

21. Векстерн Т.В., Баев А.А. Нуклеотидный состав ядерных эритроцитов // Биохимия. 1957. Т. 22. № 6. С. 1043–1055.

22. Ennor A.H., Rosenberg H. The determination and distribution of phosphocreatine in animal tissues // Biochem. J. 1952. V. 51. P. 606–610.

23. Райскина М.Е., Онищенко Н.А., Шаргородский Б.М. и др. Методы прижизненного исследования метаболизма сердца. М.: Медицина, 1970. 264 с.

24. Atkinson D.E. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers // Biochem. 1968. V. 7. № 11. P. 4030–4034.

УДК 599:539.1.047

Исследование противолучевых свойств экидистероидсодержащих препаратов при хроническом облучении в малых дозах

© 2012. А. Г. Кудяшева¹, д.б.н., зав. лабораторией, О. Г. Шевченко¹, к.б.н., н.с., Н. Г. Загорская¹, н.с., Л. А. Башлыкова¹, к.б.н., с.н.с., О. В. Раскоша¹, к.б.н., н.с., О. В. Ермакова¹, д.б.н., в.н.с., Л. Н. Шишкина², д.х.н., зав. лабораторией,

¹Институт биологии Коми научного центра Урального отделения РАН,

²Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН,

e-mail: kud@ib.komisc.ru

Изучены противолучевые свойства экидистероидсодержащего препарата Серпистен и инокостерона при использовании их до и после хронического воздействия гамма-излучения в малой дозе 22,6 сГр. Показано, что радиозащитный эффект зависит от дозы препарата и времени применения (терапевтически/профилактически). Использование Серпистена в дозе 50 мг/кг после действия облучения приводит к нормализации фосфолипидной компоненты клеточных мембран печени и эритроцитов, кортикостероидной функции надпочечников, значительно снижает мутагенный эффект. Инокостерон в дозе 5 мг/кг проявляет противолучевые свойства при воздействии гамма-излучения в малой дозе и при определенной схеме введения препарата приводит к нормализации показателей состояния перекисного окисления липидов в тканях облученных животных. Совместное действие инокостерона в дозах 5 и 15 мг/кг с облучением достоверно снижает мутагенный эффект хронического облучения соматических и половых клеток.

Anti-ray properties of the ecdysteroid containing preparation Serpisten and inokosterone when used before and after chronic exposure to γ -radiation at a lower dose of 22,6 cG are studied. It is showed that radioprotective effect depends on the dose and duration of course (therapeutic / prophylactic). Using Serpisten in a dose of 50 mg/kg after the irradiation leads to normalization of the phospholipid component of cell membranes of liver and red blood cells, corticosteroid function of adrenal glands, reduces the mutagenic effect. Inokosterone at a dose of 5mg/kg shows anti-ray properties when exposed to γ -radiation in small doses and with a certain scheme of administration leads to normalization of the status of lipid peroxidation in the tissues of irradiated animals. Inokosterone in doses of 5 and 15 mg/kg significantly reduces the mutagenic effects of radiation on the somatic and germ cells.

Ключевые слова: экидистероидсодержащие соединения, гамма-облучение, малые дозы, лабораторные мыши, биохимические, цитогенетические, морфологические показатели

Keywords: ecdysteroids, Serpisten, γ -irradiation, low doses, laboratory mice, biochemical, cytogenetic, morphological parameters

В настоящее время является актуальным защита населения, проживающего на загрязнённых радиоактивных территориях в связи с глобальным загрязнением окружающей среды, а также поиск и изучение препаратов растительного происхождения, обладающих адаптогенными и радиопротекторными свойствами в области малых доз облучения [1 – 4]. Исследование радиопротекторного действия фитоэкидстероидов в составе Серпистена пред-

ставляет интерес в связи с существованием положительной корреляции между радиозащитной активностью и способностью адаптогенов повышать общую неспецифическую резистентность организма [5].

По современным представлениям именно активация антиоксидантных систем, процессов репарации ДНК и регуляция апоптоза являются основными механизмами формирования неспецифического адаптивного ответа

универсальной защитной реакции любых организмов, обеспечивающей их устойчивость в неадекватных условиях среды [6 – 8]. Совокупность полученных экспериментальных данных и анализ литературы свидетельствуют об участии экидистероидов в регуляции различных систем организма и позволяют предположить, что биологическая активность этих природных соединений обусловлена воздействием на нейрогуморальные механизмы, параметры физико-химической системы регуляции перекисного окисления липидов и генетические показатели в тканях животных.

Цель работы заключалась в изучении биологического действия фитоэкидистероидов в условиях хронического облучения животных в малых дозах.

Материалы и методы

Эксперименты проводили весной на самцах белых беспородных мышей. Всего в экспериментах было использовано 250 животных. Мыши находились в гамма-поле, образованном двумя источниками ^{226}Ra , в течение одного месяца. Мощность дозы облучения составляла 40 мР/ч, суммарная поглощённая доза – в среднем 22,6 сГр. В первых двух экспериментах в течение 10 дней после облучения (терапевтически) либо в течение 10 дней до начала облучения (профилактически) животным заменяли питьевую воду раствором препарата. Дозы препаратов составили 5 и 50 мг/кг для Серпистана и 5 мг/кг – для инокостерона с учетом массы животных и объема потребляемой ими жидкости за 10 дней. В третьем эксперименте животным заменяли воду раствором инокостерона непосредственно в период облучения. Суммарные дозы инокостерона составляли 5 и 15 мг/кг массы тела за 10 сут.

Изучали состояние процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ): состав фосфолипидов (ФЛ) в печени, эритроцитах, ТБК-активные продукты, активность каталазы в печени, общую пероксидазную активность в крови, обобщенные показатели липидного обмена; морфофункциональные показатели органов эндокринной системы: морфологию коры надпочечников и щитовидной железы, содержание гормонов в надпочечниках: кортикостерона, 11-дегидрокортикостерона, альдостерона; цитогенетические параметры: частоту микроядер (МЯ), митотический индекс (МИ) в клетках костного мозга, частоту аномальных головок спермиев (АГС). Используемые методы подробно описаны нами ранее [9 – 11].

Для оценки цитогенетической эффективности исследуемых препаратов на половые и соматические клетки животных были использованы два экспресс-метода. Уровень аномалий спермиев и микроядерный тест использовали как критерий чувствительности организмов к мутагенам [12]. Для анализа частоты хромосомных aberrаций в соматических клетках проведен микроядерный тест на клетках костного мозга [13]. Нарушения в половых клетках оценивали по уровню АГС [14].

Результаты и обсуждение

В первом эксперименте с Серпистаном хроническое низкоинтенсивное облучение животных привело к резкому увеличению суммарного содержания ФЛ в липидах эритроцитов крови, а также доли лизоформ ФЛ (ЛФХ) в ФЛ эритроцитов. При этом в печени облучённых животных достоверных изменений по сравнению с контролем по этим показателям не отмечали [15]. Более выраженные изменения в составе ФЛ эритроцитов по сравнению с липидами других изученных тканей (печень, головной мозг, селезёнка) обусловлены тем, что липиды эритроцитов крови интактных животных всегда обладают прооксидантной активностью и, как правило, содержат пероксиды [16]. Гамма-облучение вызвало двукратный подъем доли кардиолипина и фосфатидной кислоты (КЛ+ФК) в ФЛ как эритроцитов крови, так и печени мышей [15]. Возрастание количества фосфатидной кислоты в ФЛ эритроцитов может быть связано с активацией фосфолипаз С и D. Наличие кардиолипина в составе ФЛ эритроцитов связано с гетерогенностью популяции клеток эритроидного ряда и присутствием в ней ретикулоцитов, и рост доли КЛ в ФЛ эритроцитов вследствие облучения может быть обусловлен ускоренным выходом в кровяное русло незрелых форм (ретикулоцитов), что действительно имеет место при радиационном воздействии в малых дозах [11, 17, 18]. Хроническое облучение привело к повышению (в 2,5 раза) частоты микроядер в клетках костного мозга мышей, уровня АГС (табл. 1).

Действие собственно Серпистана приводит к расширению сетчатой зоны в надпочечниках, свидетельствующему об усиленной продукции стероидных гормонов. Они участвуют в обеспечении адаптации организма, повышают его стрессоустойчивость и предотвращают развитие ряда патологий (рис. 1). При совместном действии Серпистана и храни-

Таблица 1

Эффекты действия Серпистена и ионизирующего излучения на цитогенетические параметры

| Вариант эксперимента | Костный мозг, ‰ | | | Спермии, ‰ | |
|------------------------------|-----------------|------------------------------|---------------------|------------|-------------------------|
| | ∑ клеток | частота клеток с микроядрами | индекс митотический | ∑ клеток | доля аномальных головок |
| Контроль | 26000 | 5,0 (26) | 3,0 (8) | 13500 | 2,34 (27) |
| Серпистен, мг/кг | | | | | |
| 5 | 8000 | 5,0 (8) | 2,9 (8) | 2500 | 2,0 (5) |
| 50 | 8000 | 7,1* (8) | 3,3 (8) | 4000 | 2,95 (8) |
| Облучение | 7000 | 12,9* (8) | 4,3* (7) | 4000 | 4,16* (8) |
| Серпистен, мг/кг + облучение | | | | | |
| 5 | 8000 | 12,6* (8) | 2,3* (8) | 4000 | *3,65 ** (8) |
| 50 | 8000 | 6,0 (8) | 2,5* (8) | 3500 | *3,46** (7) |
| Облучение + Серпистен, мг/кг | | | | | |
| 5 | 7000 | 4,6 (8) | 3,6 (7) | 5000 | *3,2** (10) |
| 50 | 9000 | 6,7 (8) | 4,8 (9) | 4000 | *1,82** (8) |

Примечание: различия с контролем (*) и отличия от эффекта хронического облучения (**) достоверны при $p < 0,05$. В скобках указано число исследованных животных.

ческого низкоинтенсивного гамма-излучения наблюдаемый эффект в значительной степени зависел как от дозы вещества, так и от времени его поступления в организм (в профилактическом или терапевтическом режимах).

Анализ биохимических данных показывает значительное возрастание доли сфингомиелина (СМ) в ФЛ эритроцитов крови во всех вариантах эксперимента, а в ФЛ печени – только при профилактическом использовании Серпистена в дозе 5 мг/кг. Доля ФЛ в составе общих липидов в большинстве вариантов опыта не отличалась от контрольных зна-

чений. Однако при совместном действии препарата и облучения эффект оказался более выраженным (рис. 2А). Содержание лизоформ в ФЛ печени облучённых животных, получавших Серпистен (независимо от схемы применения), достоверно не отличалось от контрольных показателей. В липидах эритроцитов использование Серпистена в дозе 5 мг/кг только в терапевтическом режиме привело к нормализации данного показателя, в дозе 50 мг/кг – уменьшило содержание лизоформ до следовых количеств. В большинстве вариантов опыта применение Серпистена способ-

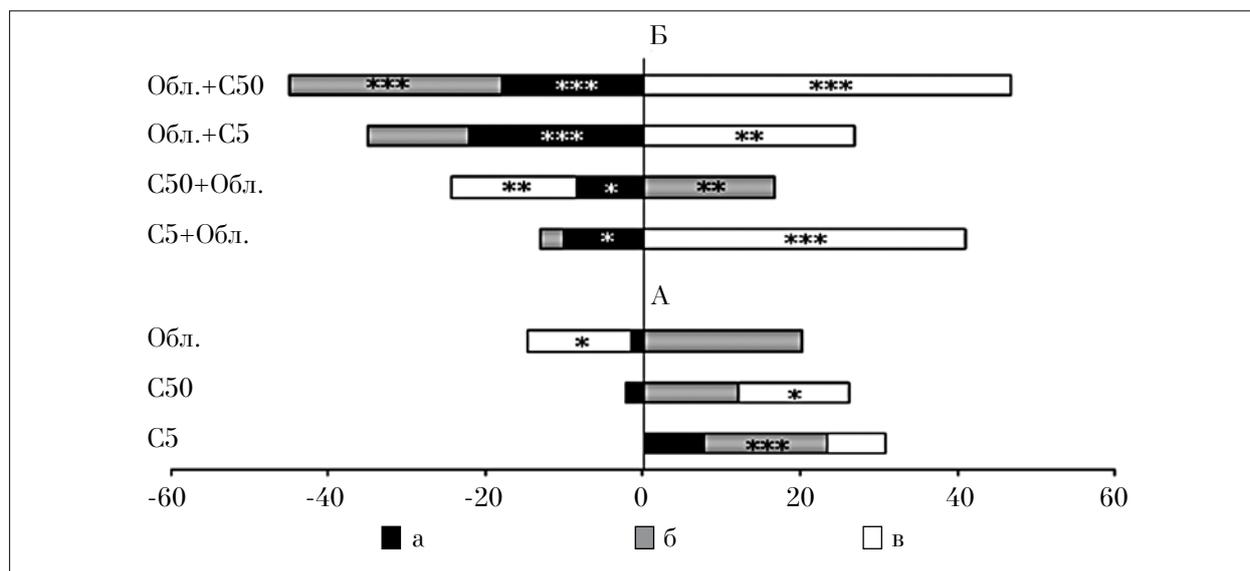


Рис. 1. Ширина клубочковой (а), пучковой (б) и сетчатой (в) зон коры надпочечников белых беспородных мышей после раздельного (А) и сочетанного (Б) действия Серпистена и облучения
Примечание: Здесь и далее: разница по отношению к контролю (мкм) достоверна при $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) и $p < 0,001$ (***)

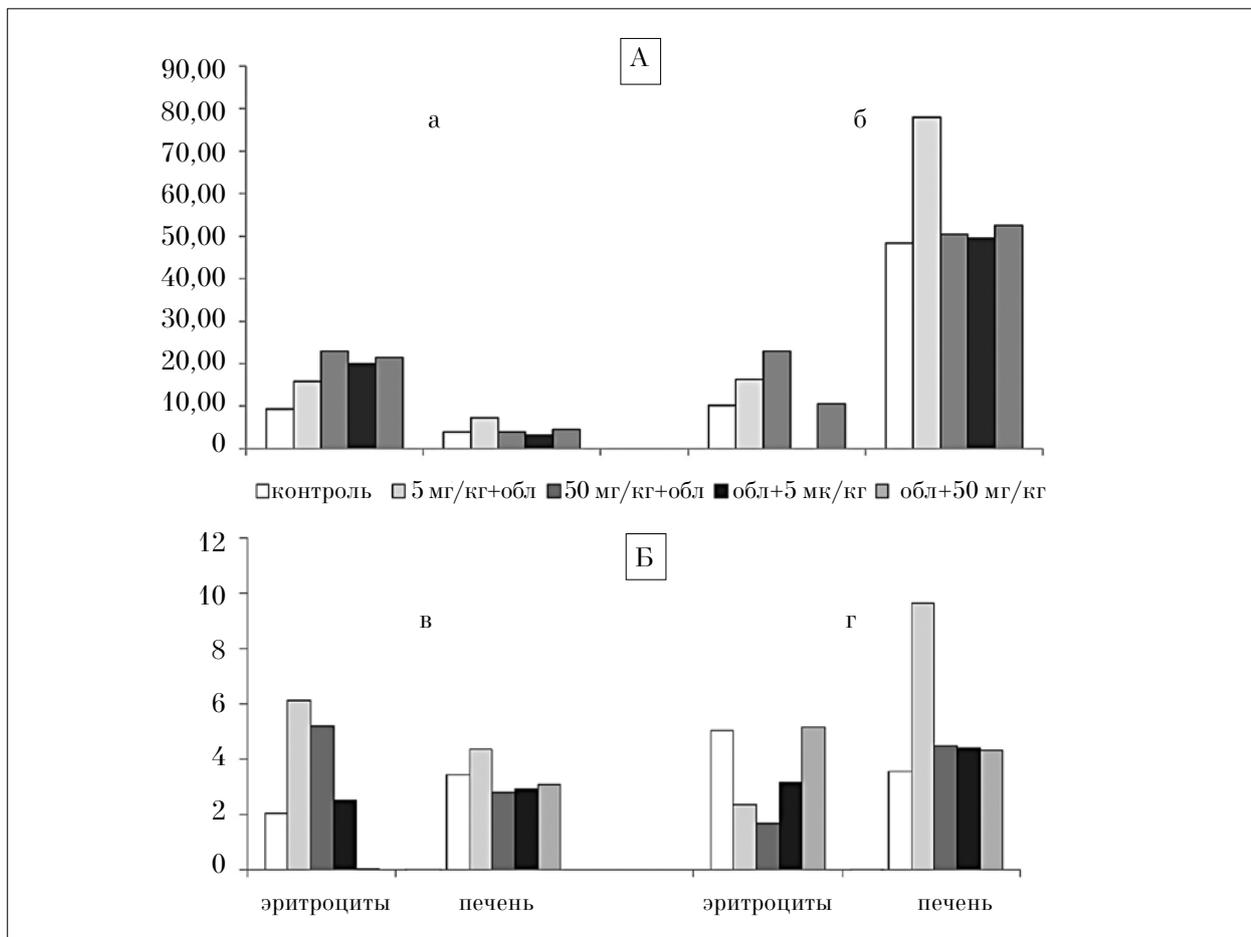


Рис. 2. Совместное действие Серпистена и облучения на отдельные показатели липидного обмена (А) и минорные фракции фосфолипидов (Б) в эритроцитах крови и печени мышей. По вертикали указана доля (%) сфингомиелина (а), фосфолипидов (б), кардиолипина в сумме с фосфатидной кислотой (в) и лизофосфатидилхолина (г)

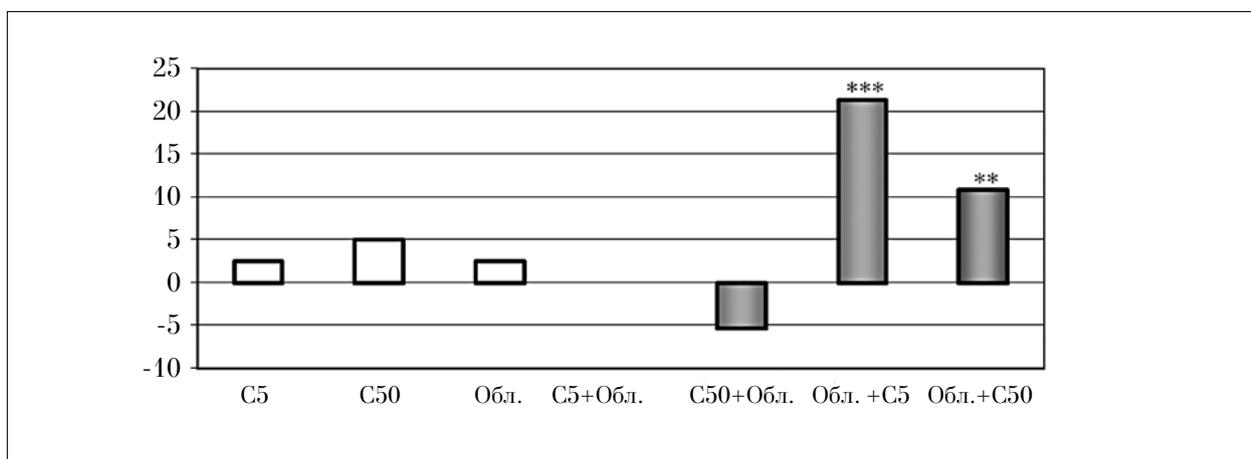


Рис. 3. Диаметры фолликулов щитовидной железы белых беспородных мышей после раздельного (белые столбики) и сочетанного (серые столбики) действия Серпистена и облучения (разница по отношению к контролю, мкм)

Таблица 2

Содержание гормонов в надпочечниках после отдельного и сочетанного действия ионизирующей радиации и Серпистена

| Вариант эксперимента | Гормон, нг | | |
|------------------------------|----------------|-------------------------|--------------|
| | Кортикостерон | 11-дегидрокортикостерон | Альдостерон |
| Контроль | 44,0 ± 11,0 | 6,0 ± 1,0 | 121,0 ± 37,0 |
| Серпистен, мг/кг | | | |
| 5 | 117,0 ± 19,0** | 11,0 ± 3,0 | 78,0 ± 30,0 |
| 50 | 45,0 ± 9,0 | 10,0 ± 4,0 | 53,0 ± 18,0 |
| Облучение | 76,0 ± 13,0 | 7,0 ± 1,0 | 68,0 ± 25,0 |
| Серпистен, г/кг + облучение | | | |
| 5 | 74,0 ± 12,0 | 3,0 ± 1,0 | 82,0 ± 29,0 |
| 50 | 79,0 ± 16,0 | 2,6 ± 0,4* | 137,0 ± 33,0 |
| Облучение + Серпистен, мг/кг | | | |
| 5 | 61,0 ± 20,0 | 4,0 ± 1,0 | 94,0 ± 44,0 |
| 50 | 103,0 ± 17,0* | 13,0 ± 6,0 | 136,0 ± 40,0 |

Примечание: отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$ (*) и $p < 0,01$ (**).

ствовало нормализации содержания КЛ+ФК в ФЛ печени облучённых мышей, в ФЛ эритроцитов восстановление доли этих ФЛ наблюдали только при терапевтическом введении Серпистена в дозе 50 мг/кг (рис. 2Б). Применение Серпистена в дозе 50 мг/кг как до, так и после облучения достоверно уменьшало повреждающее действие облучения на соматические клетки – антимутагенный эффект (АЭ) равен 53,3–48,1%, в половых клетках наиболее выраженный эффект (56%) отмечен при действии Серпистена в дозе 50 мг/кг после облучения – уменьшение в 2,3 раза (табл. 1). Изучение морфологического состояния щитовидной железы показало, что максимально приближены к контрольным значениям результаты профилактического введения мышам Серпистена до облучения, причем после обеих доз препарата (рис. 3). Серпистен при сочетанном действии с облучением оптимизирует кортико-стероидную функцию надпочечников, препятствуя её функциональному истощению. Введение Серпистена и последующее облучение животных, так же как прием препарата после облучения, приближает результат по содержанию гормонов надпочечника к контрольному уровню, снижая уровень кортикостерона и 11-дегидрокортикостерона (табл. 2).

Поскольку биологическая активность Серпистена во многом зависит от наличия в составе препарата инокостерона, в частности, инокостерон обладает более выраженным антиоксидантным и анаболическим действием [19], это обуславливало необходимость более подробного изучения противолучевых свойств данного соединения.

Воздействие гамма-излучения в малой дозе привело к увеличению общей пероксидазной активности (ОПА), введение инокостерона до облучения приближало ОПА крови к контрольному уровню (рис. 4А). Испол-

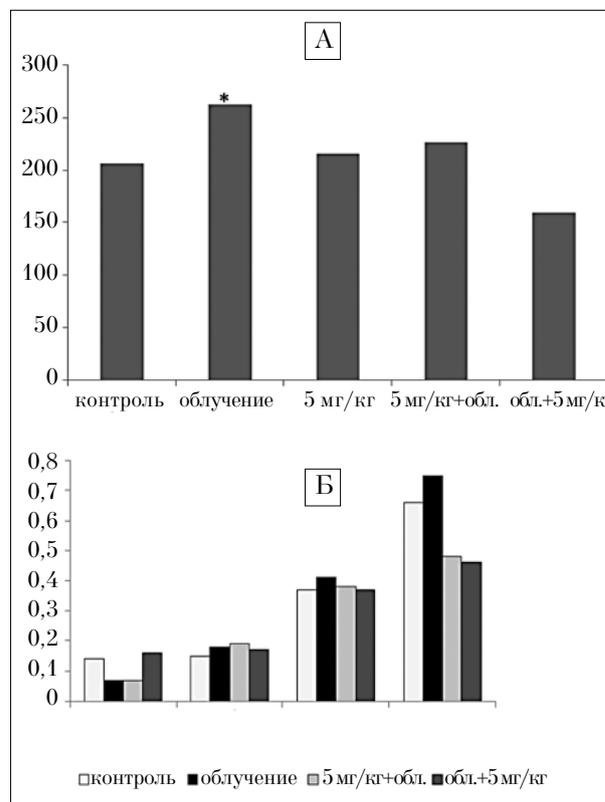


Рис. 4. Влияние совместного действия инокостерона и гамма-облучения на общую пероксидазную активность (мкМ/мл) крови (А) и содержание вторичных продуктов перекисного окисления липидов (Б) в плазме крови (а), печени (б), мозге (в) и селезенке (г) мышей

зование инокостерона и до, и после облучения способствовало нормализации интенсивности процессов ПОЛ в головном мозге и вызывало существенное снижение содержания вторичных продуктов ПОЛ в селезенке. В плазме крови при их последовательном действии эффект препарата зависел от времени его поступления в организм: нормализация данного показателя обнаружена только при терапевтическом использовании препарата (рис. 4Б). Положительная корреляция между активностью каталазы и ТБК-активными продуктами была отмечена в группах интактных животных и мышей, получавших инокостерон. Хроническое облучение в малой дозе приводит к нарушению связей между активностью каталазы и вторичных продуктов перекисного окисления липидов в печени мышей. Применение инокостерона (5 мг/кг) как до, так и после облучения способствовало восстановлению взаимосвязи между показателями активности каталазы и вторичными продуктами перекисного окисления липидов: коэффициенты корреляции соответственно равны $0,89 \pm 0,13$ и $0,79 \pm 0,17$ [15].

Совместное действие инокостерона с облучением достоверно снижает мутагенный эффект хронического облучения соматических и половых клеток (табл. 3). Обе дозы (5 и 15 мг/кг) оказывают одинаковый антимуtagenный эффект на клетки костного мозга и спермии – уровень снижения цитогенетических повреждений от облучения составил 42–46%.

Заключение

Таким образом, использование Серпистена в дозе 50 мг/кг после действия облучения приводит к нормализации как фосфолипид-

ной компоненты клеточных мембран печени и эритроцитов по большинству изученных показателей, так и кортикостероидной функции надпочечников; применение препарата в этой дозе как до, так и после облучения значительно снижает мутагенный эффект, вызванный облучением. При терапевтическом использовании Серпистен обладает выраженным противолучевым эффектом в области низкоинтенсивного облучения в малой дозе, однако радиозащитный эффект зависит от дозы препарата. Нормализацию состава ФЛ мембран митохондрий печени крыс под действием экидистероидсодержащих препаратов отмечали также в условиях аллоксанового диабета [1]. Показано [20], что экстракты некоторых растений, содержащие экидистероиды, за счет влияния на содержание и соотношение различных фракций липидов и фосфолипидов в эритроцитарных мембранах препятствуют модификации формы эритроцитов при различных экспериментальных патологиях животных.

Инокостерон проявляет противолучевые свойства при воздействии низкоинтенсивного гамма-излучения в малой дозе и при определенной схеме введения препарата приводит к нормализации показателей состояния ПОЛ в тканях облученных животных. Результаты изучения влияния фитоэкидистероидов (Серпистен и инокостерон) на цитогенетические показатели при хроническом облучении в малых дозах выявили их противолучевой эффект, уровень которого зависит от дозы и последовательности использования экидизонсодержащих препаратов. Защитное действие Серпистена при его профилактическом использовании в основном обусловлено стимуляцией репарационных процессов, при терапевтическом применении наблюдается усиление эли-

Таблица 3

Эффекты действия инокостерона и ионизирующего излучения на цитогенетические параметры (n = 15)

| Вариант эксперимента | Параметр | | |
|--------------------------------|----------|-------|--------|
| | МЯ, ‰ | МИ, ‰ | АГС, % |
| Контроль | 5,15 | 3,85 | 2,46 |
| Инокостерон, мг/кг | | | |
| 5 | 3,87* | 2,8* | 2,31 |
| 15 | 8,13* | 3,13 | 2,76 |
| Облучение | 13,6* | 3,60 | 4,16* |
| Инокостерон, мг/кг + облучение | | | |
| 5 | 8,13* | 3,13 | 2,23** |
| 15 | *7,60** | 3,07* | 2,40** |

Примечание: МЯ – частота клеток с микроядрами, МИ – митотический индекс, АГС – доля спермиев с аномальными головками. Сумма проанализированных клеток составила в контроле 13000, остальных вариантах эксперимента – по 15000. Различия с контролем (*) и вариантом «облучение» (**) достоверны при $p < 0,05$.

минации (апоптоза) клеток с повреждениями ДНК. Антимутагенный эффект инокостерона при сочетанном действии с облучением обусловлен активацией антиоксидантной и репарационной систем защиты ядерного материала.

Результаты исследований показали, что биологическая активность экдистероидсодержащих препаратов связана с воздействием на систему регуляции ПОЛ, цитогенетические параметры и структурно-функциональное состояние органов эндокринной системы. Это обуславливает их способность модифицировать эффекты низкоинтенсивного гамма-облучения животных в малых дозах. Установлена существенная зависимость биологических последствий облучения от дозы экдистероидсодержащих соединений, времени их поступления в организм [21].

Исследования выполнены при финансовой поддержке программы президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» (проект № 12-П-4-1023: «Научные основы создания адаптогенных и геропротекторных средств растительного происхождения»).

Литература

1. Сыров В.Н., Ташмухамедова М.А., Хушбактова З.А. и др. Влияние фитоэкдистероидов и нерабола на показатели углеводного и липидного обменов и фосфолипидный спектр мембран митохондрий печени крыс при экспериментальном сахарном диабете // Укр. биохим. журн. 1992. Т. 64. № 4. С. 61–67.

2. Кудряшов Ю.Б. О химической защите от ионизирующей радиации низкой интенсивности // Радиационная биология. 1997. Т. 37. № 4. С. 673–675.

3. Залашко М.В., Королева И.Ф., Салохина Г.А. и др. Противолучевые свойства липокаротиноидного экстракта из дрожжей *Rhodotorula glutinis* // Радиационная биология. 1997. Т. 37. № 1. С. 41–45.

4. Легеза В.И., Владимиров В.Г. Новая классификация профилактических противолучевых средств // Радиационная биология. 1998. Т. 38. № 3. С. 416–425.

5. Владимиров В.Г., Красильников И.И. Фармакологические механизмы радиозащитного эффекта в условиях целостного организма и перспективы изыскания радиопротекторов // Радиационная биология. 1994. Т. 34. Вып. 1. С. 121–133.

6. Соффер В.Н. Репарация генетических повреждений // Соросовский образовательный журн. 1997. № 8. С. 4–13.

7. Засухина Г.Д. Радиоадаптивный ответ в клетках человека, различающихся по репарации ДНК // Радиационная биология. 1999. Т. 39. № 1. С. 58–63.

8. Пелевина И.И., Афанасьев Г.Г., Алещенко А.В. и др. Радиоиндуцированный адаптивный ответ у детей и влия-

ние на него внешних и внутренних факторов // Радиационная биология. 1999. Т. 39. № 1. С. 106–112.

9. Кудяшева А.Г., Шишкина Л.Н., Загорская Н.Г., Таскаев А.И. Биохимические механизмы радиационного повреждения природных популяций мышевидных грызунов. СПб.: Наука, 1997. 156 с.

10. Кудяшева А.Г., Шишкина Л.Н., Шевченко О.Г. и др. Биологические эффекты радиоактивного загрязнения в популяциях мышевидных грызунов. Екатеринбург. 2004. 214 с.

11. Материй Л.Д., Ермакова О.В., Таскаев А.И. Морфофункциональная оценка состояния организма мелких млекопитающих в радиологических исследованиях (на примере полевки-экономки). Сыктывкар. 2004. 164 с.

12. Заичкина С.И., Кондакова Н.В., Розанова О.М. и др. Тестирование противолучевого действия биологически активных веществ в диапазоне средних и малых доз облучения с использованием цитогенетического показателя – микроядерного теста // Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38. № 8. С. 3–8.

13. Шевченко В.А., Померанцева М.Д. Генетические последствия действия ионизирующих излучений. М.: Наука, 1985. 279 с.

14. Heddle J.A. A rapid in vivo test chromosomal damage // Mutat. Res. 1973. V. 18. № 2. P. 187–190.

15. Шевченко О.Г., Загорская Н.Г., Кудяшева Н.Г., Шишкина Л.Н. Противолучевые свойства экдистероидсодержащих препаратов // Радиационная биология. 2007. Т. 47. № 4. С. 501–508.

16. Шишкина Л.Н., Хрустова Н.В. Кинетические характеристики липидов тканей млекопитающих в реакциях автоокисления // Биофизика. 2006. Т. 51. Вып. 2. С. 340–346.

17. Маслова К.И. Радиочувствительность таежных грызунов и возможность их приспособления к действию ионизирующей радиации как радиологическому фактору среды. Сыктывкар, 1978. 23 с. (Сер. Науч. докл. / Коми фил. АН СССР; Вып. 40).

18. Аклеев А.В., Варфоломеева Т.А. Состояние гемопоеза в условиях многолетнего облучения костного мозга у жителей прибрежных сел р. Теча // Радиационная биология. 2007. Т. 47. № 3. С. 307–321.

19. Володин В.В., Пчеленко Л.Д., Володина С.О. и др. Фармакологическая оценка новой экдистероидсодержащей субстанции серпистен // Растительные ресурсы. 2006. Т. 42. Вып. 3. С. 113–130.

20. Плотников М.Б., Алиев О.А., Васильев А.С. и др. Влияние экстракта левзеи сафлоровидной на структурно-метаболическое состояние эритроцитов при ишемии головного мозга у крыс // Бюл. эксперим. биол. мед. 2008. Т. 146. № 7. С. 50–53.

21. Патент № 2326672, Россия МПК С2, А61К 31/565 А61Р 39/00. Противолучевое средство / А.Г. Кудяшева, В.В. Володин, О.Г. Шевченко, Н.Г. Загорская, С.О. Володина, Л.А. Башлыкова, О.В. Ермакова; Институт биологии Коми НЦ УрО РАН; № 2006108965; заявл. 21.03.2006; опубл. 20.06.2008. Бюл. № 2.