необходимо проведение клинического исследования для разработки тактики по изменению режимов дозирования ЛС или других вариантов ведения пациентов в подобных ситуациях.

Если же информация о биотрансформации и транспортерах ЛС по результатам исследований *in vivo* и *in vitro* стала известна уже после проведения клинических исследований ЛС, то рекомендуется ретроспективно проанализировать результа-

ты этих клинических исследований на предмет выявления случаев межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации и транспортеров, что позволит выявить его клинические последствия, а также выработать тактику по изменению режимов дозирования ЛС или других вариантов ведения пациентов в подобных ситуациях. В этих случаях проведение дополнительных клинических исследований не требуется.

#### А. Исследования *in vitro*

Взаимосвязь между результатами исследований биотрансформации и транспортеров ЛС *in vitro* и *in vivo* до конца не выяснена. Тем не менее, исследования *in vitro* могут служить скрининговым механизмом для исключения роли биотрансформации в фармакокинетике ЛС, а также ингибирующих/индуцирующих его свойств по отношению к изоферментам цитохрома Р-450. Эта возможность должна основываться на утвержденных экспериментальных методах и рациональном выборе концентраций изучаемого ЛС и взаимодействующего ЛС. Например, если соответствующие исследования *in vitro* в терапевтических концентрациях показывают, что изоферменты цитохрома Р-4501А2, СYP2С8, СYP2С9, СYP2С19, СYP2D6 или подсемейства СYP3А<sup>2</sup> не участвуют в биотрансформации изучаемого ЛС, то не требуется проведение исследований *in vivo* для оценки влияния ингибиторов изофермента СYP2D6 или ингибиторов/индукторов изоферментов цитохрома Р-4501А2, СYP2С8, СYP2С9, СYP2С19 и подсемейства СYP3А на элиминацию изучаемого ЛС.

<sup>1</sup> Фитопрепараты рекомендуется изучать *in vitro* и *in vivo* только на предмет того, являются они ингибиторами/индукторами изоферментов цитохрома Р-450 и/или транспортеров.

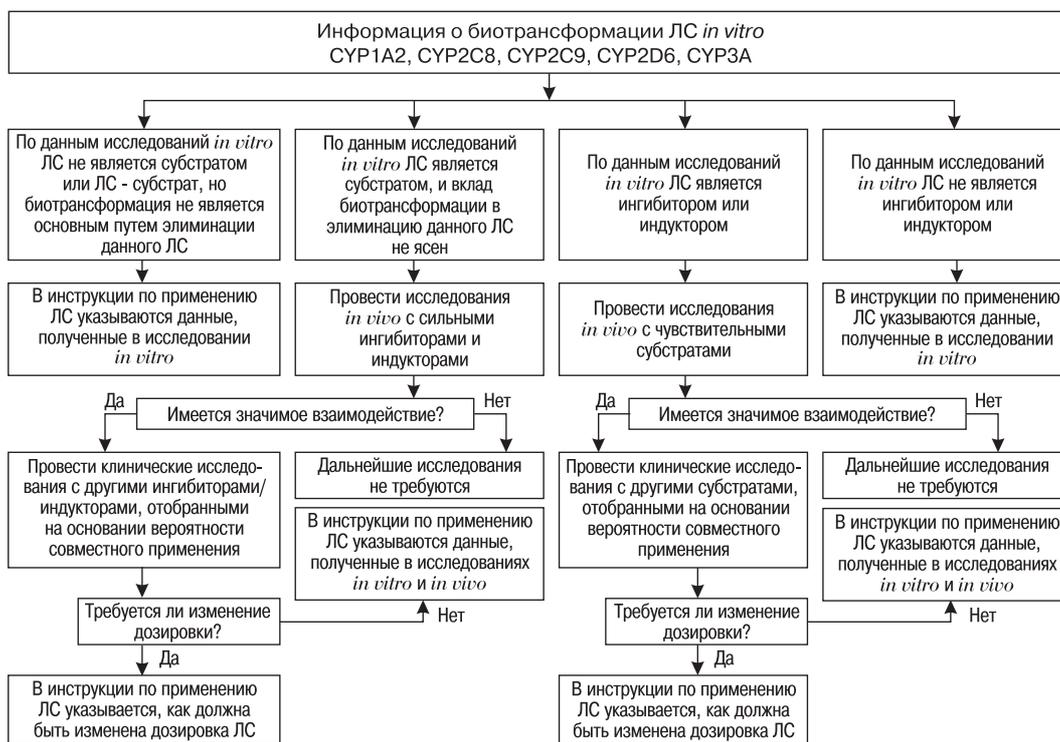
<sup>2</sup> Подсемейство СYP3А включает 3 изофермента: СYP3А4, СYP3А5 и СYP3А7. Последний активен только в плодной печени и у детей до 1 года. СYP3А5 вносит больший вклад в биотрансформацию ЛС, чем СYP3А5. Однако в связи с тем, что в большинстве случаев все три изофермента имеют одни и те же субстраты, ингибиторы и индукторы, данные, полученные в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, относятся суммарно ко всем трем изоферментам подсемейства СYP3А.

Сходным образом, если исследования *in vitro* показывают, что изучаемое ЛС не ингибирует изоферменты цитохрома P-4501A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 или подсемейства CYP3A, то не требуется проведение соответствующих исследований взаимодействия *in vivo* изучаемого ЛС и других ЛС, метаболизирующихся данными изоферментами. На рисунке представлено «дерево» для принятия решения, в каких случаях показано проведение исследований взаимодействия *in vivo*, основываясь на данных исследования биотрансформации, ингибирования и индукции изоферментов цитохрома P-450 *in vitro*.

До настоящего времени не было обнаружено индукторов фермента CYP2D6. Последние данные показали, что индукторы изоферментов подсемейства CYP3A

чаще всего являются и индукторами изоферментов подсемейств CYP2C, CYP2B и P-gp. Таким образом, для исследования вопроса, индуцирует ли изучаемое ЛС CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A, начальное исследование индукции *in vitro* может включать только CYP1A2 и CYP3A. Если исследования *in vitro* показывают, что исследуемый препарат не индуцирует изоферменты подсемейства CYP3A, то не требуется проведение исследований взаимодействия *in vivo* на предмет изучения индуцирующих свойств изучаемого ЛС по отношению к изоферментам подсемейств CYP2C и CYP2B.

Большое значение имеют межлекарственные взаимодействия на уровне изофермента CYP2B6. При наличии показаний (возможность применения изучаемого ЛС с лекарственными средствами, ме-



«Дерево» для принятия решения, в каких случаях показано проведение исследований взаимодействия *in vivo* после проведения исследования *in vitro*

таболизирующимися СУР2В6 или его ингибиторами/индукторами) возможно проведение исследований *in vitro* по изучению роли СУР2В6 в биотрансформации изучаемого ЛС, а также возможных ингибирующих/индуцирующих свойств изучаемого ЛС по отношению к СУР2В6. Другие изоферменты цитохрома Р-450, включая СУР2А6 и СУР2Е1, с меньшей вероятностью вовлекаются в клинически значимые взаимодействия, однако, при соответствующих показаниях (по аналогии с СУР2В6) также могут быть изучены.

В частности, представлены принципы разработки эксперимента, анализа данных и интерпретации полученных результатов при определении роли изоферментов цитохрома Р-450 в биотрансформации изучаемого ЛС (изучаемое ЛС в качестве субстрата), ингибирования (изучаемое ЛС в качестве ингибитора), и индукции (изучаемое ЛС в качестве индуктора) изоферментов цитохрома Р-450.

#### **В. Исследования *in vivo***

Кроме исследований биотрансформации и транспортеров ЛС *in vitro* для подтверждения роли того или иного изофермента цитохрома Р-450/транспортера в биотрансформации изучаемого ЛС и/или ингибирующих/индуцирующих свойств изучаемого ЛС по отношению к тому или иному изоферменту цитохрома Р-450/транспортеру, необходимо проведение исследований *in vivo*. Эти исследования представляют собой фармакокинетические исследования соответствующего дизайна. Совместно с информацией, полученной в ходе исследований *in vitro*, исследования *in vivo* могут быть основным фундаментом разработки инструкции (или коррекции уже имеющейся) по применению ЛС, что может помочь избежать возникновения потребности в дальнейших клинических исследованиях.

#### **IV. ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЙ БИОТРАНСФОРМАЦИИ И ТРАНСПОРТЕРОВ *IN VIVO***

Исследование биотрансформации *in vivo* необходимо проводить после исследований *in vitro* в соответствии с алгоритмом, представленным на рис. 1. В ходе следующего обсуждения термин *субстрат* используется для обозначения ЛС, в отношении которого проводится анализ для определения того, изменяется ли его фармакокинетика под влиянием другого ЛС (ингибитора/индуктора), называемого *взаимодействующим ЛС*. В зависимости от целей исследования субстрат и взаимодействующее ЛС могут быть изучаемыми ЛС или одобренными ЛС («маркерными» субстратами или «маркерными» ингибиторами/индукторами).

##### **А. Дизайн исследования**

Исследования межлекарственных взаимодействий на уровне биотрансформации *in vivo* обычно разрабатываются для сравнения фармакокинетики ЛС-субстрата при наличии или отсутствии взаимодействующего ЛС. Рекомендуется выбрать один из двух вариантов дизайна исследования.

*Перекрестное исследование.* Используется одна группа участников исследования. Участникам исследования однократно назначается ЛС-субстрат и проводится изучение его фармакокинетики, затем этой же группе в течение 8 дней назначается взаимодействующее ЛС (ингибитор/индуктор), после чего на 7-й день применения взаимодействующего ЛС (ингибитора/индуктора) повторно назначается ЛС-субстрат и повторно проводится изучение его фармакокинетики.

*Параллельный дизайн.* Используются две группы участников исследования (основная и контрольная), сформированные путем рандомизации. Первой, основной, группе в течение 8 дней назначается взаимодействующее ЛС (ингибитор/индуктор),

после чего на 7-й день применения взаимодействующего ЛС (ингибитора/индуктора) однократно назначается ЛС-субстрат и проводится изучение его фармакокинетики. Участникам второй, контрольной, группы, которым не назначалось взаимодействующее ЛС (ингибитор/индуктор), однократно назначается ЛС-субстрат и проводится изучение его фармакокинетики.

При планировании исследований *in vivo* должны также учитываться следующие положения:

- Для ЛС-субстратов с узким терапевтическим диапазоном следует изучить влияние взаимодействующего ЛС (ингибитора/индуктора) не только на его фармакокинетику при однократном назначении, но и на его равновесную концентрацию при длительном применении. В этом случае можно также выбрать один из вышеизложенных вариантов дизайна исследования *in vivo*, с тем отличием, что ЛС-субстрат будет применяться курсами до достижения равновесного состояния, после чего должна определяться равновесная концентрация ЛС-субстрата в плазме крови (максимальная и минимальная).
- Взаимодействующие ЛС (ингибиторы/индукторы), должны дозироваться так, чтобы экспозиция этих препаратов соответствовала их клиническому применению, включая максимальные дозировки, которые должны быть использованы в исследовании *in vivo*.
- Если ЛС-субстрат является пролекарством или имеет активные метаболиты, то в исследовании *in vivo* необходимо изучать не только фармакокинетику самого ЛС, но и его активного метаболита.
- Исследования *in vivo* обычно могут быть открытыми, кроме случаев, когда «фармакодинамические» конечные точки (включая НЛР) являются важными для оценки межлекарственного взаимодействия.
- В случае если на всасывание взаимодействующего ЛС (ингибитора/индуктора) могут влиять различные факторы (например, pH желудка), может быть целесообразным определение равновесной концентрации (минимальной и максимальной) в плазме крови (обычно не раньше чем через 5 периодов полувыведения ЛС).
- Во избежание расхождения результатов исследования вследствие неконтрольного использования биологически активных добавок к пище (БАД), соков или других пищевых продуктов, которые могут повлиять на активность ферментов биотрансформации и транспортеров в ходе проведения исследования *in vivo*, важно исключить их использование в соответствующих случаях. Для этого в протокол исследования *in vivo* необходимо включить, например, такое предупреждение: «Участники будут исключаться из исследования по следующим причинам: использование ЛС, отпускаемых по рецепту или без рецепта, включая препараты растительного происхождения, или алкоголь в течение двух недель до включения в исследование»; или: «В течение, по крайней мере, двух недель до начала исследования и до момента окончания добровольцам не разрешается есть пищу или пить напитки, содержащие алкоголь, грейпфрут или грейпфрутовый сок, яблочный или апельсиновый сок, овощи из семейства крестоцветных (белокочанная капуста, брокколи, кресс-салат, кольраби, брюссельскую капусту, горчицу) и мясо-гриль».

## В. Исследуемая популяция

Исследования биотрансформации *in vivo* в большинстве случаев проводятся с участием здоровых добровольцев. Данные, полученные в этой популяции, могут позволить предсказать эффекты, которые могут быть получены в популяции пациентов, принимающих изучаемое ЛС. По со-

ображениям безопасности в некоторых случаях здоровые добровольцы не могут принимать участие в исследовании *in vivo*, например, при изучении противоопухолевых, психотропных ЛС и ЛС, применяемых при ВИЧ-инфекции. В этих случаях в исследования биотрансформации *in vivo* могут быть включены пациенты с соответствующими заболеваниями. При этом дополнительно появляется возможность изучать фармакодинамические конечные точки, отсутствующие при включении здоровых добровольцев. Минимальное количество участников исследования составляет 18 человек в случае перекрестного исследования и так же по 18 человек, как минимум, в каждой из групп в случае параллельного дизайна исследования.

Определение у участников исследования *in vivo* генетических полиморфизмов ферментов, участвующих в биотрансформации, желателно при исследовании изоферментов цитохрома P-450 CYP2C19 и CYP2C9, так как степень лекарственного взаимодействия может быть различной в зависимости от генотипа по исследуемому изоферменту цитохрома P-450. Эта информация может оказаться полезной для интерпретации полученных в ходе исследования *in vivo* результатов.

### С. Выбор «маркерных» ЛС-субстрата и взаимодействующего ЛС

#### 1. Изучаемое ЛС как ингибитор или индуктор изоферментов цитохрома P-450

При исследовании *in vivo* изучаемого ЛС в качестве взаимодействующего ЛС выбор субстратов для исследований *in vivo* зависит от изоферментов P-450, на которые оказывало влияние изучаемое ЛС в исследовании *in vitro*. При исследовании ингибирующих свойств изучаемого ЛС выбранное ЛС-субстрат должно быть тем ЛС, фармакокинетика которого значительно изменится при совместном его применении с известными специфическими ингибиторами того или иного изофермента цитохрома

P-450, т. е. ЛС должно быть чувствительным субстратом, для которого было показано, что AUC увеличиваются в 5 раз или более при одновременном введении с известным ингибитором того или иного изофермента цитохрома P-450. Чувствительные субстраты, представленные в табл. 1, рекомендуется применять в исследованиях *in vivo* как «маркеры», т. е. по их фармакокинетике (при их приеме внутрь) оценивается активность того или иного изофермента цитохрома P-450.

Таблица 1

#### Чувствительные субстраты, являющиеся «маркерами» активности изоферментов цитохрома P-450, рекомендованных для применения в исследованиях *in vivo*

Изофермент цитохрома P-450	«Маркеры»
CYP1A2	Кофеин
CYP2C8	Реваглинид
CYP2C9	Толбутамид, диклофенак
CYP2C19	Омепразол
CYP2D6	Метопролол
CYP3A4 и другие изоферменты подсемейства CYP3A	Мидазолам, аторвастатин

В исследованиях *in vivo* ингибирующих/индуцирующих свойств изучаемого ЛС для оценки активности изоферментов цитохрома P-450 CYP2C9 и CYP3A4 возможно не только изучение фармакокинетики чувствительных субстратов (см. табл. 1), но и применение альтернативных методов. Для оценки активности CYP3A4 рекомендуется также использовать MEGX-тест, тест с определением соотношения 6 $\beta$ -гидрокси-кортизола/кортизол в моче. Для оценки активности CYP2C9 также может использоваться тест с лозартаном.

Если исследование *in vivo* определяет, что изучаемое ЛС либо ингибирует, либо индуцирует тот или иной изофермент цитохрома P-450, рекомендуется проведение дополнительных исследований с использо-

ванием набора других ЛС-субстратов, которые наиболее вероятно будут применяться в клинической практике вместе с изучаемым ЛС. В случае же если исследование *in vivo* дает отрицательный результат с чувствительными субстратами (табл. 1), можно предположить, что также не будет обнаружено влияния на менее чувствительные ЛС-субстраты, а, значит, дополнительные исследования не требуются.

Если исследования *in vivo* показали, что изучаемое ЛС является ингибитором того или иного изофермента цитохрома Р-450, то его следует отнести к одной из трех групп ингибиторов, что важно при внесении информации о возможном межлекарственном взаимодействии в инструкцию по применению ЛС (или ИКФС). Ингибиторы того или иного изофермента цитохрома Р-450 можно классифицировать на основании степени изменения АУС чувствительного субстрата («маркера») при его применении внутрь:

- если изучаемое ЛС увеличивает АУС чувствительного субстрата при его применении внутрь в 5 раз или более, то оно может расцениваться как сильный ингибитор;
- если изучаемое ЛС увеличивает АУС чувствительного субстрата при его применении внутрь более чем в 2 раза, но

менее чем в 5 раз, то оно может расцениваться как умеренный ингибитор;

- если изучаемое ЛС увеличивает АУС чувствительного субстрата при его применении внутрь более чем в 1,25 раза, но менее чем в 2 раза, то оно может расцениваться как слабый ингибитор.

Отнесение изучаемого ЛС по данным исследования *in vivo* к одной из трех групп ингибиторов позволяет определить вероятность его взаимодействия с чувствительными субстратами и ЛС-субстратами с узким терапевтическим диапазоном (табл. 2), что должно найти отражение в инструкции по применению ЛС и ТКФС.

В исследованиях *in vivo* может применяться так называемый «коктейльный подход», при котором одновременно применяется несколько чувствительных субстратов («маркеров») нескольких изоферментов цитохрома Р-450 в ходе одного исследования. Необходимым условием правильного дизайна подобного рода исследований является наличие следующих факторов:

- чувствительные субстраты («маркеры») должны быть специфичны для изоферментов цитохрома Р-450;
- между чувствительными субстратами не должно быть взаимодействий.

Отрицательные результаты «коктейльного» исследования *in vivo* могут исклю-

Таблица 2

**Чувствительные субстраты и субстраты с узким терапевтическим диапазоном изоферментов цитохрома Р-450**

<b>Изофермент цитохрома Р-450</b>	<b>Чувствительный субстрат</b>	<b>Субстрат с узким терапевтическим диапазоном</b>
CYP1A2	Дулоксетин	Теofilлин, тизанидин
CYP2C8	Репаглинид	Паклитаксел
CYP2C9	—	Варфарин, фенитоин
CYP2C19	Омепразол	—
CYP2D6	—	Тиоридазин
CYP3A4	Будесонид, буспирон, эплренон, элетриптан, фелодипин, флутиказон, ловастатин, мидозалам, саквинавир, силденафил, симвастатин, триазолам, варденафил	Циклоспорин, эрготамина, фентанил, пимозид, хинидин, сиролimus, такролимус

читать потребность в дальнейшем исследовании отдельных изоферментов цитохрома Р-450. Данные, полученные в ходе «коктейльных» исследований, могут дополнять данные, полученные в ходе других исследований *in vitro* и *in vivo*, оценивающих способность изучаемого ЛС ингибировать или индуцировать тот или иной изофермент цитохрома Р-450.

## **2. Изучаемое ЛС в качестве субстрата изоферментов цитохрома Р-450**

При исследовании *in vivo* изучаемого ЛС в качестве субстрата выбор ингибиторов для исследований *in vivo* зависит от изоферментов Р-450, которые, по данным исследования *in vitro*, метаболизируют изучаемое ЛС. При этом для исследования *in vivo* необходимо выбрать сильный ингибитор того или иного изофермента цитохрома Р-450, который будет являться «маркерным» ингибитором. В качестве «маркерных» ингибиторов может быть выбрано любое ЛС из табл. 3. Например, если в исследовании *in vitro* было показано, что изучаемое ЛС подвергается биотрансформации при участии изоферментов подсемейства СYP3A и их вклад в элиминацию ЛС либо значителен (>25% от общего клиренса), либо неизвестен, то в качестве ингибитора следует выбрать кетоконазол, так как он является сильным ингибитором СYP3A. Если результаты исследования *in vivo* отрицательны, тогда можно говорить о том, что было продемонстрировано отсутствие клинически значимого межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации. Если исследование *in vivo* при использовании сильного ингибитора дало положительный результат, и заказчик исследования желает определить, имеется ли взаимодействие между изучаемым ЛС и другими менее мощными ингибиторами или дать рекомендацию по изменению дозирования — в большинстве случаев требуется проведение дальнейших клинических исследований (табл. 3). В случае если препарат под-

вергается биотрансформации при помощи того или иного изофермента цитохрома Р-450, и его площадь под фармакологической кривой АUC увеличивается в 5 раз и более под влиянием сильного ингибитора, то изучаемое ЛС считается чувствительным субстратом для данного изофермента цитохрома Р-450. При этом в инструкции по применению ЛС и ТКФС необходимо отметить, что ЛС является «чувствительным» субстратом для данного изофермента цитохрома Р-450, и его применение с сильными или умеренными ингибиторами приводит к повышению его концентрации в плазме крови и развитию НЛР. В случае если ЛС подвергается биотрансформации при помощи СYP3A и не является чувствительным субстратом, однако, если его соотношение доза—ответ показывает, что даже незначительное увеличение концентрации ЛС в плазме крови при совместном применении с ингибиторами может привести к развитию серьезных НЛР (например, аритмия *torsade de pointes*), то ЛС рассматривается как «субстрат того или иного изофермента цитохрома Р-450 с узким терапевтическим диапазоном» (табл. 2).

Если в исследовании *in vivo* с сильным ингибитором изучаемое ЛС показало себя в качестве субстрата того или иного изофермента цитохрома Р-450, то его исследование с индуктором не требуется.

В случае если применяемое внутрь ЛС является субстратом СYP3A и обладает низкой биодоступностью из-за значительной пресистемной элиминации, связанной с находящимся в ЖКТ СYP3A, то грейпфрутовый сок, являясь ингибитором СYP3A, может оказывать значительное влияние на концентрацию данного ЛС в плазме крови и повышать риск развития НЛР, что должно быть указано в инструкции по применению и ТКФС данного ЛС.

Если ЛС является одновременно субстратом и СYP3A и Р-рp, то совместное применение с ним препаратов зверобоя

Таблица 3

**Сильные, умеренные и слабые ингибиторы изоферментов цитохрома P-450**

<b>Изофермент цитохрома P-450</b>	<b>Сильные ингибиторы</b>	<b>Умеренные ингибиторы</b>	<b>Слабые ингибиторы</b>
CYP1A2	Флувоксамин	Мекселитин, пропафенон, ципрофлоксацин	Ацикловир, верапамил, норфлоксацин, фамотидин, циметидин
CYP2C8	Гемфиброзил	—	Триметоприм
CYP2C9	—	Амиодарон, флуконазол	Сульфинпиразон
CYP2C19	Омепразол	—	—
CYP2D6	Пароксетин, флуоксетин, хинидин	Дулоксетин, тербинафин	Амиодарон, сертралин
CYP3A	Атазанавир, индинавир, итраконазол, кетоконазол, кларитромицин, нелфинавир, ритонавир, саквинавир, телитромицин	Ампренавир, верапамил, дилтиазем, сок грейпфрута, флуконазол, фосампренавир, эритромицин	Циметидин

приведет к снижению концентрации данного ЛС в плазме крови и снижению эффективности, что также должно быть отмечено в инструкции по применению и ТКФС данного ЛС.

**3. Изучаемое ЛС в качестве ингибитора или индуктора переносчика P-gp**

При тестировании изучаемого ЛС в отношении способности ингибировать/индуцировать P-gp может быть оправданным выбор фексофенадина в качестве субстрата P-gp.

**4. Изучаемое ЛС в качестве субстрата переносчика P-gp**

При тестировании изучаемого ЛС в качестве субстрата P-gp рекомендуется использовать такой сильный ингибитор P-gp, как верапамил.

**D. Путь введения**

Для изучаемого ЛС путь введения обычно должен соответствовать планируемому для использования в клинике. Если разрабатываются как пероральный, так и парентеральный путь введения ЛС, то потребность в исследовании межлекарственного

взаимодействия для нескольких путей введения, чаще всего перорального и парентерального, зависит от наличия у изучаемого ЛС эффекта первого прохождения, который может быть связан с активностью изоферментов цитохрома P-450 стенки и транспортеров кишечника. Если для изучаемого ЛС в качестве субстрата характерен эффект первого прохождения через печень, то необходимо изучение межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации и транспортеров как при его пероральном, так и парентеральном введении. Для ЛС-субстратов и взаимодействующих ЛС (ингибиторов/индукторов), использующихся в качестве «маркеров», путь введения будет зависеть от доступных на рынке форм выпуска данных ЛС, хотя предпочтительным является пероральный путь.

**E. Выбор дозировки**

Исследование *in vivo* должно способствовать максимальной вероятности обнаружения межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации и транспортеров как для субстрата (изучаемого ЛС или «маркера»), так и для взаимо-

действующего ЛС (ингибитора/индуктора) (изучаемого ЛС или «маркерного» ингибитора). По этой причине мы рекомендуем использовать максимальную планируемую или одобренную дозировку и наиболее короткий интервал между введением последующих доз ЛС (в качестве ингибиторов или индукторов). Например, при использовании кетоконазола в качестве ингибитора СУРЗА дозировка 400 мг в день является более предпочтительной по сравнению с более низкими дозировками. В некоторых случаях, из соображений безопасности, для ЛС-субстратов могут быть рекомендованы более низкие дозы, чем те, которые используются в клинике. В таких случаях, любые ограничения чувствительности исследования *in vivo* для обнаружения межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации и транспортеров вследствие использования более низких доз ЛС должны обсуждаться заказчиком исследования в протоколе и отчете об исследовании.

#### **Ф. Конечные точки**

Изменения фармакокинетических параметров могут быть использованы для оценки клинической значимости межлекарственных взаимодействий на уровне биотрансформации и транспортеров. Интерпретация результатов, полученных в ходе этих исследований, будет облегчаться, если они будут дополнены изучением изменения фармакодинамики ЛС (по возможности). Примером могут служить измерения МНО (при исследовании взаимодействия варфарина с другими ЛС на уровне биотрансформации).

##### **1. Фармакокинетические конечные точки**

В ходе каждого исследования *in vivo* должны быть получены следующие фармакокинетические параметры ЛС-субстрата (изучаемого ЛС или «маркера»): площадь под фармакокинетической кривой – АУС, максимальная концентрация –  $C_{max}$ , вре-

мя достижения  $C_{max}$  –  $T_{max}$ , общий клиренс, объем распределения и периоды полувыведения ( $T_{1/2}$ ). В некоторых случаях эти параметры также могут быть интересны и для взаимодействующего ЛС (ингибитора/индуктора), особенно в случаях, если в исследовании оцениваются возможные влияния на оба исследуемых ЛС. Дополнительные измерения могут помочь в исследованиях равновесного состояния (например, минимальной и максимальной равновесной концентрации) для демонстрации того, что стратегии дозирования были адекватно подобраны для достижения состояния, близкого к равновесному, до и во время взаимодействия (см. раздел IV, А. «Дизайн исследования»). Частота забора образцов должна быть адекватной для обеспечения точного определения соответствующих фармакокинетических показателей самого ЛС и его активных метаболитов (при их наличии). Для ЛС-субстрата, вне зависимости от того, является ли он изучаемым ЛС или «маркером», важным является определение активных метаболитов (при их наличии).

##### **2. Фармакодинамические конечные точки**

Фармакокинетические показатели обычно являются достаточными для исследований межлекарственного взаимодействия на уровне биотрансформации и транспортеров, хотя фармакодинамические показатели могут иногда дать полезную дополнительную информацию. Определение фармакодинамических показателей показано, если взаимосвязь фармакокинетики и фармакодинамики для интересующих конечных точек ЛС-субстрата не выяснена, или если фармакодинамические изменения происходят не только вследствие фармакокинетических, но и фармакодинамических взаимодействий (например, аддитивное влияние хинидина и трициклических антидепрессантов на интервал QT).

### Г. Размеры образца и статистические расчеты

Статистическая значимость различий фармакокинетических и фармакодинамических параметров ЛС-субстрата (изучаемого ЛС или «маркера») до и после взаимодействия должна быть оценена с помощью непараметрических статистических методов, так как в большинстве случаев полученные данные не соответствуют нормальному распределению. В случае если исследование *in vivo* было перекрестным, рекомендуется использовать парный критерий Вилкоксона, а при параллельном дизайне – метод Манна-Уитни. Различия необходимо расценивать как статически значимые при  $p < 0,05$ .

### В. ВНЕСЕНИЕ ИНФОРМАЦИИ О РЕЗУЛЬТАТАХ ИССЛЕДОВАНИЙ *IN VIVO* И *IN VITRO* В ИНСТРУКЦИЮ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ЛС И ТКФС

Очень важно, чтобы вся информация, полученная в результате исследований биотрансформации и транспортеров *in vitro* и

*in vivo*, была отражена в инструкции по применению ЛС и ТКФС.

Информация о результатах исследований *in vitro* и *in vivo*, в которых изучаемое ЛС выступало в качестве субстрата, должна быть размещена в разделе «Фармакокинетика» (табл. 4).

Если в результате исследований *in vitro* и *in vivo* обнаружено, что изучаемое ЛС является «чувствительным» субстратом или ЛС-субстратом с узким терапевтическим диапазоном того или иного изофермента цитохрома Р-450, то в разделе «Взаимодействие» инструкции по применению ЛС и ТКФС необходимо указать, что его применение с сильными или умеренными ингибиторами приводит к повышению его концентрации в плазме крови и развитию НЛР. При этом необходимо перечислить ЛС, относящиеся к сильным и умеренным ингибиторам данного изофермента цитохрома Р-450 (табл. 3), список которых эксперты Росздравнадзора должны обновлять ежегодно, внося изменения в инструкции по применению ЛС и ТКФС при очередной регистрации ЛС. В этом разделе также не-

Таблица 4

#### Формулировка информации о результатах исследований *in vitro* и *in vivo*, в которых изучаемое ЛС выступало в качестве субстрата, для раздела «Фармакокинетика» инструкции по применению ЛС или ТКФС

Результат исследования <i>in vitro</i>	Результат исследования <i>in vivo</i>	Формулировка
Не является субстратом	Не проводилось	«В исследовании <i>in vitro</i> показано, что ЛС не является субстратом изоферментов цитохрома Р-450» (рекомендуется перечислить каких)
Является субстратом определенного изофермента цитохрома Р-450	Не является субстратом изофермента цитохрома Р-450, для которого в исследовании <i>in vivo</i> был получен положительный результат	«В исследовании <i>in vitro</i> показано, что ЛС является субстратом данного изофермента цитохрома Р-450 (указывается какого), однако в исследовании <i>in vivo</i> обнаружено, что данный изофермент цитохрома Р-450 не вносит значительного вклада в биотрансформацию ЛС»
Является субстратом определенного изофермента цитохрома Р-450	Является субстратом определенного изофермента цитохрома Р-450	«В исследовании <i>in vitro</i> показано, что ЛС является субстратом данного цитохрома Р-450 (указывается какого) и в исследовании <i>in vivo</i> подтверждено, что ЛС в значительной степени метаболизируется данным изоферментом цитохрома Р-450»

обходимо указать, что применение ЛС, являющегося «чувствительным» субстратом или ЛС-субстратом с узким терапевтическим диапазоном того или иного изофермента цитохрома Р-450, с индукторами данного изофермента может приводить к снижению его концентрации и ослаблению фармакологических эффектов.

Если в результате исследований *in vitro* и *in vivo* обнаружено, что изучаемое ЛС является сильным или умеренным ингибитором того или иного изофермента цитохрома Р-450, то в разделе «Взаимодействие» инструкции по применению ЛС и ТКФС необходимо указать, что его применение с ЛС, являющимися «чувствительными» субстратами или ЛС-субстратом с узким терапевтическим диапазоном (табл. 2), приводит к повышению концентрации этих ЛС в плазме крови и развитию НЛР. При этом необходимо перечислить ЛС, относящиеся к «чувствительным» субстратам и ЛС-субстратам с узким терапевтическим диапазоном данного изофермента цитохрома Р-450 (табл. 2). Также необходимо указать потенциальную возможность повышать концентрацию других ЛС-субстратов данного изофермента при их совместном применении, без перечисления конкретных ЛС. Если изучаемое ЛС по результатам исследований *in vitro* и *in vivo* показало себя как слабый ингибитор того или иного изофермента цитохрома Р-450, то в инструкции по применению ЛС и ТКФС в разделе «Взаимодействие» необходимо указать этот факт, а также потенциальную возможность повышать концентрацию ЛС-субстратов данного изофермента при их совместном применении без перечисления конкретных ЛС.

Если в результате исследований *in vitro* и *in vivo* обнаружено, что изучаемое ЛС является индуктором того или иного изофермента цитохрома Р-450, то в разделе «Взаимодействие» инструкции по применению ЛС и ТКФС необходимо указать, что его применение с ЛС, являющимися «чувствительными» субстратами и ЛС-субстратами

с узким терапевтическим диапазоном (табл. 2), приводит к снижению концентрации этих ЛС в плазме крови и ослаблению фармакологических эффектов.

Список сильных и умеренных ингибиторов, а также «чувствительных» субстратов и ЛС-субстратов с узким терапевтическим диапазоном изоферментов цитохрома Р-450 (табл. 2, 3) эксперты Росздравнадзора должны обновлять ежегодно, в соответствии с чем, при очередной перерегистрации ЛС, должны вноситься изменения в инструкции по применению ЛС и ТКФС.

Информация, относящаяся к клиническим последствиям (развитие НЛР или ослабление фармакологических эффектов), не должна помещаться с детальным описанием более чем в один раздел инструкции по применению ЛС и ТКФС. В случае если в результате исследований *in vivo* разработаны рекомендации по изменению дозирования изучаемого ЛС, противопоказания или предупреждения (например, избегать совместного введения), то эта информация должна быть размещена в соответствующих разделах инструкции по применению ЛС и ТКФС: «Режим дозирования», «Противопоказания» и «Особые указания».

Аналогичным образом вносится информация в инструкции по применению ЛС и ТКФС и по результатам исследований *in vivo* и *in vitro* транспортеров, и в частности Р-gr.

### Литература

1. Федеральный закон от 22 июня 1998 г. № 86-ФЗ «О лекарственных средствах» (с изменениями от 2 января 2000 г., 30 декабря 2001 г., 10 января, 30 июня 2003 г., 22 августа, 29 декабря 2004 г.) // [http://www.medtran.ru/rus/trials/gov/zakon\\_86.htm](http://www.medtran.ru/rus/trials/gov/zakon_86.htm)
2. Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, and Implications for Dosing and Labeling // <http://www.fda.gov/cder/guidance/6695dft.htm>

**DRAFT RECOMMENDATIONS FOR STUDYING BIOTRANSFORMATION AND DRUG  
TRANSPORTERS: STUDY DESIGN, DATA ANALYSIS AND ENTERING INFORMATION  
INTO APPLICATION INSTRUCTIONS**

**D.A. Sychev, V.G. Kukes, N.N. Karkischenko**

*Branch «Clinical pharmacology» SC BMT Russian Academy of Medical Science,  
Institute of Clinical Pharmacology FGU «NC ESMP»*

Obviously, doctors need information on possible drug interactions that should be included in the application instructions and typical pharmacological clause. To obtain this information, it is necessary to carry out studies of biotransformation and drug transporters *in vivo* and *in vitro*. These draft recommendations present the methodology of such studies, approaches to the analysis of results and principles of stating them in the drug application instructions and typical pharmacological clause. The recommendations developed are harmonized with similar recommendations of the Food and Drug Administration (FDA).

**Keywords:** drug biotransformation, P-450, glycoprotein-P, induction, inhibition.



## Гематологические показатели свободных от патогенной флоры крыс CD (SPRAGUE-DAWLEY) и мышей CD-1 в норме

И.Н. Кравченко, О.Н. Хохлова, Н.Н. Кравченко, А.Н. Пужалин,  
И.А. Дьяченко, А.Н. Мурашев

Филиал института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина  
и Ю.А. Овчинникова РАН, Пуцино

Гематологические показатели лабораторных животных, измеренные в разных лабораториях разными исследователями, существенно отличаются. По-видимому, эта разница обусловлена различными влияниями внешней среды, зависит от способа, момента и места взятия крови, пищевого режима, возраста животного и других факторов. Для получения достоверных и воспроизводимых результатов в исследованиях необходимы стандартные условия содержания животных, поэтому вопросам содержания экспериментальных животных в настоящее время уделяется очень большое внимание. Суммированы гематологические показатели крыс CD (*Sprague-Dawley*) и мышей CD-1 категории СПФ (свободных от патогенной флоры), которые содержались в стандартных условиях, рекомендуемых для содержания лабораторных грызунов. Показано, что лабораторные животные, содержащиеся в разных лабораториях в одинаковых стандартных условиях, имеют сравнимый диапазон гематологических показателей.

**Ключевые слова:** кровь, костный мозг, крысы, мыши.

Из всех видов животных наиболее часто в биомедицинских исследованиях используются мышь (*Mus musculus*) и крыса (*Rattus norvegicus*) (67% и 21% соответственно) [12, 14]. Эти виды являются основными объектами доклинических испытаний для установления безопасности потенциальных лекарственных препаратов. Для оценки токсичности новых фармакологических препаратов необходимо комплексное исследование функциональных и морфологических показателей периферической крови и костного мозга экспериментальных животных. Однако в справочной литературе имеется мало данных по гематологии крыс и мышей, и разные авторы приводят различные величины [1, 2, 3, 5, 11]. Кроме того, публикуемые в отечественной литературе данные в основном относятся к животным с неконтролируемым

статусом (генетическим, микробиологическим), содержащихся в вивариях с большой вариацией условий содержания и параметров микроклимата. Однако, в соответствии с международными и российскими правилами проведения доклинических испытаний, экспериментальные животные должны быть обеспечены стандартными условиями содержания, быть здоровыми и обладать определенным генетическим и микробиологическим статусом [7, 13]. Использование лабораторных грызунов категории СПФ снижает вариабельность изучаемых показателей и обеспечивает воспроизводимость и достоверность результатов.

**Целью** данной работы было обобщение результатов гематологических тестов, выполненных в лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН во время проведения доклинических испытаний на крысах

и мышах с 2003 по 2007 год для выведения референс-значений для показателей крови и костного мозга здоровых животных.

### Материал и методы

Лаборатория имеет международную аккредитацию AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care International), подтверждающую высокое качество работы с лабораторными животными. Все манипуляции, проводимые на животных, были рассмотрены и одобрены Институтской комиссией по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных.

Данные, включенные в эту публикацию, были получены на контрольных группах крыс CD ( $n = 116$ ) и мышей CD-1 ( $n = 124$ ), участвовавших в исследованиях по выявлению субхронической токсичности или специфической активности различных препаратов. Возраст крыс составил 1-1,5 месяцев и 2-5 месяцев (половозрелые), возраст мышей – 2-3 месяца. В мировой практике аутбредные линии CD (*Sprague Dawley*) и CD-1 наиболее часто используются в испытаниях общей токсичности веществ. Животные были получены из НПП «Питомник лабораторных животных» Филиала института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН и имели статус СПФ, подтверждаемый сертификатом производителя. В «Питомник лабораторных животных» ядра животных поступали из Charles River Laboratories (USA) в 2001 и 2006 гг.

Все исследования проводились согласно «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации» [6] и стандартным операционным процедурам лаборатории.

Контрольные животные получали растворитель согласно способу и режиму введения исследуемых веществ опытным животным: внутривенные инъекции физиологического раствора в хвостовую вену или питьевую воду зондом в желудок. Животных содержали в комнатах барьерного типа

с контролируемыми условиями окружающей среды: температура 18-26 °С, относительная влажность 30-70%, автоматическая смена 12-часового светового периода, 100%-ное вентилирование. Условия содержания соответствуют стандартам, указанным в руководстве The Guide for Care and Use of Laboratory Animals [15]. Животные содержались в поликарбонатных клетках на подстиле из резаной пищевой бумаги, получали автоклавированный стандартный экструдированный корм Агро-1 (Ассортиментагро, Россия) и профильтрованную водопроводную воду. Во время исследования мышей содержали по одному животному в клетке площадью 364 см<sup>2</sup>, крыс – по 5 животных в клетке площадью 1815 см<sup>2</sup>.

Животных лишали корма на ночь перед сбором крови, оставляя свободный доступ к воде. Массу тела определяли непосредственно перед взятием крови. Забор крови проводили из нижней полой вены, предварительно подвергая животных анестезии в CO<sub>2</sub> камере. Гематологические показатели определяли на автоматическом анализаторе Serono Baker System 9010+. Для подсчета лейкоцитарной формулы на окрашенных мазках крови использовали аппаратно-программный комплекс МЕКОС-Ц1 с программой МЕКОС-АМК. Суспензию клеток костного мозга получали из бедренной кости стандартной методикой промывания [9], клеточный состав костного мозга анализировали на мазках, окрашенных по Паппенгейму (идентифицируя не менее 500 клеток). Содержание ретикулоцитов определяли методом суправитальной окраски бриллиантовым крезиловым синим в пробирках [4].

Для всех данных была применена описательная статистика: подсчитаны среднее значение (Mean) и стандартная ошибка среднего (SEM), которые вместе со значением  $n$ , минимальным (Min) и максимальным (Max) значениями представлены в итоговых таблицах. Данные по крысам суммированы согласно двум возрастным кате-

гориям животных. Для определения достоверности отличий между возрастными группами применялся тест Mann-Whitney. Статистический анализ проводился программой Statistica-7.0.

### Результаты и обсуждение

Масса тела крыс возрастом 1-1,5 месяцев составила  $239 \pm 4$  г (самцы) и  $177 \pm 4$  г (самки), возрастом 2-5 месяцев –  $334 \pm 10$  г (самцы) и  $206 \pm 4$  г (самки); масса тела мышей возрастом 2-3 месяцев составила  $36,1 \pm 0,3$  г (самцы) и  $27,7 \pm 0,3$  г (самки).

Как видно из полученных результатов, есть некоторые различия в содержании форменных элементов у молодых (1-1,5 месяцев) и половозрелых (2-5 месяцев) самок и самцов крыс CD (см. табл. 1 и 2). Так, у животных обоего пола с достижением половозрелости достоверно растет количество эритроцитов в периферической крови при уменьшении среднего объема эритроцита (MCV) и среднего содержания гемоглобина в эритроците (MCH). При этом уровень гемоглобина и средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC) остаются практически неизменными. Кроме того, у взрослых животных обоего пола с увеличением возраста снижается количество тромбоцитов крови, а у самок несколько снижается абсолютное содержание лимфоцитов. Следует отметить, что близкие диапазоны показателей крови и аналогичные тенденции в их изменении с возрастом прослеживаются и у крыс CD питомника Charles River Laboratories [10], где животные также содержатся в стандартных условиях.

Известно, что количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов зависит от различных влияний внешней среды, способа, момента и места взятия крови, пищевого режима, возраста животного и других факторов [2, 3]. Так, в крови, взятой из различных участков сосудистого русла, находится далеко не одинаковое количество форменных элементов, особенно лейкоцитов [5]. Кроме того, у конвенциональных живот-

ных, содержащихся в неконтролируемых условиях окружающей среды, часто присутствуют клинические и субклинические формы инфекций и паразитарные инвазии, которые, несомненно, влияют на экспериментальные данные [5, 8]. По-видимому, игнорирование исследователями всех или части этих факторов является основной причиной такой широкой вариации гематологических показателей лабораторных животных, приводимых разными авторами [1, 2, 3, 5, 11]. Следует отметить, что в наших исследованиях мы не наблюдали выраженных сезонных вариаций в содержании форменных элементов крови у лабораторных животных. Не приводится никаких данных о биоритмических изменениях картины крови и у животных питомника Charles River Laboratories [10]. По-видимому, содержание животных в условиях искусственной смены 12-часового светового периода сводит влияние сезонных биоритмов к минимуму. Таким образом, максимально возможная стандартизация экспериментальных условий, применяемая в наших исследованиях: использование категорийных животных, постоянные условия окружающей среды, стандартное выполнение манипуляций с животными – способствует максимальному снижению влияния нежелательных факторов на получаемые данные, обеспечивая их воспроизводимость.

В связи с тем, что диаметр эритроцита у мышей несколько меньше, чем у крыс, показатели красной крови у мышей отличаются от таковых у крыс в сторону увеличения количества эритроцитов, гематокрита и уменьшения среднего объема эритроцита (MCV) и среднего содержания гемоглобина в эритроците (MCH) (табл. 5). Как и крысы, мыши имеют лимфоцитарный профиль крови [5], но у мышей абсолютное содержание лимфоцитов в периферической крови несколько меньше, чем у крыс.

Картина крови тесным образом зависит от функционального состояния органов

кроветворения и отражает в той или иной степени изменения, происходящие в гемопоэтической системе. Поэтому для правильного истолкования картины крови большое значение имеет анализ клеточного состава костного мозга. Микроскопический анализ мазков костного мозга необходимо проводить в доклинических токсикологических исследованиях для определения потенциальной гематотоксичности новых лекарственных препаратов. По данным разных авторов, клеточный состав костного мозга крыс и мышей сильно варьирует [2, 9, 11]. По-видимому, результаты зависят от способа получения костного мозга, приготовления мазка и количества анализируемых клеток. В любом случае мазок должен быть приготовлен не позже чем через 2-3 минуты после смерти животного, поскольку клетки костного мозга очень чувствительны и клеточная смерть наступает быстро [9].

Клеточный состав костного мозга крыс CD и мышей CD-1 представлен в таблицах 3, 4 и 6. Миелограмма молодых и половозрелых крыс несколько отличается: с достижением половозрелого возраста доля гранулоцитов у крыс возрастает, а относительное количество лимфоцитов снижается; лейкоэритробластическое соотношение у самцов с возрастом практически не меняется, у самок немного уменьшается (по

данным разных авторов лейкоэритробластическое соотношение в норме у крыс составляет 1,07-1,93 [9]). У мышей CD-1 в составе костного мозга не наблюдается существенных межполовых различий (табл. 6); высокое содержание гранулоцитов и лимфоцитов обуславливает более высокое, чем у крыс, лейкоэритробластическое соотношение.

### **Выводы**

Получены ориентировочные ожидаемые величины показателей крови и костного мозга здоровых животных аутбредных линий крыс CD и мышей CD-1 категории СПФ, содержащихся в стандартных условиях. Показано, что лабораторные животные, содержащиеся в разных лабораториях в одинаковых стандартных условиях, имеют сравнимый, воспроизводимый диапазон гематологических показателей, которые не зависят от сезонных биоритмов. Выявлены отличия клеточного состава периферической крови и костного мозга крыс разных возрастных диапазонов: 1-1,5 и 2-5 месяцев, что важно учитывать при оценке результатов каждого конкретного исследования. Гематологические данные, приведенные в данной статье, помогут исследователям разных лабораторий правильно интерпретировать результаты своих исследований.

Таблица 1

Показатели периферической крови крыс CD (возраст 1–1,5 мес.)

Показатель	n	Mean	SEM	Min	Max
Самцы					
Количество эритроцитов, 10 <sup>6</sup> /мкл	10	7,06	0,10	6,65	7,62
Концентрация гемоглобина, г/дл	10	15,9	0,2	14,9	17,3
Гематокрит, %	10	45,4	0,7	42,5	50,1
Средний объем эритроцита (MCV), фл	10	64,3	0,5	61,4	66,8
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	10	22,5	0,2	21,2	23,5
Концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), %	10	34,9	0,2	34,0	35,8
Количество тромбоцитов, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	1217	67	700	1429
Количество лейкоцитов, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	12,1	0,6	8,7	15,6
Нейтрофилы палочкоядерные, %	10	1,2	0,3	0,0	3,0
Нейтрофилы палочкоядерные, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	0,2	0,0	0,0	0,4
Нейтрофилы сегментоядерные, %	10	4,8	0,6	2,0	8,0
Нейтрофилы сегментоядерные, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	0,6	0,1	0,2	0,9
Эозинофилы, %	10	0,2	0,2	0,0	2,0
Эозинофилы, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	0,0	0,0	0,0	0,2
Базофилы, %	10	0,0	0,0	0,0	0,0
Базофилы, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	0,0	0,0	0,0	0,0
Моноциты, %	10	4,9	0,7	2,0	9,0
Моноциты, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	0,6	0,1	0,2	1,4
Лимфоциты, %	10	88,9	0,9	86,0	93,0
Лимфоциты, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	10,7	0,5	7,5	13,4
Самки					
Количество эритроцитов, 10 <sup>6</sup> /мкл	10	6,98	0,11	6,40	7,52
Концентрация гемоглобина, г/дл	10	15,6	0,2	14,3	16,8
Гематокрит, %	10	44,4	0,7	40,5	47,7
Средний объем эритроцита (MCV), фл	10	63,6	0,3	62,0	65,3
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	10	22,4	0,2	21,2	23,3
Концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), %	10	35,2	0,2	33,8	36,5
Количество тромбоцитов, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	1290	56	1043	1610
Количество лейкоцитов, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	13,7	1,4	7,2	19,2
Нейтрофилы палочкоядерные, %	10	2,0	0,3	1,0	3,0
Нейтрофилы палочкоядерные, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	0,3	0,0	0,1	0,5
Нейтрофилы сегментоядерные, %	10	2,2	0,7	0,0	7,0
Нейтрофилы сегментоядерные, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	0,2	0,1	0,0	0,6
Эозинофилы, %	10	0,2	0,1	0,0	1,0
Эозинофилы, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	0,0	0,0	0,0	0,2
Базофилы, %	10	0,4	0,2	0,0	1,0
Базофилы, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	0,1	0,0	0,0	0,2
Моноциты, %	10	3,5	0,7	0,0	7,0
Моноциты, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	0,4	0,1	0,0	0,7
Лимфоциты, %	10	91,7	1,4	84,0	98,0
Лимфоциты, 10 <sup>3</sup> /мкл	10	12,7	1,4	6,0	18,6

**Обозначения:** n – количество животных, Mean – среднее значение, SEM – стандартная ошибка среднего, Min и Max – минимальное и максимальное значения показателей.

Таблица 2  
Показатели периферической крови крыс CD (возраст 2–5 мес.)

Показатель	n	Mean	SEM	Min	Max
Самцы					
Количество эритроцитов, $10^6$ /мкл	51	7,85 *	0,10	6,17	9,10
Концентрация гемоглобина, г/дл	51	16,1	0,1	13,2	17,6
Гематокрит, %	40	46,1	0,5	39,3	52,2
Средний объем эритроцита (MCV), фл	41	59,2*	0,7	49,1	69,9
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	51	20,6*	0,2	16,8	24,3
Концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), %	41	34,9	0,3	30,2	39,9
Количество тромбоцитов, $10^3$ /мкл	41	1038*	22	789	1363
Количество ретикулоцитов, %	30	2,3	0,1	1,2	3,5
Количество лейкоцитов, $10^3$ /мкл	51	12,1	0,5	5,2	19,0
Нейтрофилы палочкоядерные, %	44	1,6	0,2	0,0	5,0
Нейтрофилы палочкоядерные, $10^3$ /мкл	44	0,2*	0,0	0,0	0,5
Нейтрофилы сегментоядерные, %	45	8,7*	0,8	1,0	23,0
Нейтрофилы сегментоядерные, $10^3$ /мкл	45	1,0	0,1	0,1	2,5
Эозинофилы, %	43	0,4	0,1	0,0	3,0
Эозинофилы, $10^3$ /мкл	43	0,0	0,0	0,0	0,3
Базофилы, %	45	0,1*	0,0	0,0	1,0
Базофилы, $10^3$ /мкл	45	0,0*	0,0	0,0	0,2
Моноциты, %	43	4,1	0,3	1,0	9,0
Моноциты, $10^3$ /мкл	43	0,5	0,0	0,1	1,0
Лимфоциты, %	45	84,2*	1,1	67,0	97,0
Лимфоциты, $10^3$ /мкл	45	10,0	0,5	4,4	16,9
Самки					
Количество эритроцитов, $10^6$ /мкл	45	7,50 <sup>∇</sup>	0,11	6,00	9,00
Концентрация гемоглобина, г/дл	45	15,5	0,2	12,8	17,7
Гематокрит, %	35	43,3	0,6	36,1	49,9
Средний объем эритроцита (MCV), фл	35	58,4 <sup>∇</sup>	0,6	51,9	65,3
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	45	20,8 <sup>∇</sup>	0,3	17,2	25,0
Концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), %	35	35,8	0,4	30,1	40,7
Количество тромбоцитов, $10^3$ /мкл	35	1068 <sup>∇</sup>	29	737	1460
Количество ретикулоцитов, %	30	2,1	0,1	1,3	2,8
Количество лейкоцитов, $10^3$ /мкл	44	10,2 <sup>∇</sup>	0,6	3,9	21,2
Нейтрофилы палочкоядерные, %	45	1,6	0,2	0,0	5,0
Нейтрофилы палочкоядерные, $10^3$ /мкл	45	0,2 <sup>∇</sup>	0,0	0,0	0,9
Нейтрофилы сегментоядерные, %	45	7,3 <sup>∇</sup>	0,6	2,0	19,0
Нейтрофилы сегментоядерные, $10^3$ /мкл	45	0,7 <sup>∇</sup>	0,1	0,1	2,1
Эозинофилы, %	45	0,4	0,1	0,0	2,0
Эозинофилы, $10^3$ /мкл	45	0,0	0,0	0,0	0,2
Базофилы, %	45	0,1	0,0	0,0	1,0
Базофилы, $10^3$ /мкл	45	0,0	0,0	0,0	0,2
Моноциты, %	45	3,6	0,4	0,0	9,0
Моноциты, $10^3$ /мкл	45	0,4	0,0	0,0	1,6
Лимфоциты, %	45	87,0 <sup>∇</sup>	0,9	69,0	98,0
Лимфоциты, $10^3$ /мкл	44	8,8 <sup>∇</sup>	0,6	3,5	18,4

\*  $p < 0,05$  относительно самцов возрастом 1–1,5 мес. по тесту Mann-Whitney.∇  $p < 0,05$  относительно самок возрастом 1–1,5 мес. по тесту Mann-Whitney.

Таблица 3

Морфологический состав костного мозга крыс CD (возраст 1-1,5 мес.)

Показатель	n	Mean	SEM	Min	Max
Самцы					
Недифференцированные бласты, %	10	0,2	0,0	0,0	0,4
Все гранулоциты, %	10	38,9	1,0	35,0	44,4
Нейтрофильные промиелоциты, %	10	1,6	0,2	1,0	3,0
Нейтрофильные миелоциты, %	10	4,0	0,3	3,0	6,0
Нейтрофильные метамиелоциты, %	10	7,0	0,4	4,0	9,0
Нейтрофилы палочкоядерные, %	10	16,7	0,8	12,0	20,0
Нейтрофилы сегментоядерные, %	10	5,0	0,4	3,0	8,0
Эозинофилы (всех генераций), %	10	4,1	0,3	3,0	6,0
Базофилы (всех генераций), %	10	0,5	0,1	0,0	1,0
Все эритрокарициты, %	10	38,5	0,8	33,0	42,0
Лимфоциты, %	10	20,8	0,9	16,0	25,0
Моноциты, %	10	1,3	0,2	0,6	2,0
Плазматические клетки, %	10	0,3	0,1	0,0	0,6
Ретикулярные клетки, %	10	0,1	0,0	0,0	0,4
Лейкоэритробластическое соотношение	10	1,59	0,06	1,4	2,0
Индекс созревания нейтрофилов	10	0,59	0,03	0,4	0,8
Самки					
Недифференцированные бласты, %	10	0,3	0,0	0,2	0,4
Все гранулоциты, %	10	46,2	1,7	38,0	55,0
Нейтрофильные промиелоциты, %	10	1,1	0,1	1,0	2,0
Нейтрофильные миелоциты, %	10	5,5	0,3	4,0	7,0
Нейтрофильные метамиелоциты, %	10	9,0	0,4	7,0	11,0
Нейтрофилы палочкоядерные, %	10	20,8	1,0	14,0	25,0
Нейтрофилы сегментоядерные, %	10	2,9	0,5	1,0	6,0
Эозинофилы (всех генераций), %	10	6,1	0,6	4,0	10,0
Базофилы (всех генераций), %	10	0,8	0,1	0,4	1,0
Все эритрокарициты, %	10	29,2	0,8	24,0	32,0
Лимфоциты, %	10	23,4	1,2	18,0	28,0
Моноциты, %	10	0,7	0,1	0,4	1,0
Плазматические клетки, %	10	0,2	0,0	0,0	0,4
Ретикулярные клетки, %	10	0,1	0,0	0,0	0,2
Лейкоэритробластическое соотношение	10	2,43	0,12	2,1	3,1
Индекс созревания нейтрофилов	10	0,68	0,04	0,5	0,9

Таблица 4  
Морфологический состав костного мозга крыс CD (возраст 2–5 мес.)

Показатель	n	Mean	SEM	Min	Max
Самцы					
Недифференцированные бласты, %	20	0,2	0,0	0,2	0,2
Все гранулоциты, %	20	52,3*	0,8	44,8	58,0
Нейтрофильные промиелоциты, %	20	1,4	0,1	1,0	2,0
Нейтрофильные миелоциты, %	20	4,9*	0,2	3,0	6,0
Нейтрофильные метамиелоциты, %	20	12,3*	0,3	10,0	15,0
Нейтрофилы палочкоядерные, %	20	19,1*	0,5	15,0	24,0
Нейтрофилы сегментоядерные, %	20	8,9*	0,5	5,0	13,0
Эозинофилы (всех генераций), %	20	5,1*	0,2	3,0	6,0
Базофилы (всех генераций), %	20	0,8*	0,1	0,4	2,0
Все эритрокарициты, %	20	37,5	0,7	30,0	43,0
Лимфоциты, %	20	7,5*	0,2	6,0	9,0
Моноциты, %	20	0,7*	0,0	0,4	1,0
Плазматические клетки, %	20	0,7*	0,1	0,0	1,0
Ретикулярные клетки, %	20	0,6*	0,0	0,4	1,0
Лейкоэритробластическое соотношение	20	1,63	0,05	1,3	2,2
Индекс созревания нейтрофилов	20	0,67	0,02	0,5	0,8
Самки					
Недифференцированные бласты, %	20	0,2	0,0	0,2	0,4
Все гранулоциты, %	20	52,9 <sup>~</sup>	0,9	45,4	61,0
Нейтрофильные промиелоциты, %	20	1,6 <sup>~</sup>	0,2	1,0	3,0
Нейтрофильные миелоциты, %	20	4,8	0,2	4,0	7,0
Нейтрофильные метамиелоциты, %	20	12,2 <sup>~</sup>	0,4	10,0	15,0
Нейтрофилы палочкоядерные, %	20	19,0	0,6	14,0	27,0
Нейтрофилы сегментоядерные, %	20	9,2 <sup>~</sup>	0,7	4,0	14,0
Эозинофилы (всех генераций), %	20	5,4	0,3	2,0	7,0
Базофилы (всех генераций), %	20	0,9	0,1	0,4	2,0
Все эритрокарициты, %	20	35,3 <sup>~</sup>	1,1	27,0	43,0
Лимфоциты, %	20	8,9 <sup>~</sup>	0,6	7,0	18,0
Моноциты, %	20	0,9 <sup>~</sup>	0,1	0,4	2,0
Плазматические клетки, %	20	0,8 <sup>~</sup>	0,1	0,0	2,0
Ретикулярные клетки, %	20	0,9 <sup>~</sup>	0,1	0,4	2,0
Лейкоэритробластическое соотношение	20	1,83 <sup>~</sup>	0,09	1,3	2,6
Индекс созревания нейтрофилов	20	0,67	0,02	0,5	0,9

\*  $p < 0,05$  относительно самцов возрастом 1–1,5 мес. по тесту Mann-Whitney.

<sup>~</sup>  $p < 0,05$  относительно самок возрастом 1–1,5 мес. по тесту Mann-Whitney.

Показатели периферической крови мышей CD-1 (возраст 2–3 мес.)

Показатель	n	Mean	SEM	Min	Max
Самцы					
Количество эритроцитов, 10 <sup>6</sup> /мкл	57	9,10	0,11	7,32	10,81
Концентрация гемоглобина, г/дл	56	15,7	0,3	4,5	18,5
Гематокрит, %	54	51,0	0,6	41,6	61,7
Средний объем эритроцита (MCV), фл	54	56,1	0,6	35,6	64,0
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	56	17,5	0,2	14,4	20,0
Концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), %	53	31,0	0,3	26,2	36,2
Количество тромбоцитов, 10 <sup>3</sup> /мкл	53	1275	29	866	1770
Количество ретикулоцитов, %	9	2,6	0,2	1,8	3,3
Количество лейкоцитов, 10 <sup>3</sup> /мкл	53	7,6	0,4	2,9	16,2
Нейтрофилы палочкоядерные, %	61	3,7	0,4	0,0	13,0
Нейтрофилы палочкоядерные, 10 <sup>3</sup> /мкл	55	0,2	0,0	0,0	0,8
Нейтрофилы сегментоядерные, %	61	8,8	0,7	0,0	21,0
Нейтрофилы сегментоядерные, 10 <sup>3</sup> /мкл	54	0,7	0,1	0,0	2,1
Эозинофилы, %	62	1,5	0,2	0,0	7,0
Эозинофилы, 10 <sup>3</sup> /мкл	55	0,1	0,0	0,0	0,9
Базофилы, %	60	0,2	0,1	0,0	1,0
Базофилы, 10 <sup>3</sup> /мкл	54	0,0	0,0	0,0	0,2
Моноциты, %	63	3,1	0,3	0,0	8,0
Моноциты, 10 <sup>3</sup> /мкл	56	0,2	0,0	0,0	1,3
Лимфоциты, %	62	81,9	1,1	59,0	96,0
Лимфоциты, 10 <sup>3</sup> /мкл	52	5,9	0,4	1,1	15,2
Самки					
Количество эритроцитов, 10 <sup>6</sup> /мкл	61	8,97	0,12	6,36	10,68
Концентрация гемоглобина, г/дл	61	15,7	0,2	12,0	18,2
Гематокрит, %	58	50,1	0,5	39,6	57,0
Средний объем эритроцита (MCV), фл	58	56,4	0,5	49,2	65,4
Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	61	17,5	0,2	15,2	23,3
Концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), %	58	31,2	0,4	24,9	36,3
Количество тромбоцитов, 10 <sup>3</sup> /мкл	57	1073	29	612	1509
Количество ретикулоцитов, %	10	2,0	0,3	0,7	4,3
Количество лейкоцитов, 10 <sup>3</sup> /мкл	56	9,0	0,5	2,1	18,3
Нейтрофилы палочкоядерные, %	53	3,1	0,3	0,0	7,0
Нейтрофилы палочкоядерные, 10 <sup>3</sup> /мкл	50	0,2	0,0	0,0	0,8
Нейтрофилы сегментоядерные, %	55	9,5	0,8	1,0	25,0
Нейтрофилы сегментоядерные, 10 <sup>3</sup> /мкл	50	0,7	0,1	0,1	2,0
Эозинофилы, %	54	1,9	0,3	0,0	7,0
Эозинофилы, 10 <sup>3</sup> /мкл	49	0,1	0,0	0,0	0,6
Базофилы, %	53	0,1	0,0	0,0	1,0
Базофилы, 10 <sup>3</sup> /мкл	49	0,0	0,0	0,0	0,1
Моноциты, %	55	3,4	0,3	0,0	9,0
Моноциты, 10 <sup>3</sup> /мкл	51	0,3	0,0	0,0	0,8
Лимфоциты, %	54	82,0	0,9	63,0	95,0
Лимфоциты, 10 <sup>3</sup> /мкл	50	6,4	0,4	1,7	13,2

Таблица 6  
Морфологический состав костного мозга мышей CD-1 (возраст 2–3 мес.)

Показатель	n	Mean	SEM	Min	Max
Самцы					
Недифференцированные бласты, %	55	0,3	0,0	0,0	0,6
Все гранулоциты, %	55	56,8	0,7	39,0	66,0
Нейтрофильные промиелоциты, %	55	1,2	0,1	0,6	2,0
Нейтрофильные миелоциты, %	55	5,5	0,3	2,0	12,0
Нейтрофильные метамиелоциты, %	55	11,6	0,3	6,0	17,0
Нейтрофилы палочкоядерные, %	55	27,1	0,4	20,0	33,0
Нейтрофилы сегментоядерные, %	55	6,9	0,5	1,0	15,0
Эозинофилы (всех генераций), %	55	5,7	1,2	2,0	69,0
Базофилы (всех генераций), %	55	0,1	0,0	0,0	0,4
Все эритрокарициты, %	55	23,0	0,6	14,0	33,0
Лимфоциты, %	55	18,5	0,8	8,0	32,0
Моноциты, %	55	1,3	0,1	0,4	4,0
Плазматические клетки, %	55	0,1	0,0	0,0	0,4
Ретикулярные клетки, %	55	0,2	0,0	0,0	0,4
Лейкоэритробластическое соотношение	55	3,50	0,13	2,0	6,1
Индекс созревания нейтрофилов	55	0,54	0,02	0,3	0,8
Самки					
Недифференцированные бласты, %	49	0,2	0,0	0,0	0,4
Все гранулоциты, %	49	55,7	0,6	46,8	63,8
Нейтрофильные промиелоциты, %	49	1,1	0,1	0,0	3,0
Нейтрофильные миелоциты, %	49	4,4	0,2	2,0	10,0
Нейтрофильные метамиелоциты, %	49	10,7	0,4	6,0	17,0
Нейтрофилы палочкоядерные, %	49	27,0	0,4	21,0	33,0
Нейтрофилы сегментоядерные, %	49	7,3	0,5	1,0	17,0
Эозинофилы (всех генераций), %	49	5,0	0,3	1,0	10,0
Базофилы (всех генераций), %	49	0,0	0,0	0,0	0,2
Все эритрокарициты, %	49	23,1	0,8	14,0	40,0
Лимфоциты, %	49	20,1	0,9	6,0	31,0
Моноциты, %	49	1,0	0,0	0,0	2,0
Плазматические клетки, %	49	0,1	0,0	0,0	0,8
Ретикулярные клетки, %	49	0,1	0,0	0,0	0,4
Лейкоэритробластическое соотношение	49	3,58	0,15	1,5	6,1
Индекс созревания нейтрофилов	49	0,49	0,02	0,3	1,0

### Литература

1. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. – М., 2003.
2. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – Киев: Вища школа, 1983.
3. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2004.
4. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е., Долгов В.В. Лабораторная гематология. – Москва 2002.
5. Никитин В.Н. Атлас клеток крови сельскохозяйственных и лабораторных животных. – М., 1949.
6. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации».
7. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М., 2005.
8. Baker, D.G. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research // *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:231-266, 1998.
9. Bolliger A.P. Cytologic evaluation of bone marrow in rats: indications, methods, and normal morphology // *Vet. Clin. Path.*, vol.33. No. 2, pp.58-67, 2004.
10. Charles River Laboratories. Clinical Laboratory Parameters for CrI:CD(SD) Rats. March, 2006. Internet resource (February, 2008): [http://www.criver.com/flex\\_content\\_area/documents/rm\\_rm\\_r\\_clinical\\_parameters\\_cd\\_rat\\_06.pdf](http://www.criver.com/flex_content_area/documents/rm_rm_r_clinical_parameters_cd_rat_06.pdf)
11. Criswell K.A., Bleavins M.R., Zielinski D., et al. Comparison of flow cytometric and manual bone marrow differentials in Wistar rats // *Cytometry*, vol. 32, pp.18-27, 1998.
12. Krinke G.J. The Laboratory Rat. – Academic Press, 2000.
13. OECD Principles of Good Laboratory Practice. ENV/MC/CHEM(98)17 // *Environment Directorate Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris, 1998.*
14. Suckow M.A., Danneman P., Brayton C. The Laboratory Mouse. – CRC Press, Boca Raton, FL, 2001.
15. The Guide for Care and Use of Laboratory Animals. – LAR publication, National Academy Press, 1996.

### HEMATOLOGICAL CHARACTERS OF NORMAL SPECIFIC PATHOGEN-FREE CD (SPRAGUE-DAWLEY) RATS AND CD-1 MICE

I.N. Kravchenko, O.N. Khokhlova, N.N. Kravchenko, A.N. Puzhalin,  
I.A. Dyachenko, A.N. Murashev

*Branch of Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Pushchino*

Hematological characters of laboratory animals measured in different laboratories by different investigators are varied essentially. Apparently, this difference is caused by various influences of environment, depends on the way, moment and a place of blood sampling, dietary, animal age and some other factors. Standard conditions of animals maintenance are necessary for valid and reproducible research data, therefore much attention now is given to the experimental animals care and use. This paper summarizes hematological characters of CD (*Sprague-Dawley*) rats and CD-1 mice which had SPF-status (specific pathogen-free) and were housed in standard conditions recommended for laboratory rodents maintenance. It is shown, that laboratory animals housed at different facilities but in the same standard conditions have comparable range of hematological characters.

**Key words:** blood, bone marrow, rats, mice.

## Экономическая эффективность развития лабораторного животноводства в филиале «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН

Е.Л. Матвеевко, Л.Г. Дубакина, К.В. Афонин

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

В связи с курсом государственной политики России на существенное повышение качества жизни граждан особое значение приобретают отрасли, связанные с медициной и фармакологией. Лабораторное животноводство играет значительную роль в развитии биологии, медицины, фармакологии. Приведены показатели экономической эффективности развития лабораторного животноводства в динамике по филиалу «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН. Показаны возможные пути повышения экономической эффективности производства.

**Ключевые слова:** лабораторное животноводство, экономическая эффективность.

Основной целью, ключевым вопросом государственной политики России является существенное повышение качества жизни ее граждан. В связи с этим были разработаны национальные проекты, внутри которых выявлены приоритетные направления, обозначены параметры и главные мероприятия по их реализации. Основными направлениями повышения благосостояния граждан были определены здравоохранение, образование и жилье.

Летом 2006 года был издан Указ Президента Российской Федерации об образовании Федерального агентства по высокотехнологической медицинской помощи. Планируется сделать высокие медицинские технологии в кардиохирургии, онкологии, травматологии, ряде других важнейших областях, и прежде всего при лечении детей максимально доступными. Число граждан, которым за счет федерального бюджета будет оказана высокотехнологическая медицинская помощь, должно вырасти к 2008 году не менее чем в четыре раза.

Но все эти широкомасштабные мероприятия невозможны без развития медицинской, биологической и биомедицинской науки и медицинской и фармацевтической промышленности. Эти направления не только являются составной частью национального проекта «Здравоохранение», но и

социально-значимыми отраслями народного хозяйства, от состояния которых зависит национальная безопасность страны, здоровье нации. Биомедицина включает в себя научные принципы живых систем в медико-биологических и клинических направлениях и технологиях развития методов и средств для изучения здоровья и предупреждения нездоровья человека.

Биомедицинские исследования необходимы на стадиях разработки новых лекарственных средств, изучения физиологических и патологических состояний. На животных контролируется токсический, канцерогенный и мутагенный эффекты физических и химических факторов современного производства и возможных загрязнений природы. В связи с этим в задачи лабораторного животноводства входит не только разведение достаточного количества животных, но и выведение новых линий и стоксов в соответствии с запросами медиков, фармакологов, токсикологов.

За последние двадцать лет в лабораторном животноводстве произошли существенные изменения, в том числе экономические, и, отнюдь, не в лучшую сторону. В частности, если в 1970-х гг. в системе Академии медицинских наук СССР было десять питомников по разведению лабораторных животных для экспериментальной

работы и учебных целей, то в 2006 г. их количество сократилось вдвое, а объем производимых ими животных в десятки раз. Рассмотрим эти процессы на примере филиала «Андреевка» ГУ Научный центр биомедицинских технологий РАМН, расположенного в Московской области.

В 1970-е годы филиал представлял собой экономически хорошо развитое прибыльное хозяйство, которое поставляло лабораторных животных в учреждения Академии медицинских наук и Министерства здравоохранения СССР. Основными видами животных являлись кролики, морские свинки, белые крысы, белые мыши, линейные и гибридные мыши. В 2000 г. разведение кроликов было прекращено в виду их невостребованности. Показатели рентабельности производства приведены в табл. 1. Такой разброс рентабельности производства по годам можно объяснить следующими причинами: сокращением объемов научных исследований, отсутствием четкого плана реализации, высокой себестоимостью производства лабораторных животных. Хотя, по

данным таблицы, наглядно видна и положительная тенденция. С 2000 г. стало уделяться больше внимания развитию научных исследований, и, как следствие, в питомнике стала снижаться убыточность, а затем и появилась прибыль от реализации лабораторных животных.

Эти факты подтверждаются также динамикой реализации лабораторных животных (рис. 1). С 1990 г. до 1999 г. общее количество реализованных животных существенно снизилось, в том числе в 4,5 раза по нелинейным мышам, в 6 раз – по морским свинкам, почти в 8 раз – по нелинейным крысам, в 36 раз – по линейным мышам и гибридам. До 1990 г. реализация продукции производилась в учреждения Академии медицинских наук и Министерство здравоохранения СССР, в 1994 году стали поступать заказы и от Российской академии наук, с 1998 года – от предприятий иммунобиологического профиля (далее Медбиопром). При этом в общем объеме реализации наблюдаются два пика в 1997 и 2001 гг. В 1997 г. рост по сравнению с пре-

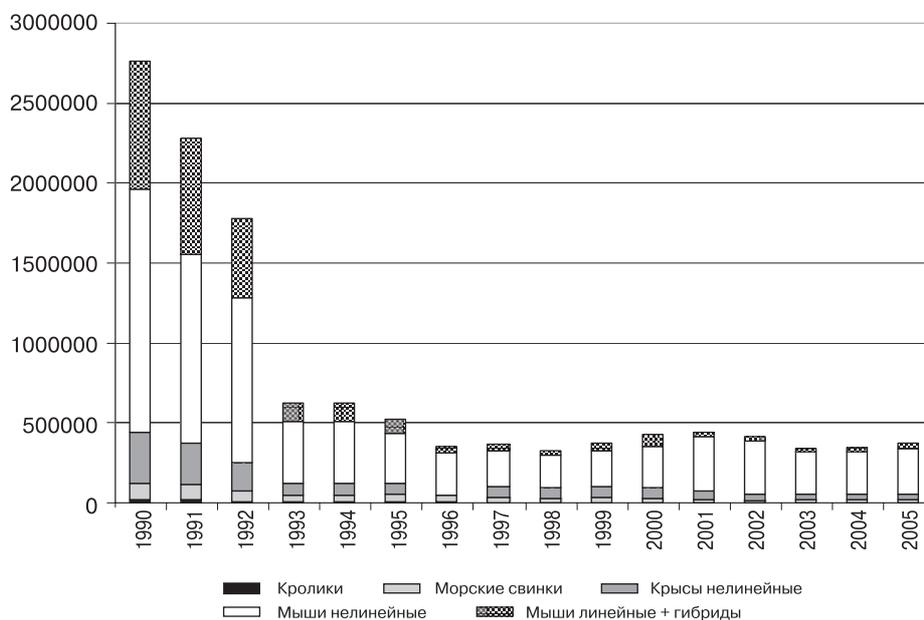


Рис. 1. Динамика реализации лабораторных животных в филиале «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН (голов)

дыдущим годом составил почти 20% по нелинейным мышам, несколько меньше по другим видам животных, а в 2001 г. – реализация линейных и гибридных мышей возросла на 30%, что повысило общий уровень реализации на 3,5%. Тенденция к росту реализации животных сохраняется и в настоящее время.

На рис. 2 показана прибыль (убыток) от реализации лабораторных животных в филиале «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН. При сравнении рисунков 1 и 2 хорошо видно, что, если в 2001 году начинается стабильный рост реализации лабораторных животных в целом по питомнику, то с 2002 года производство начинает давать прибыль. По уравнению линии тренда (рис. 2) можно рассчитать возможные прибыли на перспективу. Можно с уверенностью сказать, что при сохранении наметившихся тенденций можно планировать повышение прибыльности производства и обеспечения гарантированного производства необходимого количества животных хорошего качества.

Структура реализации животных по отдельным видам потребителей показана на рис. 3. Реализация заказчикам также существенно варьирует по годам как по общему количеству животных, так и в структурном отношении. Проблема заключается в том, что никогда не существовало точных планов реализации животных заказчикам. Хозяйство получало только примерные заявки от

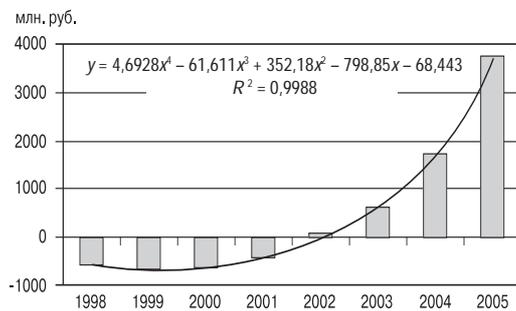


Рис. 2. Прибыль (убыток) от реализации лабораторных животных в филиале «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН

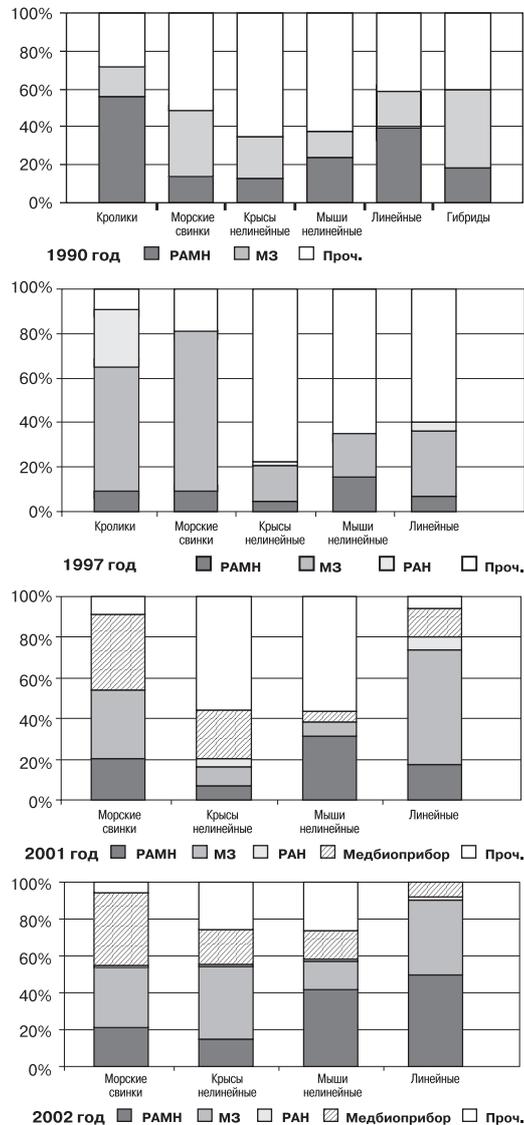


Рис. 3. Структура реализации животных по различным заказчикам

различных учреждений, которые точно выполнялись в плане разведения необходимых видов и линий животных, но заказчик имел право не забирать выращенных животных, если его планы научной и учебной работы изменились. В 2002 г. были отменены даже такие планы-заявки, что поставило хозяйство в еще более неопределенные рамки по планированию своей работы.



В графу прочие потребители входит реализация учреждениям, имеющим другое подчинение, а также реализация выбракованных животных в зоопарк и другие нужды. Выбраковка животных осуществляется по ветеринарным, зоогигиеническим требованиям, а также в силу особенностей экспериментальной работы. Для сопоставимости полученных в эксперименте результатов часто требуется отбирать животных определенного вида или конкретной линии, по возрасту, весу, полу. Таким образом, выращенных животных, не подходящих для экспериментальной работы, но вполне здоровых и качественных, приходится отбраковывать из-за невострребованности в данный момент времени.

Производство лабораторных животных является весьма затратным. В структуре прямых затрат основными статьями являются зарплата с начислениями, корма и отопление. Эти три статьи в сумме дают более 70% прямых затрат на производство лабораторных животных. Такое соотношение затрат непосредственно связано с особенностями производства. Животные для экспериментов должны иметь сертификат качества и выращиваться при соблюдении технологии содержания и кормления. Все животные содержатся в регламентированных санитарно-гигиенических условиях при постоянной температуре и влажности, в хорошо проветриваемых помещениях. Корма, получаемые животными должны быть определенного качества, специально приготовленные по каждому из видов животных. Поэтому стоимость кормов определяется их высоким качеством и специальной сбалансированностью по макро- и микроэлементам. Высоки затраты на отопление, так как животноводческие помещения отапливаются в зависимости от погодных условий. Питомники лабораторных животных имеют свои собственные котельные, обеспечивающие необходимый температурный режим в животноводческих помещениях. Доставка животных к потре-

бителю производится собственным автотранспортом филиала в специальных транспортных клетках.

При анализе данных таблицы 2 можно обратить внимание на отрицательные значения по статье «Амортизация» в 2003 г. Это не ошибка и не опечатка. Отрицательные значения связаны с тем, что в 2002 г. были внесены изменения в ведение бухгалтерской отчетности по лабораторному животноводству в бюджетных предприятиях, а именно, с упразднением начисления амортизации. Поэтому в 2003 году амортизация была пересчитана и возвращена хозяйству, а в 2005 г. статья «Амортизация» была вновь введена в отчетность. В структуре затрат по видам животных больших отличий не наблюдается, хотя затраты на корма по морским свинкам несколько выше, чем по мышам и крысам различных видов, что связано с особенностями данного вида животных. Затраты на зарплату и содержание примерно одинаковы, выбраковка ведется по одним и тем же принципам.

Особые требования предъявляются к персоналу, работающему с животными. Специалист в лабораторном животноводстве должен быть одновременно и зоотехником, и биологом, и генетиком, и гигиенистом, и инженером. В филиале «Андреевка» ГУ НЦБМТ РАМН при общей численности сотрудников, работающих с животными, в 100 человек, 8 специалистов имеют высшее и один — среднее специальное образование (фельдшер). Такое распределение обусловлено наличием в питомнике 5 цехов по производству животных. Работу по производству животных координирует главный зоотехник питомника в сотрудничестве с главным ветеринарным врачом. В каждом цехе работает зоотехник, также имеются 3 ветеринарных врача и ветеринарный фельдшер. Качество реализуемых животных отвечает всем предъявляемым требованиям. Все сотрудники, непосредственно обслуживающие животных, и специалисты практически всю жизнь про-

работали на одном месте и имеют очень высокую квалификацию. Общий стаж работы по специальности составляет от 14 до 55 лет, в том числе в филиале — от 14 до 53 лет. Рабочие в цехах также практически всю свою жизнь проработали на одном месте, знают все особенности содержания животных, могут обеспечить требования к кормлению, содержанию и разведению.

Таким образом, анализ динамики основных показателей эффективности разведения лабораторных животных позволяет предложить следующие меры по повышению эффективности производства. Во-первых, необходимо четкое государственное регулирование масштабов производства лабораторных животных, что может быть сделано доведением точных планов реализации лабораторных животных в определенные научные и учебные заведения системы РАМН и Минздравсоцразвития. Во-вторых, необходимо увеличивать общие объемы производства животных, так как

большое производство всегда рентабельнее мелкого. В-третьих, необходимо укрепление материально-технической базы питомника, что возможно только при выделении достаточного финансирования на проведение работ.

### Литература

1. Каркищенко Н.Н. Основы биомоделирования. — М.: Изд-во ВПК, 607 с., 2004.
2. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 1. Основы биомедицины и фармако-моделирования. — М.: Изд-во ВПК, 340 с., 2007.
3. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармако-токсикологии. — М.: Изд-во ВПК, 448 с., 2007.
4. Festing M.F.W. Inbred Strains in Biomedical Research // *ATLA* 26, 283-301, 2002.
5. Festing M.F.W. Good experimental design and statistics can save animals, but how can it be promoted? // *ATLA*, vol. 32, suppl. 1A, pp. 133-136, 2004.

## COST EFFICIENCY OF LABORATORY ANIMALS HUSBANDRY IN THE BRANCH «ANDREEVKA» OF THE RESEARCH CENTER FOR BIOMEDICAL TECHNOLOGIES

E.L.Matveenko, L.G.Dubakina, K.V.Afonin

*Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

In the context of state policy to increase essentially the population life quality the branches connected with medicine and pharmacology becomes very important. Laboratory animals husbandry plays the significant role in biology, medicine and pharmacology. The data of cost efficiency of laboratory animals husbandry in the branch «Andreevka» of Research Center for Biomedical Technologies is presented. Some methods for increasing production economic efficiency are also shown.

**Key words:** laboratory animals husbandry, cost efficiency.



## Нелинейные мыши Kv:SHK как адекватная модель для исследования эффекта противораковых препаратов (пилотный опыт с альфа-аманитином)

Н.Н. Вейко, А.М. Малашенко, Е.В. Соколова, Н.Л. Тишкина

*Медико-генетический научный центр РАМН, Москва*

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

Выполнено исследование противораковых свойств малых доз известного токсина бледной поганки, ингибитора РНК-полимеразы II – альфа аманитина. Установлено, что мыши стока Kv:SHK являются удобной моделью для исследования противораковых средств, аманитин тормозит рост опухолей молочных желез.

**Ключевые слова:** неинбредные мыши Kv:SHK, рак молочных желез, аманитин.

Лабораторные мыши более века являются основным объектом для изучения проблем онкологии: от поиска противораковых средств до исследования причин возникновения опухолей. Наибольший вклад в знания о природе и закономерностях канцерогенеза был получен благодаря выведению высококорковых инбредных линий мышей, затем конгенно-резистентных и в настоящее время – трансгенных и нокаутных. Продолжается выведение новых линий как моделей для тестирования потенциальных противораковых средств [6]. В современных исследованиях канцерогенеза неинбредные мыши практически не используются.

Испытание противораковых препаратов на инбредных и новых линиях мышей требует существенных затрат времени и средств, так как спонтанные опухоли возникают у мышей в возрасте одного года и старше. Работа с перевиваемыми опухолями более эффективна, но в любом случае исследователь имеет дело с одним уникальным генотипом. В то же время известно, что и мыши и люди обладают разной гене-

тической предрасположенностью к опухолеобразованию, разной чувствительностью к онкогенным вирусам и химическим препаратам. Следовательно, эффект противоракового препарата, установленный на млекопитающих одного генотипа, требуется подтвердить в дополнительных опытах с другими линиями.

Предположили, что для первых опытов по оценке противораковых препаратов целесообразно использовать неинбредных мышей популяции Kv:SHK, размножаемых в филиале НЦБМТ «Андреевка». Эта популяция является наиболее изученной генетически [4, 5], самки подвержены к спонтанному образованию опухолей молочных желез (ОМЖ) с высокой частотой [1]. Технология разведения этих животных и размер популяции (в настоящее время число размножающихся самок более 8 тысяч) позволяют к моменту выведения самок из размножения в возрасте 8 месяцев набирать необходимое количество самок с опухолями.

**Материал и методы.** Мыши этой популяции генетически гетерогенны, полиморфны по ряду маркерных генов и генов ком-

плекса гистосовместимости Н-2, оказывающих влияние на чувствительность к вирусам ММТВ, аналогично человеческой популяции [6]. У мышей Kv:SHK найдены гаплотипы Н-2 – *a, d, f*, определяющие чувствительность к ММТВ, и гаплотип *h*, относительно резистентный. Большинство мышей имеет генотип *b/x*, где *x* – неидентифицированный рекомбинантный аллель [4, 5]. Популяция существует как закрытая с 1961 года, мыши для ее создания были закуплены в ЧССР в конце 50-х годов и находятся в генетическом равновесии.

Для первого опыта были отобраны самки в возрасте 8 месяцев с ОМЖ, размер (диаметр) которых варьировал от 5 до 15 мм. Две подопытные и контрольные группы состояли из 10 самок, которые были размещены по 5 голов в стандартные пластиковые клетки с автопоилками. Как и в основном стаде, кормление производили, гранулированным комбикормом ПК-120. Токсин альфа-аманитин (АМ) давался в питьевой воде, исходя из нормы потребления воды мышью и стремления создать в организме концентрацию АМ, которая в культуре клеток проявляла бы определенный биологический эффект.

Токсин АМ – самый ядовитый токсин гриба бледная поганка (*Amanita falloides*), смертельная доза для человека 20–30 мг [2]. Основной мишенью этого токсина в клетке является фермент РНК-полимераза II [8]. Ранее в работах Д.М. Спитковского и сотр. [7] было установлено, что очень малые дозы аманитина, которые не ингибируют РНК-полимеразу II, тем не менее, вызывают перемещение центромерных локусов хромосом в G0-лимфоцитах человека. Эта реакция клетки является необходимым этапом в процессе репарации разрывов ДНК по механизму гомологичной рекомбинации. Было показано, что при мутациях в генах BRCA1 и BRCA2, ассоциированных

с наследственным раком молочной железы у человека, перемещение локусов хромосом в ответ на повреждения в ДНК отсутствует. Однако малые дозы АМ способны индуцировать эту реакцию в клетках больных с мутациями в указанных генах, которые принимают участие в репарации разрывов ДНК, то есть частично восстановить нарушенную функцию. На основании приведенных выше фактов, Д.М. Спитковский высказал предположение, что малые, нетоксичные для организма дозы аманитина могут препятствовать росту опухоли.

**Результаты.** В таблице дана продолжительность жизни самок в опыте, который длился пять месяцев. Эти данные являются иллюстративными, поэтому статистическая обработка результатов, полученных на малых выборках, не выполнялась. Измерение опухолей производили один раз в месяц, поэтому данные о размерах и темпах роста не совсем точны, так как не измеряли опухоли у погибших до осмотра мышей. Тем не менее, к третьему месяцу наблюдения заметна разница средней величины ОМЖ подопытных групп (21–23 мм) и контрольной (42 мм), в которой в это время осталось 3 живые мыши с ОМЖ. Через три месяца в контроле погибли все мыши с ОМЖ, мыши, получавшие раствор токсина, жили дольше

**Выживаемость самок мышей Kv:SHK с опухолями молочных желез в опытах с альфа-аманитином**

Время потребления АМ, месяцы	Количество живых опухоленосителей		
	Доза токсина, нг/день*		
	0,42	4,2	0 (контроль)
0	10	10	10
1	9	10	9
2	7	7	5
3	7	4	2
4	3	4	0
5	1	2	0
6	1	1	0

\* В предположении, что одна мышь выпивает в день 8 мл воды с концентрацией АМ 0,53 нг/мл или 0,053 нг/мл.

на 1-2 месяца. Следовательно, раствор АМ, примененный в крайне низких дозах, замедлил рост опухолей. Следует отметить, что в каждой подопытной группе было по 1 мыши, а в контроле – 2 мыши, у которых произошла регрессия опухолей. Вероятно, это обусловлено относительной резистентностью этих животных к ММТВ.

Результаты пилотного эксперимента требуют подтверждения с использованием больших выборок животных и более точным контролем темпа роста ОМЖ, но на два вопроса получен положительный ответ. Во-первых, популяция мышей Kv:SHK – удобный и стабильный источник животных с ОМЖ для испытания противораковых средств; во-вторых, препарат АМ в малых дозах оказывает тормозящее действие на рост опухолей и, следовательно, заслуживает более глубокого изучения.

#### Литература

1. Бунто Т.В., Обухова Л.К. Частота злокачественных преобразований и продолжительность жизни нелинейных мышей SHK и мышей линии СЗНА // *Материалы конференции «Использование лабораторных животных в разработке, производстве и контроле биологических медицинских препаратов»*, с.209-210, 1976.
2. Горленко М.В. Ядовитые грибы рода Аманита // В кн. «Жизнь растений». – М.: Просвещение, с. 277-278, 1976.
3. Клепиков Н.Н., Хрусталева С.А. Линейные мыши в онкологических исследованиях // *Вестник АМН СССР*, №9, с. 43-51, 1983.
4. Крышкина В.П., Малашенко А.М. Генетическая изменчивость белых нелинейных мышей // *Генетика*, т.8, № 11, с. 76-82, 1972.
5. Крышкина В.П., Бландова З.К. Стабильность генетической структуры рамдомбредных мышей колонии SHK по комплексу генов H-2 // *Генетика*, т.13, № 11, с.1955-1959, 1977.
6. Крюкова И.Н. О возможности участия ретровирусов в индукции рака молочных желез человека // В кн. «Канцерогенез» – М.: Медицина, с.351-361, 2004.
7. Спитковский Д.М., Вейко Н.Н., Моисеева О.С., Ермаков А.В., Терехов С.М. Структурные преобразования хроматина как процесс его самоорганизации в клетках эукариот и проблема репарации ДНК // *Радиационная биология. Радиоэкология*, т.45, № 5, с. 517-534, 2005.
8. Lindell T.J., Weinberg F., Morris T.V., Roeder R.G., Rutter G.V. Specific inhibition of nuclear RNA polymerase II by alpha-amanitin // *Science*, v. 170, p. 447-449.

#### NON-INBRED MICE KV:SHK AS AN ADEQUATE MODEL FOR STUDY OF ANTICARCINOGENIC PREPARATIONS EFFECT (PILOT EXPERIMENTS WITH $\alpha$ -AMANITIN)

N.N.Veiko, A.M.Malashenko, E.V.Sokolova, N.L.Tishkina

*Research Centre for Medical Genetics RAMS*

*Research Centre for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

The studies of anticancer properties of  $\alpha$ -Amanitin in very small quantities were done. Noninbred mice Kv:SHK are a convenient biological model for studying anticancer agents. Amanitin inhibits the growth of mammary glands tumours.

**Key words:** noninbred mice Kv:SHK, tumours of mammary glands,  $\alpha$ -Amanitin.



## Сравнение частот встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *G1846A* гена *CYP2D6* в трех этнических группах Чукотского АО

Р.Е. Казаков, И.В. Игнатьев, И.Э. Коман, Д.А. Сычев, В.Г. Кулес

*Филиал «Клиническая фармакология» ГУ НЦ БМТ РАМН, Москва*

*Институт клинической фармакологии ФГУ НЦ ЭСМП Росздрава, Москва*

Аллель *1846A* гена *CYP2D6* (*CYP2D6\*4*) является фактором риска возникновения нежелательных лекарственных реакций при применении лекарственных средств, являющихся субстратами изофермента цитохрома P450 2D6 (*CYP2D6*), включая в-адреноблокаторы и психотропные препараты. Нами определены частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *G1846A* в трех этнических группах Чукотского АО: русских, чукчей и эвенов. Знание межэтнических различий клинически значимых аллельных вариантов, помимо теоретического интереса, может применяться при разработке региональных рекомендаций по применению лекарственных средств.

**Ключевые слова:** цитохром P450 2D6, *CYP2D6*, *G1846A*, фармакогенетика.

Изучение генетических особенностей человека, определяющих индивидуальный фармакологический ответ, является первоочередной задачей клинической фармакогенетики. Учет таких особенностей позволяет в ряде случаев индивидуализировано подойти к выбору лекарственных средств (ЛС) и режимов их дозирования, что способствует повышению эффективности и снижению риска развития нежелательных лекарственных реакций (НЛР). В первую очередь перспективными объектами исследования являются гены, контролирующие синтез и работу ферментов метаболизма ЛС, в частности изоферментов цитохрома P450, и других ферментов I и II фаз биотрансформации [1, 2, 3, 4].

Изофермент 2D6 цитохрома P450 (*CYP2D6*) участвует в метаболизме более 20% всех известных лекарственных средств, в том числе амитриптилина, амфетамина, кодеина, карведилола, фенацетина, галоперидола, метадона и других.

Субстратами *CYP2D6* также являются многие психотропные ЛС, включая все трициклические антидепрессанты, некоторые нейрорептики, опиаты, ряд ингибиторов обратного захвата серотонина [7].

Информация, полученная в ходе исследования этнических особенностей в распределении частот аллелей и генотипов клинически значимых полиморфных маркеров, имеет прогностическую ценность, является основой для разработки и внедрения алгоритмов назначения ЛС в соответствии с индивидуальным генотипом пациента, позволяет заранее оценить масштабы позитивного эффекта генетических тестов с учетом этнических особенностей населения регионов России.

В настоящей статье представлены результаты исследования частот встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *G1846A* гена *CYP2D6* в трех этнических группах Чукотского АО: русских, чукчей и эвенов. Обнаруженные различия в

их распределении должны учитываться при разработке и внедрении в медицинскую практику фармакогенетических тестов.

### Материал и методы

Генетическому обследованию было подвергнуто 262 человека, относящихся к трем этническим группам (83 чукчей, 53 эвена и 126 русских). Возраст испытуемых от 10 до 16 лет.

ДНК из крови выделяли стандартным фенольным методом с модификациями [8].

ПЦР проводили в термоциклере Терцик («ДНК-Технология», Россия) с использованием Таq-полимеразы («СибЭнзим», Россия) в буфере производителя. Подобранный эмпирически температура отжига составила 55°C; концентрация хлорида магния в амплификационной смеси – 2мМ. Дизайн праймеров проводился с использованием программы Windows 32 PrimerSelect 4.05©1993-2000 DNSTAR Inc.

Последовательность праймеров реакции:

C2D6-1-F1 3' CGGGAGACCAGGGGGAGCATAGG -5'  
C2D6-1-R1 3'- GACCGTTGGGGCGAAAGGGGGT-5'

Идентификация аллелей осуществлялась методом ПЦР-ПДРФ (полимеразная цепная реакция – полиморфизм длин рестриционных фрагментов). Амплифицированный фрагмент ДНК длиной 358 пар нуклеотидов затем подвергался рестрикции (рестриктаза PspN4I, «СибЭнзим», Россия) в течение ночи при температуре 37°C в буфере производителя. Сайт узнавания рестриктазы – GGN<sup>^</sup>NCC. При расщеплении аллеля G образовывались фрагменты длиной 116, 220 и 22 п.н. соответственно. В случае аллеля А присутствовали только фрагменты 116 и 243 п.н. Результаты рестрикции анализировали с помощью электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле. Визуализацию результатов проводили в ультрафиолетовом свете (312 нм) после окрашивания раствором бромистого этидия.

### Результаты и обсуждение

Результаты измерения частот встречаемости аллеля 1846A гена CYP2D6 трех этнических групп Чукотского АО приведены на рис. 1.

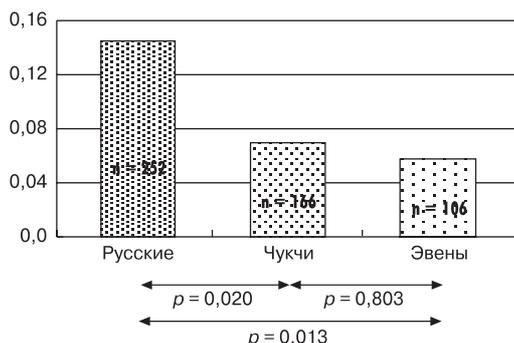


Рис. 1. Сравнение частот встречаемости аллеля 1846A гена CYP2D6 (CYP2D6\*4) в трех этнических группах Чукотского АО

У русских среди 252 проанализированных аллелей полиморфного маркера G1846A гена CYP2D6 частота встречаемости аллеля 1846A составляла 15%, а частота встречаемости аллеля 1846G, соответственно, 85%. У чукчей из 166 аллелей частота встречаемости аллеля 1846A была 7%, (1846G – 93%). У эвенов среди 106 аллелей частота встречаемости аллеля 1846A была 6%, (1846G – 94%).

Нами установлено, что частота встречаемости аллеля 1846A достоверно различается у русских, проживающих в Чукотском АО, и у представителей коренного населения региона (чукчей и эвенов;  $p = 0,020$  и  $p = 0,013$ , соответственно). Частоты встречаемости аллеля 1846A у чукчей и эвенов достоверно не различаются ( $p = 0,803$ ).

На рис. 2 представлено распределение генотипов трех этнических выборок. Видно, что по распределению генотипов чукчи и эвены также не имеют существенных отличий друг от друга: носителями генотипа 1846GG были 86% чукчей и 89% эвенов, носителями гетерозиготного генотипа 1846GA были 14% чукчей и 11% эвенов. В группе

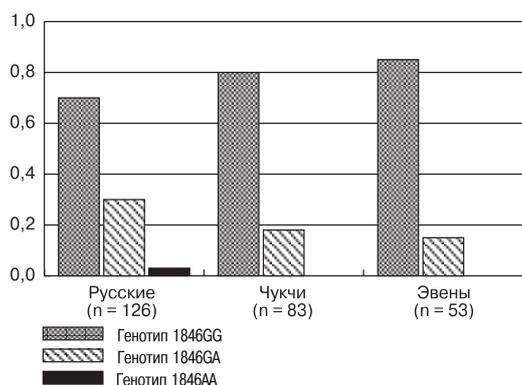


Рис. 2. Сравнение частот встречаемости генотипов полиморфного маркера *G1846A* гена *CYP2D6* в трех этнических группах Чукотского АО

русских, имеющих, как сказано выше, достоверно большую частоту аллеля *1846A*, реже встречается генотип *1846GG* – у 71% лиц, и чаще встречается генотип *1846GA* – у 29% лиц. Редкий генотип *1846AA*, не обнаруженный у чукчей и эвенов, был встречен, в единственном числе, в выборке русских и поэтому не рассматривается при анализе. Распределение генотипов достоверно не отличалось от соотношения Харди-Вайнберга.

К настоящему моменту в литературе описано более 70 аллелей и аллельных вариантов<sup>1</sup> гена *CYP2D6* [5]. Известно, что нуклеотидная замена *1846G>A* на границе третьего интрона и четвертого экзона гена *CYP2D6* приводит к нарушению сплайсинга и, как следствие, к образованию в мРНК одноосновной делеции [10]. Такая делеция вызывает сдвиг рамки считывания, в результате чего образуется усеченный фермент, не обладающий активностью [11]. Поэтому гомозиготы *1846AA* ха-

рактеризуются сниженной интенсивностью метаболизма ЛС-субстратов *CYP2D6* и относятся по фенотипу к группе «медленных» метаболизаторов (poor metabolizers, PM) [9, 12]. У этой категории пациентов повышен риск возникновения НЛР при применении ЛС, являющихся субстратами *CYP2D6*, и они нуждаются в снижении доз данных ЛС (см. табл.).

Сложнее обстоит дело с гетерозиготами *1846AG*, так как их фенотип зависит от второго функционального аллеля. Если второй аллель кодирует полностью функциональный фермент, то у таких лиц обнаруживается нормальная ферментативная активность, и они относятся к фенотипической группе EM (extensive metabolizers). В случае, если второй аллель кодирует фермент, обладающий сниженной активностью, то у таких лиц также могут развиваться НЛР при приеме ЛС – субстратов *CYP2D6*. Они относятся к фенотипической группе IM (intermediate metabolizers) [12].

Так как, по нашим данным, среди населения Чукотского АО присутствуют носители аллеля *1846A* как среди русского населения, так и среди коренного населения, представляется целесообразным разработка и внедрение в регионе определения генотипа *CYP2D6* для индивидуализации применения ЛС-субстратов *CYP2D6*. Кроме того, информация о выявленных межэтнических различиях в частотах встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *G1846A* гена *CYP2D6*, должна быть учтена при разработке регионального формуляра по применению ЛС. Из-за того, что генотип *1846AA*, предполагающий отсутствие ферментативной активности цитохрома *CYP2D6*, встречается редко, особенно у коренного населения, а у гетерозигот активность фермента определяется вторым нормально функционирующим аллелем, то для предсказания фенотипической группы необходимо определять и учитывать влияние других клинически значимых полиморфных маркеров в комплексе.

<sup>1</sup> В литературе в последнее время принято комбинацию аллелей называть «гаплотип»; мы считаем, что это неверно, поскольку гаплотипом можно называть только такие комбинации аллелей, которые наследуются сцепленно, большинство же авторов, использующих данный термин, вообще не рассматривают факт сцепления, поэтому мы используем более корректный термин «аллельный вариант».

**Нежелательные лекарственные реакции, риск которых повышен у «медленных» метаболизаторов по CYP2D6**

<b>Лекарственные средства – субстраты CYP2D6</b>	<b>Нежелательные лекарственные реакции</b>
Метопролол	Бронхоспазм, гипотония, брадикардия, AV-блокада, асистолия
Тимолол (внутриглазное применение)	Системные нежелательные реакции: брадикардия, гипотония, AV-блокада
Дилтиазем	Брадикардия
Флекаинид	Желудочковые тахикардии
Пропафенон	Нейротоксичность, бронхоспазм
Фенформин	Молочнокислый ацидоз
Пропафенон	Нейротоксичность
Тиоридазин	Желудочковая тахикардия по типу «пируэт»
Нортриптилин и другие трициклические антидепрессанты	Гипотония, ажитация, сонливость
Флувоксамин	Гастроинтестинальные нежелательные реакции
Галоперидол	Экстрапирамидные расстройства
Дексфенфлурамин	Тошнота, рвота, головная боль
Симвастатин	Повышение уровня трансаминаз, миалгии
Пергексила малаеат	Гепатотоксичность
Метоклопрамид	Экстрапирамидные расстройства
3,4-метилendioксиметамфетамин (экстази)	Повышение токсичности: нейротоксичность, гипертермии, гиперпролактинемии и др.

Известно, что частота встречаемости аллеля *1846A* (*CYP2D6*\*4) варьирует у разных рас и этносов. У европеоидов она изменяется от 11,6 до 20,7% [6]. В наших исследованиях частота встречаемости аллеля *1846A* у русских (15%) согласуется с литературными данными для европеоидной расы. У азиатской расы данный аллель встречается с меньшей частотой: 0,5% у японцев, 1,2% у китайцев, 2,8% у малайцев [6]. Определенная нами частота встречаемости аллеля *1846A* у чукчей и эвенов (7 и 6%) существенно превышает значения, характерные для большинства азиатских народов. Интересно, что близкие значения частоты встречаемости аллеля *1846A* были обнаружены у инуитов Канады (7,5%) [6].

**Выводы**

Нами определены частоты встречаемости аллелей и генотипов полиморфного маркера *G1846A* в трех этнических группах

Чукотского АО: русских, чукчей и эвенов. Частота встречаемости клинически значимого аллеля *1846A* у двух народов – представителей коренного населения Чукотского АО (чукчей и эвенов), не имела достоверных различий и составляла 7 и 8% соответственно. Частота встречаемости данного аллеля у русских (15%), проживающих в том же регионе, достоверно выше, чем у представителей коренного населения Чукотского АО. В соответствии с этим, в группе русских чаще, чем у представителей коренного населения Чукотского АО, встречается генотип *1846GA* и реже – генотип *1846GG*.

Наличие функционально-дефектного аллеля *1846A* у населения Чукотского АО является предпосылкой для практического применения в регионе фармакогенетических тестов, основанных на определении аллельных вариантов клинически значимых полиморфных маркеров, в том числе

и маркера *G1846A*. Данные тестов позволят осуществлять выбор режима дозирования ЛС – субстратов цитохрома *CYP2D6*.

Частота аллеля *1846A* чукчей и эвенов сильно отличается от частот, характерных для представителей большинства монголоидных народов, населяющих Азию, и близка к значениям, обнаруженным у инуитов Канады.

### Литература

1. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств: клинко-фармакологические аспекты. – М., 2004.
2. Кукес В.Г., Дрожжин А.П., Сычев Д.А. Основы клинической фармакогенетики // В кн. Молекулярная медицина, под ред. Пальцева М.А. – М., 2004.
3. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Гришианова А.Ю. и др. Фармакогенетика и современная медицина // Вестник РАМН, № 3, с. 40-45, 2004.
4. Середенин С.Б. Лекции по фармакогенетике. – М., 2004.
5. Bertilsson L., Dahl M-L., Dalen P. et al. Molecular genetics of *CYP2D6*: clinical relevance with focus on psychotropic drugs // *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 53, 111-122, 2002.
6. Bradford L.D. *CYP2D6* allele frequency in European Caucasians, Asians, Africans and their descendants // *Pharmacogenomics.*, 3(2), 229-243, 2002.
7. Brose K. Differences in interactions of SSRIs // *Int. Clin. Psychopharmacol.*, 13 Suppl., 5., 45-47, 1998.
8. Budowle B., Baechtel F.S. Modifications to improve the effectiveness of restriction fragment length polymorphism // *Appl. Electrophor.*, 1, 181-187, 1990.
9. Chou W-H., Yan F-X., Robbins-Weilert D.K. Comparison of two *CYP2D6* genotyping methods and assessment of genotype-phenotype relationships // *Clinical. Chemistry*, 49(4), 542-551, 2003.
10. Gough A.C., Miles J.S., Spurr N.K. et al. Identification of the primary gene defect at the cytochrome P450 *CYP2D* locus // *Nature*, 347(6295), 773-776, 1990.
11. Hanioka N., Kimura S., Meyer U.A. et al. The human *CYP2D* locus associated with a common genetic defect in drug oxidation: a *G1934A* base change in intron 3 of a mutant *CYP2D6* allele results in an aberrant 3' splice recognition site // *Am. J. Hum. Genet.*, 47(6), 994-1001, 1990.
12. Zanger U.M., Raimundo S., Eichelbaum M. Cytochrome P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 369, 23-37, 2004.

## COMPARISON OF OCCURENCES OF THE ALLELES AND GENOTYPES OF POLYMORPHOUS MARKER *G1846A* OF GENE *CYP2D6* IN THREE ETHNIC GROUPS OF CHUKOTKA

R.E.Kazakov, I.V.Ignatiev, I.E.Koman, D.A.Sychev, V.G.Kukes

Branch « Clinical Pharmacology » SC BMT Russian Academy of Medical Science,  
Institute of Clinical Pharmacology FGU «NC ESMP»

Allele *1846A* of gene *CYP2D6* (*CYP2D6\*4*) is a risk factor of the adverse drug reactions during application of the cytochrome P450 isoform 2D6 (*CYP2D6*) substrata drugs, including adrenoblockers and psychotropic drugs. We have explored the allelic and genotype frequencies of the *G1846A* polymorphism in three ethnic groups of Chukotka – Russians, Chukchians and Evenians. Understanding the interethnic differences of clinically significant allelic variants can be used for working out regional drug references and for theoretical research.

**Key words:** cytochrome P450 2D6, *CYP2D6*, *G1846A*, pharmacogenetics.

## Влияние интерферона на мутагенное и цитотоксическое действие вируса гриппа у белых мышей и их эмбрионов

А.Г. Пирцхелани, Н.А. Пирцхелани, Н.В. Мамаладзе, Г.А. Пирцхелани,  
Н.Г. Джаджанидзе, Г.Д. Капанадзе

*Тбилисский государственный университет, Республика Грузия  
Тбилисский государственный медицинский университет, Республика Грузия  
Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

На лабораторных мышах и их эмбрионах изучено антииммуногенное и антицитотоксическое действия эндогенного интерферона при индукции мутации вирусом гриппа  $A_0/PR_8$ . Однократное и интраназальное введение животным в разные сроки беременности вируса гриппа  $A_0$  вызывает достоверное повышение количества структурных нарушений хромосом, геномных мутаций, патологических митозов, центромерных ассоциаций хромосом и нарушение интерфазных ядер, как у беременных мышей так и их эмбрионов. Хромосомы эмбрионов, как на стадии до имплантации, так и на стадии активного органогенеза, более чувствительны к воздействию вируса гриппа  $A_0$ , чем хромосомы взрослых животных. Эндогенный интерферон в три раза уменьшает частоту мутагенных и цитотоксических эффектов вируса гриппа  $A_0$ .

**Ключевые слова:** вирус гриппа, интерферон, митоз, хромосомы, мыши, эмбрионы.

Среди причин перинотальной заболеваемости и смертности исключительно важное место принадлежит инфекциям беременных, в частности вирусным болезням. Особенно тяжело эти инфекции протекают у эмбрионов и плодов, так как интенсивное клеточное деление создает благоприятную среду для размножения вирусов, которые оказывают выраженное цитопатогенное воздействие на клетки эмбриона, нарушают их генетический аппарат и часто приводят к гибели.

Если проблема перинатальной вирусной инфекции в настоящее время привлекает к себе все большее внимание, то вопрос о влиянии противовирусных препаратов, в том числе и интерферона, на хромосомы эмбрионов при гриппозной инфекции изучен крайне недостаточно. Имеются единичные сведения о влиянии экзогенного интерферона на хромосомы клеток людей, инфицированных вирусом гриппа [15]. Авторы показали, что экзогенный ин-

терферон снижает число структурных нарушений хромосом.

В наших предыдущих работах [12, 13, 14] было показано, что вирус гриппа  $A_0$  обладает выраженным эмбриотоксическим и мутагенным действием как в клетках беременных мышей, так и в клетках плодов [14]. Мутагенное действие вируса гриппа установлено также в культурах лимфоцитов человека [11]. Исходя из этого, изыскание препаратов, уменьшающих указанный эффект вирусов, представляется исключительно важным.

**Целью** настоящего исследования явилось изучение влияния эндогенного интерферона на хромосомы беременных мышей и их эмбрионов при гриппозной инфекции.

### Материал и методы

Опыты проводились на нелинейных белых мышах. Первым днем беременности считали день обнаружения влагалищных

пробок у самок после подсаживания к ним самцов. В работе использованы патогенный для мышей вирус  $A_0/PR_8$  (далее  $A_0$ ), который вводили интраназально однократно в дозе  $10^4$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл и индуктор интерферона вирус болезни Ньюкасла (далее ВБН) в дозе  $10^7$  ЭИД<sub>50</sub>/0,2 мл – вводили внутривенно.

Всего исследовано 22 беременные мыши, 40 эмбрионов на стадии органогенеза и 121 4-дневный эмбрион, которые распределены в 4 группы: 1) зараженных вирусом гриппа  $A_0$  через 6 часов индукции интерферона у беременных мышей; 2) зараженных только вирусом гриппа  $A_0$ ; 3) зараженных вирусом болезни Ньюкасла; 4) контрольная группа.

Для приготовления хромосомных препаратов из клеток беременных мышей использовали метод Форда-Уоллама [17].

Хромосомные препараты из зародышей периода органогенеза (9-12-дневные) готовили по методу Врублевской-Дыбана [19]. Зародышей периода дробления и на стадии бластоцисты исследовали под бинокулярной лупой МБС-2. Подсчет числа бластомеров и хромосомный анализ проводился на препаратах, приготовленных по методу Тарковского [20]. Учет структурных нарушений хромосом проводился по классификации Н.Бочкова [5], геномный мутаций – Н.Дубинина [6], патологических митозов – И.Алова [2]. Изучение нарушения интерфазных ядер проводилось по модифицированному методу А. Пирцхелани, Н. Мамаладзе [13]. Все полученные данные были статистически обработаны.

### Результаты и обсуждение

Анализ полученных данных показал (см. табл.), что вирус гриппа  $A_0$  в клетках взрослых мышей вызывает резкое возрастание частоты хромосомных аномалий (структурные нарушения хромосом, геномные мутации). Со дня инфицирования частота этих нарушений постепенно возрастает и на седьмой день достигает 40, 47% (в

контроле 2,0%). Аналогичные данные получены клиническими наблюдениями некоторых авторов [8, 9]. Следует отметить, что из структурных нарушений в три раза чаще наблюдается лизис хромосом, чем единичные и множественные фрагменты.

Кроме хромосомных аномалий вирус гриппа  $A_0$  характеризуется высоким цитотоксическим действием. Он часто вызывает образование патологических митозов и на 7-й день инфицирования достигает 27,9%. Из патологических митозов под воздействием вируса гриппа  $A_0$  наиболее часто наблюдается полая метафаза, деспирализация и склеивание хромосом, значительно реже – трехгрупповая метафаза и набухание хромосом. Из патологических митозов в контроле наблюдается только полая метафаза и склеивание хромосом.

Анализ полученного нами материала также показал, что вирус гриппа  $A_0$  вызывает нарастание нарушения интерфазных ядер: плотноконденсированный хроматин располагается в виде кольца по периферии клетки, а середина остается пустой. Микроскопический анализ таких ядер проводился в тех же препаратах, где проводился учет хромосомных аномалий.

Под влиянием вируса гриппа  $A_0$  в клетках взрослых мышей на 7-й день инфицирования частота нарушений интерфазных ядер достигала 3,4% (в контроле 1,1). Цитогенетический анализ показал, что под влиянием вируса гриппа резко возрастает частота центромерных ассоциаций хромосом, и на 7-е сутки после инфицирования в клетках взрослых мышей они достигали 30,0 % (в контроле 0,8 %).

Мутагенная и цитотоксическая активность вируса гриппа  $A_0$  еще более выражена в эмбриональных клетках (9-12-дневные). Цитогенетический анализ показал, что под влиянием вируса гриппа  $A_0$  на 5 сутки после инфицирования в клетках эмбрионов число структурных изменений хромосом составлял 48%, а число патологических митозов 45% (см. табл.).

**Антимутагенное и антицитотоксическое действие эндогенного интерферона в клетках взрослых мышей и эмбрионов в условиях индукции мутации вирусом гриппа A<sub>0</sub>**

Варианты	Группа животных	Количество животных	Дни исследования	Число метафаз	Общее число структурных нарушений хромосом (%±ст. от)	Число геномных мутации (%±ст. от.)	Число патологических митозов (%)	P
A <sub>0</sub>	Взрослые мыши	5	53	500	11,29±1,3	5,13±0,6	19,15±1,8	
		6	7	340	40,2±2,6	5,2±0,7	27,9±1,9	
		5	15	500	4,0±0,9	1,6±0,4	7,3±1,3	
Инт+ A <sub>0</sub>		6	7	400	13,5±1,4	10,5±0,4	11,3±1,5	<0,001
A <sub>0</sub>	9-12-дневные эмбрионы	20	3	350	33,3±2,6	8,9±2,8	29,8±2,3	
		10	5	300	48,0±4,0	5,5±1,7	45,0±4,0	
Инт+ A <sub>0</sub>		10	5	350	13,0±2,1	2,0±0,7	19,0±2,0	<0,001
A <sub>0</sub>	4-дневные эмбрионы	45	2	75	30,0±4,6	9,0±2,9	28,3±5,2	
		46	3	100	37,0±4,0	13,7±2,0	35,0±4,7	
Инт+ A <sub>0</sub>		30	3	50	7,8±4,2	2,2±0,8	12,0±3,8	<0,001

Из цитогенетического анализа явствует, что вирус гриппа A<sub>0</sub> в клетках 4-дневных эмбрионов вызывает высокую частоту как структурных нарушений хромосом, так и геномных мутации и патологических митозов. Например, число структурных нарушений хромосом на 3-и сутки после инфицирования было 17,0%; геномных мутаций — 4,0%, а число патологических митозов достигает 35,3%.

Таким образом, эмбриональные клетки оказались более чувствительными к действию вируса гриппа, чем клетки взрослых мышей. Этот факт согласуется с данными других авторов, показавших, что при действии разных факторов внешней среды в большей степени повреждаются клетки плода и эмбриона, чем клетки взрослого организма [3, 10], что, по их мнению, связано с несовершенством защитно-приспособительных механизмов эмбриона.

Ранее нами было установлено, что вирус гриппа A<sub>0</sub> характеризуется высоким летальным и эмбриотоксическим действием [12]. На возможную связь между цитогенетичес-

ким нарушением и эмбриотоксическим эффектом вируса гриппа, с одной стороны, указывает совпадение пиков их действия, а с другой — известно [11], что клетки с грубыми нарушениями хромосом (лизис, депирализация, полая метафаза, фрагментация) в дальнейшем элиминируются, так как в изученных нами случаях около 50% делящихся эмбриональных клеток были повреждены указанными изменениями. С большой долей вероятности можно допустить, что эмбрионы с подобными повреждениями хромосом оказывались нежизнеспособными и погибали, то есть эмбриотоксическое действие вируса было обусловлено его мутагенным и цитотоксическим эффектом.

Таким образом, гриппозная инфекция характеризуется высоким летальным, эмбриотоксическим, мутагенным и цитотоксическим действием. Исходя из этого, большое внимание было уделено выявлению и использованию протекторных веществ, которые снижали бы до минимума как нарушения хромосомного аппарата, так и гибель животных и их эмбрионов.

Раньше нами было установлено, что вирус гриппа  $A_2/Aichi$  характеризуется высоким мутагенным действием. Эндогенный интерферон, индуцированный вирусом болезни Ньюкасла, обладает способностью снижать смертность мышей от гриппозной инфекции, а также существенно угнетает мутагенный эффект вируса гриппа [16].

Было отмечено, что влияние противовирусных препаратов, в том числе интерферона на генетический аппарат эмбрионов (стадия бластоциста и стадия активного органогенеза) при гриппозной инфекции изучено крайне недостаточно.

Беременным мышам до моделирования гриппозной инфекции вводили вирус болезни Ньюкасла (ВБН), который вызывает индукцию эндогенного интерферона. Результаты опытов показали, что число аномальных метафаз на фоне эндогенного интерферона уменьшалось с 40,4% (7-е сутки вируса гриппа  $A_0$ ) до 13,5% ( $p < 0,001$ ). На фоне интерферона в клетках беременных мышей аналогично уменьшилась число патологических митозов.

Следующая серия опытов проведена на 9-12-дневных и на 4-дневных эмбрионах. Было показано, что эндогенный интерферон как в клетках 9-12-дневных эмбрионов, так и в клетках 4-дневных эмбрионов в среднем в три раза уменьшает частоту хромосомных аномалий и патологических митозов. Под влиянием интерферона в три раза снижалась также гибель животных и их эмбрионов.

Достоверность полученных данных, свидетельствующих об антимутагенном действии как экзогенных, так и эндогенных интерферонов, подтверждена нами и другими авторами [4, 7, 12, 18].

При изучении механизмов действия антимутагенов основную сложность представляет то, что они относятся к соединениям разных классов. Антимутагены обладают свойством включаться в разные биологические процессы. Один из способов реализации протекторных свойств — это

дисмутогенизация, т.е. инактивация вредного агента антимутагеном. Второй путь — это участие антимутагенов в активации репарационных процессов. Указанные механизмы изучены и доказаны экспериментально [1, 7].

Исходя из вышесказанного, представляется перспективным использование антимутагенов с лечебно-профилактической целью людьми, имеющими контакт с вирусными инфекциями и другими вредными веществами.

### Выводы

1. Вирус гриппа  $A_0$  обладает мутагенной и цитотоксической активностью, которые зависят от стадии онтогенеза и срока заражения. Хромосомы эмбрионов более чувствительны к воздействию вируса, чем хромосомы взрослых животных.
2. Вирус гриппа  $A_0$  вызывает в генетическом аппарате 5 типов повреждений:
  - хромосомные aberrации (одиночные и множественные фрагменты, лизис хромосом);
  - геномные мутации (анеуплоидия, триплоидия, тетраплоидия);
  - патологические митозы (полая метафаза, деспирализация, трехгрупповая метафаза, набухание и слипание хромосом);
  - нарушение интерфазных ядер (полное ядро);
  - вирус гриппа вызывает резкое возрастание частоты центромерных ассоциаций хромосом.
3. Эндогенный интерферон обладает выраженным антимутагенным и антицитотоксическим действием. Он в три раза уменьшает мутагенный и цитотоксический эффект вируса гриппа  $A_0$ .

### Литература

1. Алакперов У.К. Антимутагенез. — М.: Наука, 1984.
2. Алов И.А. Цитофизиология и патология митоза. — М. 1972.

3. *Бариян И.Р.* Особенности эмбриотоксического действия вируса гриппа // *Арх. анат. гист. и эмбриол.*, № 2, с. 53-58, 1985.
4. *Бичикашвили Н.* Автореф. канд. дисс. 2003.
5. *Бочков И.П., Демин Ю.С., Лучник И.В.* Классификация и методы учета хромосомных aberrации в соматических клетках // *Генетика*, № 8, т. 5, с. 138-142.
6. *Дубинин Н.Р.* Общая генетика. — М.: Наука, 1976.
7. *Засухина Г.Д.* Реперативные механизмы клеток и проблемы окружающей среды. — М.: Наука, 1979.
8. *Канторович Р.А., Соколова Н.М., Гаврина Е.М. и др.* Действие вируса гриппа на хромосомы человека // *Биол. эксперим. бюл.*, № 77, т. 2, с. 99-102, 1974.
9. *Кучерова Н.Г.* Влияние гриппозной инфекции на хромосомы клеток человека и животных // *Тез. докл. XIV Международный генетический конгресс. М.*, 343 с., 1983.
10. *Дибан А.П., Удалова Л.Д.* Изучение хромосомных нарушений на начальных стадиях эмбриогенеза млекопитающих // *Генетика*, № 4, с. 52-65, 1967.
11. *Михайлова Г.Р., Горшунова Л.П.* Цитологическое и кариологическое изучение культур клеток человека. Хрон. инфекц. вируса гриппа // *Цитол. и генетика*, № 10, т. 6, с. 582-534, 1980.
12. *Пирицхелани А.Г., Кинтрая П.Я., Кристесашвили Д.И., Корсантия Б.М.* Влияние эндогенного интерферона на эмбриональное развитие и хромосомы при гриппозной инфекции // *Вопросы охраны материнства и детства*, № 11, с. 71, 1985.
13. *Пирицхелани А.Г., Мамаладзе И.В.* Нарушение интерфазных ядер митозов и хромосом как показатель общетоксического и мутагенного действия факторов среды на организм. Методические рекомендации. — Тбилиси, 1991.
14. *Пирицхелани А.Г.* Докт. дисс. 1994.
15. *Фролов А.Ф., Дядюн С.Т., Дзяблик И.В.* // *Цитол. генет.*, №1, с. 18-20, 1982.
16. *Шелия Г.П., Кинтрая П.Я., Корсантия Б.М., Пирицхелани А.Г.* Влияние эндогенного интерферона на эмбриональное и мутагенное действие вируса гриппа у белых мышей // *Вопросы вирусологии*, № 2, с. 179-183, 1984.
17. *Ford E., Wollam D.* A study of the mitotic chromosomes of mice of the strong a line // *Exp. Cell. Res.*, v. 32, p. 320, 1963.
18. *Pirtskhelani A., Pirtskhelani G.* Investigation of antimutagenous and antitoxic action of interferon and a-tocopherol on the background of metapyrin // *Proc. Georgian Acad. Sci. Biol. Ser. vol. 24. v. 1-6, p. 299-301, 1998.*
19. *Tarkowski A.* An air-drying method for chromosome preparation from mouse ages cytogenetics // *Cytogenetics*, v.5, p.394, 1966.
20. *Wroblewska L., Dyban A.* Chromosome preparations from mouse embryos during early organogenesis dissociation after fixation followed by air-drying // *Stain Technol.*, v.44, p. 147, 1969.

#### THE INFLUENCE OF INTERFERON ON MUTAGENIC AND CYTOTOXIC ACTION OF INFLUENZA VIRUS IN WHITE MICE AND THEIR EMBRYOS

A. Pirtskhelani, N. Pirtskhelani, N. Mamaladze, G. Pirtskhelani, N. Jajanidze, G. Kapanadze

*Tbilisi Medical State University, Republic of Georgia*

*Tbilisi State University, Republic of Georgia*

*The Research Centre for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

In the laboratory mice and their embryos, the antimutagenic and anticitotoxic effects of the endogenous interpheron during mutation influenza virus A<sub>0</sub> (Strain PR<sub>8</sub>) have been studied . The ten-day administration of influenza virus A<sub>0</sub> (0,2 ml dose) induced high incidence of structural aberrations of the chromosomes (deletions, multiple fragments, lyses) genomic mutations (triploid, tetraploidy) the chromosomal centromere associations and pathologic mitosis (hollow metaphase, K mitosis, chromosomal adhesion) and deterioration of the interphase nuclei (hollow nucleus) as mice and their embryon. Endogenous interferon exerted highly effective antimutagenic and anticytotoxic action. It decreased incidence and mutagenic and cytotoxic effects of the influenza virus A<sub>0</sub> by about 3 times.

**Key words:** influenza virus, interpheron, mitosis, chromosomes, mice, embryo.



## Особенности количественной фарм-ЭЭГ при действии новерила и пиразидола в эксперименте

С.П. Матуа, В.Н. Каркищенко, В.П. Омельченко

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

*Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону*

В эксперименте на животных оценивались сходства и различия действия психотропных средств на электрограммы мозга. Установлено, что все антидепрессанты вызывают значимые изменения спектральных характеристик биопотенциалов мозга. При этом каждый антидепрессант имеет специфический профиль изменений.

**Ключевые слова:** электрограммы мозга, психотропные средства, биоэлектрическая активность мозга.

Количественная фармакоэлектроэнцефалография (фарм-ЭЭГ) является очень удобным методом оценки изменений функционального состояния мозга человека и животных, что убедительно показано как многими отечественными [1, 2, 3], так и зарубежными исследователями. Весьма актуальным становится вопрос об использовании интегральных показателей, включающих такие важные информативные параметры, как уровни спектральной мощности ЭЭГ при различных лекарственных воздействиях [5, 6].

Оценка состояний биоэлектрической активности мозга при действии психотропных средств зависит от особенностей действия различных лекарственных препаратов на церебральные структуры экспериментальных животных. **Цель** данной работы: оценить сходство и различия действия различных психотропных средств (новерила и пиразидола) на электрограммы (ЭГ) различных отделов мозга животных с последующим определением индивидуальных особенностей формирования спектральной структуры.

### Материал и методы

Проведено 38 хронических опытов на взрослых кошках обоего пола массой 3–4 кг. Подготовка животных к эксперименту проводилась поэтапно. После взвешивания их наркотизировали внутривенно 2%-ным раствором нембутала (этамилал-натрий) из расчета 35–40 мг на 1 кг массы. Операции по вживлению электродов осуществлялись в стереотаксическом аппарате типа «МВ-4101» венгерской конструкции в стерильных условиях. Ориентация электродов в исследуемые области мозга производилась в соответствии с координатами стереотаксических атласов для кошек [7] с поправками по методике В.А. Черкеса и др. [4].

В качестве электродов использовали константановую проволоку в фабричной изоляции с диаметром активного кончика 100 мкм. Отведение электрограмм различных отделов мозга осуществляли монополярно, при этом референтный электрод располагали в носовых костях черепа. Животные брались в эксперимент че-

рез 7–10 дней после операции, перед каждым опытом их адаптировали к экспериментальным условиям. Во время опытов они находились в свободном поведении в специально оборудованной камере. Интервалы между экспериментами на одном и том же животном составляли 5–7 суток. Одновременно регистрировали ЭГ следующих структур головного мозга: дорзального гиппокампа, заднего гипоталамуса, медиодорзального ядра таламуса, ретикулярного ядра покрышки, среднего мозга, хвостатого ядра, правой и левой соматосенсорных и зрительной областей коры.

Электрограммы мозга животных регистрировались на электроэнцефалографе-анализаторе ЭЭГА-21/26 «Энцефалан 131-03» до и через 1, 1,5, 2, 2,5 и 3 часа после одномоментного перорального введения исследуемых препаратов. Спектральные характеристики электрограмм мозга определялись с помощью быстрого преобразования Фурье в диапазоне 1–30 Гц. Для описания ЭГ на каждом этапе исследования усреднялись нормированные спектры мощности 5 следующих друг за другом 8-секундных отрезков. Препараты вводили в дозах: пиразидол – 6 мг/кг, новерил – 20 мг/кг.

### Результаты и обсуждение

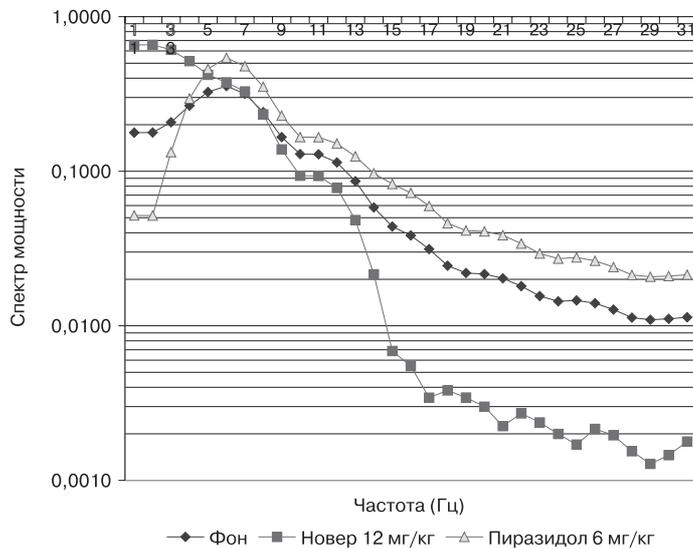
Усредненные изменения представительств спектральных составляющих в основных частотных диапазонах после введения новерила и пиразидола приведены в таблице.

Антидепрессант новерил в дозе 20 мг/кг вызывал практически идентичные изменения спектральных характеристик ЭГ как коры, так подкорковых структур. Действие препарата на биопотенциалы мозговых образований выявлялось через 1 час после его введения и продолжалось до конца эксперимента, причем изменения спектральных характеристик заключались в увеличении мощности частот в области 1–3 Гц и подавлении в остальной части спектра. Наиболее значимые изменения спектра в 1-й час действия выявлялись больше в ЭГ подкорковых образований, чем в коре, где отмечалось значимое снижение мощности в области 13–15 Гц и возрастание медленноволновой (1–3 Гц) активности на ЭГ гиппокампа. В этот период достоверных изменений в медленноволновом диапазоне не отмечалось, а через 1,5 часа наблюдалось некоторое увеличение мощности 7 Гц по отношению к фону. На рисунке показаны усредненные спектральные характеристики ЭГ мозга при действии пиразидола и новерила.

Возрастание мощности частот в области тета-ритма отмечалось в ЭГ гипоталамического ядра, в меньшей степени – в ЭГ таламического и ретикулотегментарного ядер, а также левой сенсомоторной коры. Наиболее значимое увеличение инфранизких частот (1–3 Гц) регистрировалось через 2,5 часа после введения, препарата. Через 3 часа действие новерила на ЭГ мозга животных нивелировалось, хотя еще отмечались достоверные изменения в правой сенсомотор-

Изменения представительств спектральных составляющих в основных частотных диапазонах после введения новерила и пиразидола

Диапазон	Частота, Гц	Фон		Новерил 6 мг/кг		Пиразидол 12 мг/кг	
		(%)	Средн IgG(f)	(%)	Средн IgG(f)	(%)	Средн IgG(f)
дельта	0,5-3,5	20,29%	0,2170	0,465026	0,5948	0,091	0,1598
тета	4,0-7,0	41,82%	0,3098	0,37557	0,3392	0,462	0,4577
альфа	8,0-12,0	23,46%	0,1248	0,1363	0,0903	0,244	0,1674
бета	13-30	14,43%	0,0219	0,0230	0,0038	0,201	0,0406



Усредненные спектральные характеристики ЭГ мозга

ной коре и подкорковых структурах. При этом во всех ЭГ подкорковых образований отмечалось увеличение (хотя и статистически недостоверное) мощности тета-активности. Таким образом, новерил вызывал увеличение низкочастотных составляющих (1–3 Гц) и подавление всех остальных частот во всех ЭГ исследованных мозговых структур, начиная с 1-го часа его действия с максимумом эффекта через 2,5 часа.

Пиразидол в дозе 6 мг/кг существенно отличался по влиянию на спектральные характеристики ЭГ мозга от новерила. Через час после введения препарата наиболее значимые изменения отмечались в спектрограммах гиппокампа, где снижалась мощность частот в диапазоне 20–24 Гц. Выраженный эффект действия пиразидола регистрировался через 2 часа после его введения во всех анализируемых структурах мозга. Характерной особенностью спектрального профиля данного препарата являлось снижение мощности инфранизких частот (1–3 Гц) и увеличение частотных составляющих в области 5–7 Гц. В электрограммах гиппокампа и ретикулотегментарного ядра отмечалось также значимое увеличение 9–10 Гц и некоторое воз-

растание (хотя и недостоверное) в диапазоне 23–27 Гц. Наиболее выраженное снижение частотных составляющих в области 1–3 Гц отмечалось в ЭГ правой и левой сенсомоторной коры, гиппокампа, гипоталамического, ретикулотегментарного и хвостатого ядер. Через 2,5 часа отмеченные изменения мозговых структур нивелировались, а через 3 часа после введения препарата в спектральных профилях ЭГ правой сенсомоторной коры и подкорковых образованиях отмечалось появление пиков в области

10 Гц и 23–27 Гц, то есть изменения, которые были характерны для ЭГ гиппокампа и ретикулотегментарного ядра в 2-часовом замере.

### Выводы

Все антидепрессанты в исследуемых дозах вызывают значимые изменения спектральных характеристик биопотенциалов мозга, имеющих характерную временную динамику, в отличие от изменений при приеме плацебо.

Каждый антидепрессант имеет специфический профиль изменений, спектральных характеристик ЭГ мозга в динамике действия препарата.

### Литература

1. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Том 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. — М: Изд-во ВПК, 2007.
2. Матуа С.П., Рудковский М.В. Перспективы применения метода многомерного шкалирования при осуществлении электроэнцефалографического мониторинга психофармакотерапии // Биомедицина, № 4, с.95-97, 2006.
3. Омельченко В.П., Матуа С.П., Гришин А.Д. Компьютерный анализ электрограмм моз-

- га при действии некоторых психотропных средств // *Фармакол.и токсикол.*, т. 52, № 3, с. 18-22, 1989.
4. Черкес В.А., Олешко Н.Н., Ваколюк Н.И., Луханина Е.П. Физиология головного мозга. — Киев, 1976.
  5. Centorrino F., Bruce H., Price M.D. et al. EEG abnormalities during treatment with typical and atypical antipsychotics // *Am. J. Psychiatry* 159:109-115, January 2002.
  6. Itil T.M. The discovery of psychotropic drugs by computer-analyzed cerebral bioelectrical potentials (CEEG) // *Drug Development Research*, vol. 1, iss. 4, pp. 373-407 / Published Online: 5 Oct 2004.
  7. Jasper H.H., Ajmont-Marsan C. A stereotaxic atlas of diencephalon of the cat. — Ottawa. 1954.

#### EVALUATION THE QUANTITATIVE CHARACTERISTICS OF PHARM-EEG UNDER EXPOSURE TO NOVERIL AND PIRAZIDOL IN EXPERIMENT

S.P. Matua, V.N. Karkischenko, V.P. Omel'chenko

*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow  
Rostov State Medical University, Rostov-on-Don*

Similarities and differences of psychotropic drug activity were estimated. It has been proved that all antidepressants stimulated important changes of spectral characteristics of brain biopotentials. Each antidepressant has it's own profile of changes.

**Key words:** brain electrograms, brain bioelectrical activity, psychotropic drugs. ■

### Поиск информативных показателей биоэлектрической активности функционального состояния головного мозга при действии некоторых антидепрессантов

В.Н. Каркищенко, С.П. Матуа, В.П. Омельченко

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва  
Ростовский государственный медицинский университет, Ростов-на-Дону*

Проанализировано действие мелипрамина и амитриптилина на электрограммы (ЭГ) мозга. Выявлены дозозависимые изменения ЭГ мозга при введении мелипрамина.

**Ключевые слова:** электрограммы мозга, биоэлектрическая активность мозга, антидепрессанты.

Широкое внедрение в клиническую практику электроэнцефалографических методов исследования обуславливает растущий спрос на поиск таких показателей, которые объективно оценивают функциональное состояние ЦНС. Весьма актуальным становится вопрос об использовании

интегральных показателей, включающих наиболее информативные параметры [1, 2, 4, 5, 10].

Важное место среди методов количественной оценки психотропных эффектов как в клинике, так и в эксперименте занимает фармако-ЭЭГ, которая включает в

себя комплекс компьютеризированных ЭЭГ-профилей, отражающих спектральные характеристики биоэлектрической активности мозга в зависимости от его функционального состояния, а также в условиях действия психотропных веществ [7, 8].

Анализ влияния психотропных средств на биопотенциалы мозга человека строго определены рамками курса лечения больного, поэтому для выяснения особенностей действия различных лекарственных препаратов на церебральные структуры предпочтительны предварительные исследования на экспериментальных животных, а затем — на здоровых испытуемых и больных. Важной стороной таких исследований является экстраполяция данных, полученных в экспериментальных исследованиях, с помощью методов межвидовой аллометрии — с животных на человека [3].

В данной работе нами ставились следующие цели:

- провести анализ особенностей действия мелипрамина и амитриптилина на электрограммы (ЭГ) мозга различных отделов мозга животных;
- оценить возможности дозозависимых эффектов антидепрессантов по степени их влияния на ЭГ мозга животных.

### Материал и методы

На взрослых кошках обоего пола массой 3-4 кг было проведено 78 хронических опытов. Подготовка животных к эксперименту проводилась поэтапно. После взвешивания их наркотизировали внутрибрюшинно 2%-ным раствором нембутала (этамилал-натрий) из расчета 35-40 мг на 1 кг массы. Операции по вживлению электродов осуществлялись в стереотаксическом аппарате типа «МВ-4101» венгерской конструкции в стерильных условиях. Ориентация электродов в исследуемые области мозга производилась в соответствии с координатами стереотаксических атласов для кошек [9] с поправками по методике В.А. Черкеса и др. [6], после

чего зубным бором высверливали отверстия в костях черепа. Имплантированные электроды подпаивались к панели девятиконтактной лампы и крепились на черепе с помощью пластмассы протакрил.

В качестве электродов использовали константановую проволоку в фабричной изоляции с диаметром активного кончика 100 мкм. Отведение электрограмм различных отделов мозга осуществляли монополярно, при этом референтный электрод располагали в носовых костях черепа.

После операции животных брали в эксперимент через 7-10 дней, уже адаптированных к экспериментальным условиям. Во время опытов они находились в оборудованной камере, специально животных не фиксировали. Интервалы между экспериментами на одном и том же животном составляли 5-7 суток.

В каждом опыте производилась одновременная регистрация и анализ электрограмм следующих 9 центральных структур: дорзального гиппокампа, заднего гипоталамуса, медиодорзального ядра таламуса, ретикулярного ядра покрышки, среднего мозга, хвостатого ядра, правой и левой соматосенсорных и зрительной областей коры.

ЭГ мозга животных регистрировались на электроэнцефалографе-анализаторе ЭЭГА-21/26 «Энцефалан 131-03» до и через 1, 1,5, 2, 2,5 и 3 часа после одномоментного перорального введения исследуемых препаратов с учетом стационарности.

Спектральные характеристики электрограмм мозга определялись с помощью быстрого преобразования Фурье в диапазоне 1-30 Гц. Для описания ЭГ на каждом этапе исследования, усреднялись нормированные спектры мощности 5 следующих друг за другом 8-секундных отрезков.

Доза, в которой вводился мелипрамин, составляла 6 и 12 мг/кг; амитриптилин вводился в дозе 6 мг/кг.

В качестве контроля была проведена серия с плацебо на всех исследованных животных.

### Результаты и обсуждение

Действие мелипрамина и амитриптилина на ЭГ мозга животных имело определенные отличия. Для выявления эффектов психотропных средств были рассмотрены усредненные характеристики изменения спектров мощности ЭГ относительно фоновых записей, которые, как видно из рис.1, имеют существенное различие при действии психотропных средств

Количественные изменения представительства усредненных спектральных составляющих в основных частотных диапазонах после введения мелипрамина и амитриптилина приведены в табл.1.

Триклический антидепрессант мелипрамин в дозе 6 мг/кг оказывал выраженное действие на ЭГ всех мозговых структур через 1,5 часа, но максимум эффекта приходился на 2 часа после его введения. Особый интерес представляет тот факт, что первоначальное влияние мелипрамина оказывал на ЭГ гиппокампа, медиодорзального и ретикулотегментарного ядер. Причем обнаруженное в гиппокампе уменьшение мощности ЭГ в области 4 Гц, которая включает тета-диапазон, являющийся маркерным для

этой структуры, свидетельствует об угнетении гиппокампальных тормозных эффектов под действием мелипрамина. Снижение мощности высокочастотных составляющих в ЭГ ретикулотегментарного ядра говорит об угнетении восходящего активирующего влияния этой системы мозга. Как следствие этого, на ЭГ мозга всех исследованных образований наблюдался выраженный синхронизирующий эффект.

В спектральных характеристиках ЭГ мозга отмечалось значительное возрастание мощности в диапазоне 1–3 Гц (рис.1). Эти изменения были отражены во всех отведениях, но наиболее ярко выражены в гиппокампе, и достигали максимума через 2 часа после введения препарата. Через 2,5 часа в гиппокампе уже не обнаруживалось достоверного изменения спектральной мощности, а уменьшение ее в остальных подкорковых структурах касалось лишь высокочастотной (25 Гц) области спектра. Через 3 часа мелипрамин в дозе 6 мг/кг не оказывал статистически значимых изменений мощности спектра ни в одной из исследуемых областей мозга, что свидетельствовало о нивелировании электрофизиологических эффектов данного препарата.

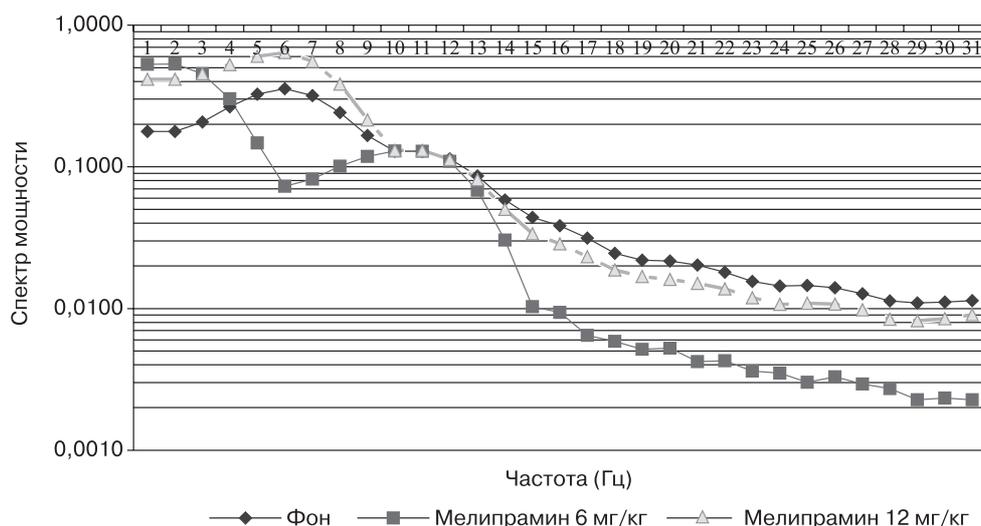


Рис. 1. Спектральные характеристики ЭГ мозга при введении мелипрамина

Таблица 1

## Изменения представительства спектральных составляющих в основных частотных диапазонах после введения мелипрамина

Диапазон	Частота (Гц)	Фон		Мелипрамин 6 мг/кг		Мелипрамин 12 мг/кг	
		%	Средн. lgG(f)	%	Средн. lgG(f)	%	Средн. lgG(f)
дельта	0,5-3,5	20,29	0,2170	53,54	0,4284	29,42	0,4645
тета	4,0-7,0	41,82	0,3098	19,27	0,1008	49,45	0,5444
альфа	8,0-12,0	23,46	0,1248	21,82	0,1108	17,82	0,1308
бета	13-30	14,43	0,0219	5,37	0,0060	3,31	0,0065

Введение мелипрамина в дозе 12 мг/кг сопровождалось выраженными и более пролонгированными ЭГ-эффектами (рис. 1 и табл. 1). В отличие от предыдущей серии мелипрамин в этой дозе вызывал снижение спектральной мощности в диапазоне 14–16 Гц, а увеличение – в области 4–6 Гц. Отмеченное на пике (через 2 часа) действия препарата достоверное увеличение мощности в диапазоне 6 Гц на спектрограммах гипоталамуса, ретикулотегментарного и хвостатого ядер на фоне снижения ее в высокочастотных (20–28 Гц) составляющих ЭГ этих структур может свидетельствовать об активации синхронизирующих механизмов мозга влиянием высоких доз мелипрамина. Это предположение подтверждает и тот факт, что на ранних (1–1,5 часа) этапах действия мелипрамина отмечается значимое увеличение медленноволновой (5–8 Гц) ритмики в медиодорзальном ядре таламуса, ответственного за запуск тормозных синхронизирующих механизмов, реализующихся в коре как непосредственно через таламо-кортикальные связи, так и через хвостатое и ретикулотегментарное ядра. Достоверные увеличения мощности в спектрах этих структур на частотах 6–10 Гц регистрировались и на поздних (2,5–3 часа) этапах исследования. Подчеркнем, что мелипрамин в высокой дозе практически не вызывал статистически значимых изменений в диапазоне 1–5 Гц в анализируемых спектрограммах мозга, хотя имелась тенденция к снижению мощности этого частотного диапазона в динамике всего исследования.

Амитриптилин в дозе 6 мг/кг (рис. 2) вызывал выраженный эффект в ЭГ всех исследуемых структур мозга, начиная с 1-го часа действия препарата, однако направленность изменения спектральных характеристик имела явно выраженный фазный характер. На 1-м часу действия препарата во всех подкорковых структурах отмечалось уменьшение мощности в диапазонах 1–4, 11–22 и 27–30 Гц при достоверном ее увеличении в области 6–10 и 18–20 Гц. Наиболее значимое возрастание 6–7-герцовых составляющих отмечалось в ЭГ медиодорзального ядра таламуса и гиппокампе. Аналогичные изменения спектрального профиля отмечались и в активности сенсомоторной коры правого полушария и несколько меньше – левого.

Усредненные изменения представительства спектральных составляющих в основных частотных диапазонах после введения амитриптилина, приведены в табл. 2.

Через 1,5 часа в ЭГ подкорковых структур, за исключением гиппокампа, оставались одночасовые изменения спектральных характеристик. В активности гиппокампа достоверных изменений не отмечалось, а через 2 часа после введения препарата наблюдалось снижение уровня мощности в диапазоне 5–6 Гц и увеличение – в диапазоне 8–9 Гц. В спектрах ЭГ других подкорковых образований к этому времени регистрировалось снижение в области 14–17 Гц. В ЭГ коры также отмечалось достоверное снижение мощности в этих диапазонах. В дальнейшем, то есть через 2,5 часа после введе-

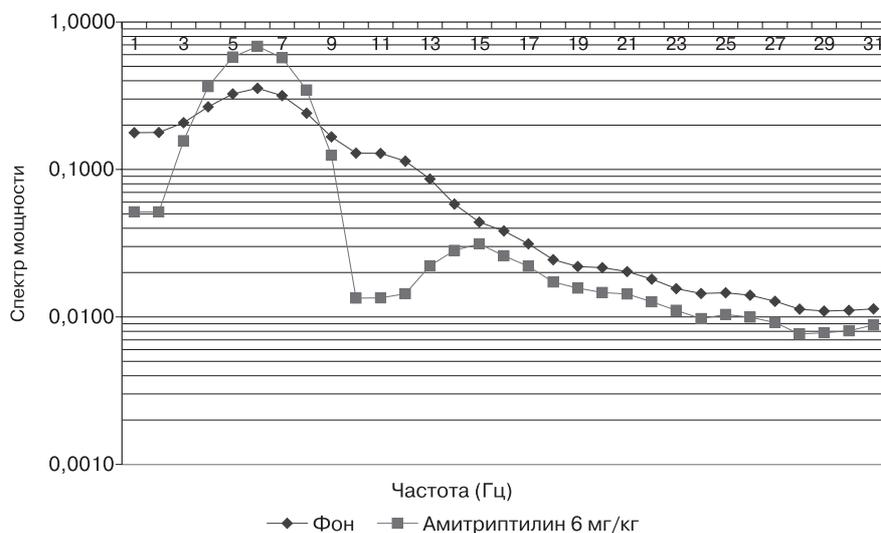


Рис. 2. Спектральные характеристики ЭГ мозга при введении амитриптилина

Таблица 2

**Изменения представительства спектральных составляющих в основных частотных диапазонах после введения амитриптилина**

Диапазон	Частота (Гц)	Фон		Амитриптилин 6 мг/кг	
		%	Средн. lgG(f)	%	Средн. lgG(f)
дельта	0,5-3,5	20,29	0,2170	12,64	0,1911
тета	4,0-7,0	41,82	0,3098	66,34	0,5440
альфа	8,0-12,0	23,46	0,1248	10,73	0,0387
бета	13-30	14,43	0,0219	10,29	0,0184

ния препарата, спектральные характеристики ЭГ коры приближались к одночасовым.

Необходимо отметить, что вторая фаза действия амитриптилина приходится на 3 часа после его введения. В этот период наблюдалось достоверное уменьшение мощности в диапазоне 15-18 Гц во всех исследуемых структурах мозга, в ЭГ ретикулотегментарного ядра – еще и в области 11–12 и 21–22 Гц. В ЭГ правой сенсомоторной зоны в этот период регистрировалось увеличение мощности и в диапазоне 4–5 Гц (рис. 2).

Таким образом, амитриптилин вызывал пролонгированные и фазные изменения в ЭГ церебральных структур с максимумом эффекта в 1–1,5 часа и 3 часа после его введения в организм.

**Выводы**

Резюмируя полученные изменения спектральных характеристик ЭГ мозга животных при действии антидепрессантов, следует отметить следующее:

- выявлено значимое изменение спектральных характеристик биопотенциалов мозга при введении антидепрессантов по сравнению с изменениями при приеме плацебо;
- выявлено пролонгированное действие амитриптилина, а также обнаружены фазные изменения в ЭГ мозга при его введении;
- выявлены дозозависимые изменения ЭГ мозговых структур при исследовании мелипрамина.

### Литература

1. Думенко В.Н., Козлов М.К. Электрографические корреляты «внутренних состояний», вызываемых условными раздражителями при инструментальном обучении у собак // *Материалы Международных чтений, посвящ. 100-летию со дня рожд.чл.-корр. АН СССР, академика АН АрмССР Э.А.Асратяна. 30 мая 2003* / mosmedclinic.ru/conf\_library/2003/5/481
2. Жирмунская Е.А. О преодолении традиций, сложившихся в электроэнцефалографии // *Физиология человека, т. 17, вып. 2, с. 147-154, 1991.*
3. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Том 1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. — М: Изд-во ВПК, 2007.
4. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Том 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. — М: Изд-во ВПК, 2007.
5. Омельченко В.П., Матуа С.П., Гришин А.Д. Компьютерный анализ электрограмм мозга при действии некоторых психотропных средств // *Фармакол.и токсикол., т. 52, № 3, с. 18-22, 1989.*
6. Черкес В.А., Олешко Н.Н., Ваколюк Н.И., Луханина Е.П. Физиология головного мозга. — Киев, 1976.
7. Itil T.M., Menon G.N., Dreyfus J.-F. et al. Central effects and effective dose determination of suriclone (double-blind, controlled, phase I safety and quantitative pharmaco-EEG study) // *Drug Development Research, vol. 4, iss. 2, pp. 155-165. / Published Online: 5 Oct 2004.*
8. Itil T.M., Soldatos C. Epileptogenic side effects of psychotic drugs: practical recommendation // *JAMA 147:1069-1071, 1990.*
9. Jasper H.H., Ajmont-Marsan C. A stereotaxic atlas of diencephalon of the cat. — Ottawa. 1954.
10. Narushima K., Kosier J.T., Robinson R.G. A reappraisal of poststroke depression, intra- and inter-hemispheric lesion location using meta-analysis // *J. Neuropsychiatry and Clinical Neurosci., 15, 423-430, 2003.*

### SEARCHING FOR INFORMATIVE INDICATORS OF BRAIN FUNCTIONAL STATE BIOELECTRICAL ACTIVITY UNDER SOME ANTIDEPRESSANT

V.N. Karkischenko, S.P. Matua, V.P. Omel'chenko

*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow  
Rostov State Medical University, Rostov-on-Don*

The melipramine and amitriptiline action on the brain electrograms (EG) were analyzed. Dose dependent changes of brain EG under melipramine were revealed.

**Key words:** brain electrograms, brain bioelectrical activity, antidepressants.

## Особенности действия amitриптилина на плавательное поведение intactных и овариоэктомированных самок крыс в разное время суток

Э.А. Манвелян, В.А. Батурич

Ставропольская государственная медицинская академия, г. Ставрополь

В экспериментах на самках белых крыс линии Wistar изучали активность amitриптилина (10 и 25 мг/кг) у intactных и овариоэктомированных самок крыс в утренние (8-10 ч) и вечерние (18-20 ч) часы в плавательном тесте. Оценивали общие (статические) показатели и ритмическую структуру плавания. Затем рассчитывали биоритмологический индекс депрессивности. Выполненное исследование показало, что у овариоэктомированных самок в плавательном тесте индекс депрессивности был выше, чем у intactных крыс. При этом он был наиболее выражен утром. Также выявлено, что действие amitриптилина зависело от времени суток, сохранности эстрального цикла, гормонального фона. Антидепрессант выраженно понижал индекс депрессивности овариоэктомированных самок в дозе 25 мг/кг в утреннее время, но этот эффект был слабее, чем у intactных крыс.

**Ключевые слова:** принудительное плавание, amitриптилин, овариоэктомия, утро, вечер.

Значительное распространение психоневрологических, депрессивных состояний среди мужского и женского населения, более высокая частота возникновения депрессий у женщин, чем у мужчин [10, 13], атипичное протекание депрессий у женщин в маскированной, соматизированной форме [12] обуславливают актуальность поиска новых подходов к оптимизации фармакотерапии антидепрессантами. В этой связи было интересно изучить хронобиологические особенности действия amitриптилина на поведение intactных и овариоэктомированных (ОЭ) самок крыс в тесте принудительного плавания, позволяющего моделировать экспериментальную депрессию и широко применяемого для скрининга и исследования антидепрессантов [1, 2, 5, 6, 11].

**Материал и методы.** Опыты были выполнены на 120 белых половозрелых intactных и ОЭ самках со средней массой 130-200 г, полученных из питомника «Рапполово». Животных содержали в клетках-ваннах при естественном освещении и максимальной стандартизации температурного

режима. Кормление (комбикорм) и уход осуществляли в привычном для животных режиме вивария. Обеспечивался свободный доступ крыс к пище и воде.

Учитывая, что в клинических условиях эффект антидепрессантов проявляется при длительном использовании, amitриптилин в дозах 10 и 25 мг/кг внутрибрюшинно вводился хронически в течение 14 дней утром (8-10 ч) и вечером (18-20 ч) разным группам крыс. Оценку влияния антидепрессанта на плавательное поведение животных проводили также в утренние и вечерние часы. Контрольные животные в каждой серии опытов в тех же режимах получали физиологический раствор. Овариоэктомию осуществляли по общепринятой методике [4]. Самок в эксперименты брали не ранее двух недель после овариоэктомии.

Принудительное плавание оценивали по предложенной Батуриным В.А. и соавторами методике [3]. Регистрация локомоции проводилась при помощи компьютерной программы, позволяющей учитывать общие (статические) показатели принудительного плавания и его ритмическую структуру. Определяли продолжительность

состояний неподвижности (иммобилизация), активного (энергичные гребковые движения всеми конечностями) и пассивного (слабые гребки) плавания. Для характеристики временной динамики плавательного поведения регистрировали количество разных по длительности периодов (циклов): менее 6, 6-18, 18-36, более 36 секунд. На основании полученных результатов рассчитывалась доля активного плавания, пассивного плавания и иммобилизации в процентах к общему времени тестирования. Для оценки «депрессивности» рассчитывали биоритмологический «индекс депрессивности» (ИД) как частное от деления количества периодов иммобилизации длительностью не более 6 секунд на общее число периодов активного плавания. Для определения стадии эстрального цикла у самок брали вагинальные мазки до проведения опытов [4].

Результаты обрабатывали с использованием стандартных компьютерных программ. Достоверность обнаруженных различий определяли при помощи критериев Стьюдента, Вилкоксона-Манна-Уитни.

**Результаты.** Выполненные эксперименты показали, что у животных обнаруживался различный индекс депрессивности в разное время суток. При этом у контрольных самок ИД значительно возрастал по сравнению с исходным уровнем.

Введение amitriptилина в малой дозе самкам утром несколько увеличивало суммарное время пассивного плавания и ограничивало продолжительность иммобилизации. В ритмической структуре плавания отмечали увеличение частоты всех циклов активного плавания, продолжительных актов пассивного плавания и лимитирование средних и длинных периодов иммобилизации. ИД при этом снижался, особенно заметно в фазе эструса и метаэструса. Увеличение дозы препарата в это время суток у интактных самок приводило к существенному росту времени активного плавания и

ограничивало продолжительность пассивного. ИД понижался заметнее в эструсе и диэструсе.

Использование антидепрессанта вечером вызывало сходные изменения общих и ритмических показателей плавания самок. ИД достоверно снижался и этот эффект был дозозависимым.

ОЭ особи в целом характеризовались более высоким ИД, нежели интактные. При этом биоритмологический показатель у ОЭ самок вечером несколько снижался по сравнению с утренними данными. Однако по сравнению с интактными самками вечером сдвиг «индекса депрессивности» у ОЭ крыс был менее выраженным, нежели утром.

Хроническое введение amitriptилина в дозе 10 мг/кг после овариэктомии увеличивало время активного и пассивного плавания ( $p < 0,001$ ) и снижало продолжительность иммобилизации ( $p < 0,01$ ) и индекс иммобилизации ( $p < 0,01$ ) по сравнению с контрольными ОЭ самками. В ритмической структуре активного и пассивного плавания уменьшалось число коротких ( $p < 0,05$ ) и средних циклов ( $p < 0,01$ ), увеличивалось количество продолжительных периодов ( $p < 0,01$ ). В структуре иммобилизации ограничивалась частота всех циклов ( $p < 0,05$ ). ИД при этом несколько снижался.

Введение антидепрессанта в малой дозе вечером приводило к достоверному повышению коэффициента активного плавания ( $p < 0,05$ ), учащению коротких и продолжительных актов активного плавания ( $p < 0,05$ ). ИД вечером несколько снижался. Различия при этом были больше, чем утром.

Увеличение дозы amitriptилина до 25 мг/кг у ОЭ самок заметно снижало ИД ( $p < 0,05$ ), что было связано с увеличением частоты актов активного плавания ( $p < 0,01$ ) и уменьшением числа периодов иммобилизации ( $p < 0,01$ ). В вечерние часы введение антидепрессанта в большой дозе вызывало тенденцию к снижению «индекса депрес-

сивности» у ОЭ самок. Различия при этом были менее выражены, нежели утром.

Следовательно, амитриптилин у овариоэктомированных самок достоверно снижал ИД лишь в дозе 25 мг/кг утром. Однако этот эффект был слабее, чем у интактных крыс.

Таким образом, результаты, полученные с использованием биоритмологического подхода к оценке принудительного плавания самок крыс, свидетельствуют, что, несомненно, имеются различия в эффективности амитриптилина у интактных и ОЭ самок. При этом эффект антидепрессанта зависел от времени суток, гормонального фона, сохранности эстрального цикла, что согласуется с данными других авторов [6, 7, 8, 9].

#### Выводы

1. У овариоэктомированных самок в плавательном тесте индекс депрессивности был выше, чем у интактных крыс. Индекс депрессивности у овариоэктомированных самок был наиболее выражен утром.
2. Амитриптилин выраженно понижал индекс депрессивности овариоэктомированных самок в дозе 25мг/кг в утреннее время, но этот эффект был слабее, чем у интактных крыс.

#### Литература

1. Арушанян Э.Б., Батурич В.А. Основы хронофармакологии. — Ставрополь: Ставрополье, 1989.
2. Арушанян Э.Б. Антидепрессанты. — Ставрополь: Ставрополье, 2002.
3. Батурич В.А., Щетинин Е.В., Арушанян Э.Б. и др. Биоритмологический подход к оценке принудительного плавания как экспериментальной модели «депрессивного» состояния // *Журн. выш. нервн. деят.*, № 5, с. 959-964, 1989.
4. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии. Основные методики экспериментально-эндокринологических исследований. — М: Изд-во Московского университета, 1968.
5. Молодавкин Г.М., Воронина Т.А., Мдзинаришвили А.Л. Особенности влияния фармакологических веществ разных классов на вынужденное плавание у крыс // *Эксперим. и клин. фармакол.*, т. 57, № 1, с. 3-5, 1994.
6. Федотова Ю.О. Влияние 8-ОН-DРАТ на депрессивное поведение и обмен моноаминов в гиппокампе овариоэктомированных крыс // *Эксперим. и клин. фармакол.*, т. 69, № 1, с. 12-17, 2006.
7. Федотова Ю.О., Платонова Н.А., Сапронов Н.С. 8-ОН-DРАТ модулирует экспрессию генов серотониновых рецепторов 1A/2A подтипов и рецептора 17 Р-эстрадиола у овариоэктомированных крыс в тесте Порсолта // *Эксперим. и клин. фармакол.*, т. 69, №3, с. 53-57, 2006.
8. Carlson, J.N., Click, S.D. Cerebral internalization as a source of interindividual differences in behavior // *Experimental.* № 45, p. 788-790, 1989.
9. Haaren F. Van, Hest A. Van, Heinsbrock, P.P.W. Behavioral differences between male and female rats: effects of gonadal hormones on learning and memory // *Neurosci. Biobehav. Rev.*, v. 14, pp. 23-25, 1990.
10. Hamilton J.A., Halbreich U. Special aspects of neuropsychiatric illness in women: focus on depression // *Ann. Rev. Med.*, No. 44, pp. 355-364, 1993.
11. Rogoz Z., Skuza Grazyna, Wojcikowski Jacek, Daniel Wladislawa A. Effects of combined treatment with imipramine and metyrapone in the forced swimming test in rats. Behavioral and pharmacokinetic studies // *Pol. J. Pharmacol.*, No. 6, pp. 993-999, 2003.
12. Yonkers, K.A., Zlotnic, K. C, AHsworth, J. et al. Is the course of panic disorder the same in women and men? // *Am. J. Psychiatry*, No. 155, pp. 596-602, 1998.
13. Wolk S.I., Weissman M.M. Women and depression: an update // In: Oldham J.M., Riba M.B., eds. *Review of psychiatry*. — Washington, DC: American Psychiatric Press., No. 14, pp. 227-259, 1995.

**SPECIFIC EFFECT OF AMITRIPTILINS ON SWIMMING BEHAVIOUR OF INTACT  
AND OVARECTOMIZED FEMALE RATES AT DIFFERENT TIME OF THE DAY**

**E.A. Manvelyan, V.A. Baturin**

*Stavropol State Medical Academy, Stavropol*

In swimming tests on white intact and ovariectomized female rats of a Wistar line, there was studied the amitriptylin activity (10 and 25 mg/kg) in the morning (8-10 hours) and in the evening (18–20 hours). The general (static) parameters of swimming and its rhythmic structure were estimated. Then the biorhythmological index of depressivity was calculated. The index of depressivity of ovariectomized females in the swimming test was shown to be higher than that of intact rates and more expressed in the morning. Also, it was found that amitriptylin action depends on the time of the day, retention of estrus cycle and hormone background. Antidepressant (25 mg/kg) clearly decreased the index of depressivity of ovariectomized females in the morning, but this effect was weaker, than that of the intact rates.

**Key words:** swimming test, amitriptylin, ovarioectomy, females, the morning, the evening.



## Мониторинг использования опиоидных анальгетиков у амбулаторных пациентов как способ оптимизации лечения интенсивной хронической боли

М.В. Пчелинцев, Э.Э. Звартау, А.Н. Кубынин, Т.Е. Аргеева

*Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова, Санкт-Петербург*

Проблема лечения сильной хронической боли у инкурабельных онкологических больных представляет важную медицинскую и гуманитарную задачу. Сильные опиоиды (морфин, омнопон, фентанил) являются безальтернативными средствами для лечения сильной боли и рекомендуются к применению ВОЗ на третьей ступени медикаментозного обезболивания. Вместе с тем, по данным как российских, так и зарубежных исследователей, количественный и качественный уровень обеспеченности опиоидами инкурабельных онкологических больных в Российской Федерации значительно уступает ведущим странам Западной Европы и США. В статье проанализированы данные по применению опиоидов в Санкт-Петербурге у инкурабельных онкологических больных, отмечены недостатки и позитивные тенденции, предложены меры по улучшению обезболивающей терапии сильными опиоидами.

**Ключевые слова:** боль, анальгезия, опиоиды, фармакоэпидемиология.

Обезболивание является одной из важнейших задач в работе врача, поскольку боль служит очень частой причиной страданий и обращения пациента к медикам. Так, по оценкам ВОЗ, 90% всех заболеваний проявляется болью, а пациенты с хронической болью в пять раз чаще обращаются за медицинской помощью, чем остальное население.

Боль является особым чувством, служащим сигналом о повреждении тканей или угрозе такого повреждения, вызывающим нарушение функций организма, физические страдания и негативные эмоциональные переживания. Патологическая боль, вызывая целый комплекс дезадаптивных реакций в организме, приводит к регионарным и системным нарушениям микроциркуляции, является причиной вторичных иммунодепрессивных состояний и других изменений. Хроническая патологическая

боль, длительная или постоянная, чаще всего отмечается при хронических воспалительных неонкологических (ревматоидный артрит, остеоартроз) или онкологических заболеваниях, а также при неврологической патологии. Особенности механизмов, лежащих в основе хронизации боли, недостаточно изучены, и лечение хронического болевого синдрома является сложной задачей для врача.

Наиболее сильная хроническая, изматывающая пациента боль может быть купирована в первую очередь с помощью опиоидных анальгетиков. В амбулаторной практике частой причиной страданий пациентов служит хронический болевой синдром при онкологических заболеваниях в терминальной стадии течения. В такой ситуации мощные опиоиды являются безальтернативными средствами терапии. Для полноценного обезболивания и улучшения

самочувствия в последние недели или месяцы жизни этих пациентов врач должен хорошо ориентироваться в современных лекарственных средствах и формах и уметь грамотно их применять.

В настоящее время в Санкт-Петербурге и в России в целом имеет место недостаточное использование опиоидных анальгетиков при хронической боли, в том числе у онкологических пациентов. Нами были предприняты фармакоэпидемиологические исследования с целью анализа назначения опиоидов амбулаторным пациентам в Санкт-Петербурге.

Данные об использовании опиоидов при хронической боли имеют весьма разрозненный, децентрализованный характер. Оказалось, что невозможно установить, сколько пациентов с хронической болью получают опиоидные анальгетики, с какой патологией, какие и как долго. В существующие формы отчетности подобные сведения не включаются. В рамках «ракового регистра» [4, 5] ведется учет количества онкологических пациентов с различными фазами заболевания, в том числе инкурабельных, статистика смертности, но отсутствуют данные о количестве больных с интенсивной болью, нуждавшихся в течение года в сильных опиоидных анальгетиках. Данные о конкретных пациентах, получающих опиоиды, «разбросаны» по журналам отпуска наркотических анальгетиков в поликлиниках города, в историях болезней хосписов, «розовых» рецептурных бланках, хранящихся в уполномоченных отпускать опиоидные анальгетики аптеках города.

В Российской Федерации, как известно, нуждающиеся в опиоидных препаратах больные получают их бесплатно по месту жительства в рамках льготного лекарственного обеспечения. С 2006 года граждане, отказавшиеся от льгот на лекарственное обеспечение, покупают медикаменты за деньги. Пациенты со злокачественными заболеваниями консультируются врачами-

онкологами районного онкологического или хосписного (амбулаторного) отделения, которые констатируют необходимость назначения сильно действующих анальгетиков из группы опиоидов, после чего рекомендованные ими обезболивающие препараты выписываются участковыми врачами на специальных рецептурных бланках. Выписанные препараты выдаются пациентам или их родственникам в аптеках, имеющих соответствующие лицензии и разрешения. Обычно врач-онколог консультирует пациентов определенных, закрепленных за ним поликлиник, а те или иные поликлиники района закреплены за конкретной аптекой, имеющей разрешение на хранение и отпуск опиоидов.

Онкологические больные с тяжелым хроническим болевым синдромом в ряде случаев госпитализируются и проводят последний период своей жизни в стационаре или хосписе. Там они получают обезболивающую терапию, но все же большинство этих пациентов лечатся амбулаторно, по месту жительства и получают в районных аптеках сильные обезболивающие средства по рецептам лечащего врача поликлиники. К сожалению, доступ к информации о назначенных и отпущенных пациентам препаратов из группы опиоидов в достаточной мере затруднен. Это связано, с одной стороны, с необходимостью получать большое количество административных согласований и разрешений, а с другой — с большим объемом децентрализованной информации. Тем не менее, нам удалось проанализировать ряд данных, позволяющих судить о положении дел с использованием опиоидов за последние годы в Санкт-Петербурге, сделать выводы об имеющихся тенденциях и проблемах. Знание же конкретной ситуации позволяет выработать обоснованные рекомендации по качественному и количественному улучшению лечения хронического болевого синдрома у амбулаторных инкурабельных онкологических больных. В этой статье мы

хотим провести систематизированный анализ данных, представленных в ранее опубликованных работах [10-17].

### 1. Анализ количественного и качественного отпуска опиоидных анальгетиков в Санкт-Петербурге аптечным учреждениям города

С помощью базы данных ГУП «Центральная фармацевтическая база Санкт-Петербурга» нами были проанализированы сведения об общем количестве опиоидных анальгетиков, отпущенных медицинским учреждениям города, а также о количестве опиоидов, отпущенных через лицензированные городские аптеки льготникам (онкобольным) за несколько последних лет.

Было выявлено, что в период с 2000 по 2004 гг. амбулаторным онкобольным через систему уполномоченных аптек отпускались **только препараты для парентерального введения**, а именно: морфин 1% 1 мл; омнопон 2% 1 мл; промедол 2% 1 мл. Препараты в энтеральной, буккальной, трансдермальной формах этой категории пациентов не отпускались. Данный факт говорит о явном несоответствии подхода в лечении амбулаторных пациентов международным стандартам и рекомендациям. В международных рекомендациях считается наиболее правильным, эффективным и безопасным использовать у амбулаторных пациентов с сильной хронической болью пролонгированные лекарственные формы опиатов (энтеральные, буккальные, трансдермальные). В рассмотренный период выявлена тенденция к снижению отпуска в 2004 году по отношению к 2000 году морфина на 60%, омнопона на 13 %, промедола на 69%. Это происходило при стабильном увеличении в Санкт-Петербурге количества онкобольных, в том числе с терминальной IV стадией заболевания. Так, в 2000 г. общее

количество зарегистрированных онкобольных составило 85891 человек, из них 18 295 человек с заболеванием в IV стадии, а в 2004 г. – 97 325 человек, из них 21 317 человек с заболеванием в IV стадии.

Для понимания уровня обеспеченности препаратами амбулаторных пациентов был предпринят ряд расчетов. Эти расчеты учитывали количество опиоидов, отпущенное льготным контингентам (инкурабельным онкологическим пациентам), и общее количество инкурабельных пациентов с IV фазой заболевания в том или ином году. Количество каждого из отпущенных опиоидов было пересчитано на средние суточные терапевтические дозы соответствующего препарата. Полученные данные представлены в табл. 1.

Как следует из табл. 1, суммарное количество средних терапевтических доз опиоидов, отпущенных аптеками онкобольным в течение 2000-2004 гг., прогрессивно уменьшалось, снизившись на 47%, то есть практически в 1,5 раза. Это снижение не было связано с финансовыми или организационными проблемами по закупке и отпуску опиоидных анальгетиков, а свидетельствовало о нежелании врачей инициировать прописывание больным препаратов данной группы. Это нежелание является следствием усложненной и строго регламентированной процедуры прописывания опиоидных анальгетиков. В результате, даже несомненно нуждавшиеся в назначении сильных опиоидов пациенты продол-

Таблица 1  
Расчетное количество суммы средних терапевтических доз морфина, омнопона, промедола в 2000-2004 гг.\*

Препарат	Количество среднесуточных доз				
	2000 г.	2001 г.	2002 г.	2003 г.	2004 г.
Морфин	31617	19267	17233	11633	12717
Омнопон	21200	31950	25600	19867	18633
Промедол	15610	9995	9525	5750	4850
Суммарное количество	68427	61212	52358	37250	36200

\* Расчет выполнен на основании данных по отпуску препаратов онкобольным на амбулаторном этапе лечения.

жали получать ненаркотические анальгетики, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), трамадол [10] или их сочетания. Следует отметить, что названные выше лекарственные средства и их сочетания отнесены ВОЗ ко второй ступени обезболивания, рекомендуемой для лечения боли средней интенсивности и не могут подменить сильные опиаты [20, 21].

В 2005 году ситуация стала несколько меняться. Помимо препаратов для парентерального введения, через аптеки пациентам стали отпускать морфина сульфат для энтерального введения – «МСТ континус» в дозах 30, 60 и 100 мг в одной таблетке. В результате, несмотря на продолжающееся снижение отпуска в 2005 г. по сравнению с 2004 г. ампулированного 1% морфина на 41%, омнопона 2% 1 мл на 35% и промедола 2% 2 мл на 41%, при пересчете отпущенного морфина в форме «МСТ континус» на эквивалентные дозы парентерального морфина оказалось, что суммарное количество отпущенного морфина в 2005 г. выросло на 47% от уровня 2004 г.

Общее количество всех опиоидных анальгетиков в перерасчете на эквивалент «морфина для парентерального введения» в 2005 г. незначительно отличалось от суммарного их отпуска в 2004 г., но было примерно в 2 раза ниже суммарного отпуска по льготе в 2000 г. (табл. 2).

Одним из общепризнанных показателей уровня обеспеченности населения опи-

оидными анальгетиками является коэффициент «кг морфина на 1 млн. населения» [18]. Для расчета этого показателя все отпущенные населению Санкт-Петербурга наркотические анальгетики были пересчитаны, исходя из эквивалентности анальгетической активности, на морфин для парентерального введения. Полученное общее количество «эквивалентного морфина» в килограммах, поделено на число жителей С-Петербурга в соответствующем году. Рассчитанный показатель (кг/млн. населения) составил: в 2000 году – 1,69; в 2001 – 1,82; в 2002 – 1,73; в 2003 – 1,67; в 2004 – 1,64, в 2005 – 1,71. Следует отметить, что значение данного показателя в Санкт-Петербурге существенно уступает ведущим странам мира. Так, в странах Восточной и Западной Европы оно составляет 4,2 и 34,2 кг/млн. населения соответственно; в США – 21,0 кг/млн. населения.

Легко также подсчитать, что при численности населения Санкт-Петербурга около 4,5 млн. человек общее количество потребляемых в медицинских целях опиоидных анальгетиков в течение года составляет около 8 кг в пересчете на парентеральный морфин. Не подвергая сомнению необходимость должного контроля за медицинским использованием препаратов данной группы, хотелось бы заметить, что это количество несопоставимо с рынком нелегального оборота опиатов и опиоидов.

Таблица 2

**Количество опиоидов в перерасчете на эквивалент морфина для парентерального введения, отпущенное амбулаторным пациентам в рамках льготного обеспечения в 2000, 2004-2006 гг.**

Годы	Доза препарата (эквивалент п/э морфину), мг					ВСЕГО
	Морфин амп. 1% – 1 мл	Оmnopон амп. 2% – 1 мл	Промедол амп. 2% – 1 и 2 мл	Морфин тб. 30, 60 и 100 мг N 20	Дюрогезик ТТС 25: 50, 75 мкг/час N5	
2000	948500	636000	249760	0	0	1834260
2004	381500	559000	77600	0	0	1018100
2005	227000	365000	46000	361333	0	999333
2006	48750	168210	24948	524600	548400	1314908

Таблица 3

**Некоторые дозовые и фармакокинетические параметры ТТС Дюрогезик**

Площадь ТТС Дюрогезик/доза фентанила, выделяемая за час	Суммарная доза фентанила, содержащаяся в ТТС Дюрогезик, мг	Доза фентанила, выделяемая ТТС Дюрогезик за сутки, мг	Максимальная концентрация фентанила в плазме крови, нг/мл	T <sub>max</sub> фентанила в плазме крови, час
10 см <sup>2</sup> / 25 мкг/час	2,5	0,6	0,6	38,1
20 см <sup>2</sup> / 50 мкг/час	5	1,2	1,4	34,8
30 см <sup>2</sup> / 75 мкг/час	7,5	1,8	1,7	33,5
40 см <sup>2</sup> / 100 мкг/час	10	2,4	2,5	36,8

В 2006 г. для лечения хронической боли у онкологических пациентов в Санкт-Петербурге впервые стала применяться трансдермальная форма фентанила (Дюрогезик). Этот препарат отличается высоким уровнем анальгетической активности и длительностью действия до 72 часов. ТТС Дюрогезик содержит достаточно большое количество фентанила (табл. 3). Площадь контакта с кожей составляет 10, 20, 30 и 40 см<sup>2</sup> и в зависимости от этого системой высвобождается в системный кровоток 25, 50, 75 и 100 мкг фентанила в час. За сутки пациенту, соответственно, вводится 0,6 мг (600 мкг), 1,2 мг (1200 мкг), 1,8 мг (1800 мкг) или 2,4 мг (2400 мкг). Содержимое системы используется на 47% в первые 24 часа, на 68% через 48 часов и 94% после 72 часов применения.

В силу высокой анальгетической активности и длительности действия трансдермального фентанила перерасчет его доз на морфин для парентерального введения приводит к резкому увеличению показателей суммарного отпуска опиоидов в «парентеральном морфиновом эквиваленте» (табл. 4). Именно с этим связано то, что впервые за годы, в течение которых велся мониторинг, общее количество отпущенных через аптеки для лечения хронической боли опиоидов в 2006 г. стало иметь тенденцию к увеличению (табл. 2).

Так, введение в клиническую практику в 2006 году Дюрогезика привело к тому, что общее количество опиоидов в пересчете на эквивалент морфина для парентерального введения на 55% превысило уровень 2005 г. и составило 79% от уровня 2000 г. – года максимального отпуска опиоидов за период мониторинга.

Наряду с внедрением в клиническую практику трансдермального фентанила в 2006 г. произошло и увеличение отпуска таблеток пролонгированного морфина сульфата по сравнению с 2005 г. Увеличение составило: для таблеток в дозе 30 мг – на 247% (или в 2,5 раза) для общего отпуска препаратов для таблеток в дозе 60 мг: на 242% (в 2,4 раза) для общего количества препаратов; для таблеток по 100 мг: на 160,6% (или в 1,6 раза).

В не меньшей степени, чем количественный аспект, важен и качественный аспект структурных изменений отпуска

Таблица 4

**Соотношение эквивалентных доз трансдермального фентанила (Дюрогезик) и морфина для парентерального введения [7]**

Доза Дюрогезика	Эквивалентная доза морфина для парентерального введения, мг в сутки	Эквивалентная доза морфина для парентерального введения за 3 суток, мг
25 мкг/час или 600 мкг/сут	40	120
50 мкг/час или 1200 мкг/сут	70	210
75 мкг/час или 1800 мкг/сут	100	300
100 мкг/час или 2400 мкг/сут	120	360

опиатов амбулаторным категориям пациентов, произошедший в 2006 г. Изменились соотношения количеств препаратов, назначавшихся парентерально и не парентерально (энтерально, трансдермально) (табл. 5).

Таблица 5  
Соотношение общего количества опиоидов для парентерального и не парентерального введения (2000-2006 гг.)

Год	Соотношение п/э и НЕ п/э опиоидов
2000-2004	100% / 0%
2005	64% / 36%
2006	19% / 81%

Общепризнанно, что энтеральное, буквальное или трансдермальное введение препаратов является наиболее оптимальным для лечения интенсивной хронической боли в амбулаторных условиях. Парентеральное введение представляется менее предпочтительным из-за достаточно непродолжительного эффекта, более высокого риска угнетения дыхания и развития патологического пристрастия, необходимости участия медицинского персонала в проведении инъекции больному.

**2. Анализ длительности лечения, суточных и курсовых доз опиоидных анальгетиков, применявшихся для лечения хронической боли у амбулаторных онкологических больных в четырех административных районах Санкт-Петербурга в 2000-2005 гг.**

Для лучшего понимания величины доз и длительности терапии опиоидами, которую получает конкретный амбулаторный пациент, нами был принят анализ 5600 рецептов, выписанных на наркотические анальгетики в 4 административных районах С-Пе-

тербурга в период 2000-2005 гг. Этот анализ позволил провести ряд расчетов по количеству и длительности назначения препаратов-опиатов конкретным пациентам, страдавшим тяжелой болью онкологического генеза. Всего за рассмотренный период в 17 поликлиниках 4 административных районов города рецепты были выписаны на эти препараты 844 пациентам (табл. 6) на амбулаторном этапе лечения. Предпочтения по выписыванию препаратов распределились следующим образом: в 60-70% случаев в зависимости от анализируемого года пациентам выписывался опион, в 20-30 % – морфин и в 7-10% случаев – промедол. Энтеральная пролонгированная форма морфина – «МСТ-континус» (таблетки 30, 60 и 100 мг) выписывалась только в 2005 г. Препарат был назначен 24 пациентам из 102 или примерно 24% пациентов, из тех, которым выписывались рецепты на опиоидные анальгетики в 2005 г. в проанализированной популяции. Дюрогезик вплоть до 2006 г. в городе не применялся.

Длительность применения наркотических анальгетиков у каждого пациента вычислялась путем деления общей дозы препарата, выписанного на рецепте, на размер предписанной суточной дозы. Например, если пациенту выписывались 10 ампул 1% раствора морфина по 1 мл, а в сутки назначалось 20 мг (2 мл 1% раствора препарата), то считалось, что терапия препаратом, отпущенным по этому рецепту, продолжалась 5 дней. Были проведены так-

Таблица 6  
Количество амбулаторных пациентов, которым выписывались опиоидные анальгетики в период 2001-2005 гг. в 17 поликлиниках четырех административных районов Санкт-Петербурга

Показатель	2001 г.	2002 г.	2003 г.	2004 г.	2005 г.
Количество пациентов, которым выписывались наркотические анальгетики	224	175	157	177	102

же сопоставления суммарного количества дней, на которые выписывались препараты, с диапазонами между датами рецептов, выписанных конкретным больным. Оказалось, что рассчитанное по рецептам количество дней, на которые выписывались опиоиды, и временной диапазон, определенный по датам рецептов, в течение которого они выписывались, для большинства больных близки или практически совпадают. Однако у некоторых пациентов имели место и достаточно большие расхождения. Это могло быть связано с пребыванием больного какое-то время в хосписе или больнице, или с неполучением пациентом анальгетика в силу каких-то организационных причин (отсутствие родственников, отсутствие адекватной социальной опеки и т.п.). Естественно, что подобные расхождения сроков лечения по диапазонам дат выписанных рецептов и сроков, рассчитанных по предписанным суточным дозам и количеству выписанного в рецепте препарата, чаще имели место у пациентов с длительными сроками лечения.

Таким образом, представленные значения в днях характеризуют суммарное количество дней, на которое пациентам был выписан и получен в аптеке тот или иной опиоидный анальгетик.

Анализ длительности применения наркотических анальгетиков в рассматриваемой популяции пациентов показал, что средняя длительность применения препаратов группы с 2001 по 2004 гг. почти не менялась и составляла 30-37 суток. В 2005 г. этот срок увеличился до 45 суток, что может быть связано или с более ранним началом терапии хронической боли у пациентов или с клиническими особенностями течения заболевания в популяции именно в этом году. Индивидуальная длительность курсов лечения наркотическими анальгетиками у различных пациентов варьировала в очень широком диапазоне и составляла от трех дней до года и более [11]. Однако, несмотря на значительный разброс ин-

дивидуальной длительности получения опиоидных анальгетиков различными пациентами, большинство из них (78-89%), независимо от анализируемого года, получали препараты в течение не более 60 суток. Причем всего одну неделю и менее лечились 20-25% больных, один месяц и менее — 60-75% больных. Доля пациентов, получавших лечение не более трех месяцев, составило около 90% за весь анализируемый период времени. Для большей объективности были отдельно проанализированы рецепты пациентов, получавших наркотические анальгетики по данным дат на рецептах не только в течение одного года, но и в течение нескольких лет. Количество таких пациентов было незначительно. Большинство из них получали опиоидные анальгетики в двух соседних годах, причем сравнительно короткие сроки как в предшествующем, так и в последующем году. Терапия у таких пациентов начиналась в ноябре-декабре предыдущего года, а завершалась в январе-феврале следующего. Однако были выявлены исключения. Так, три пациента получали наркотические анальгетики на протяжении всех пяти лет, взятых для анализа. Двум из них терапия проводилась на протяжении этого срока практически ежедневно. Одна пациентка получала терапию на протяжении трех лет подряд, а еще одна — двух.

Вероятно, подобная длительность получения препаратов была обусловлена особенностями течения онкологического процесса. К сожалению, отсутствие доступа к медицинским документам этих больных в рамках проведенного исследования не позволяет определенно ответить на этот вопрос.

Был также произведен расчет средних показателей количества препаратов, выписывавшихся пациентам на сутки. Оказалось, что в разные годы анализируемого периода выписывалось от 22,52 до 29,59 мг морфина для парентерального введения, от 44,02 до 54,28 мг омнопона и от 28,54 до

Таблица 7

Среднее количество опиоидных анальгетиков (морфина, омнопона, промедола), выписанное на сутки в период 2001-2005 гг.

Год	Выписано больному морфина в среднем на сутки лечения (мг)	Выписано больному омнопона в среднем на сутки (мг)	Выписано промедола больному в среднем на сутки (мг)
2001	22,52	44,02	38,51
2002	23,57	49,92	28,54
2003	27,96	48,40	30,80
2004	29,59	54,28	29,44
2005	26,24 и 97,24 (в энтеральной форме)*	50,65	33,22

38,51 мг промедола для парентерального введения (табл. 7).

Из табл. 8 видно, что средние суточные дозы, назначавшиеся пациентам, были ниже, чем средние дозы этих препаратов, рекомендованные в пособиях по лечению боли у онкологических больных, что подтверждает расчеты, приведенные в предыдущем разделе статьи. Учитывая разницу в абсолютной анальгетической активности препаратов, был произведен пересчет сред-

них суточных доз различных опиоидных анальгетиков на эквивалент морфина для парентерального введения в миллиграммах, что позволило рассчитать дозу в «парентеральном морфиновом эквиваленте», выписывавшуюся пациентам в среднем на сутки. При пересчете оказалось, что эквивалентная доза опиоидных анальгетиков, выписываемая на одного пациента в сутки, составляла 17,41-22,65 мг «парентерального морфина» (табл. 8).

Таблица 8

Среднее количество опиоидных анальгетиков в эквивалентном пересчете на парентеральный морфин, выписанное пациентам на сутки, в период 2001-2005 гг.\*

Год	Выписано морфина для парентерального введения в среднем на сутки (мг)	Выписано морфина для энтерального введения (МСТ) в среднем на сутки (мг)	Выписано омнопона в среднем на сутки в эквивалентном пересчете на морфин (мг)	Выписано промедола в среднем на сутки в эквивалентном пересчете на морфин (мг)	Выписано в среднем НА в пересчете на эквивалентный морфин для парентерального введения на сутки (мг)
2001	22,52	0	22,01	7,70	17,41
2002	23,57	0	24,96	5,70	18,07
2003	27,96	0	24,20	6,16	19,44
2004	29,59	0	27,14	5,89	20,87
2005	26,22	97,24 (32,41**)	25,33	6,64	22,65

\* Расчет эквивалентности производился из соотношения 10 мг морфин = 20 мг омнопона = 50 мг промедола.

\*\* Эквивалентная доза для энтерального пролонгированного морфина в форме таблеток МСТ континус рассчитывалась из соотношения: 10 мг п/э морфина = 30 мг МСТ континус

Таблица 9

**Распределение средних суточных доз опиоидов по величине в пересчете на парентеральный морфин у пациентов за анализируемые годы**

Диапазон средней дозы	0–10 мг в сутки	11–20 мг в сутки	21–30 мг в сутки	31–40 мг в сутки	41–50 мг в сутки	51–60 мг в сутки	Более 61 мг в сутки
Количество и процент пациентов ее получавших	257 30,45%	393 46,56%	115 13,62%	58 6,87%	5 0,59%	8 0,95%	8 0,95%

Для того чтобы понять, какие суточные дозы и с какой частотой прописывались пациентам, был произведен анализ частоты выписывания тех или иных суточных доз в абсолютном значении в перерасчете на парентеральный морфин для всех пациентов за все анализируемые годы. Оказалось, что у большинства пациентов (77%) средние дозы не превышали 20 мг в сутки в пересчете на парентеральный морфин. Доля пациентов со средней суточной дозой, превышавшей 31 мг морфина в сутки, была минимальна и составляла примерно 9% (табл. 9).

Приведенные дозы свидетельствуют о неадекватном дозировании опиоидных анальгетиков по сравнению с выработанными международными рекомендациями. Суммарное (курсовое) количество опиоидного анальгетика, полученное тем или иным больным за период лечения, в первую очередь зависело от длительности получения пациентом препарата. Различия в средней суточной дозе в начале и в конце лечения у отдельных пациентов в подавляющем большинстве случаев не были очень существенными. При длительном получении препарата одним и тем же пациентом со временем наблюдалось лишь незначительное нарастание назначавшейся ему суточной дозы, что легко объясняется развитием толерантности к опиоидам.

**Выводы**

1. Анализ использования опиоидных анальгетиков при хроническом онкологическом болевом синдроме в Санкт-Петербурге выявил несоответствия при

их назначении современным требованиям и международным рекомендациям как по суточным дозировкам, так и по продолжительности противоболевой терапии.

2. В 2005–2006 гг. отмечены позитивные тенденции в применении опиоидных анальгетиков при хроническом болевом синдроме у онкологических больных. Они связаны с внедрением в практику амбулаторного лечения хронической боли неинвазивных пролонгированных лекарственных форм опиоидов (морфина сульфата, трансдермального фентанила – Дюрогезик). Это соответствует современным международным тенденциям и рекомендациям ВОЗ по оптимизации противоболевой терапии и значительно повышает обеспеченность пациентов современными анальгетиками.
3. Необходимо дальнейшее внедрение в клиническую практику лечения сильной хронической боли неинвазивных лекарственных форм опиоидов с одновременным сокращением использования парентеральных форм препаратов.
4. Целесообразно систематическое проведение обучения врачей терапевтов и онкологов различным аспектам применения опиоидных анальгетиков для лечения интенсивной хронической боли.

**Литература**

1. Волчков В.А., Игнатов Ю.Д., Страшнов В.И. Болевые синдромы в анестезиологии и реаниматологии. – М.: МЕДпресс-информ, 2006.

2. Криштопин В.С. Унификация терапии хронического болевого синдрома в амбулаторных и домашних условиях. Практическое руководство для врачей. — Ставрополь, 2006.
3. Машфорт М.Л., Купер М.Г., Кохен М.Л. и др. Боль и анальгезия. Руководство для практикующих врачей. — М.: Литтерра, 2004.
4. Мерабишвили В.М., Хансон К.П. Злокачественные новообразования в Северо-Западном Федеральном Округе России. — СПб, 2005.
5. Мерабишвили В.М. Онкологическая служба Санкт-Петербурга. — СПб, 2003.
6. Новиков Г.А., Осипова Н.А., Старинский В.В. и др. Перспективы развития и совершенствования паллиативной помощи онкологическим больным в России // *Российский медицинский журнал*, № 1, с. 13-17, 1995.
7. Новиков Г.А., Осипова Н.А. Лечение хронической боли онкологического генеза. Учебное пособие. — М. 2005.
8. Осипова Н.А., Абузарова Г.Р., Петрова В.В. Принципы клинического применения наркотических и ненаркотических анальгетических средств при острой и хронической боли. *Методические указания. Практическое руководство для врачей.* — М.: 2005.
9. Осипова Н.А. Порядок и сроки назначения наркотических анальгетиков. Методические указания. — М., 2001.
10. Пчелинцев М.В., Полякова Л.В., Звартау Э.Э. Анализ использования опиоидных анальгетиков и трамадола у онкологических больных в Санкт-Петербурге на этапе амбулаторного лечения в период 2000-2004 гг. // *Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета, том XIII, №2, с. 61-64, 2006.*
11. Пчелинцев М.В., Кубынин А.Н., Звартау Э.Э. Длительность лечения хронической боли наркотическими анальгетиками у амбулаторных онкологических больных в ряде районов Санкт-Петербурга // *Паллиативная медицина и реабилитация*, № 2, с. 29-33, 2007.
12. Пчелинцев М.В., Полякова Л.В. Анализ отпуска наркотических анальгетиков онкобольным на амбулаторном этапе лечения в Санкт-Петербурге в период 2000-2004 гг. // *Человек и лекарство: Тез. докл. 13-го Рос. нац. конгр.*, с. 723. — М., 2006.
13. Пчелинцев М.В., Громова Л.Ю., Звартау Э.Э. Мониторинг отпуска наркотических анальгетиков онкобольным на амбулаторном этапе лечения в Санкт-Петербурге, тенденции 2005 года // *Человек и лекарство: Тез. докл. 14-го Рос. нац. конгр.*, с. 187-188. — М., 2007.
14. Пчелинцев М.В., Кубынин А.Н., Звартау Э.Э. Исследование практики назначения наркотических анальгетиков онкологическим больным на амбулаторном этапе лечения в ряде районов Санкт-Петербурга в период 2001-2005 гг. Хронические болевые синдромы // *Тез. докл. Российской научно-практ. конф.*, с. 318-320. — Новосибирск, 2007.
15. Пчелинцев М.В., Кубынин А.Н., Звартау Э.Э. Фармакоэпидемиологическое исследование длительности паллиативного лечения наркотическими анальгетиками амбулаторных онкологических больных на основании анализа рецептов, выписанных на препараты этой группы в ряде районов Санкт-Петербурга в период 2001-2005 гг. Хронические болевые синдромы // *Тез. докл. Российской научно-практ. конф.*, с. 320-323. — Новосибирск, 2007.
16. Пчелинцев М.В., Громова Л.Ю., Звартау Э.Э. Фармакоэпидемиологическое исследование качественной и количественной структуры отпуска наркотических анальгетиков в Санкт-Петербурге гражданам, имеющим право на льготу за период 2001-2005 гг. Хронические болевые синдромы // *Тез. докл. Российской научно-практ. конф.*, с. 323-325. — Новосибирск, 2007.
17. Пчелинцев М.В., Кубынин А.Н., Звартау Э.Э. Фармакоэпидемиологический анализ амбулаторного назначения опиоидных анальгетиков в ряде районов Санкт-Петербурга в 2001-2005 гг. // *Фармакология — практическому здравоохранению: Тез. докл. III съезда фармакологов России. Психофармакология и биологическая наркология, т. 7, спец. вып. (сентябрь), ч. 2. с. 2-1910, 2007.*
18. Штрибель Х.В. *Терапия хронической боли. Практическое руководство.* — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2005.
19. Grond S., Zech D., Diefenbach C., Bischoff A. Prevalence and pattern of symptoms in patients with cancer pain: A prospective evaluation of 1635 cancer patients referred to a pain clinic // *J. Pain Symptom Manage*, 9:372–382, 1994.

20. World Health Organization. *Cancer pain relief: with a guide to opioid availability. 2.* – Geneva: WHO; 1996. Organization guidelines for cancer pain relief: A 10-year prospective study // *Pain*, 63:65–76, 1995.
21. Zech D.F., Grond S., Lynch J., Hertel D., Lehmann K.A. Validation of World Health

#### MONITORING OF USING OPIOID-ANALGETICS IN AMBULATORY PATIENTS AS AN OPTIMIZATION METHOD OF INTENSIVE CHRONIC PAIN TREATMENT

M.V. Pchelintsev, E.E. Zvartau, A.N. Kubynin, T.E. Arteeva  
St. Petersburg Pavlov State Medical University, Saint Petersburg

The problem of severe chronic pains treatment in the incurable oncological patients is an important medical and humanitarian task. Strong opioids (morphin, omnopon, phentaniil) are nonalternative means for severe pains treatment and recommended for usage by WHO on the third stage of anaesthetization. The qualitative and quantitative level of providing incurable oncological patients with opioids in Russian Federation is many times worse than that in the West Europe and USA. Data on opioid usage in Saint Petersburg in the incurable oncological patients is analyzed; the pitfalls and positive tendencies are pointed out; some measures to improve anaesthetization therapy are discussed.

**Key words:** pain, analgesia, opioids, pharmacoepidemiology.

#### Микробиологические и фармакоэпидемиологические аспекты антибиотикотерапии при микоплазмозах

В.А. Батурин, Е.В. Щетинин, И.Ф. Демиденко, С.А. Ерофеев, М.В. Батурина  
Ставропольская государственная медицинская академия, г. Ставрополь

Обследовано более 15000 пациентов с различными заболеваниями верхних и нижних отделов дыхательной системы, а также репродуктивного тракта. Проводили культуральную диагностику микоплазмоза с выделением *M.pneumoniae*, а также *M.hominis*, *M.genitalium* и *U.urealyticum*, и определением чувствительности к антибиотикам. Обнаружено наличие резистентных штаммов микоплазм к антибактериальным средствам. Наиболее существенное снижение чувствительности урогенитальных микоплазм выявлено за последние годы к ципрофлоксацину. Возможно, это связано с интенсивным потреблением фторхинолонов населением региона.

**Ключевые слова:** микоплазмоз, антибиотикорезистентность, потребление антибиотиков.

Микоплазмология — один из самых динамично развивающихся разделов медицины. Известно, что тахителичные (быстро эволюционирующие) бактерии (микоплазмы, класс *Mollicutes*) обладают высоким уровнем генетически опосредованной фенотипической пластичности. Миниатюрный размер генома и ограниченные биохимичес-

кие способности в значительной мере определяют зависимость микоплазм от высших организмов. Тем не менее, эти микроорганизмы способны не только к самостоятельному воспроизведению, но и высокоэффективной адаптации, обеспечивающей преодоление различных защитных систем организмов хозяев и циркуляцию в природе [1].

Вместе с тем, объективных данных о распространенности микоплазмозов, о региональных особенностях состава возбудителей инфекций респираторного и репродуктивного трактов, об уровне резистентности микоплазм к противомикробным средствам недостаточно. Это, с одной стороны, послужило основанием для проведения бактериологического мониторинга при заболеваниях верхних и нижних отделов респираторного тракта и инфекционно-воспалительных поражениях репродуктивной системы. С другой стороны, было интересно параллельно изучить динамику потребления различных классов противомикробных средств в амбулаторной практике, поскольку масштабы использования антибактериальных средств могут определять формирование резистентности микроорганизмов к ним.

#### Методы исследования

Исследование было начато в 2000 году. Обследовано более 15000 пациентов с различными заболеваниями верхних и нижних отделов дыхательной системы, а также репродуктивного тракта. Бактериологические исследования проводились в соответствии с установленными правилами [2, 3, 4]. Культуральный метод диагностики микоплазмоза обеспечивался наборами диагностических сред, выпускаемых отечественными предприятиями. Наиболее полно объединили в себе возможности комплексной диагностики наборы питательных сред для диагностики *M.pneumoniae*, а также *M.hominis*, *M.genitalium* и *U.urealyticum* с возможностью определения чувствительности к антибиотикам, выпускаемые НПО «Иммунотэкс» (Россия). В состав набора входят дифференциально-диагностическая среда для выделения и идентификации микоплазм. Производителем предлагается возможность определения чувствительности микоплазм к достаточно широкому кругу антибактериальных средств: макролиды (эритромицин, азитромицин и кларитромицин), тетрациклины (доксикак-

лин) и фторхинолоны (офлоксацин, ципрофлоксацин и левофлоксацин).

Потребление противомикробных средств в амбулаторной практике оценивали по результатам продаж в трех аптеках г. Ставрополя. Был проанализирован в динамике объем поступлений препаратов в аптеки в период с 2000 по 2007 гг. включительно. Объем потребления оценивали с использованием методологии DDD (Defined Daily Doses). Данные о потреблении противомикробных средств населением в амбулаторной практике выражали как DDD/1000 жителей/день и DDD/1 жителя/год.

#### Результаты

Результаты исследования еще раз подтвердили необходимость проведения микробиологической диагностики, направленной на выявление возбудителя в местах колонизации. Оптимальным является исследование мазков из доступных мест (зев, нос, цервикальный канал т.д.), мокроты, пунктатов пазух носа, среднего уха, секрета предстательной железы с обязательным проведением культурального исследования. При сопоставлении результатов, полученных методом РИФ по выявлению антигена *M.pneumoniae*, с данными культурального исследования, выполненного с помощью коммерческих наборов НПО «Иммунотэкс», выявлено 98% совпадения результатов. Вместе с тем, в 20% случаев выделение микоплазм с помощью питательных сред удавалось подтвердить методом РИФ только при изучении не менее трех мазков из материала пациента, что оказалось гораздо более трудоемким и затратным, чем культуральное исследование.

Применение современного комплекса клинических и лабораторных методов исследования позволило с высокой степенью достоверности верифицировать этиологию респираторных заболеваний и определить их реальную частоту. При рецидивирующих формах хронических тонзиллофарингитов (n-868) бактериологический диагноз под-

твержден у 63,6% обследованных. Стрептококковый процесс выявлен у 53% пациентов (самый частый возбудитель — *Streptococcus pyogenes*), а в 24,5% выделена *Mycoplasma pneumoniae*.

При синуситах (n-453) выявлены различия в составе выделенных возбудителей у пациентов разных возрастных групп. *M. pneumoniae* выявлены в 16,7% лишь у пациентов старше 35 лет. При инфекционных заболеваниях нижних отделов респираторного тракта в амбулаторной практике (n-4531) структура выделяемых микроорганизмов зависела от установленного диагноза, возраста пациента, а также антибактериального анамнеза, предшествовавшего бактериологическому исследованию. *Streptococcus pneumoniae* и *M. pneumoniae* определялись в равных долях практически в 75% всех случаев внебольничной пневмонии (ВП) у взрослых пациентов. *M. pneumoniae* в 2-3 раза реже обнаруживалась в мокроте больных с хроническими формами патологии. С возрастом, независимо от диагноза, увеличивалась доля пневмококков, гемофильных палочек и различных представителей семейства *Enterobacteriaceae*, а роль *M. pneumoniae* значительно снижалась. Вместе с тем, даже у пациентов старше 60 лет микоплазмы занимали существенную долю в общей структуре возбудителей (до 10%). Следовательно, требуется обязательное микробиологическое обследование пациентов, в том числе с целью выявления микоплазм, особенно при ХОБЛ.

Интересным можно считать тот факт, что в сентябре-ноябре и марте-апреле респираторные микоплазмы выявляются в два раза чаще, чем в другие месяцы.

В Ставрополе в 2004-2007 гг. обследовано 858 больных с признаками инфекционной патологии урогенитального тракта. Диагностика включала выделение всех возможных возбудителей, включая грамположительные, грамотрицательные микроорганизмы, а также хламидий (метод иммунофлюоресценции), трихомонад и микоплазм с помощью наборов НПО «Иммунотэкс».

Положительный бактериологический результат получен у 93% пациентов. У 46,7% обследованных больных выделены микоплазмы, хламидии и трихомонады. У 78 таких больных выявлены ассоциации «атипичных» микроорганизмов (19,5%). *U. urealyticum* обнаружена у 20% пациентов, а хламидии — только у 4,6%.

Оценка чувствительности микоплазм к противомикробным средствам показала наличие резистентных штаммов (табл. 1). Существенные изменения чувствительности урогенитальных микоплазм выявлены за последние годы к ципрофлоксацину. Возможно, что это связано с особенностями потребления фторхинолонов населением региона.

Изучение потребления противомикробных препаратов в амбулаторной практике показало существенные изменения в приоритетах врачей и пациентов за последние 7 лет. Наибольшие сдвиги произошли в показателях использования препаратов ципрофлоксацина — увеличение интенсивности применения почти в 5 раз (табл. 2). Чаще стали использовать неомакролидные средства, а эритромицин и тетрациклины — реже. Обращало на себя внимание также наличие устойчивых штаммов *U. urealyticum M. hominis* к макролидным антибиотикам.

Результаты исследования еще раз подтвердили необходимость проведения микробиологической диагностики, направленной на выявление возбудителя в местах колонизации. Кроме того, именно культуральные исследования позволили выявить резистентные формы урогенитальных микоплазм к ципрофлоксацину, макролидам.

Интересным можно считать выявленную взаимосвязь между значительным увеличением применения ципрофлоксацина и снижением чувствительности к этому препарату урогенитальных микоплазм.

Таблица 1

**Количество чувствительных штаммов микоплазм к противомикробным средствам в различные годы исследования**

Препарат		<b>M.pneumoniae n-51</b>	<b>U.urealythicum n-100</b>	<b>M.hominis n-43</b>
Ципрофлоксацин	2005 г.	83,8%	94%	100%
	2007 г.	85%	51%	61%
Офлоксацин	2005 г.	96,7%	94%	100%
	2007 г.	90%	86%	94,5%
Эритромицин	2005 г.	83,8%	72%	57,2%
	2007 г.	75%	74%	61,2%
Кларитромицин	2005 г.	96,7%	78%	42,8%
	2007 г.	90%	79%	66,7%
Азитромицин	2005 г.	96,7%	67%	57,2%
	2007 г.	90%	77%	66,7%
Тетрациклин	2005 г.	93,5%	84%	100%
	2007 г.	95%	86%	88,9%

Таблица 2

**Значения DDD/1000 населения/день в амбулаторной практике для различных антибактериальных средств в 2000-2006 гг.**

Препарат	2000 г.	2002 г.	2004 г.	2005 г.	2006 г.
Эритромицин	0,6	0,37	0,15*	0,14*	0,2*
Азитромицин	0,32	0,21	0,37	0,45	0,65*
Кларитромицин	0,00	0,1	0,6**	0,5**	0,41**
Ципрофлоксацин	0,46	0,81	1,95*	1,5*	2,03*
Офлоксацин	0,31	0,12	0,26	0,32	0,31
Тетрациклины	2,83	2,4*	1,41**	1,12**	0,8**

\*  $p < 0,05$  в сравнении с данными 2000 г.

\*\*  $p < 0,01$  в сравнении с данными 2000 г.

**Литература**

1. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М. и др. Микоплазмы. — СПб: Наука, 2002.
2. Зубков М.Н. Сбор, транспортировка биологического материала и трактовка результатов микробиологических исследований // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.*, т. 6, № 2, с.143-154, 2004.
3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания МУК 4.2.1890-04) // *Клин. микробиол. антимикроб. химиотер.*, т. 6, № 4, с. 306-357, 2004.
4. NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing // *11th Inform. Suppl., M100-S11 21(1)*, 2001.

**MICROBIOLOGICAL AND PHARMACOEPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF  
ANTIBIOTICOTHERAPY IN MYCOPLASMOSIS**

**V.A. Baturin, E.V. Schetinin, I.F. Demidenko, S.A. Erofeev, M.V. Baturina**

*Stavropol State Medical Academy, Stavropol*

15,000 patients with different diseases of respiratory system and reproduction tract were studied. Cultural diagnostics micoplasmosis with secretion of *M.pneumoniae*, *M.hominis*, *M.genitalium* and *U.urealyticum* was done. Detection of sensitivity for antibacterial means was done. Resistant mycoplasmosis cultures were detected. Reducing of resistance to cyrophloxacinum was the result, probably, due to intensive consumption of fluoroquinolone in this region.

**Key words:** mycoplasmosis, antibiotic resistance, consumption of antibiotics.



## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

### Использование клеток разных фракций аллогенного костного мозга для терапии сахарного диабета типа II на генетической модели

О.И. Степанова, Н.А. Онищенко, Н.Н. Каркищенко, О.В. Баранова, Т.В. Галахова

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

*НИИ трансплантологии и искусственных органов, Москва*

Целью исследования было изучение возможности коррекции гипергликемии, метаболических и иммунологических нарушений на генетической модели мышей СД II типа за счет последовательного многократного введения культивированных гемопоэтических и стромальных фракций аллогенных клеток костного мозга (ККМ). Донорами ККМ служили мыши линии B10.GFP. По результатам нашего исследования был получен регресс клинических проявлений сахарного диабета у мышей db//db за счет нормализации регуляторных функций иммунной системы и торможения признаков системной воспалительной реакции, а так же была увеличена продолжительность и качество жизни животных.

**Ключевые слова:** стромальные клетки, регенерация, реципиент, трансплантация.

Несмотря на определенные достижения последних лет, современная медикаментозная терапия сахарного диабета (СД) по-прежнему не способна надежно препятствовать прогрессированию клинических проявлений СД и его осложнений. [1, 4]. Поэтому поиск и разработка новых подходов к лечению СД остается актуальной проблемой диабетологии, терапии и кардиологии. С разработкой учения о стволовых клетках появилась надежда на возможность более эффективной регуляции липидного и углеводного обмена в организме с помощью стволовых клеток костного мозга [3, 5, 6].

**Целью** нашего исследования было изучение возможности коррекции гипергликемии, а также метаболических и иммунологических нарушений с помощью гемопоэтической и стромальной фракций аллогенных клеток костного мозга (ККМ) на генетической модели СД типа II [2].

#### Материал и методы

В эксперименте использовали мышей линии C57BL/KsLEPR<sup>db/+</sup> в возрасте 136 дней. В этот период у животных наблюдаются резкое снижение веса, выраженная полидипсия и полиурия. В крови выявляется высокий уровень содержания глюкозы и гликозилированного гемоглобина, т.е. проявляются клинические признаки СД, напоминающие сахарный диабет I типа.

Для коррекции углеводного и липидного обмена использовали клетки костного мозга от доноров мышей линии B10.GFP. Сначала вводили гемопоэтические ККМ (моноклеарную фракцию), культивированные в течение 5 суток, а затем — мультипотентные мезенхимальные стромальные (ММС КМ) (фибробластоподобные), культивированные в течение 14 суток.

Реципиентам вводили внутривенно мононуклеарную фракцию ККМ в количе-

стве 4,5–5 млн. четырехкратно с интервалом 7 дней. Стромальную фракцию клеток ММС КМ вводили по 1,5 млн. клеток трехкратно с интервалом в 14 дней после первого введения моноклеарной фракции.

### Результаты

В течение 4 месяцев у мышей-реципиентов измеряли содержание глюкозы и гликозилированного гемоглобина в цельной крови. Взвешивали животных и их внутренние органы. На 120-е сутки исследовали криосрезы поджелудочной железы, селезенки, печени и почек на присутствие донорских ККМ с геном зеленого белка.

По результатам нашего исследования был получен регресс клинических проявлений сахарного диабета у мышей db/db. Установлено, что семикратное введение дозы культивированных гемопоэтических и стромальных ККМ способствует пролонгированному снижению содержания глюкозы и гликозилированного гемоглобина в течение всего эксперимента. Наблюдалось устранение мацерации кожных покровов, снижение и исчезновение полиурии. В контрольной группе мышей вес резко снизился, тогда как в экспериментальной группе животных вес за аналогичный период удерживался на одном уровне.

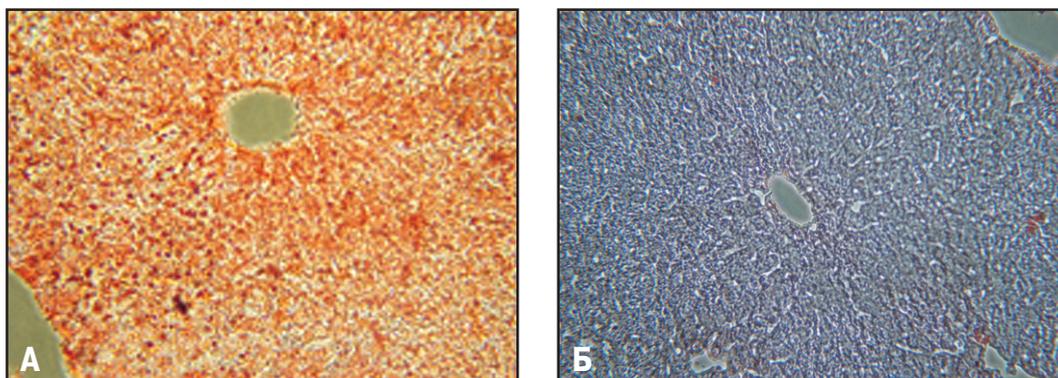
В конце исследования возраст реципиентов в экспериментальной группе составлял 256 дней (животные были забиты), тогда как в контрольной группе срок жизни составил 150-189 дней (животные погибли).

На 120-е сутки эксперимента установили, что после семикратного введения клеток при гистологическом исследовании органов мышей линии C57BL/KsLEPR<sup>db/+</sup> в поджелудочной железе реципиентов отмечалось увеличение количества и размеров самих островков и дегранулированных  $\beta$ -клеток в них. Островки были среднего и крупного размера, с четкими контурами и большими центрами размножения, площадью от 64762,5 до 128347,9 усл. ед.

Площадь островка в среднем составляла 101462,7 усл. ед., что превышало размеры островков в контрольной группе в 4 раза. Среднее количество клеток в островке составило 258 клеток, что превышало количество клеток в контрольной группе в 3 раза. Преобладание в островках  $\beta$ -клеток подтверждалось гистохимической окраской по Гомори, при которой  $\beta$ -клетки окрашивались в сине-сиреневый цвет. Таким образом, анализ морфологических изменений поджелудочной железы показал, что семикратное введение клеток ККМ приводит к выраженной гиперплазии эндокринной части поджелудочной железы на фоне общей нормализации углеводного и белкового обменов.

Морфологическая картина изменений в печени свидетельствовала о полном восстановлении белково-синтетической функции в экспериментальной группе, что проявлялось внутриклеточным накоплением большого количества гликогена. Наблюдалось отсутствие признаков жировой дистрофии гепатоцитов по сравнению с контролем, что подтверждалось при окрашивании препаратов Суданом III (рис.). Следовательно, подтверждался положительный эффект от введения культур ККМ, проявляющийся в уменьшении степени выраженности жировой дистрофии гепатоцитов и улучшении белково-синтетической функции.

В почках животных экспериментальной группы отмечалось снижение дистрофических изменений эпителия дистальных и проксимальных канальцев, исчезновение эозинофильных масс в просвете канальцев, что было обусловлено нормализацией углеводного и белкового обменов. В селезенке и лимфатических узлах имелись признаки умеренной и выраженной гиперплазии с образованием лимфоидных фолликулов как среднего, так и крупного размера с большими центрами размножения. Выявлялись признаки умеренного, а в некоторых наблюдениях — выраженного, мегака-



Морфологические изменения в печени после клеточной терапии

А – Мелко-крупнокапельная жировая дистрофия печени у контрольных мышей СД II типа

Б – Отсутствие жировой дистрофии после клеточной терапии, окраска, Судан III, ув. × 200

риоцитоза. Масса селезенки в этой группе колебалась от 0,053 до 1,027 г, что в среднем превышало массу селезенки в контрольной группе в 11,4 раза. Площадь лимфоидных фолликулов колебалась в пределах от 62313,5 до 249674,2 усл. ед. Средняя площадь островка составляла 140447,8 усл. ед, что превышало площадь лимфоидных фолликулов в контрольной группе в 5,38 раза и свидетельствовало о восстановлении структуры селезенки как иммунокомпетентного органа. Оценка введенных ККМ показала, что на 120-е сутки после внутрибрюшинного введения клеток в организм они не погибают, а сохраняют свою жизнедеятельность, мигрируя в разные органы, в том числе в поджелудочную железу и селезенку, стимулируя участие этих органов в аутогенерации.

### Выводы

Можно предположить, что последовательное многократное введение культивированных гемопоэтических и мультипотентных мезенхимальных стромальных фракций аллогенного ККМ позволяет достичь клинической реабилитации больных животных за счет нормализации углеводного и липидного обмена на фоне нормализации регуляторных функций иммунной системы и тор-

можения признаков системной воспалительной реакции, ведущей к снижению клинических признаков СД, а также к увеличению продолжительности и улучшению качества жизни.

### Литература

1. Александровский Я.А. Сахарный диабет. Эксперименты и гипотезы. – М.: СИП РИА, 2005.
2. Бландова З.К., Душкин В.А., Малащенко А.М., Шмидт Е.Ф. Линии лабораторных животных для медико-биологических исследований. – М.: Наука 1983.
3. Владимирская Е.Б., Румянцев А.Г. Дифференцировочные потенции стволовых гемопоэтических клеток // *Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии*, № 1, с. 7-11, 2002.
4. Зайчик А.Ш., Гурилов Л.П. Инсулинонезависимый сахарный диабет (ИНСД) // *Основы патохимии*. – СПб: ЭЛБИ-СПБ 2001.
5. Ende N., Chen R., Redd A.S. Transplantation of human umbilical cord blood cells improves glycemia and glomerular hypertrophy in type 2 diabetic mice // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 321, 168–171, 2004.
6. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues // *Science*, 276: 71-74, 1997.

## THE RELEVANCE OF VARIOUS FRACTIONS OF ALLOGENIC BONE MARROW CELLS TO THE TYPE II DIABETES CORRECTION

O.I. Stepanova, N.A. Onischenko, N.N. Karkischenko, O.V. Baranova, T.V. Galahova

*The Research Centre for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

*Research Institute of Transplantology and Artificial Organs, Moscow*

The aim of the study was to restore the immune disturbance in mice with diabetes. The clinical and histological signs of diabetes type II were decreased by application of bone marrow cells. The mice life duration was prolonged. The expressed therapeutic effect was achieved.

**Key words:** stromal cells, regeneration, recipient; transplantation.

## Изучение влияния агонистов и антагонистов дофаминергических рецепторов на толерантность опиатной анальгезии

Н. Пирцхелани, Е. Абзианидзе, В. Беришвили, Т. Ткемаладзе, Б. Парцхаладзе, Г. Капанадзе

*Тбилисский государственный медицинский университет, Республика Грузия*

*Институт физиологии им. И. С. Бериташвили АН Грузии, Республика Грузия*

*Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва*

На крысах исследуется эффект малых доз парлодела – агониста дофамина – на вызванной морфином анальгезии, толерантности и зависимости. Парлодел в дозе 0,05 и 0,1 мг/кг не вызывает изменения латентного периода рефлекса поднятия хвоста у крыс, но дозозависимо усиливает морфиновую анальгезию. Предварительное введение 5 мг/кг алкоприда – антагониста дофаминергических рецепторов – блокирует эффект 0,1 мг/кг парлодела и уменьшает морфиновую анальгезию. Ежедневное введение 10 мг/кг морфина ускоряет толерантность к болеутоляющему эффекту у животных контрольной группы. Ежедневное совместное введение парлодела и морфина подавляет развитие толерантности к морфину. Однако ежедневное введение парлодела (0,1 мг/кг) и алкоприда (5 мг/кг) не вызывает значительных изменений развития толерантности к морфиновой анальгезии у крыс.

**Ключевые слова:** анальгезия, толерантность, морфин, парлодел, алкоприд.

В определенных областях мозга уставлены дофаминергические и энкефалинергические нейроны [6]. Согласно [1, 6, 12], опиаты могут влиять на синтез [14], кругооборот и высвобождение [15] дофамина. Кроме того, имеются данные, указывающие, что повышение уровня дофамина вызывает антиноцицептивное действие [3, 7]. Однако данные относительно эффекта дофаминергических агонистов на опиат-

ную анальгезию, толерантность и зависимость весьма малочисленны [5, 10]. Поэтому целью настоящей работы является определение влияния парлодела на ноцицептивную чувствительность и морфиновую анальгезию. В работе также исследуется влияние низких доз парлодела на изменение степени толерантности и зависимости, вызванной морфиновой анальгезией.

### Материал и методы

Эксперименты проводились на половозрелых белых крысах весом 200–250 г. Животного с целью иммобилизации помещали в специальную клетку из органического стекла, в которой крыса привыкала к условиям опыта. Для болевого раздражения использовался фокусированный луч, который наносился на верхнюю треть хвоста крысы, заранее отмеченную тушью [9]. Поднятие хвоста, как правило, происходило при действии фокусированного луча при температуре 42–47°C, вызывавшем болевое ощущение. Фокусированный луч автоматически выключался сразу же после поднятия хвоста. Скрытый период рефлекса регистрировался на энцефалографе с помощью специального устройства.

Для нейрофармакологического анализа использовались наркотический анальгетик морфин (1–10 мг/кг), агонист дофаминергических рецепторов парлодел (0,05–0,1 мг/кг) и антагонист этих же рецепторов алкоприд (5 мг/кг) – интраперитонеально; в контрольной группе животным вводился физиологический раствор.

Антиноцицептивный эффект морфина изучался на животных, которым предварительно вводился парлодел и алкоприд или физиологический раствор. Изучалось также влияние парлодела на латентный период рефлекса поднятия хвоста. Болеутоляющий эффект морфина (10 мг/кг) определялся в течение восьми дней, затем производилось сравнение с эффектом, полученным в первый день опыта. Развитие толерантности действия морфина определялось в четырех группах крыс. Животным первой и второй группы ежедневно предварительно вводился парлодел, животным третьей группы – парлодел и алкоприд, а животным контрольной группы вводился физиологический раствор.

### Результаты и обсуждение

Латентный период рефлекса поднятия хвоста равнялся 4–6 секундам. Введение

0,05 мг/кг парлодела не изменяет латентный период рефлекса поднятия хвоста, тогда как 0,1 мг/кг парлодела вызывает незначительное увеличение латентного периода.

При введении морфина (2–4 мг/кг) латентный период зависимо от дозы увеличивается. Предварительное введение парлодела (0,05 мг/кг) не влияет на продолжительность латентного периода рефлекса поднятия хвоста, однако отмечается статистически недостоверное увеличение латентного периода при введении парлодела (1 мг/кг) (рис. 1).

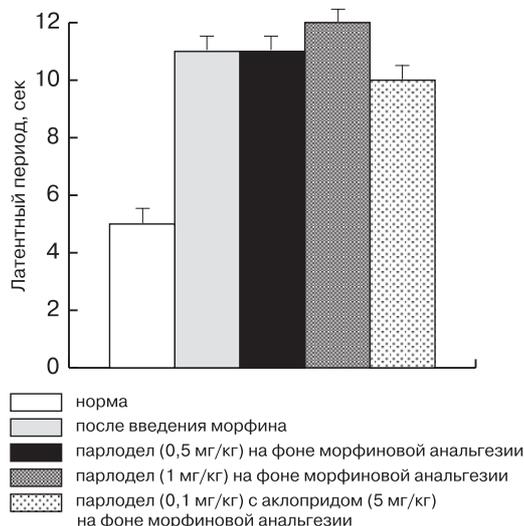


Рис. 1. Изменения латентного периода рефлекса поднятия хвоста под влиянием парлодела (0,05 – 1мг/кг), парлодела (1 мг/кг) и алкоприда (5 мг/кг) на морфиновую анальгезию (мг/кг)

Таким образом, парлодел в низких дозах (0,05 мг/кг) существенно не влияет на анальгезирующий эффект морфина, но увеличение дозы парлодела (1 мг/кг) потенцирует антиноцицептивное действие морфина. Одновременное введение алкоприда и парлодела на фоне морфиновой анальгезии блокирует эффект парлодела на морфиновую анальгезию, более того, значительно уменьшает антиноцицептивное действие морфина (рис. 1).

Ежедневное введение морфина (10 мг/кг) в течение восьми дней вызывает развитие толерантности к болеутоляющему действию морфина. При одновременном введении парлодела и морфина зависимо от дозы подавляется толерантность морфиновой анальгезии. Ежедневное введение морфина и парлодела (0,05–0,08 мг/кг) вызывает уменьшение болеутоляющего эффекта морфина только на 4-й день, на 20–10% соответственно, по сравнению с первым днем; однако для животных, которым одновременно вводился морфин и физиологический раствор, болеутоляющий эффект морфина на 5-й день уменьшается на 50% (рис. 2). Ежедневное применение парлодела и алкоприда на фоне введения морфина у животных вызывает толерантность к болеутоляющему эффекту. Повторное введение парлодела и алкоприда вызывает уменьшение эффекта морфиновой анальгезии (10 мг/кг) на 40% по сравнению с контрольными животными.

Установлено, что дофаминергическая система включена в модуляции болевой афферентации [1, 2, 6, 8, 14]. Также показано, что нигростриальная дофаминергическая

система отвечает на разнообразный болевой стимул [11]. Полученные нами данные показывают, что введение парлодела существенно не влияет на латентный период рефлекса поднятия хвоста, тогда как парлодел зависимо от дозы увеличивает анальгетический эффект морфина, что выражается в увеличении латентного периода рефлекса. Согласно [13, 4] введение низких доз апоморфина вызывает существенное увеличение латентного периода рефлекса поднятия хвоста, однако в наших опытах применение низких доз парлодела не вызывает антиноцицептивного действия. Это можно объяснить применением разных видов животных, различных доз веществ, аффинностью рецепторов и селективностью дофаминергических агонистов.

Показано, что при блокировании D-2 рецепторов алкопридом парлодел уменьшает антиноцицептивное действие морфина. Следовательно, когда D-2 рецепторы блокированы алкопридом, парлодел, стимулируя D-1 рецепторы, уменьшает антиноцицептивное действие морфина. Кроме того, одновременное введение агониста дофаминергических рецепторов и морфина не вызывает толерантность к морфину.

### Литература

1. *Лабахуа Т.Ш., Бутхузи С.М., Бекая Г.Л. и др.* Модуляция постсинаптических реакций нейронов коры больших полушарий при стимуляции черной субстанции // *Изв. АН Грузии, Биол. сер. А, т. 30, № 4, с. 517-525, 2004.*
2. *Akil H., Liebeskind J.C.* Brain Res. 94:279 // *C.F.Gonzalez et al. Br. J. Pharmac. 86:709P, 1985.*
3. *Barasi S., Ben-Sreti M.M., Duggal K.N., Gonzalez J.P., Sewell R.D.E.* Antinociceptive activity on intravenous and intrathecal dopamine agonists in naive and supersensitive rats // *Br. J. Pharmac. 84: 166 P, 1985.*
4. *Barasi B., Ben-Sreti M.M., Clatworthy A.L. et al.* Dopamine receptor-mediated spinal antinociception in the normal and haloperidol

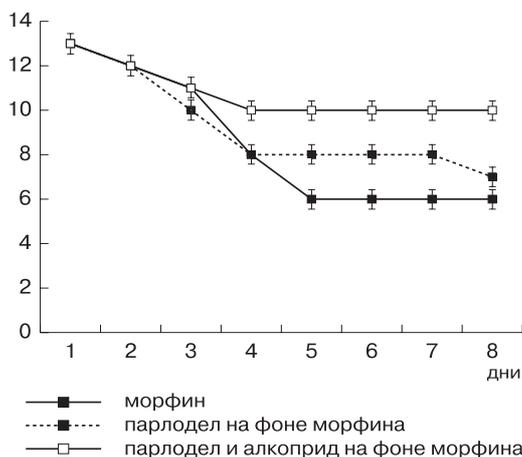


Рис. 2. Влияние парлодела с алкопридом на толерантность к морфину (10 мг/кг). Крысам ежедневно предварительно вводился парлодел (0,5-1 мг/кг) Введение парлодела (1 мг/кг) с алкопридом (5 мг/кг)

- pretreatment rat: effects of sulpiride and SCH 23390 // *Br. J. Pharmac.* 90:15, 1987.
5. Choe C.H. and Smith F.L. Sedative tolerance accompanies tolerance to the analgesic effects of fentanyl in infant rats // *J. Pediatric Research*, 47:727-735, 2000.
  6. Chudler E.H., Dong W.K. The role of the basal ganglia in nociception and pain // *Pain*, 60, pp. 3-38; 1995.
  7. Delfs J.M., Zhu Y., Druhan J.P., Aston-Jones G. Noradrenergic actions in ventral forebrain are critical for opiate withdrawal // *Nature (Lond.)*, 403: 430-434, 2000.
  8. Druhan J.P., Walters C.L., Aston-Jones G. Behavioral Activation Induced by D<sub>2</sub>-Like Receptor Stimulation during Opiate Withdrawal // *J. Pharmacology and experimental therapeutics*, vol. 294, 2, pp. 531-538, 2000.
  9. Hardy J.D., Jacobs I. and Meixner M.D. Thresholds of pain and reflex contraction as related to noxious stimulation // *J. Appl. Physiol.*, 5:725-739, 1953.
  10. Khanna J.M., Morato G.S., Ferreira V.M.M. NMDA Antagonists and Tolerance to Drugs Affecting the Central nervous System // *CNS Drug Reviews*, vol. 5, 2, pp. 165-176.
  11. Pay S., Barasi S. A study of the connections of nociceptive substantia nigra neurons // *Pain* 12:75, 1982.
  12. Spampinato U., Inveermizzi R., Nowakowska E. Reduction of morphine's effect on striatal dopamine metabolism in rats treated with a low dose of apomorphine of agents increasing serotonin transmission // *Biochem. Pharmacol.* 33:163, 1984.
  13. Stoof J. C., Keabian J.W. Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum // *Nature* 294:366, 1981.
  14. Wilcox C.L. Pharmacology of pain and analgesia // *IASP Refresher Courses on Pain Management held in conjunction with the 9<sup>th</sup> World Congress on Pain. August 22-27, Vienna Austria, pp. 573-591, 1999.*
  15. Wood P.L., Scotland M., Richard J.W., Rachham A. Actions of mu, Kappa, Sigma, delta and agonist/antagonist opiates on striatal dopaminergic junction // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 215:697, 1980.

#### STUDY OF AGONISTS AND ANTAGONISTS OF DOPAMINERGIC RECEPTORS INFLUENCE ON TOLERANCE TO OPIATE ANALGESIA

N. Pirtskhelani, E. Abzianidze, V. Berishvili, T. Tkemaladze, B. Partskhaladze, G. Kapanadze

*Tbilisi State Medical University, Republic of Georgia*

*I. Beritashvili Institute of Physiology of Georgian Academy of Sciences, Republic of Georgia*

*The Research Centre for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

The effect of small doses of parlodel, a dopamine agonist, on morphine-induced analgesia, tolerance and dependence was investigated in rats. Parlodel of 0.05 and 0.1 mg/kg dose did not affect the base line of tail flick latency of mice but potentiated the morphine analgesia depending on dose. Pretreatment of rats with 5 mg/kg of alkoprid, a D-2 antagonist, not only blocked the effect of 0.1 mg/kg of parlodel but also antagonized the morphine analgesia. Daily injections of 10 mg/kg of morphine rapidly developed tolerance to the analgesic effect in control animals. Daily treatment with parlodel plus morphine suppressed the development of tolerance to morphine. However, daily treatment with parlodel (0.1 mg/kg) plus alkoprid (5 mg/kg) did not produce significant changes in development of tolerance to the morphine analgesia in rats.

**Key words:** Analgesia, tolerance, morphine, parlodel, alkopride.

## ВНИМАНИЮ АВТОРОВ

Журнал «Биомедицина» публикует статьи обзорного, экспериментального и учебно-методического плана, не публиковавшиеся ранее в других изданиях. В приоритетном порядке печатаются статьи, посвящённые биологическому, математическому и комплексному моделированию. Принимаются рукописи, касающиеся доклинических и клинических испытаний лекарственных препаратов, выполненных на классических и альтернативных биологических объектах. Особое внимание уделяется вопросам генетической, микробиологической и экологической стандартизации лабораторных животных в соответствии с рекомендациями GLP и российскими нормативами. Публикуются работы по внедрению в лабораторную практику новых видов, представляющих ценность для биомедицинских исследований в качестве тест-систем, биологических объектов, моделирующих патологические состояния человека, продуцентов вакцин и сывороток клеточных культур, органов и тканей для ксенотрансплантации. Рассматриваются проблемы обеспечения репрезентативности, воспроизводимости и экстраполяции на человека данных, полученных в биомедицинских экспериментах на животных. Значительное место отводится статьям по разработке и внедрению новых биомедицинских технологий.

### Рубрикация журнала

1. Обзоры
2. Оригинальные статьи
3. Краткие сообщения
4. Практикум
5. Нормативные документы

В рубрике «Обзоры» публикуются обзоры научной литературы, по темам, соответствующим профилю журнала, методологические статьи (максимальный объём рукописи – до 12 стр., максимальное количество ссылок – до 35).

В рубрике «Оригинальные статьи» печатаются труды, отражающие результаты завершённых исследований (до 10 стр., до 25 ссылок).

В «Кратких сообщениях» приводятся завершённые фрагменты работ, представляющие самостоятельный интерес (до 4 стр., до 15 ссылок).

«Практикум» – учебно-методический раздел, где помещаются описания используемых в биомедицине методик, новых технологий (до 6 стр., до 10 ссылок).

В разделе «Нормативные документы» печатаются правила обращения с лабораторными животными, отечественные и международные законодательные акты, регламентирующие использование биомоделей в экспериментах (до 3 стр.).

### Общие требования к оформлению

Статью следует представлять в двух экземплярах с электронной версией текста, набранной в программе Microsoft Word шрифтом Times New Roman, кегль 12, на одной стороне листа с интервалом 1 между строками и полями 2,5 см со всех сторон. Латинские названия видов должны быть выделены курсивом.

На первой странице следует указать: 1) предполагаемую рубрику журнала; 2) название статьи; 3) инициалы и фамилии авторов; 4) учреждения, в которых была проведена работа, город или населённый пункт. На той же странице печатается реферат (не более 250 слов) и ключевые слова (не более 6 слов). В конце статьи приводится список цитированной литературы (см. «Литература») и ставятся собственноручные подписи всех авторов рукописи. Нумерация страниц – сверху по центру (на первой странице номер не проставляется).

## Вниманию авторов

На отдельных листах печатаются таблицы, иллюстративный материал, подписи к рисункам, а также реферат и ключевые слова на английском языке. К рукописи прилагают сопроводительное письмо от учреждения, направившего работу, и на отдельном листе – фамилия, имя, отчество автора, осуществляющего связь с редакцией, его почтовый адрес, телефон, адрес электронной почты.

Статьи, написанные по результатам экспериментальных исследований, должны (если это возможно) строиться по схеме: «Введение», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Литература». Для работ, предназначенных для рубрики «Краткие сообщения», раздел «Обсуждение результатов» необязателен, а количество литературных ссылок должно быть минимальным. Форма изложения обзорных и теоретических статей – свободная.

Статьи, описывающие исследования, выполненные на экспериментальных животных или альтернативных биологических объектах, в разделе «Материалы и методы» должны содержать следующую информацию: организм, орган, ткань, клеточная культура, микробная культура, субклеточный, молекулярный уровень экспериментальных объектов. В тех работах, где были использованы лабораторные животные, следует указать: 1 – биологический вид; 2 – пол; 3 – возраст или массу животного; 4 – генетический статус: инбредные линии, популяции нелинейных животных гибриды, генетически модифицированные организмы (трансгенные, нокаутные); 5 – источник, откуда получены животные; 6 – микробиологический статус: гнотобиоты; SPF; конвенциональные; 7 – условия содержания: виварий, изолятор, барьерная система, тип клеток, плотность посадки животных, корм.

### Статистическая обработка результатов и таблицы

Таблицы должны содержать только обобщённые и статистически обработанные материалы исследования. Следует указать метод обработки результатов и необходимые для расчётов исходные данные. Информация, представленная в таблицах, не должна повторяться в тексте статьи. Таблицы должны быть пронумерованы и озаглавлены. Таблицы печатаются на отдельных листах, а в тексте в круглых скобках дается ссылка на них, например: (см. табл. 1).

### Иллюстративный материал

Рисунки не должны дублировать материалы таблиц. Все обозначения на них необходимо сопровождать пояснениями в подписи к рисунку. Иллюстрации следует пронумеровать в порядке их упоминания в тексте. На обороте каждого рисунка или фотографии должны быть указаны (карандашом) фамилии авторов, название статьи, номер рисунка, «верх». Подписи к рисункам даются общим списком на отдельной странице. Для микрофотографий полагается указать способ фиксации образцов и увеличение. На полях рукописи следует проставить (карандашом) номера таблиц и рисунков напротив тех мест в тексте, где желательно их поместить. Требования к иллюстрациям на дискетах или компакт-дисках: а) чёрно-белая графика – разрешение не менее 600 точек на дюйм, формат EPS или TIFF; б) полутоновые и цветные изображения – разрешение не менее 300 точек на дюйм, формат EPS или TIFF; в) диаграммы и графики (векторные изображения) представляются в собственном формате программы Adobe Illustrator, FreeHand или CorelDraw или в формате EPS с приложением исходных (табличных) данных, по которым построены графики/диаграммы.

### Сокращения

Помимо общепринятых, допускается использование не более 3 сокращений терминов с обязательным указанием полного названия (в скобках) при первом упоминании в тексте.

### Литература

Цитируемая в статье литература приводится общим списком в конце статьи в *алфавитном порядке* (вначале – на русском, затем – на иностранных языках). Ссылки на цитируемую литературу в тексте статьи отмечаются порядковым номером работы в списке литературы, заключённым в квадратные скобки. Фамилии иностранных авторов указываются (если это необходимо) в тексте на русском языке, при первом упоминании приводится их написание на языке оригинала в круглых скобках.

## Вниманию авторов

---

В списки литературы приводятся:

**для книг:** фамилии и инициалы всех авторов, название, место издания, название издательства, год издания, цитируемые страницы, либо общее количество страниц в книге (если текст статьи содержит несколько ссылок на данную книгу).

Пример:

1. Даренская Н.Г., Ушаков И.Б., Иванов И.В. Экстраполяция экспериментальных данных на человека в физиологии и радиологии. – М.-Воронеж: ИСТОКИ, с.232, 2004.

**для главы (статьи) в книге:** фамилии и инициалы авторов главы, название главы, название книги, фамилии и инициалы редакторов, место издания, название издательства, год издания, первая и последняя страницы главы.

Пример:

2. Авербах М.М., Мороз А.М. Естественная резистентность к туберкулезу и некоторые вопросы иммуногенетики // В кн.: Иммунология и иммунопатология туберкулеза. – М.: Медицина, с. 106-116, 1976.

**для статьи в журнале:** фамилии и инициалы авторов, название статьи, наименование журнала, год, том (выпуск), номер, первая и последняя страницы статьи.

Пример:

3. Каркищенко Н.Н. Концептуальное пространство и топологические структуры биомедицины // Биомедицина, № 1, с. 5-17. 2005.

**для сайта:** ссылка на страницу в Интернете.

Пример:

<http://www.nih.gov/science/models/mouse/knockout/index.html>

### Корректурa

Рукописи, не отвечающие перечисленным правилам, не рассматриваются и не возвращаются. Редакция оставляет за собой право принимать решение о публикации рукописи, производить редакционные изменения и сокращения, стилистическую правку, а также переносить статью в другую рубрику или номер журнала. Все рукописи направляются на внешнее рецензирование. За публикацию статей плата не взимается и гонорар не выплачивается.

После опубликования статьи авторам высылается бесплатно 1 экземпляр журнала.

Рукописи направлять по адресу:

143332 Московская обл., Красногорский р-н, п/о Отрадное, пос. Светлые Горы, ГУ НЦБМТ РАМН, редакция журнала «Биомедицина».

Электронный адрес редакции: [biomedicina@inbox.ru](mailto:biomedicina@inbox.ru)

[matveyenkoel@mail.ru](mailto:matveyenkoel@mail.ru)

Телефон редакции: 561-52-64.



---

Изготовлено в «Универсум Паблинг»  
Тираж 3 000 экз.

Адрес: ул. 3-я Мытищинская, д. 16  
тел.: (495) 980-9230, факс (495) 980-9231  
e-mail: [prepress@clinpharma.com](mailto:prepress@clinpharma.com)

