

ИССЛЕДОВАНИЕ СУКЦИНАТ-СОДЕРЖАЩЕГО ПРЕПАРАТА КАК СРЕДСТВА ОБЛЕГЧЕНИЯ СИМПТОМОВ МЕНОПАУЗЫ

Васильева А.А.¹, Учитель М.Л.¹, Болотанова М.К.¹, Мурашев А.Н.², Маевский Е.И.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), Российская федерация, 142290, Пущино, Институтская, 3. +7(495)6327869. emaevsky@iteb.ru

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Филиал института биоорганической химии Российской академии наук (ФИБХ РАН), Российская федерация, 142290, Пущино, Проспект науки, 6.

Резюме

Ранее было показано, что курсовой прием субстратной смеси, содержащей до 50% сукцината аммония и малые количества дисукцината кальция, дисукцината магния, дифумарата цинка, L-глутамата натрия, глицина, токоферол ацетата, облегчает или ликвидирует патологические симптомы климактерического синдрома у женщин в ранней менопаузе – в течение 3-5 лет после начала менопаузы. Установлено, что этот эффект обусловлен повышением чувствительности к регуляторным сигналам прямой и обратной связи в оси гипоталамус-гипофиз-яичники.

В работе представлена попытка экспериментально определить влияние сукцинат-содержащего препарата на энергетический обмен *in vivo* путем анализа активности митохондрий иммобилизованных лимфоцитов периферической крови и на интегральные показатели гормонального статуса самок крыс во время репродуктивного и позднего пост-репродуктивного периода. Восстановление нитросинего тетразолия до формазана (цитобиохимическое исследование митохондрий лимфоцитов) свидетельствует о том, что двухнедельный курс подобранной субстратной композиции в дозе 5,7 мг/кг в день способствовал активации сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и ингибированию α -кетоглутаратдегидрогеназы (КДГ). При этом сглаживались возрастные различия в соотношении активностей СДГ и КДГ: у старых животных отношение СДГ/КДГ увеличилось с 1,5 до 7 – величины, характерной для репродуктивных самок крыс. В присутствии малоната (ингибитора СДГ) наблюдался высокий уровень свободно-радикального восстановления нитросинего тетразолия в митохондриях старых самок.

Уровень формазана падал после курса сукцинат-содержащего препарата до нуля. Вопреки ожиданиям, сукцинат в составе использованной композиции не повышал артериального давления у животных, но оказывал выраженное влияние на гормональный статус: увеличивал продолжительность фаз проэструса и эструса в эстрального цикла наряду с резким укорочением фазы первоначально удлиненного диэструса у старых крыс. Наблюдаемые эффекты можно оценить как «омолаживающие» с симпатотонической активацией нейроэндокринной системы.

Ключевые слова: активность митохондрий лимфоцитов, эстрального цикл, гипертензия.

STUDY SUCCINATE-CONTAINING DRUG AS A MEANS TO ALLEVIATE THE MENOPAUSE SYMPTOMS

Vasilieva A.A.¹, Uchitel M.L.¹, Bolotanova M.C.¹, Murashev A.N.², Maevsky E.I.¹

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of Russian Academy of Sciences (ITEB RAS), Russian Federation, 142290, Pushchino, Moscow Region, Institutskaya, 3.*

+74956327869. emaevsky@iteb.ru

²*Institute of Bioorganic chemistry of the Russian Academy of Sciences (BIBC RAS), Russian Federation, 142290, Pushchino, Moscow Region, Prospect Nauki, 6.*

Abstract

Previously it was shown that the course of the succinate-containing mixture which consists of 50% ammonium succinate disuccinate and small amounts of calcium, magnesium disuccinate, difumarate zinc, L-sodium glutamate, glycine, tocopheryl acetate, facilitates or eliminates pathological symptoms of menopausal syndrome in women in early menopause - within 3-5 years after the onset of menopause. This effect was due to the increased sensitivity to the direct and feedback regulatory signals in hypothalamus-pituitary-ovarian axis.

In this paper we attempt to experimentally determine the effect of succinate -containing drug on energy metabolism in vivo by analyzing mitochondrial activity in immobilized peripheral blood lymphocytes and on integral indicators of the hormonal status of female rats during reproductive and late post- reproductive periods. Reduction of nitroblue tetrazolium to formazan (cytobiochemicall study of lymphocyte mitochondria) indicates that the two-week course the chosen substrate composition at a dose of 5.7 mg/kg per day induced activation of

succinate dehydrogenase (SDH) and inhibition of α -ketoglutarate dehydrogenase (KDH). Simultaneously it smoothed age differences in the ratio of SDH and KDH activities: in old animals the ratio of SDH/KDH increased from 1.5 to 7 - the value which is inherent to the reproductive female rats. In the presence of malonate (SDH inhibitor) had a high level of free-radical reduction of nitroblue tetrazolium in old rat mitochondria, but formazan level fell to zero after a course of succinate -containing drug. Contrary to expectations, succinate in used composition did not raise blood pressure in animals, but had a pronounced effect on the hormonal status: increased duration of the phases of proestrus and estrus in estrous cycle, along with a sharp shortening of diestrus phase initially elongated in old rats. The observed effects might be assessed as "anti-aging" with simpathtonic activation of the neuroendocrine system.

Keywords: lymphocyte mitochondria activiry, estrous cycle, hypertension

Введение

На протяжении жизни репродуктивная функция животных и человека находится под контролем гипоталамуса в системе так называемой "оси" гипоталамус-гипофиз-яичники. При старении организма понижается чувствительность всех звеньев оси, особенно гипоталамуса, к сигналам прямой и отрицательной обратной связи от уровня управляющих структур мозга и до органов-мишеней [1]. Нереализованность регуляторных сигналов приводит к гиперфункции и истощению гипоталамуса, гипофиза и яичников. Разобщение регуляторных взаимоотношений в оси гипоталамус-гипофиз-яичники нарушает ритм эстрального цикла и, наконец, овуляторный цикл прерывается и репродуктивная функция утрачивается.

У женщин наступление менопаузы происходит, как правило, после 45-50 лет. Нередко при этом проявляются патологические симптомы климактерического синдрома различной интенсивности, которые могут продолжаться до 60 лет и далее, вплоть до весьма преклонного возраста [2]. Климактерический синдром – «комплекс вегетативно-сосудистых, психических и обменно-эндокринных нарушений, возникающих у женщин на фоне угасания гормональной функции яичников и общей возрастной инволюции организма. Наиболее ранние и специфические проявления климактерического синдрома - так называемые приливы, отражающие нарушение в центральных механизмах, контролирующих синтез и пульсирующий выброс нейропептидов гипоталамуса (люлиберина, тиреолиберина, кортиколиберина и др.), которые участвуют в регуляции

секреции тропных гормонов гипофиза, деятельности сердечно-сосудистой и дыхательной систем, а также в регуляции и формировании эмоционально-поведенческих реакций» [3]. Как правило, при развитии климактерического синдрома повышается утомляемость, снижается работоспособность, появляются немотивированные приступы депрессии и состояний тревоги, раздражительность, сонливость днем и бессонница в ночное время, ослабление памяти и т.п. [2, 3].

И 1976 году Дильман В.М., Анисимов В.Н. и Кондрашова М.Н. [4] обнаружили, что сукцинат и глутамат - субстраты энергетического обмена могут восстанавливать пониженную чувствительность гипоталамуса к регуляторным сигналам у старых самок крыс. В настоящее время прямыми исследованиями установлено, что сукцинат и α -кетоглутарат обладают не только сугубо энергетической функцией, но участвуют в процессах регуляторной сигнализации как лиганды специфических рецепторов [5-7]. Показано, что метаболическая терапия с использованием митохондриальных субстратов способна существенно повышать фертильность [8]. Перечисленные факты легли в основу разработки негормональной субстратной композиции для облегчения и устранения симптомов климактерического синдрома [9]. Состав включает до 50% сукцината аммония от общей массы, остальные компоненты представлены смесью дисукцинатных солей кальция и гидрата магния, дифумарата цинка, L-глутамата натрия, глицина и микродозами α -токоферол ацетата. Показано, что прием такой сукцинат-содержащей композиции (ССК) в первые годы после развития менопаузы в большинстве случаев обеспечивает купирование климактерического синдрома: уменьшаются частота и выраженность приливов жара, скачков артериального давления, утомляемость, снижается ощущение тревожности, нормализуется сон и повышаются настроение работоспособность [10]. Одновременно отмечается 3-4-кратный подъем уровня эстрадиола в крови. Проведенные нами исследования дали основания предположить, что ССК влияет на нейро-эндокринную деятельность организма, в частности, обладает симпатотоническими свойствами. Для проверки предположения о возможном влиянии ССК в малых, явно не субстратных дозах, на энергетический обмен на уровне целостного организма был использован оригинальный цитобиохимический метод [11] анализа активности ферментов митохондрий лимфоцитов периферической крови, в первую очередь сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и α -кетоглутаратдегидрогеназы (КДГ) до и после курса ее приема. Согласно представлениям, развиваемым Кондрашовой [5,11], изменения

активности именно этих дегидрогеназ могут наиболее ярко отражать в условиях целостного организма сдвиги в энергетического статуса и в состоянии вегетативной регуляции. В какой мере редокс активность митохондрий иммобилизованных лимфоцитов периферической крови ответит на прием ССК было не ясно.

Цель работы

Исследование возможности влияния с помощью малых количеств субстратов, входящих в состав разработанной ССК, на энергетический обмен целостного организма в такой мере, чтобы это можно было отследить по изменению редокс активности митохондрий лимфоцитов периферической крови, на гормональный статус в позднем пострепродуктивном периоде и выяснение, не будет ли прием ССК вызывать подъем артериального давления, как это следует ожидать из анализа лиганд-рецепторного взаимодействия сукцината с рецептором GRP91 [6,12].

Для ответа на эти вопросы изучали воздействие ССК на активность СДГ и КГД митохондрий лимфоцитов периферической крови с помощью цитобиохимического метода [11] и на эстральный цикл у самок репродуктивного возраста, а также в поздний пост-репродуктивный период (через 1,5 года по окончании репродуктивного периода при среднем жизненном цикле крыс до 3 лет). Одновременно регистрировали влияния ССК на величину артериального давления и частоту сердечных сокращений у животных.

Материалы и методы

ССК расфасовывалась в две капсулы по 200 мг, В одной из них был сукцинат аммония, а в другой - смесь дисукцината кальция и магния, L-глутамината натрия, глицина, дифумарата цинка, токоферол ацетата. Данная ССК была зарегистрирована и разрешена для применения Роспотребсоюзом. Редокс активность митохондрий лимфоцитов, иммобилизованных на мазке периферической крови, взятой у самок крыс линии WKY (Wistar Kyoto) и SHR (генетический гомолог WKY) анализировали цитобиохимическим методом. В эксперимент были взяты самки в репродуктивном 9-месячном возрасте (n=8; по 4 животных WKY и SHR) и в позднем пост-репродуктивном возрасте >2 лет (n=8, по 4 животных WKY и SHR). Редокс активность митохондрий регистрировали по образованию формазана при восстановлении нитросинего тетразолия (НСТ) в клетках мазка крови. Образование формазана обусловлено парным и

одноэлектронным переносом восстановительных эквивалентов на НСТ. ССК вводили животным вместе с пищей один раз в сутки в течение двух- или трехнедельного курса ежедневно по 5,7 мг/кг. Кровь у крыс брали натошак в 10 часов утра из хвостовой вены в объеме ~30 мкл при спонтанном истечении на охлажденное часовое стекло. Мазок крови кратковременно фиксировали (30 сек) при комнатной температуре в 60% ацетоне (Химмед, Россия), приготовленном в 10 мМ HEPES (Sigma) при pH 5.2. Затем мазок ополаскивали и высушивали. Фиксированный мазок инкубировали в течение 1 часа при 37°C в среде, содержащей 125 мМ KCl (Sigma), 10 мМ HEPES (pH 7.2) и 1,22 мМ НСТ (Dudley Chemical Corporation). Все растворы готовили на бидистиллированной воде. Редокс активность митохондрий оценивали при окислении эндогенных субстратов, при окислении 5 мМ сукцината калия, добавленного в среду или 5 мМ α -кетоглутарата калия в присутствии малоната - ингибитора СДГ (сукцинат, α -кетоглутарат и малонат компании Sigma, США). Кроме того, мазок инкубировали в среде без субстратов окисления только в присутствии 5 мМ малоната калия, чтобы оценить возможную активность одноэлектронного переноса в дыхательной цепи митохондрий [13]. После инкубации с НСТ мазки отмывали и докрашивали 0,5% раствором нейтрального красного в течение 8 мин, для облегчения идентификацию лимфоцитов по окраске ядер клеток и для повышения контрастности формазана. Интенсивность окраски формазана регистрировали с помощью светового микроскопа Mikmed-2 и видеокамеры MINTRON CCDMTV-1 802 СВ. Полученные данные обрабатывали с помощью компьютерной программы. В каждом мазке выделяли по 30 клеток, в которых идентифицировали по 300-700 окрашенных объектов (программа Image Tool), и подсчитывали общую площадь (S , $\mu\text{м}^2$) окрашенных формазаном объектов в 30 клетках.

Артериальное давление и частоту сокращений сердца регистрировали у самок крыс возраста 17-22 месяцев нормотезивной линии крыс WKY ($n=19$) и спонтанно гипертензивной линии SHR ($n=11$) с помощью телеметрических датчиков TA11PA-C40, имплантированных в брюшную аорту. Сигналы с датчиков и подвижность животных регистрировали телеметрической системой Dataquest A.R.T. Silver 3.0 (Data Sciences International, USA).

Гормональный статус животных в возрасте 22-25 месяцев определяли по интегральным показателям на основании идентификации фаз эстрального цикла путем микроскопии влагалищных мазков [14] у самок WKY ($n=9$) и у самок SHR ($n=8$). С

помощью пластиковой пипетки вводили во влагалище 10 мкл 0,9% NaCl, затем брали одну каплю полученной суспензии, из которой получали мазок. Неокрашенный мазок анализировали при увеличении 10 и 40. Для идентификации фазы эстрального цикла подсчитывали число и долю эпителиальных клеток, имеющих ядро и округлую форму, безъядерных ороговевших клеток, имеющих неправильную форму, и лейкоцитов. В результате определяли длительность и вариабельность фаз эстрального цикла.

Полученные данные обрабатывали параметрическими и непараметрическими критериями статистики с помощью программы "OriginPro" версии 8.1.15.

Результаты и обсуждение

По цитобioхимическим показателям самки крыс WKY и SHR одного возраста не отличались друг от друга, но наблюдалась выраженная зависимость редокс активности митохондрий от возраста животных. Для каждого животного были характерны сугубо индивидуальные сочетания активностей восстановления НСТ. Благодаря значительному количеству обрабатываемых объектов (в каждом мазке подсчитывалось, как указано в предыдущем разделе, от 300 до 700 окрашенных объектов) с помощью программы ANOVA рассчитывали и строили по полученным выборкам ящичковые диаграммы по Тьюки: "ящик с усами" (box-and-whiskers plot), изображающие одномерное распределение вероятностей (рис.1 и 2).

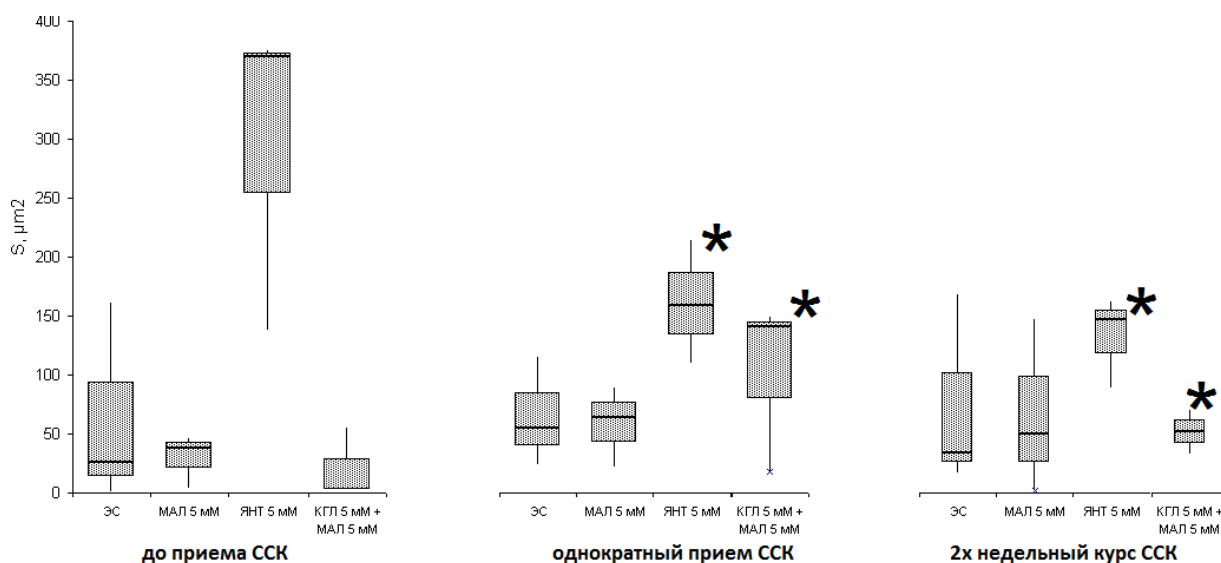


Рис.1 Суммарные площади окраски формазана в митохондриях лимфоцитов в мазках периферической крови самок крыс репродуктивного возраста до и после однократного

введения или после 2-недельного курса ССК. ЭС - окисление эндогенных субстратов, МАЛ – наличие в среде малоната, ЯНТ и КГЛ окисление соответственно сукцината или α -кетоглутарата; *различия по сравнению с исходным уровнем «До» значимы при $p < 0.05$.

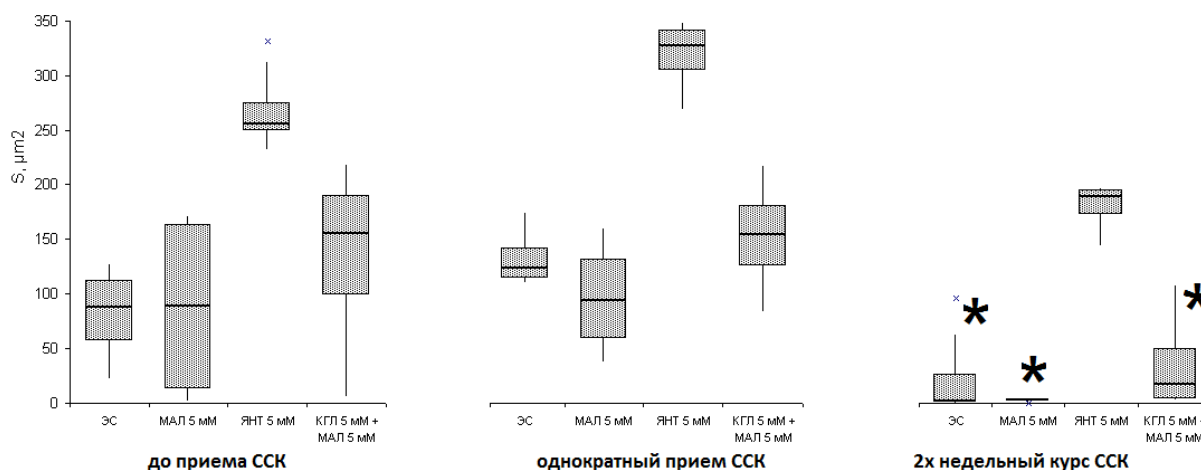


Рис. 2 Приведенные площади окраски формазана в митохондриях лимфоцитов из расчета на одну клетку в мазках периферической крови самок крыс позднего пост-репродуктивного возраста до и после однократного введения или после 2-недельного курса ССК. Остальные обозначения, как на рис. 1.

Как видно из сопоставления данных на рис.1 и рис. 2, в позднем пострепродуктивном возрасте активность КДГ была существенно повышена и наблюдался более выраженный прирост восстановления НСТ в присутствии малоната без других субстратов окисления, что может свидетельствовать о повышении вклада свободно-радикальных реакций, обусловленных возрастной интенсификацией прооксидантных процессов при одновременном ослаблении активности антиоксидантных систем [13].

У более молодых крыс (рис.1) повышенная активность СДГ обычно сочеталась с низкой активностью КДГ и высоким соотношением активностей СДГ/КГД до величины, равной 7. Если принимать соотношение активностей СДГ и КГД в качестве своеобразного критерия состояния вегетативной нервной системы [5,11], то из представленных данных следует, что у самок репродуктивного возраста преобладает симпатический тонус, а в пост-репродуктивный период преобладает тонус парасимпатической нервной системы, поскольку отношение СДГ/КГД снижалось до 1,7 (различия по сравнению с отношением, рассчитанным для животных репродуктивного возраста значимы при $p < 0.02$).

Соответственно начальное состояние более молодых самок можно оценить как более возбужденное (симпатотоническое или даже стрессовое) в связи со столь высокой активностью СДГ [15]. Однократное введение и последующий двухнедельный курс ССК понижали показатель активности СДГ (возможно, это антистрессовый эффект), одновременно повышая показатель активности КДГ. Заметим, что после однократного введения ССК индивидуальная ответная реакция животных по цитобиохимическим данным варьировала и существенным образом определялась состоянием исходного фона: чем выше был начальный уровень СДГ, тем более выражено снижалась активность СДГ и, напротив, исходно пониженная СДГ возрастала. Интересно, что 2-недельное введение ССК способствовало снижению отношения СДГ/КДГ до величины, равной 3 (различия с состоянием «До приема ССК» были значимы при $p < 0.05$).

В пост-репродуктивном периоде (рис.2) однократное введение ССК вызывало прирост активности СДГ без статистически значимого увеличения отношения СДГ/КДГ, тогда как эффект 2-недельного введения можно определить как нормализующий, прежде всего, вследствие резкого снижения восстановления НСТ в присутствии малоната. Во всех случаях после длительного приема ССК в пост-репродуктивном возрасте показатели пробы с малонатом снижались до нуля. Одновременно отношение активностей СДГ/КДГ возрастало после курсового использования ССК до 6-7 (прирост значим, $p < 0.05$), что мы оценили как «омолаживающий» эффект. В большинстве случаев введения субстратной композиции в составе пищи наблюдалась выраженная тенденция к снижению образования формазана при окислении эндогенных субстратов.

Таким образом, по цитобиохимическим данным редокс активность митохондрий лимфоцитов самок крыс позднего пост-репродуктивного возраста после приема ССК приближался к таковой у более молодых животных, на которых разработанная ССК не оказывала столь выраженного действия. Отсюда можно заключить, что курс ССК оказывал регуляторно-нормализующее действие на старых самок крыс.

Зафиксировано существенные изменения структуры эстрального цикла (рис.3) у самок позднего пост-репродуктивного периода, независимо от принадлежности к линии WKY или SHR. Исходно старые самки находились в фазе диэструса. После 3-х недельного введения ССК наблюдалось "омоложение" структуры эстрального цикла: значительно сокращалась длительность фазы диэструса и, напротив, фаза проэструса увеличивалась вдвое, а фаза эструса - в 8 раз.

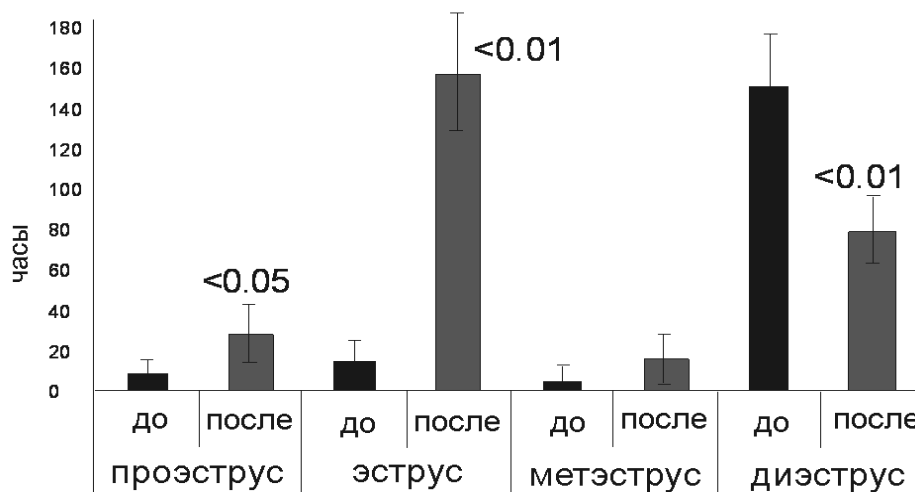


Рис. 3. Сравнение длительности различных фаз эстрального цикла у старых самок крыс до и после трехнедельного курса ССК.

Эти данные хорошо согласуются с результатами анализов содержания эстрадиола в крови у женщин, принимавших ССК с целью ослабления явлений климактерического синдрома [14,15].

Вопреки предсказываемым ожиданиям средние значения величин артериального давления и частоты сокращений сердца у старых животных после трехнедельного курса ССК оставались неизменными (рис.4).

Поскольку ни у одной самки нормотензивной самки линии WKY и даже среди спонтанно гипертензивных самок линии SHR трехнедельный курс ССК не вызывал подъемом артериального давления, очевидно, что введенный в составе ССК сукцинат быстро распределялся между кровью, интерстициальной жидкостью и тканями, где с высокой скоростью подвергался метаболическим превращениям, как это неоднократно отмечалось ранее нами и во многих других независимых исследованиях.

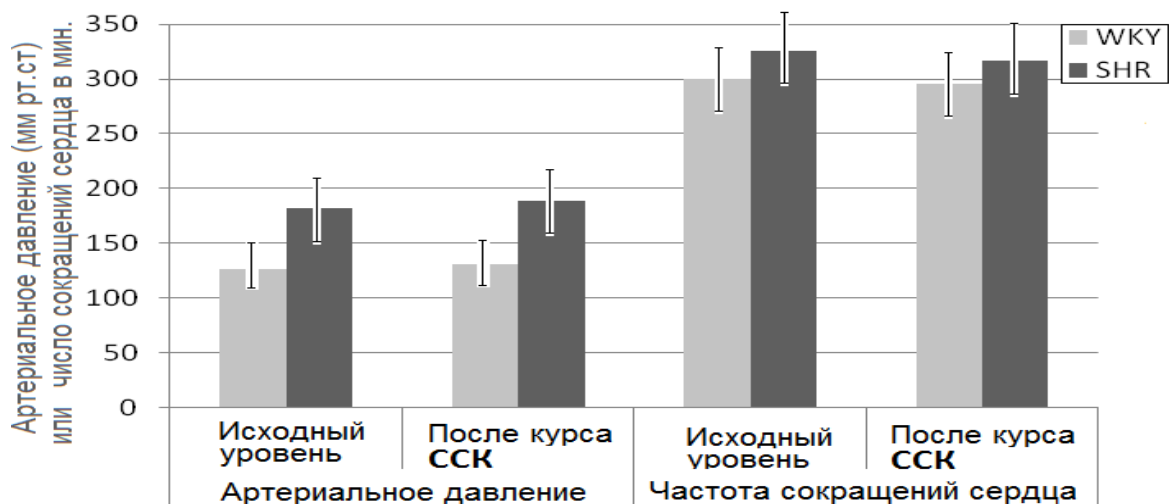


Рис. 4. Величины артериального давления и частоты сокращений сердца у самок крыс линий WKY и SHR пост-репродуктивного возраста до и после 3-недельного курса введения ССК. Приведены средние значения и величины стандартного отклонения.

В результате в крови и межклеточном пространстве не достигалась такая концентрация аниона сукцината при использованных дозах ССК, которая необходима (на уровне 10^{-4}M) [12] для проявления гипертензивного эффекта за счет лиганд-рецепторного взаимодействия между введенным сукцинатом и рецептором GRP91 с последующей активацией ренин-ангиотензиновой системы.

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о выраженном способности метаболической негормональной ССК сдвигать гормональный статус у старых самок крыс, находящихся в позднем пост-репродуктивном периоде, до уровня, приближающегося к таковому у более молодых животных репродуктивного периода. Несмотря на то, что основу препарата составляют соли сукцината, ни у одного животного не наблюдался подъем артериального давления и изменение частоты сокращений сердца, что можно было ожидать, исходя из опубликованных данных о возможности лиганд-рецепторного взаимодействия сукцината и рецептора GRP91 [6,12].

Согласно полученным цитобиохимическим данным введение ССК сопровождалось уменьшением выраженности возрастных изменений в активности СДГ и КДГ и особенно в величине отношения СДГ/КДГ у самок позднего пост-репродуктивного возраста до уровня, зафиксированного у более молодых самок репродуктивного возраста. ССК

способствовала снижению активности прооксидантных процессов, повышенных у старых животных, что проявилось в подавлении одноэлектронное восстановлении НСТ при инкубации иммобилизованных лимфоцитов в присутствии малоната.

Итак, зафиксировано сочетание омолаживающего сдвига в активности редокс реакций митохондрий лимфоцитов периферической крови и изменении соотношения фаз эстрального цикла в сторону преобладания фаз, свидетельствующих обычно о наличии течки у животных. В целом влияние разработанной ССК на самок старых крыс можно оценить как «омолаживающее», регуляторное, с преобладанием симпатикотонического действия.

Литература

1. Дильман В.М. Большие биологические часы. Л. Медицина. 1982.
2. Физиология эндокринной системы (под ред. Дж. Гриффина и С. Охеды; пер. с англ.). М. Бином. Лаборатория знаний. 2008. 496 с.
3. Рафикова Г.Н. Климактерический синдром. http://www.rusmed.ru/annonce/show/178/Klimaktericheskiy_sindrom/18.12.2009.
4. Дильман В.М., Анисимов В.Н., Кондрашова М.Н. Влияние янтарной и глутаминовой кислот на чувствительность гипоталамо-гонадотропной системы к ингибирующему действию эстрогенов у старых крыс. // Фармакология токсикология. 1976. 3, 540-549.
5. Кондрашова М.Н. Гормоноподобное действие янтарной кислоты // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2002, 1. с. 7-12.
6. He W., Miao F., Lin D., Schwandner R.T., Wang Z., Gao J., Chen J.-L., Tlan H., Ling L. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. // Nature. 2004. 429, 188–193.
7. Maevsky E.I., Rosenfeld A.S., Grishina E.V., Peskov A.B., Kondrashova M.N. Signal , Sympathetic action of succinate in experimental and clinical studies. // BBA. Bioenergetics. 14th EBEC Short Reports. ed. V. Borisov. 2006. Supplement v. 14 (2): 536-537.
8. Bentov Y, Esfandiari N, Burstein E, et al. The use of mitochondrial nutrients to improve the outcome of infertility treatment in older patients. // Fertility and Sterility. 2010. 93 (1): 272–275.

9. Маевский Е.И., Учитель М.Л. Средство и набор для нормализации функциональных нарушений, возникающих в предклимактерический и климактерический период. / Патент РФ № 2220712..10.01.2004.

10. Maevsky E.I., Peskov A.B., Uchitel M.L., Pogorelov A.G., Saharova N.Y., Vihlyantseva E.F., Bogdanova L.A., Kondrashova M.N. A succinate-based composition reverses menopausal symptoms without sex hormone replacement therapy (русск. и англ. версии) //Успехи геронтологии.-Adv. gerontol. 2008. 21(2): 298-305.

11. Кондрашова М.Н., Захарченко М.В., Хундерякова Н.В., Маевский Е.И. Цитобиохимический способ определения активности сукцинатдегидрогеназы, окисления эндогенной янтарной кислоты, сигнального действия микромолярных концентраций янтарной кислоты, его применение для количественной оценки уровня адренергической регуляции в организме, среда и набор для осуществления способа Патент РФ № 2364868. 2009.08.20.

12. Vargas S.L., Toma I., King J.J., Meer E.J., Peti-Peterdi J. Activation of the Succinate Receptor GPR₉₁ in Macula Densa Cells Causes Renin Release //J. Am. Soc. Nephrol. 2009: 20(5). p.1002-1011.

13. [Dröse S.](#), [Bleier L.](#), [Brandt U.](#) A Common Mechanism Links Differently Acting Complex II Inhibitors to Cardioprotection: Modulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production // Molecular Pharmacology May. 2011 v. 79.(5) 814-822.

14. Marcondes, F. K.; Bianchi, F. J. and Tanno, A. P.. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. //Braz. J. Biol. 2002. 62(4A): 609-614.

15. Zakharchenko M.V., Zakharchenko A.V., Khunderyakova N.V., Tutukina M.N., Simonova M.A., Vasilieva A.A., Romanova O.I., Fedotcheva N.I., Litvinova E.G., Maevsky E.I., Zinchenko V.P., Berezhnov A.V., Morgunov I.G., Gulayev A.A., Kondrashova M.N. // Burst of succinate dehydrogenase and α -ketoglutarate dehydrogenase activity in concert with the expression of genes coding for respiratory chain proteins underlies short-term beneficial physiological stress in mitochondria.// Int J Biochem Cell Biol. 2013;45(1):190-200.