

УДК 615.28 :615.03

ВЛИЯНИЕ ХРОНОБИОЛОГИЧЕСКИХ РИТМОВ НА ТОКСИЧНОСТЬ ИЗОНИАЗИДА И РИФАМПИЦИНА ПРИ КОМБИНИРОВАННОМ ПРИМЕНЕНИИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА НА КРЫСАХ

К.И. Усов^{1,2}, Т.А. Гуськова³,
Г.Г. Юшков¹, А. В. Машанов¹,
А.А. Гущина¹

¹НИИ Биофизики, лаборатория токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665835, г. Ангарск, Российская Федерация

²ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет Минздрава России», кафедра фармакологии, 664003, г. Иркутск, Российская Федерация

³Некоммерческое партнерство содействия здравоохранению «Научный центр контроля качества», 115191, г. Москва, Российская Федерация

Статья содержит результаты экспериментального токсикологического исследования противотуберкулезных препаратов: «Изониазид» и «Рифампицин» в условиях их комбинированного введения, которые позволили установить: антагонистический эффект рифампицина к летальным дозам изониазида; факт снижения токсичности комбинации изониазида и рифампицина при введении препаратов в вечернее время суток.

Ключевые слова: противотуберкулезный препарат; изониазид; рифампицин; хронобиология; хронобиологические ритмы; рациональная химиотерапия; экспериментальные исследования.

Введение. Современный режим химиотерапии туберкулеза должен включать не менее двух противотуберкулезных препаратов (ПТП), к которым микобактерии (*Mycobacterium tuberculosis*) сохраняют чувствительность [7]. В противном случае весьма вероятно неудача лечения из-за развития лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза. Таким образом, стоит отметить, что комбинации противотуберкулезных препаратов подбирают обычно по противомикробной активности без учета их токсических свойств. Длительность химиотерапии ПТП в среднем составляет от 6 до 16 месяцев [8, 27-28], что неизбежно приводит к проявлению нежелательных реакций, в том числе токсического характера [3,15]. Определение токсичности каждого из ПТП в отдельности сопряжено с определенными трудностями, поскольку лечение почти всегда проводится сочетаниями нескольких из них, а также с применением комбинированных ПТП с фиксированными

дозами активных веществ в составе единой лекарственной формы [7,25-26]. Известно, что комбинированное применение лекарственных средств может приводить к усилению, ослаблению или появлению новых фармакологических эффектов и нежелательных реакций организма. При оценке безопасности совместного применения лекарственных средств, в условиях токсикологического эксперимента, приоритетом должно выступать изучение их взаимодействия, а «изолированный» подход к определению токсичности каждого препарата (каждого активного вещества лекарственного средства) должен реализовывать функцию «позитивного» контроля. Взаимодействие с точки зрения токсикологии – это количественное и/или качественное изменение прогнозируемого суммарного спектра токсичности лекарственных средств при их совместном (одновременном или последовательном) применении [4].

Усов Константин Ильич (Usov Konstantin Ilich), к.б.н., доцент, заведующий лабораторией токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики, ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665830, г. Ангарск, konstausov@yandex.ru

Гуськова Татьяна Анатольевна (Guskova Tatjana Anatolievna), член-корреспондент РАН, заслуженный деятель науки РФ, д.м.н., проф., заместитель Председателя Всероссийской общественной организации токсикологов, Некоммерческое партнерство содействия здравоохранению «Научный центр контроля качества», tagus@rambler.ru

Юшков Геннадий Георгиевич (Jushkov Gennadij Georgievich), к.м.н., доцент, научный сотрудник лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики, ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665835, г. Ангарск, prof_ushkov@mail.ru

Машанов Антон Владимирович (Mashanov Anton Vladimirovich), к.б.н., научный сотрудник лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики, ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665835, г. Ангарск, mashan_gir@mail.ru

Гущина Альбина Анатольевна (Gushchina Albina Anatolevna), научный сотрудник лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики, ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет», 665835, г. Ангарск, alla_gushchina@bk.ru

Согласно классификации Международного союза по борьбе с туберкулезом «Изониазид» и «Рифампицин» относятся к препаратам первого ряда и являются наиболее эффективными в лечении различных форм туберкулеза [16]. Применение препарата «Изониазид» сопряжено с возможностью возникновения побочных реакций, в том числе токсического характера (преимущественно нейротоксичность; реже: гепато-, нефро-, кардиотоксичность и др.) [3,14,28]. Препарат «Рифампицин» является ключевым компонентом современной химиотерапии туберкулеза и единственным наиболее важным препаратом при краткосрочном режиме лечения. Побочные реакции на прием рифампицина возникают значительно реже, и чаще всего проявляются при прерывистой схеме лечения в виде синдромов: абдоминального синдрома (боли в эпигастрии, тошнота, рвота, диарея); «кожного» синдрома, проявляющегося гиперемией кожи и/или зудом, с появлением сыпи или без высыпаний, затрагивающей кожу лица и волосистой части головы; «гриппоподобного» синдрома в виде повышения температуры, озноба, общей слабости, головной боли и болей в костях; респираторного синдрома, проявляющегося одышкой и иногда сопровождающегося коллапсом и шоком; также возможно проявление гепатотоксичности, пурпуры и др. [10,28]. Эти побочные реакции напрямую отражаются на состоянии соматического и психического здоровья человека, находящегося как на этапе химиотерапии, так и после завершения курса (курсов) лечения препаратами. В некоторых случаях наличие нежелательных реакций, возникающих при приеме ПТП, отрицательно влияет на принцип непрерывности организации химиотерапии туберкулеза и зачастую приводит к её срыву, что провоцирует микобактерии к развитию лекарственной резистентности [17].

При совместном применении изониазида и рифампицина следует учитывать особенности их биотрансформации. Изониазид считается классическим примером препарата, вызывающего идиосинкразический гепатит. У 15-20 % получавших изониазид пациентов отмечалось повышение активности сывороточных трансаминаз, но лишь у 1 % развивается тяжелый гепатит. Факторами риска являются голодание, прием индукторов цитохрома P450 (рифампицина, алкоголя, прогестерона и др.), возрастные изменения печеночного метаболизма и индивидуальная предрасположенность [11, 18]. Известно, что изониазид индуцирует изофермент цитохрома P450 2E1, а для рифампицина характерен «рифампицин-дексаметазоновый» тип индукции изоферментов цитохрома P450 1A1, 3A4, 2B6 [10]. Эти особенности трансформации изониазида и рифампицина могут приводить к усилению прояв-

ления нежелательных реакций при проведении режима химиотерапии с использованием сочетанного применения ПТП (изониазид + рифампицин), с повышением риска проявления у медленных ацетиляторов [18].

Действие лекарственного вещества на организм отличается высокой вариабельностью и зависит от множества как внутренних, так и внешних факторов, одним из которых является фактор времени [29]. Наиболее значимыми для лекарственной токсикологии являются суточные или циркадные ритмы. Зависимость токсичности лекарственных препаратов от времени суток отмечена для препаратов различных фармакологических групп. [4-6,9]. Полученные нами ранее экспериментальные данные [23] свидетельствуют о влиянии хронобиологических факторов на токсичность изониазида при пероральном введении крысам. При введении изониазида в вечерние часы токсичность его была достоверно ниже, чем при введении препарата в утреннее время, установленный феномен определяет актуальность настоящего исследования. При разработке рациональных схем лекарственной терапии туберкулеза важно учитывать хронобиологические ритмы чувствительности организма к препаратам, что позволит улучшить их переносимость, и тем самым повысить эффективность лечения.

Цель работы: оценить клинику острого отравления и продолжительность жизни крыс, изучить возможность кумуляции при совместном введении противотуберкулезных препаратов «Изониазид» и «Рифампицин» в утренние и вечерние часы.

Материалы и методы исследования. В соответствии с действующими нормативными документами и методическими рекомендациями, принятыми на территории РФ для проведения экспериментальных токсикологических исследований, а также на основе многолетнего экспериментального опыта сотрудников лаборатории токсикологических испытаний и исследований ИЛЦ НИИ Биофизики ФГБОУ ВО «АнГТУ» по изучению ПТП, в качестве экспериментально-биологической модели были выбраны белые нелинейные крысы (самцы, самки) [20-21]. Критериями включения животных в эксперимент являлись: заключение Службы ветеринарии Иркутской области, отсутствие видимых проявлений заболеваний, однородность по массе тела, в ряде случаев – по анализу периферической крови и некоторым другим показателям в соответствии с принятыми в лаборатории стандартными операционными процедурами и паспортом состояния лабораторных животных. Все животные содержались в условиях специализированной экспериментально-биологической клиники (вивария) (ветеринарное удостоверение 238 № 0019817).

Эксперименты были проведены в соответствии с этическими требованиями по работе с экспериментальными животными, изложенными в следующих нормативно-правовых документах: «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.), «Правила надлежащей лабораторной практики» (приложение к приказу МЗ РФ № 199н от 01.04.2016 г.) и разрешены локальным этическим комитетом.

Параметры острой токсичности изониазида, рифампицина и комбинации изониазида и рифампицина при совместном введении устанавливали по методу Кербера [13], на белых крысах массой тела 180-200 г. Препарат «Изониазид» (форма выпуска: таблетки, 0,3 г, производства ОАО «Московское производственное химико-фармацевтическое объединение им. Н.А. Семашко», г. Москва) испытывали в дозах $0,6 \div 2,4$ г/кг с шагом наращивания дозы на 0,1 г. Препарат «Рифампицин» (форма выпуска: капсулы, 0,15 г, производства РУП «Белмед-препараты», г. Минск) испытывали в дозах $6,0 \div 24$ г/кг с шагом наращивания дозы на 1 г. Изониазид и рифампицин вводили однократно, однако по технологическим (количественным) причинам однократное введение рифампицина осуществлялось дробно в течение 5 часов, начиная с 10 ч (утра) и с 22 ч (вечера). Для корректного сравнения полученных данных (неколичественные причины), формировали группу подопытных крыс с дробным введением ожидаемой среднесмертельной дозы изониазида (240 мг/кг в 10 ч 00 мин утра и 280 мг/кг в 22 ч 00 мин вечера, на 1 введение с интервалом 1 час).

Дробное введение рифампицина представляло собой установление ожидаемой DL_{50} рифампицина, разделенное на 5 введений, на каждое из которых приходилось по $1/5$ от предполагаемой DL_{50} . Интервал между введениями составлял 1 час. Из-за технологических и количественных затруднений при введении изучаемых доз рифампицина в эксперименте по определению параметров острой токсичности комбинации изониазида и рифампицина, совместное введение представляло собой дробное введение $1/5$ от установленных нами ранее [24] DL_{50} для изониазида (240 мг/кг на 1 введение) и рифампицина (3800 мг/кг на 1 введение), разделенное на 5 введений, с интервалом 1 час. Рандомизацию животных на группы проводили по принципу диапазона доз и полу. Было сформировано 10 групп животных для введения в 10 ч 00 мин утра и 10 групп животных для введения в 22 ч 00 мин вечера. Выбор времени введения лекарственных средств был обоснован удобством их применения человеком в утренние и вечерние часы суток, а также проведенными ранее исследованиями [5, 19]. Каждая группа состояла из 12 крыс ($n = 6$ М, $n = 6$ F) и представляла отдельную серию эксперимента.

При изучении кумуляции животным ежедневно, внутрижелудочно вводили $1/10$ от DL_{50} : первой серии – препарат «Изониазид», второй серии – препарат «Рифампицин», третьей серии – вводили изониазид в сочетании с рифампицином. Для каждой из доз препарата были сформированы две группы животных: одной подопытной группе животных ($n = 10$ М, $n = 10$ F) вводили в 10 ч 00 мин утра, второй – ($n = 10$ М, $n = 10$ F) – в 22 ч 00 мин вечера. Наряду с подопытными группами были сформированы контрольные группы, которым вводили воду в эквивалентном объеме подопытных групп крыс, и группа интактных животных. Все эксперименты проведены в зимний период.

Во всех экспериментах животным вводили изониазид и рифампицин, внутрижелудочно, *per os*, в виде суспензии с дистиллированной водой с помощью металлического атравматичного зонда. Дозирование проводили по количеству активного вещества: изониазида в таблетке, рифампицина в капсуле, индивидуально для каждого подопытного животного с учетом ежедневного мониторинга массы тела, определяемой ежедневно перед введением препаратов. Перед введением препаратов таблетки и капсулы растерлись в ступке. Однократный объем вводимой суспензии для крыс не превышал 5 мл, максимальная продолжительность введения не превышала 6 часов [22]. Наблюдение за животными вели в течение 14 суток [21].

Для обработки полученных результатов применялись методы математической статистики, реализованные в табличном процессоре Microsoft Office Excel 2007, входящем в состав лицензионного пакета офисных приложений для комплексной обработки данных Microsoft Office 2007 (Microsoft Co., США); правообладатель лицензии ФГБОУ ВО «Ангарский государственный технический университет». Вычисляли среднее арифметическое значение (M), стандартную ошибку среднего арифметического значения (m), производили оценку значимости различий средних величин по t -критерию. Методики расчета показателей соответствуют общепринятым, изложенным в руководстве по математической статистике для медико-биологических исследований [2].

Результаты и обсуждение. Полученные данные токсикометрии острого отравления при однократном введении DL_{50} препарата «Изониазид» и «Рифампицин» в утренние и вечерние часы суток приведены в таблице 1.

При сравнении установленных величин DL_{50} , приведенных в таблице 1, критерий t (коэффициент достоверности) более или равен 2 ($t \geq 2$), что соответствует вероятности безошибочного прогноза P , равном или более 95 % ($P \geq 95$ %), следовательно, различия можно считать статистиче-

Таблица 1

Данные токсикометрии исследуемых препаратов в зависимости от времени и дробности их введения per os DL₅₀ (n = 12) в каждой подопытной группе)

Одноразовое и дробное введение препаратов в дозе DL ₅₀	Время введения препаратов (00:00 – часы минуты)	DL ₅₀ , мг/кг		Класс опасности*	Степень токсичности**
		Крысы М	Крысы F		
Изониазид (одноразовое введение)	10:00 (утро) (1)	1233 ± 43	1250 ± 38	3	4
	22:00 (вечер) (1)	1375 ± 38	1367 ± 38		
Изониазид (дробное введение)	10:00 (утро) (2)	960 ± 90	920 ± 74		
	22:00 (вечер) (2)	1280 ± 97	1243 ± 105		
Рифампицин (дробное введение)	10:00 (утро) (3)	19000 ± 434	15250 ± 434	4	5
	22:00 (вечер) (3)	19000 ± 434	16167 ± 434		
Коэффициент достоверности (t) между экспериментальными группами	t (1 утро-1 вечер) = 2,5 (M); t (1 утро -1 вечер) = 2,2 (F); t (1 утро -2 утро) = 2,7 (M); t (1 утро -2 утро) = 3,9 (F); t (1 вечер -2 вечер) = 0,9 (M); t (1 вечер -2 вечер) = 2,0 (F); t (2 утро -2 вечер) = 2,4 (M); t (2 утро -2 вечер) = 2,5 (F); t (3 утро -3 вечер) = 0 (M); t (3 утро -3 вечер) = 1,5 (F); t (3 утро -3 утро) = 6,1 (M-F); t (3 вечер -3 вечер) = 4,6 (M-F).				

Примечание: * – по классификации опасности химических веществ: 3-й класс – умеренно опасные, 4-й класс – малоопасные (ГОСТ 12.007-76*). ** – по степени токсичности (Hodge and Sterner) оценочное понятие: 4 – малотоксично, 5 – практически нетоксично [1].

ски достоверными. Анализ полученных данных токсикометрии острого отравления изониазидом (таблица 1), как при одноразовом, так и при дробном введении препарата (длительность дробного введения не более 6 часов) показал статистически значимые различия величин среднесмертельных доз изониазида, определяемых в утренние и вечерние часы введения. Чувствительность животных была статистически достоверно выше в утренние часы введения изониазида вне зависимости от дробности перорального введения препарата (табл. 1). Процентное повышение DL₅₀ при введении в 22 ч 00 мин от DL₅₀ к величинам дозы, установленным при введении препарата в 10 ч 00 мин для крыс-М составило 12 % (одноразовое введение), 33 % (дробное введение), для крыс-F – 9 % (одноразовое введение), 35 % (дробное введение). Это подтверждает установленный нами ранее феномен влияния суточных (циркадных) ритмов на токсичность изониазида, в направлении повышения среднесмертельной дозы изониазида, при его введении крысам в 22 ч

00 мин [23]. Дробное введение изониазида приводило к статистически достоверному повышению токсичности, по отношению к установленным среднесмертельным дозам изониазида в условиях одноразового ее введения (таблица 1). Введение препарата «Рифампицин» в 10 ч 00 мин утра и в 22 ч 00 мин вечера не приводило к изменению величин DL₅₀, что свидетельствовало об отсутствии эффекта влияния циркадного ритма на токсичность препарата, оцениваемого по летальному эффекту. Чувствительность крыс-самок к дробному введению DL₅₀ рифампицина была статистически достоверно выше по сравнению с дозой, установленной для крыс-самцов (табл. 1).

В отличие от клинической картины острого отравления изониазидом [24], дробное введение изониазида в дозе 240 мг/кг (1/5 от DL₅₀) с интервалом 1 час (в течение 5-6 часов), до достижения установленной среднесмертельной дозы приводило к временной пролонгации проявления фармакодинамических признаков отравления (табл. 2). В фазу двигательного возбуждения у 80 %

крыс развивалась саливация после (и во время) 2-3 дробного введения, которая усиливалась при последующих введениях изониазида, у 30 % регистрировали экзофтальм. Появление хромодакриарреи (наличие красных порфириновых корочек вокруг глаз), отсутствие рефлекса при перемещении животного на спину, арефлексия – свидетельствовало о приближении наступления биологической смерти. Смерть наступала в состоянии судорог, без вхождения животных в состояние «изониазидовой» комы.

В клинике острого отравления рифампицином четко прослеживалось две фазы отравления: фаза двигательного торможения, фаза двигательного возбуждения, лихорадки (озноба). Фазы острого отравления рифампицином, по сравнению с фазами отравления изониазидом, носили пролонгированный характер проявления, что объяснимо различиями в химии, фармакокинетике и фармакодинамике препарата. Фаза двигательного торможения визуально определялась уже к концу первого часа после введения $1/5$ от DL_{50} рифампицина, при этом у крыс проявлялось групповая коммуникация двигательного торможения (все подопытные крысы собирались в одном общем месте и сидели единой группой, практически неподвижно), со стороны глазных симптомов – экзофтальм (80-90 % случаев), наблюдались первые признаки окрашивания под действием препарата мочи, ушей, хвоста. Последующие введения $1/5$ от DL_{50} рифампицина до достижения среднесмертельной дозы постепенно приводили к «разрыву» групповой коммуникации подопытных крыс (животные размещались обособленно друг от друга по всей площади клетки) и усилению угнетения, которое проявлялось снижением или практически полным отсутствием локомоций, эпизодической прострацией, со стороны функции дыхания – признаками диспноэ, со стороны глазных симптомов – усилением экзофтальма. Моча, фекалии, глазные яблоки, уши, хвост были окрашены в цвет рифампицина, что свидетельствовало о развитии признаков материальной кумуляции. Гипертонус мышц тела крыс постепенно сменялся гипотонусом, реакция на внешние раздражители (свет, звук) была слабая или отсутствовала. Снижение рефлекса сохранения нормального положения тела при перемещении на спину определялось только у 30 % крыс в группе. Фаза двигательного возбуждения наступала уже после окончания дробного введения среднесмертельной дозы рифампицина (через 6 ч после начала введения). Первыми определяемыми симптомами были фрагментарные кратковременные вздрагивания всего тела (как при ознобе), при этом у животных возобновлялось стремление к передвижению, поза тела во время попыток движения была неустойчивая.

Для этого промежутка времени было характерно общее локомоторное беспокойство подопытных животных. Далее наблюдалось усиление дрожи, визуально напоминающей сильный лихорадочный озноб, хвост крыс был напряжен и выпрямлен. Лихорадочная дрожь (тремор) крыс имела прерывистый, фрагментарный и быстро возобновляемый характер проявления. Диспноэ, определяемое в фазу торможения, сменилось в фазу двигательного возбуждения на тахипноэ. В поведении животных отмечалась вторичная по проявлению групповая коммуникация (крысы на ползали друг на друга), но за несколько минут до наступления смерти крыс занимали обособленное положение. Биологическая смерть наступала не позднее первых суток, в состоянии лихорадки (дрожи) переходящей в кратковременные конвульсии с асфиксией.

В группах динамического контроля животные получали дробное (на 1 введение приходилось не более 5 мл воды для животных с массой тела 200 г), эквивалентные подопытным группам крыс количество дистиллированной воды. Введенные крысам эквивалентные объемы воды не вызывали эффектов гипергидратации и не приводили к летальности.

Средняя продолжительность фаз локомоторного торможения и возбуждения при отравлении изониазидом и рифампицином, средняя продолжительность жизни погибших животных за время наблюдения представлена в таблице 2.

Введение изониазида, разделенное на 5 введений, начиная, с 22 ч 00 мин вечера приводило к статистически достоверному увеличению средней продолжительности жизни крыс по сравнению с данными, полученными в условиях утреннего введения препарата. Увеличение средней продолжительности жизни достигалось за счет пролонгации во времени фаз двигательного торможения и возбуждения, что свидетельствовало о влиянии циркадного ритма на время жизни в условиях дробного введения среднесмертельной дозы. Введение рифампицина крысам в установленной DL_{50} , в 10 ч 00 мин утра и 22 ч 00 мин вечера не приводило к статистически достоверному изменению средней продолжительности жизни и фаз отравления в зависимости от времени введения (табл. 2).

Совместное дробное введение изониазида с рифампицином (длительность введения не более 6 часов) приводило к повышению токсичности комбинации препаратов «изониазид + рифампицин». По отношению к токсичности изониазида и рифампицина (при определении собственной токсичности каждого препарата, таблица 1) процент повышения токсичности был идентичен и составил при сочетанном введении препаратов в 10 ч 00 мин утра – 37 % (крысы-М), 43 % (кры-

Таблица 2

Средняя продолжительность фаз отравления, средняя продолжительность жизни крыс-самцов в условиях дробного введения среднесмертельной дозы изониазида и рифампицина

Показатели	Время начала дробного введения препаратов в DL ₅₀			
	Доза изониазида 240 мг/кг (1/5 от DL ₅₀) на 1 введение, с интервалом 1ч		Доза рифампицина 3800 мг/кг (1/5 от DL ₅₀) на 1 введение, с интервалом 1ч	
	10 ч 00 мин	22 ч 00 мин	10 ч 00 мин	22 ч 00 мин
Продолжительность фазы торможения, 00:00 – часы, минуты (M ± m)	03:00 ± 6,8	04:26 ± 8,5	05:06 ± 9,0	05:22 ± 10,2
	t утро-вечер = 8,0		t утро-вечер = 1,2	
Продолжительность фазы двигательного возбуждения, 00:00 – часы, минуты (M ± m)	00:55 ± 6,3	01:59 ± 6,7	07:05 ± 51,3	06:57 ± 51,0
	t утро-вечер = 7,0		t утро-вечер = 0,1	
Суммарная доза препаратов, приводящая к летальности 50% подопытных крыс	960 мг/кг	1200 мг/кг	19000 мг/кг	19000 мг/кг
Средняя продолжительность жизни*, 00:00 – часы, минуты (M ± m)	03:55 ± 11,6	06:25 ± 14,2	12:11 ± 55,6	12:09 ± 56,9
	t утро-вечер = 8,2		t утро-вечер = 0,03	

Примечание: * – средняя продолжительность жизни погибших животных за время наблюдения.

сы-Ф), при введении препаратов в 22 ч 00 мин вечера – 10 % (крысы-М), 23 % (крысы-Ф). Анализ полученных экспериментальных данных по изучению влияния суточных ритмов на токсичность комбинированно вводимых препаратов позволил установить, что применение препаратов в 22 ч 00 мин вечера приводило к снижению их токсичности (табл. 3).

Одноразовое введение среднесмертельной дозы изониазида (1200 мг/кг) в комбинации с рифампицином в дозе 3800 мг/кг (1/5 от DL₅₀) приводило к снижению токсичности изониазида, что проявлялось полным отсутствием летальности крыс (табл. 4). Установленный феномен позволил четко определить антагонистическое действие рифампицина на токсичность изониазида.

При данном варианте совместного введения препаратов наблюдалось снижение эффектов нейротоксичности изониазида, что проявлялось отсутствием судорог (фазы двигательного возбуждения). Известно, что проявление фазы двигательного возбуждения, эпистатуса является истинным признаком острого отравления изониазидом при его введении в диапазонах летальных доз [23-24]. Для отравления при совместном введении 1200 мг/кг изониазида и 3800 мг/кг ри-

фампицина (дозы в соотношении 1:3) было характерно только наличие фазы двигательного торможения, продолжительностью до 6-12 часов, далее у животных происходило восстановление нормальных локомоций и концу 1 суток признаки интоксикации постепенно исчезали, животные подходили к поилкам, активно проявляли интерес к корму. Процент повышения установленной среднесмертельной дозы изониазида при его одноразовом совместном введении с рифампицином (3800 мг/кг, что составляло 1/5 от DL₅₀) по отношению к полулетальной дозе изониазида установленной при одноразовом её введении интактным крысам составил 43 % при введении 10 часов утра и 48 % при введении в 22 часа вечера. Определение фазы двигательного возбуждения, эпистатуса переходящего в 50% случаев в состояние «изониазидной» комы (продолжительностью 40-60 минут) было характерно только при введении летальных доз изониазида в условиях его одноразового совместного введения с рифампицином. За 10-15 минут до наступления «без судорожной» биологической смерти животные выходили из состояния комы, что определялось возобновлением слабого ориентировочного рефлекса, который проявлялся небольшим подъ-

Таблица 3

Данные токсикометрии совместного введения изониазида с рифампицином в зависимости от времени введения (n = 12 в каждой подопытной группе)

Время введения (00:00 – часы минуты)	Препараты вводимые совместно	DL ₅₀ , мг/кг	
		Крысы М	Крысы F
10 ч 00 мин	Расчет по введенному изониазиду совместно с рифампицином (а)	608 ± 59	521 ± 56
	Расчет по введенному рифампицину совместно с изониазидом (б)	12033 ± 1165	8642 ± 935
22 ч 00 мин	Расчет по введенному изониазиду совместно с рифампицином (в)	1152 ± 78	878 ± 70
	Расчет по введенному рифампицину совместно с изониазидом (г)	17100 ± 1165	12397 ± 992
Коэффициент достоверности (t) между экспериментальными группами		t а-в = 5,6 t б-г = 3,1	t а-в = 4,0 t б-г = 2,8

Таблица 4

Установление среднесмертельной дозы изониазида при его совместном введении с рифампицином крысам-самцам (n = 10 в каждой подопытной группе)

Схема совместного введения: DL ₅₀ изониазида* + 1/5 от DL ₅₀ рифампицина - однократно				Установленная DL ₅₀ по изониазиду, при его совместном введении с рифампицином в дозе 1/5 от DL ₅₀
Дозы препаратов	Летальность	Дозы препаратов	Летальность	
1200 мг/кг (DL ₅₀ *) Изониазид + 3800 мг/кг (1/5 от DL ₅₀) Рифампицин	0/10	2400 мг/кг (2 • DL ₅₀ *) Изониазид + 3800 мг/кг (1/5 от DL ₅₀) Рифампицин	10/10	1767 ± 53 мг/кг (введение в 10 ч утра)
				2033 ± 53 мг/кг (введение в 22 ч вечера)
Средняя продолжительность жизни погибших животных за время наблюдения (00:00 – часы, минуты) 03:19 ± 10 (введение в 22 ч вечера)				01:53 ± 15 (введение в 10 ч утра)
Коэффициент достоверности (t)				t утро-вечер (по DL ₅₀) = 3,6 t утро-вечер (по СПЖ) = 4,8

Примечание: * - DL₅₀ изониазида, установленная при его однократном введении интактным крысам.

ёмом головы животного в сторону звукового раздражителя. В остальных случаях смерть наступала в состоянии судорог. Совместное однократное введение изониазида в среднесмертельной дозе (табл. 4) с рифампицином в дозе 3800 мг/кг позволило установить и влияние суточных ритмов на токсичность и среднюю продолжительность крыс в сторону понижения токсичности изониазида и повышения продолжительности жизни крыс при его введении в 22 часа вечера.

Полученные статистически достоверные данные влияния хронобиологических ритмов на

среднюю продолжительность жизни крыс после введения препарата «Изониазид», «Рифампицин» и комбинации изониазида и рифампицина в условиях совместного введения в утренние и вечерние часы суток представлены в таблице 5.

Анализ данных таблицы 5, позволил установить, что однократное и дробное введение изониазида, а также его совместное дробное введение с рифампицином, приводило к статистически достоверному повышению средней продолжительности жизни при введении препаратов в 22 часа вечера. Дробное введение рифампицина не приво-

Таблица 5

**Средняя продолжительность жизни крыс после однократного введения
препарата «Изониазид» в дозах DL₅₀**

Препараты, дробность введения доз препаратов per os	Время введения препаратов (00:00 – часы минуты)	Средняя продолжительность жизни крыс 00:00 – часы, минуты (M±m)	
		Крысы М	Крысы F
Изониазид (одноразовое введение)	10:00 (утро) (1)	00:35 ± 5	00:37 ± 3
	22:00 (вечер) (1)	01:00 ± 4	00:54 ± 6
Изониазид (дробное введение)	10:00 (утро) (2)	03:55 ± 11,6	04:20 ± 16,1
	22:00 (вечер) (2)	06:25 ± 14,2	07:55 ± 20,6
Рифампицин (дробное введение)	10:00 (утро) (3)	12:11 ± 55,6	09:20 ± 42,9
	22:00 (вечер) (3)	12:09 ± 56,9	09:52 ± 51,2
Изониазид + Рифампицин (совместное дробное введение)	10:00 (утро) (4)	03:30 ± 10,0	03:44 ± 12,2
	22:00 (вечер) (4)	05:41 ± 13,1	05:03 ± 9,5
Коэффициент достоверности (t) между экспериментальными группами: утро-вечер	t (1утро-1вечер) = 3,9 (M); t (1 утро -1 вечер) = 2,5 (F); t (2 утро -2 вечер) = 8,2 (M); t (2 утро -2 вечер) = 8,1 (F); t (3 утро -3 вечер) = 0,03 (M); t (3 утро -3 вечер) = 0,48 (F); t (4 утро -4 вечер) = 7,9 (M); t (4 утро -4 вечер) = 5,1 (F);		

дило к достоверным изменениям показателя в условиях введения препарата в разное время суток.

Результаты изучения кумуляции препаратов «Изониазид», «Рифампицин» в отдельности и в комбинации при введении в утренние и вечерние часы суток представлены в таблице 6.

При введении изониазида в течение 10 дней в дозе 1/10 от DL₅₀ (табл. 6) признаки интоксикации визуально не определялись, летальность отсутствовала [24]. Введение среднесмертельной дозы изониазида на 12-е сутки приводило к появлению признаков понижения токсичности, по-видимому, вследствие развития толерантности к токсическим дозам изониазида, которая усиливалась у животных получавших изониазид в 22 часа вечера, что определялось лишь 10% летальности подопытных крыс.

Введение рифампицина в дозе 1/10 от DL₅₀ в течение 10 дней (табл.6) приводило к наступлению летальности, что свидетельствовало о наличии признаков развития кумуляции. Введение подопытной группе крыс на 12-е сутки среднесмертельной дозы изониазида установленной на интактных крысах приводило к 50 % летальности крыс.

Совместное введение изониазида с рифампицином приводило к снижению кумуляции. Введе-

ние изониазида в среднесмертельной дозе, установленной на интактных крысах на 12-е сутки, не приводило к летальности подопытных крыс, что подтверждало установленный ранее феномен антагонизма рифампицина в отношении токсического действия изониазида, применяемого в условиях совместного введения и развития толерантности к изониазиду при его применении в относительно низких токсических дозах (табл. 6). Влияние суточных ритмов на снижение токсичности было выявлено при введении изониазида в условиях моно – и совместного введения с рифампицином. Процент повышения среднесмертельной дозы изониазида, вводимого совместно с рифампицином в 22 часа вечера на 12-е сутки, составил 14 % (коэффициент достоверности t = 2,2).

Заключение. Проведенные экспериментальные токсикологические исследования токсичности изониазида и рифампицина в условиях совместного перорального введения крысам позволили установить эффект снижения токсичности изониазида при совместном применении с рифампицином. Было установлено, что введение среднесмертельной дозы изониазида, установленной на интактных крысах, совместно с ри-

Динамика летальности крыс-самцов при ежедневном пероральном применении изониазида, рифампицина, комбинации изониазида и рифампицина при их совместном введении в течение 10 дней с последующим определением DL₅₀ (n = 10 в каждой подопытной группе)

Время введения препаратов	Вводимые препараты	Длительность введения препаратов – 10 дней			Однократное введение изониазида после 10-дневного применения препаратов		
		Дозы препаратов в сутки	Суммарные дозы препаратов, мг/кг	Летальность крыс	DL ₅₀ , установленной на интактных крысах, мг/кг	Летальность крыс после введения DL ₅₀ , установленной на интактных крысах	DL ₅₀ на 12-е сутки от начала эксперимента, мг/кг
10 ч 00 мин утра	Изониазид	1/10 от DL ₅₀	1233	0/10	1233 ± 43	4/10	1400 ± 43
	Рифампицин	1/10 от DL ₅₀	19000	4/10	1233 ± 43	3/6	1233 ± 43
	Изониазид + Рифампицин	1/10 от DL ₅₀	1233 + 19000	4/10	1233 ± 43	0/6	1433 ± 34
22 ч 00 мин вечера	Изониазид	1/10 от DL ₅₀	1375	0/10	1375 ± 38	1/10	1521 ± 27
	Рифампицин	1/10 от DL ₅₀	19000	4/10	1375 ± 38	3/6	1375 ± 38
	Изониазид + Рифампицин	1/10 от DL ₅₀	1375 + 19000	1/10	1375 ± 38	0/9	1635 ± 84

фампицином не вызывало летальности крыс, а в клинике острого отравления не проявлялась фаза двигательного возбуждения, переходящая в эпистатус, что свидетельствовало об уменьшении нейротоксичности изониазида при совместном применении с рифампицином.

При исследовании влияния суточных ритмов на токсичность комбинации изониазида и рифампицина было установлено снижение токсичности и увеличение средней продолжительности жизни крыс при совместном введении препаратов в вечернее время суток. Введение рифампицина в утреннее и вечернее время суток не приводило к изменению токсичности и средней

продолжительности жизни, отмечена лишь большая чувствительность крыс-самок к действию летальных доз рифампицина вне зависимости от времени введения препарата.

Полученные экспериментальные токсикологические данные дают основание специалистам разрабатывать рациональный подход к режимам химиотерапии туберкулеза с использованием комбинаций изониазида с рифампицином, а также при применении современных комбинированных противотуберкулезных препаратов, содержащих фиксированные дозы изониазида и рифампицина в составе единой лекарственной формы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. Химико-фармацевтический журнал. 2003; 37(3): 32-34.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика (пер. с англ.) / Москва: Практика; 1999.
- Гриценко Н.С., Долгих В.Т. Нарушение сократимости и метаболизма миокарда при длительном приеме изониазида. Сибирский медицинский журнал. 2009; 5: 79-82.
- Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. Москва: ИД «Русский врач»; 2003.
- Гуськова Т.А., Либман С.С. Значение хронобиологии для фармакологических и токсикологических исследований. Фармакология и токсикология. 1987; 1(4): 111-118.
- Гуськова Т.А., Либман С.С. Хронобиологические аспекты лекарственной токсикологии (обзор состояния проблемы). Токсикологический вестник. 1997; 2: 2-7.
- Зоркальцева Е.Ю. Комбинированные противотуберкулезные препараты в практике врача фтизиатра. Иркутск, 2009.
- Иванова Д.А. Нежелательные побочные реакции при лечении больных туберкулезом: общие вопросы. Туберкулез и социально-значимые заболевания. 2013; 1: 57-65.
- Калько Е.А., Дрогозов С.М., Позднякова А.Ю., Захарко Н.В. Циркадианная зависимость токсичности парацетамола у крыс. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2016; 79(7): 25-28.
- Клиническая фармакология: национальное руководство / под ред. Ю.Б. Белоусова, В.Г. Кукеса, В.К. Лепяхина, В.И. Петрова. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014.
- Коваленко В.Н., Бышовец Т.Ф., Воронина А.К. Индукция цитохрома P-450 2E1 в патогенезе токсического действия лекарств. Психофармакология и биологическая наркология. 2007; 7(4): 1730-1731.
- Лесная Н.А. Хронотоксикология некоторых алкилирующих агентов. Российский биотерапевтический журнал. 2003; 1: 30-31.
- Лойт А.О., Савченков М.Ф. Профилактическая токсикология: руководство для токсикологов-экспериментаторов. Иркутск: Изд-во Иркут. ун-та; 1996.
- Лоншакова К.С., Абгалдаева Е.А., Ажунова Т.А., Убашеев И.О., Разуваева Я.Г., Мондодоев А.Г. Нефрозащитное действие фитозактракта «Нефрофит» при введении комплекса противотуберкулезных препаратов в эксперименте. Сибирский медицинский журнал. 2007; 1: 82-85.
- Мордык А.В., Иванова О.Г., Нагибина Л.А., Ситникова С.В. Препараты янтарной кислоты в комплексном лечении больных туберкулезом. Туберкулез и болезни легких. 2014; 91(6): 61-64.
- Павлюченкова Н.А., Крикова А.В., Мякишева Т.В., Сахаритова Е.А. Сравнительный анализ назначений противотуберкулезных препаратов в стационарах медицинских организаций гражданского и пенитенциарного секторов Смоленской области. Туберкулез и болезни легких. 2015; 5: 132-133.

17. Паролина Л.Е., Морозова Т.И., Отпущеникова О.Н., Разина А.Ю., Докторов Н.П. Клиническая эффективность лечения туберкулеза легких при множественной лекарственной устойчивости возбудителя. Туберкулез и болезни легких. 2015; 5: 138-139.

18. Пентюк А.А., Мороз Л.В., Паламарчук О.В. Поражение печени ксенобиотиками. Современные проблемы токсикологии. 2001; 2: 8-16.

19. Расулов М.М., Бабаев Б.М. Изучение поведения крыс в условиях, близких к виварию. Материалы Всесоюзной конференции. 8-10 октября 1980 г. Москва, 1980; 39-40.

20. РД 64-126-91 «Правила доклинической оценки безопасности фармакологиче-

ческих средств (GLP)». Москва; 1991.

21. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. ЧАСТЬ ПЕРВАЯ. МОСКВА: ГРИФ И К; 2012.

22. ТРАХТЕНБЕРГ И.М., СОВА Р.Е., ШЕФТЕЛЬ В.О., ОНИКИЕНКО Ф.А. ПОКАЗАТЕЛИ НОРМЫ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ. МОСКВА: МЕДИЦИНА; 1978.

23. Усов К.И., Гуськова Т.А., Юшков Г.Г., Машанов А.В. Влияние хронобиологических ритмов на токсичность противотуберкулезного препарата «Изониазид» в условиях эксперимента. Токсикологический вестник. 2016; 2: 31-36.

24. Усов К.И., Гуськова Т.А., Юшков Г.Г.,

Машанов А.В. Чувствительность животных различных возрастных групп к изониазиду в условиях токсикологического эксперимента. Токсикологический вестник. 2016; 5: 36-43.

25. Усов К.И., Юшков Г.Г., Машанов А.В. Острая токсичность противотуберкулезных препаратов, содержащих и не содержащих пиридоксина гидрохлорид (экспериментальное исследование). Туберкулез и болезни легких. 2014; 12: 76-82.

26. Усов К.И., Юшков Г.Г., Машанов А.В., Шульгина Н.А., Дударева К.А. Ксантуреновая кислота как биомаркер обмена триптофана в условиях экспериментального воздействия современными противотуберкулезными препаратами. Туберкулез и болезни легких. 2015; 5: 184-185.

27. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению туберкулеза органов дыхания. М., Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2014; 56 с.

28. Фещенко Ю.И., Черненко С.А., Мальцев В.И., Викторов А.П., Матвеева Е.В., Логвина И.А. и др. Оценка значимости побочных реакций противотуберкулезных препаратов при лечении туберкулеза. Украинский медицинский часопис. 2008; 3(65): 117-125.

29. Филиппова Г.Ф. Особенности временной организации суточных вариаций температуры тела лабораторных животных в эксперименте при применении производных ГОМК (оксидиригид натрия). Вестник Уральской медицинской академической науки. 2013; 2: 58-60.

REFERENCES:

1. Berezovskaya I.V. Classification of chemical substances by parameters of acute toxicity at parenteral modes of introduction. Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal. 2003; 37(3): 32-34 (in Russian).

2. Glants S. Primer of Biostatistics. Moscow: Praktika, 1999 (in Russian).

3. Gritsenko N.S., Dolgikh V.T. Infringement of contractility and a metabolism of a myocardium in long reception of izoniazid. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal. 2009; 5: 79-82 (in Russian).

4. Guskova T.A. Toxicology of drugs. Moscow: ID «Russkiy vrach»; 2003 (in Russian).

5. Guskova T.A., Liberman S.S. The importance of chronobiology for pharmacological and toxicological studies. Farmakologiya i toksikologiya. 1987; 1(4): 111-118 (in Russian).

6. Guskova T.A., Liberman S.S. Chronobiological aspects of drug toxicology (critical evaluation of the problem). Toksikologicheskiy vestnik. 1997; 2: 2-7 (in Russian).

7. Zorkalceva E.Ju. Combined antituberculous drugs in the practice of phthisiatrician. Irkutsk, 2009 (in Russian).

8. Ivanova D.A. Adverse drug reactions during treatment of tuberculosis: the main questions. Tuberkuлез i sotsialno-znachimye zabolovaniya. 2013; 1: 57-65 (in Russian).

9. Kalko E.A., Drogovoz S.M., Pozdnyakova A.Ju., Zakharko N.V. Circadian dependence of paracetamol hepatotoxicity in rats. Eksperimentalnaya i klinicheskaya

farmakologiya. 2016; 79(7): 25-28 (in Russian).

10. Clinical pharmacology: national leadership. Moscow: GEOTAR-Media, 2014 (accessed 23 January 2017) (in Russian).

11. Kovalenko V.N., Byshovets T.F., Voronina A.K. Induction of cytochrome P-450 2E1 in the pathogenesis of toxic effects of drugs. Psikhofarmakologiya i biologicheskaya narkologiya. 2007; 7(4): 1730-1731 (in Russian).

12. Lesnaya N.A. Chronotoxicology of some alkylating agents. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 2003; 1: 30-31 (IN RUSSIAN).

13. Loyt A.O., Savchenkov M.F. Preventive toxicology. Irkutsk; 1996 (in Russian).

14. Lonshakova K.S., Abgaldava E.A., Azhurova T.A., Ubashev I.O., Razuvaeva Ya.G., Mondodoev A.G. Nephroprotective effect of phytoextract «Nephrophyt» of a complex of antituberculous preparations in experiment. Sibirskiy meditsinskiy zhurnal. 2007; 1: 82-85 (in Russian).

15. Mordyk A.V., Ivanova O.G., Nagibina L.A., Sitnikova S.V. Succinic acid preparations in the combination treatment of patients with tuberculosis. Tuberkuлез i bolezni legkikh. 2014; 91(6): 61-64 (in Russian).

16. Pavljuchenkova N.A., Krikova A.V., Myakisheva T.V., Sakharitova E.A. Comparative analysis of tuberculosis drugs prescription in in-patient departments of civilian and penitentiary sectors of Smolensk region. Tuberkuлез i bolezni

legkikh. 2015; 5: 132-133 (in Russian).

17. Parolina L.E., Morozova T.I., Otputshchennikova O.N., Razina A.Ju., Doktorova N.P. Clinical efficiency of pulmonary tuberculosis treatment with multiple resistance of mycobacteria. Tuberkuлез i bolezni legkikh. 2015; 5: 138-139 (in Russian).

18. Pentjuk A.A., Moroz L.V., Palamarчук O.V. Liver damage by xenobiotics. Sovremennye problemy toksikologii. 2001; 2: 8-16 (in Russian).

19. Rasulov M.M., Babaev B.M. The study of the behavior of rats in conditions close to the vivarium. In: Materials of all-Union conference. Moscow, 1980; 39-40 (in Russian).

20. RD 64-126-91. Terms of preclinical safety evaluation of pharmacological substances (GLP) Moscow; 1991 (in Russian).

21. Guidelines for pre-clinical trials of medicinal products. Part one. Moscow; 2012 (in Russian).

22. Trakhtenberg I.M., Sova R.E., Sheftel V.O., Onikienko F.A. Performance standards in laboratory animals in toxicological experiment. Moscow; 1978 (in Russian).

23. Usov K.I., Guskova T.A., Jushkov G.G., Mashanov A.V. The influence of chronobiological rhythms on the toxicity of anti-tuberculosis drug «Isoniazid» in the experiment. Toksikologicheskiy vestnik. 2016; 2: 31-36 (in Russian).

24. Usov K.I., Guskova T.A., Jushkov G.G., Mashanov A.V. The Sensitivity of Animals

of Different Age Groups to Isoniazid in Conditions Toxicological Experiment. Toksikologicheskiy vestnik. 2016; 5: 36-43 (in Russian).

25. Usov K.I., Jushkov G.G., Mashanov A.V. Acute toxicity of pyridoxine hydrochloride containing and noncontaining antituberculosis drugs (an experimental study). Tuberkuлез i bolezni legkikh. 2014; 12: 76-82 (in Russian).

26. Usov K.I., Jushkov G.G., Mashanov A.V., Shulgina N.A., Dudareva K.A. Xanthurenic acid as a biomarker of tryptophan exchange under experimental effect by modern anti-tuberculosis drugs. Tuberkuлез i bolezni legkikh. 2015; 5: 184-185 (in Russian).

27. Federal clinical recommendations on diagnostics and treatment of tuberculosis of respiratory organs. Moscow, Tver: Triada, 2014 (in Russian).

28. Feshchenko Ju.I., Cherenko S.A., Maltsev V.I., Viktorov A.P., Matveeva E.V., Logvina I.A. et al. Significance evaluation of the antituberculosis drugs side effects in tuberculosis treatment. Ukrainskiy medichniy chasopis. 2008; 3(65): 117-125 (in Russian).

29. Filippova G.F. Features of time regulations of laboratory animal bodies temperature change in experiment with gammaoxybutanoic acid derivatives (sodium oxybutyrate). Vestnik Uralskoy meditsinskoy akademicheskoy nauki. 2013; 2: 58-60 (in Russian).

K.I. Usov^{1,2}, T.A. Guskova³, G.G. Yushkov¹, A.V. Mashanov¹, A.A. Gushchina¹

THE INFLUENCE OF CHRONOBIOLOGICAL RHYTHMS ON TOXICITY OF ISONIAZID AND RIFAMPICIN COMBINATION UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS IN RATS

¹Research Institute of Biophysics, Test Laboratory Center, Angarsk State Technical University, 665835, Angarsk, Russian Federation.

²Irkutsk State Medical University, RF Ministry of Health, 664003, Irkutsk, Russian Federation

³Non-commercial partnership of Healthcare assistance «Scientific Center of Quality Control», 115191, Moscow, Russian Federation,

Results of an experimental toxicological study on anti-tubercular drugs Isoniazid and Rifampicin at their combined administration are reported. It made it possible to establish antagonistic effect of rifampicin to lethal doses of isoniazid and to elicit a decrease in toxicity of the isoniazid and rifampicin combination when administrated at the evening time..

Keywords: anti-tubercular drug, Isoniazid; Rifampicin; chronobiology; chronobiological rhythms; sound chemotherapy; experimental research.

Материал поступил в редакцию 17.05.2017 г.