

УДК 612.017+615.399

**АНТИОКСИДАТНОЕ И ИММУНОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЭКСТРАКТА ЛИЧИНОК
ВОСКОВОЙ МОЛИ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ У КРЫС, ВЫЗВАННОМ
ПОТРЕБЛЕНИЕМ КОРМА, ОБОГАЩЕННОГО ЖЕЛЕЗОМ**

А.А. ОВСЕПЯН, Н.И. ВЕНЕДИКТОВА, М. В. ЗАХАРЧЕНКО, Р.Е. КАЗАКОВ,
М.Н. КОНДРАШОВА, Е.Г. ЛИТВИНОВА, И.Р. СААКЯН, Т.В. СИРОТА, И.Г. СТАВРОВСКАЯ,
П.М. ШВАРЦБУРД

Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН
E-mail: litvinova@rambler.ru, mkondrashova23@inbox.ru, тел.: 7(4967)33-05-53

Резюме: Антиоксидантное и иммунопротекторное действие экстракта личинок восковой моли *Galleria mellonella* - биологически активной добавки, разработанной нами на основе старинного противотуберкулезного средства народной медицины, исследовалось на модели окислительного стресса, вызванного пищевой перегрузкой железом. Длительное потребление крысами корма, обогащенного железом в дозах, близких к принятым в ветеринарии, приводило к развитию окислительного стресса и нарушениям иммунных и митохондриальных функций. Одновременное с железом добавление экстракта устраняло или существенно снижало окислительный стресс и патологические изменения, вызванные длительным потреблением железа.

Ключевые слова: личинки *Galleria mellonella*, окислительный стресс, пищевая перегрузка железом, антиоксидант, тимус, нейтрофилы, митохондрии.

**THE ANTIOXIDATIVE AND IMMUNOPROTECTIVE EFFECTS OF THE BEE MOTH
LARVAE EXTRACT DURING OXIDATIVE STRESS IN RATS INDUCED BY INTAKE OF
IRON-ENRICHED FEED**

A.A. OVSEPYAN, N.I. VENEDIKTOVA, M.V. ZAKHARCHENKO., R.E. KAZAKOV, E.G. LITVINOVA, M.N. KONDRASHOVA, I.R. SAAKYAN, T.V. SIROTA, I.G. STAVROVSKAYA,
P.M.SHVARZBURD

The Institute of theoretical and experimental biophysics from Russian academy of the sciences
E-mail: litvinova@rambler.ru, mkondrashova23@inbox.ru, tel.: 7(4967)33-05-53

Summary: The mechanism of biological activity of a new food additive that the authors have developed on the basis of the ancient folk ant tuberculosis remedy, the bee moth (*Galleria mellonella*) larvae extract, is presented. The ant oxidative and immunoprotective effects were studied in a model of oxidative stress induced in rats by high-iron diet. A long-term consumption of feed supplemented by iron at doses close to those used in veterinary practice led to the development of oxidative stress in rats, and to disturbance of immune and mitochondrial functions. The administration of the extract to iron-fed rats eliminated or substantially reduced the oxidative stress and related pathological changes caused by long-term high-iron intake.

Key words: bee moth, *Galleria mellonella* larvae; oxidative stress, high-iron diet, antioxidant, thymus, neutrophils, mitochondria.

Наряду с созданием новых высокоэффективных синтетических лекарств накапливаются данные о неблагоприятных побочных действиях при их применении, что заставляет обратиться к немедикаментозным природным лечебным средствам, которые, к сожалению, становятся уже мало известными. Одним из таких очень важных для медицины средств является экстракт личинок большой восковой моли, использовавшейся в народной медицине при лечении туберкулеза. Биологические исследования препарата проводили Мечников, его ученики и некоторые другие. Особенно большой вклад в клиническое изучение препарата внес крупный московский кардиолог и врач широкого профиля С.А. Мухин. Помимо успешного применения препарата для лечения туберкулеза он открыл его лечебное действие при сердечных заболеваниях и общеукрепляющее действие на лиц пожилого возраста. В личном контакте С.А.Мухина и М.Н. Кондрашовой начались исследования в нашей лаборатории механизмов биологического действия препарата, который при поддержке ОАО ДИОД мы разрабатываем в качестве БАД, названной в знак уважения к С.А. Мухину – Натуральный экстракт доктора Мухина. Разработанный препарат защищен патентом и имеет разрешение на применение.

Это остро востребованное средство не находит до сих пор широкого применения из-за недостаточных знаний механизмов его действия. Ранее мы показали, что спиртовой экстракт личинок восковой моли (ЭВМ) улучшает состояние туберкулезных больных и людей с ослабленным иммунитетом [1–4].

В экспериментах на животных было показано, что ЭВМ повышает физическую активность, силу сердечных сокращений и устойчивость изолированного сердца крыс к высоким дозам строфангина. Прием ЭВМ также приводил к повышению уровня гликогена в сердце и к аэробному сдвигу окислительного метаболизма в ткани сердца и аорты, что проявлялось в увеличении количества пирувата [5]. Было показано, что ЭВМ повышает эффективность энергетических процессов в митохондриях, особенно в сердце. Было обнаружено в экспериментах на стареющих крысах, что курсовый прием ЭВМ повышает устойчивость сердечной мышцы к искусственной ишемии [6]. Кроме того, показано, что ЭВМ стимулирует рост и дифференцировку культивируемых клеток [7].

Известно, что многие заболевания, включая кардиологические, воспалительные и инфекционные, как острые, так и хронические сопровождаются развитием окислительного стресса. Умеренная перегрузка пищевым железом может служить моделью таких патологических состояний. При этом такая модель имитирует реальные состояния, сопровождающиеся избытком железа в организме. Широкая практика обогащения многих пищевых продуктов, напитков и лекарств железом с целью оздоровления может приводить к перегрузке железом у людей, потребляющих такие продукты длительное время.

Мы предположили, что ЭВМ содержит антиоксиданты и что антиоксидантная активность (АОА) препарата в значительной мере определяет широкий спектр его биологического действия. Ранее мы обнаружили АОА в ЭВМ *in vivo* с использованием нескольких модельных систем [8]. В данном исследовании мы использовали модель окислительного стресса и иммуносупрессии у крыс, вызванных длительным приемом пищи, обогащенной ветеринарным препаратом железа, чтобы определить, проявляет ли ЭВМ АОА *in vivo* и чтобы выявить связь между АОА и иммунопротекторными свойствами ЭВМ. Препараты железа обычно используют для предотвращения анемии у растущих животных. Мы предположили, что окислительный стресс будет более резко выраженным у взрослых животных, так как они менее нуждаются в железе, чем растущие. Поэтому мы провели сравнительные исследования на молодых и взрослых животных.

Материалы и методы. В работе использовали ветеринарный препарат железа «Ферроглокин-75», содержащий 75 мг/мл железо-декстрана производства «Белмедпрепарат» (НПК Биогель, Беларусь). Компоненты буферных растворов, субстраты и ингибиторы дыхания – Sigma.

ЭВМ готовили из личинок Большой восковой моли путем экстракции 40% этанолом. Личинки выращивали в стандартных условиях как описано в литературе [9].

В работе использовались крысы Wistar, содержащиеся в виварии ИТЭБ РАН. Было проведено две серии экспериментов: на растущих и взрослых животных. В первой серии использовали 1,5 месячных самцов (начальный вес 100 - 130 г.). Животные были разделены на три группы: I - контрольная группа – получала стандартный рацион; II группа вместе с основным рационом ежедневно в течение 10 недель получала препарат железа (1 мл/жив/сут); III группа получала препарат железа (1мл/жив/сут) а также ЭВМ (100 мкл/жив/сут). Добавки давались отдельно с небольшим количеством пищи. Во второй серии экспериментов использовали трехмесячных самок крыс Wistar (начальный вес 180-200 г.). Группы животных были такие же, как в первой серии, добавки давались в течение 12 недель.

В конце эксперимента животных декапитуировали и исследовали состояние внутренних органов, уровень малонового диальдегида (МДА) в тканях, антиоксидантную активность (АОА) в крови, размер ассоциатов и дыхательную функцию митохондрий, иммунную активность нейтрофилов. Митохондрии сердца выделяли по методу Чанса и Хагихары за исключением добавления протеиназ к среде. После декапитации животных сердце быстро извлекали и помещали в охлажденную среду выделения, содержащую 250 мМ сахарозы, 10 мМ HEPES 1 мМ ЭГТА, 0,5% альбумин, pH 7,4. Ткань измельчали, отмывали от крови и гомогенизировали (соотношение ткани и среды 1 : 10). Гомогенат центрифугировали 7 мин при 400 x g. Супернатант центрифугировали в течение 10 мин при 12000 x g. Осадок суспензировали в среде, содержащей 250 мМ сахарозы, 10 мМ HEPES pH 7,4 и центрифугировали 12 минут при 12000 x g. Осадок суспензировали в той же среде в соотношении 1 : 0,1. Митохондрии хранили в ледяной бане. Митохондрии мозга выделяли как описано у Lai & Clark [10] с небольшими изменениями. Размельченную ткань мозга гомогенизировали на льду в 14 мл среды выделения, содержащей 250 мМ сахарозы, 10 мМ HEPES, 0,5 мМ ЭГТА, pH 7,4 и центрифугировали 3 мин при 2000 x g. Супернатант центрифугировали 10 мин при 2000 x g и полученный супернатант центрифугировали при 12500 x g 8 минут. Осадок суспензировали в 0,25 мл среды без ЭГТА.

Эритроциты получали из гепаринизированной крови и разбавляли двумя объемами физраствора. Эритроциты осаждали центрифугированием при 1000 x g 10 мин и дважды отмывали физраствором. 0,05 мл осажденных эритроцитов суспензировали в 0,3 мл воды и встряхивали в течение 15 минут при 4°C. Центрифугировали при 1000 x g 15 мин, осадок удаляли. Гемолизаты цельной крови получали, добавляя 0,1 мл физраствора и 0,35 мл дистиллированной воды к 0,05 мл гепаринизированной крови и оставляя смесь на 15 мин при 4°C.

МДА в гомогенатах печени, эритроцитах, митохондриях мозга и сердца определяли спектрофотометрически по реакции с тиобарбитуровой кислотой [11].

АОА гемолизатов цельной крови и эритроцитов определяли по измерению степени ингибирования аутоокисления адреналина в щелочном (рН 10,6) карбонатном буфере. Образование продукта окисления – адrenoхрома регистрировали на спектрофотометре UVIKON 923 при 347 нм как описано Сирота Т.В. (2000).

Структурное и функциональное состояние митохондрий исследовали разработанным нами методом [12]. Размер ансамблей митохондрий и эндоплазматического ретикулаума в гомогенатах тканей определяли путем компьютерной видеомикроскопии. 30 мкл гомогената добавляли к 970 мкл среды гомогенизации (125 мМ КСl, 10 мМ HEPES), перемешивали в течение 5 минут при разных температурах (18 и 28°C) и помещали в камеру Горяева. Ансамбли исследовали микроскопией в темном поле и изображения фиксировали с помощью видеокамеры. Для каждого препарата проводили морфометрический анализ девяти случайно выбранных полей зрения, содержащих около 2000 объектов.

Дыхание митохондрий исследовали полярографически, используя термостатируемую полярографическую ячейку с компьютерной регистрацией и обработкой полярограмм. Измерения проводили при 26 и 37°C для митохондрий сердца и мозга, соответственно. Скорость дыхания вычисляли по снижению содержания кислорода в ячейке в 1 мин на 1 мг митохондриального белка

Для определения фагоцитарной активности нейтрофилов использовали реакционную смесь следующего состава: гепарин 0,8 мкл; кровь 20 мкл; 0,2% нитросиний тетразолий 20 мкл; Смесь наносили на предметное стекло и добавляли 10 мкл 0,1% липополисахарида из *Salmonella typhimurium*. После перемешивания каплю смеси термостатировали в течение 30 минут при 37°C во влажной камере. Каплю смывали 0,15 М фосфатным буфером (рН 7,2), готовили прижизненный препарат, и число фагоцитирующих нейтрофилов в площади препарата определяли, регистрируя клетки, содержащие гранулы формазана.

Количество генерируемой митохондриями перекиси водорода определяли в присутствии сукцината и антимицина А [13]. Количество перекиси определяли при 25°C по интенсивности хемилюминесценции люминола в присутствии пероксидазы хрена при 425 нм. Митохондрии сердца (0,5 мг белка) добавляли к 1 мил среды, содержащей 120 мМ КСl, 10 мМ HEPES (рН 7.4), 0,5 мМ EDTA, 12,5 мкМ люминола и 1,1 единиц пероксидазы. Концентрацию перекиси выражали в нмоль/мин/мг белка

Белок определяли по Лоури. Статистический анализ результатов проводили с использованием критерия Стьюдента

Результаты.

В табл. 1 представлен вес животных в конце эксперимента и данные исследования органов.

Таблица 1

Масса тела и внутренних органов крыс, получавших корм с добавкой железа или железа и ЭВМ

	Масса тела, г	Печень, г	Почки, г	Жир, г	Тимус, г	Надпочечники, г
Самки крыс в возрасте 3 мес., начальный вес 180—200 г						
Контроль	300±6,8	11±0,6	—	18,8±0,9	—	—
Fe	277±10,3	8,8±1,0*	—	10,5±1,8*	—	—
Fe+ЭВМ	296±8,4	10,6±0,2	—	15±1,9	—	—
Самцы крыс в возрасте 1,5 мес., начальный вес 100-130 г						
Контроль	400±1,8	14±0,35	3,4±0,12	11,3±1,0	0,6±0,07	0,067±0,007
Fe	429±14	14,5±1,2	3,3±0,09	13±1,0	0,6±0,1	0,075±0,006
Fe+ЭВМ	423±26	15,3±1,0	3,4±0,28	15,8±1,7	0,95±0,09	0,064±0,011

* p < 0,05 относительно контроля.

Длительное включение в рацион железа являлось очевидным стрессом для животных, особенно старых. Все животные этой группы имели серую взъерошенную шерсть. Наблюдались задержка роста, снижение накопления внутреннего жира, инволюция тимуса. Средняя масса печени и внутреннего жира была соответственно в 1,2 и 1,6 раз меньше, чем у контрольных животных. Брыжейка выглядела опустошенной. Тимус большинства животных, потреблявших железо, был вялым и имел точечные кровоизлияния и очаги некроза. Другие органы (легкие, почки, сердце и селезенка) не отличались от контроля.

У растущих животных по сравнению с взрослыми изменения были менее выраженными. Потребление железа привело в этой группе животных даже к увеличению веса по сравнению с контролем, что может быть связано с более интенсивной утилизацией железа в растущем организме. Добавление ЭВМ к рациону получающих железо крыс значительно устраняло вызванные железом повреждения у взрослых животных: все физиологические показатели были близки к контролю. У растущих животных ЭВМ усиливал вызванное железом увеличение веса тела, печени, внутреннего жира и, особенно, тимуса.

Потребление с пищей железа увеличивало уровень МДА в митохондриях мозга и сердца, а также в печени растущих и взрослых животных (табл. 2).

Таблица 2

Уровень малонового диальдегида в тканях крыс, получавших с пищей препарат железа или препарат железа в сочетании с ЭВМ

Группы	Растущие животные			Взрослые крысы	
	Митохондрии мозга, нмоль/мг белка	Гомогенат печени, нмоль/мг белка	Эритроциты, мкмоль/л	Митохондрии сердца, нмоль/мг белка	Эритроциты, мкмоль/л
Контроль	8,7±0,14	0,9±0,14	309±19	2,2±0,4	553±8
Fe	13,3±0,45*	1,7±0,09*	250±17	2,6±0,2	588±8
Fe + ЭВМ	9,4±0,85	—	266±26	2,0±0,2	506±14

* P < 0.05 относительно контроля

Увеличение было особенно высоким (в 1,9 раз) в митохондриях мозга. В эритроцитах прием железа по-разному влиял на перекисное окисление липидов у животных разных возрастов: у взрослых животных увеличивал, у растущих – снижал уровень МДА. Это различие свидетельствует, что у растущих животных добавка железа расходуется на поддержание основного пути его утилизации – на формирование эритроцитов, снижая тем самым повреждающее действие железа на клетки и предотвращая окислительное повреждение. У взрослых животных образование эритроцитов не столь интенсивно и перегрузка клеток железом и их окислительное повреждение более выражены, чем у растущих животных. Прием ЭВМ приводил к снижению МДА в обеих группах по сравнению с контролем. Это свидетельствует об антиоксидантном действии препарата. Развитие окислительного стресса, вызванного приемом железа, сопровождалось изменениями со стороны системы антиоксидантной защиты. У растущих животных АОА крови на фоне приема железа повышался, а ЭВМ нормализовал уровень АОА крови (рис. 1). Повышение АОА крови на фоне приема железа, у молодых животных, вероятно, является компенсаторной реакцией в ответ на повышение скорости генерации активных форм кислорода под действием приема железа и свидетельствует о напряжении системы антиоксидантной защиты организма. ЭВМ нормализует уровень АОА крови, что, по-видимому, является следствием ослабления давления окислительного стресса на систему антиоксидантной защиты. У взрослых животных прием железа снижал уровень АОА крови и экстракт восковой моли не предотвращал это снижение (данные не представлены). Это свидетельствует о более выраженном окислительном повреждении у взрослых животных. На фоне приема железа происходила изменение параметров дыхания митохондрий, что проявлялось в гиперактивации дыхания на сукцинате в митохондриях сердца и снижении скорости дыхания в мозге у животных, получавших железо (рис. 2А). Прием ЭВМ предотвращал изменение дыхания в митохондриях.

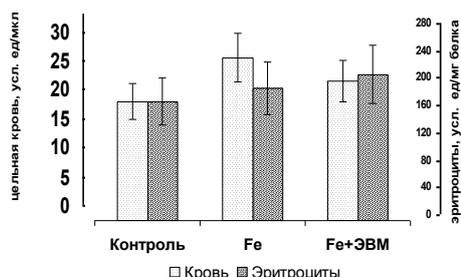


Рис. 1. Антиоксидантная активность гемолизатов цельной крови и эритроцитов крыс, получавших корм, обогащенный железом или железом с добавкой ЭВМ. За условную единицу принимали 50% ингибирование аутоокисления адреналина в стандартных условиях

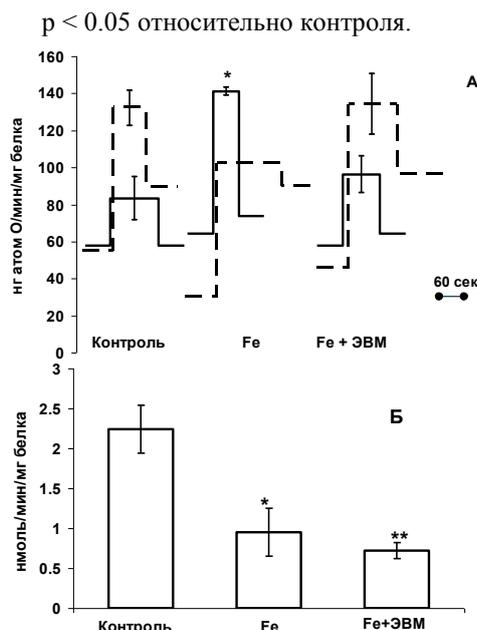


Рис. 2. Скорость дыхания и генерации перекиси водорода в митохондриях крыс, получавших корм, обогащенный железом или железом и ЭВМ. А: скорость дыхания; Б: генерация перекиси водорода. Сплошные линии – митохондрии сердца взрослых крыс, пунктирные линии – митохондрии мозга растущих крыс.

* P < 0.05; ** P < 0.01 compared with control.

Митохондрии являются одними из основных источников супероксида и перекиси водорода в клетке. Генерация этих активных форм кислорода в значительной степени зависит от скорости дыхания: увеличение скорости дыхания приводит к снижению генерации H₂O₂ [13–15]. Образование перекиси мы исследовали на митохондриях сердца, где низкий уровень каталазы.

Как и ожидалось, скорость образования перекиси в митохондриях сердца с гиперактивированным дыханием (в группе, получавшей железо) была ниже, чем в контроле (рис 2Б). Однако, хотя ЭВМ приводил к снижению скорости дыхания митохондрий крыс, получавших железо, это не приводило к увеличению генерации H₂O₂. Это может быть проявлением антиоксидантной активности ЭВМ, которая предотвращает избыточную продукцию перекиси, вызванную снижением скорости дыхания. По-видимому, это связано со способностью ЭВМ уничтожать супероксидный анион-радикал – предшественник перекиси.

Ранее нами был разработан тест, позволяющий оценивать состояние митохондрий, который включает измерение способности митохондрий в гомогенате образовывать комплексы - ансамбли с участием эндоплазматического ретикулула. Этот тест является очень чувствительным к физиологическому состоянию организма [12]. Разрушение ансамблей свидетельствует о повреждении митохондрий. Размер ансамблей митохондрий печени взрослых крыс, получавших железо, снижался на 30%. Одновременный прием ЭВМ предотвращал вызванное железом разрушение ансамблей (табл. 3). У растущих животных прием железа не приводил к изменению размера митохондриальных ансамблей, что свидетельствует об отсутствии нарушений в структурном взаимодействии митохондрий и эндоплазматического ретикулула.

Таблица 3

Средняя площадь митохондриальных ансамблей в гомогенатах печени взрослых крыс, получавших с кормом железо или железо в комбинации с ЭВМ

Группы животных	Площадь митохондриальных ансамблей, μm ²
Контроль	55,7±5,2
Fe	42,6±2,0*
Fe+ЭВМ	56,0±2,8

В процессах фагоцитоза повреждающее действие железа и защитный эффект ЭВМ были особенно ярко выражены. У взрослых животных длительное включение железа в рацион приводило к значительному ингибированию иммунной активности полиморфноядерных лейкоцитов, что проявлялось по снижению способности к адгезии, уменьшению диаметра клеток и фагоцитарной активности после стимуляции липополисахаридом из *Salmonella typhimurium* (рис. 3А). У принимавших железо животных способность нейтрофилов к адгезии снижалась на 75%, диаметр активированных клеток – на 50%, число клеток с включенными гранулами НСТ снижалось на 90%. Включение ЭВМ в рацион животных, получавших железо, в значительной степени предотвращало по всем показателям вызванные железом нарушения. Нарушения со стороны иммунной системы, вызванные железом, проявлялись также морфологическими изменениями другой иммунной ткани – тимуса, где наблюдались дряблость, точечные кровоизлияния, очаги некроза. У взрослых крыс эти изменения были более выраженными и наблюдались практически у всех животных (рис 3Б). Прием ЭВМ примерно втрое сокращал повреждения тимуса, как у взрослых, так и у растущих крыс.

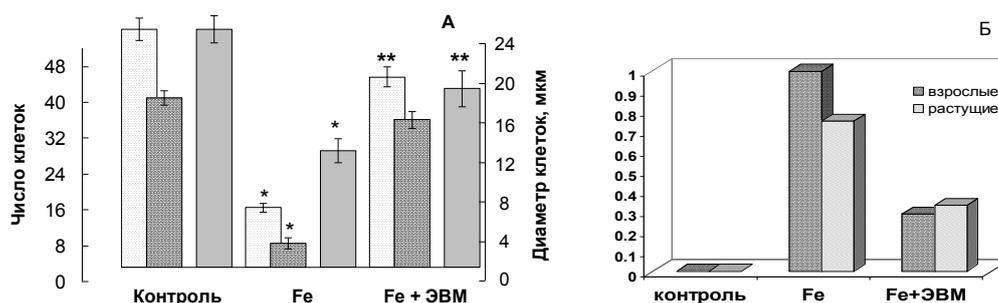


Рис. 3 ЭВМ предотвращает иммунные нарушения у крыс, вызванные Fe-обогащенной диетой
 А: Адгезия, фагоцитоз, и диаметр (слева направо) активированных нейтрофилов у взрослых крыс, получавших обогащенный железом корм без добавки или с добавкой ЭВМ. Б: Процент животных с повреждениями в тимусе (кровоизлияния, очаги некроза, дряблость) при потреблении с кормом железа или железа в комбинации с ЭВМ. *P < 0,001; ** P < 0,05 относительно контроля.

Проведенные исследования показали, что продолжительное включение в пищу добавки железа в низких лечебных дозах может приводить к патологическим нарушениям, степень тяжести которых коррелирует с уровнем индуцированного железом окислительного стресса. У растущих животных повреждения менее выражены, чем у взрослых животных. Окислительный стресс проявлялся увеличением уровня МДА в тканях и приводил к увеличению или снижению антиоксидантной активности крови (в зависимости от тяжести окислительного стресса). На рис. 4 видно, что вес тела и содержание МДА связаны обратной зависимостью в обеих экспериментальных группах. Чем успешнее проходило формирование организма, тем меньшее количество МДА содержалось в эритроцитах.

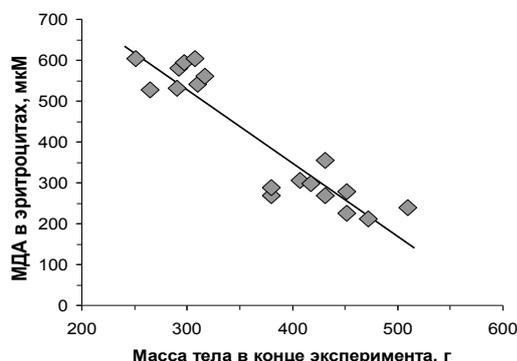


Рис. 4. Соотношение между массой тела животных в конце эксперимента и уровнем малонового диальдегида в эритроцитах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Известно, что многие заболевания сопровождаются развитием окислительного стресса и нарушением обмена железа. Последнее, как правило, приводит к снижению иммунитета. Мы обнаружили, что ЭВМ защищает иммунные клетки (белой крови и тимуса) от повреждения при развитии окислительного стресса *in vivo*, вызванного длительным приемом пищи, обогащенной железом. Кроме того, ЭВМ предотвращает развитие окислительного стресса в тканях и сохраняет структурную и функциональную активность митохондрий, особенно сердца. Согласно современным представлениям антиоксиданты эффективны и при лечении патологий сердца. Выявленная нами способность улучшать функциональное состояние митохондрий сердца, а также продемонстрированная ранее способность увеличивать уровень гликогена и снижать ацидоз в сердечной мышце подтверждает данные С.А.Мухина о лечебном действии препарата при сердечных заболеваниях и показывает механизмы этого действия.

Вероятно, антиоксидантная активность, продемонстрированная нами *in vivo*, а также иммунопротекторные свойства препарата лежат и в основе его противотуберкулезного действия. Проведенные нами исследования позволяют надеяться, что ЭВМ может быть использован в терапии заболеваний, патогенез которых первично обусловлен нарушением реутилизации железа - атаксии Фридриха, β -талассемии, последствия гемодиализа, для снижения побочных эффектов антибиотиков, для профилактики инфекционных и респираторных заболеваний.

Для лечения большинства упомянутых патологий применяют синтетические лекарственные средства с побочным действием. Особенно токсичны противотуберкулезные препараты новых поколений. Использование нетоксичного немедикаментозного природного препарата, поддерживающего иммунную систему человека, является весьма актуальным.

Литература

1. *Litvinova E.G. et al. // Mitochondrion. 2002. Vol.1. P.523*
2. *Ovsepyan A.A. et al. // Young doctors on the threshold of the third millennium, materials of the conference. Yerevan, 2001. P.103*
3. *Дмитриева Н.В. и др. // Апитерапия сегодня. Рыбное, 1993. С.59*
4. *Гусак Ю.К. и др.// Проблемы эндокринологии в акушерстве и гинекологии. Москва, 1997. С.146*
5. *Rachkov A.K. et al. // J. Pharm. Pharmacol. 1994. Vol. 46, №3. P.221-225*
6. *Спиридонов Н.А. и др. // Янтарная кислота в медицине, пищевой промышленности, сельском хозяйстве. Пушино, 1996. С.187-195*
7. *Spiridonov N.A. et al. // Comp. Biochem. Physiol (C). 1992. Vol.102. P.205-208*
8. *Сирота Т.В. и др. // Биоантиоксидант. Тезисы 6-й международной конференции. Москва, 2002. С.528-530*
9. *Пат. 2038086 РФ. Способ получения биологически активного продукта из личинок большой восковой моли/ Спиридонов Н. А., Рачков А.К., Мухин С.А., Кондрашова М.Н.. // Бюл. №18. 27.06.1995*
10. *Lai J. C. K., Clark J. B. // Methods in Enzymology. 1979. Vol. 55. P. 51-59*
11. *Ohkava H. // Analytical Biochemistry. 1979. Vol. 95. P. 351-358*
12. *Kondrashova M. N. et al. // Mitochondrion. 2001. Vol. 1. P. 249-267*
13. *Litvinova, E.G. et al. // Proc. of the XI- th Biennal Meet. of the Society for Free Radical Research International.– Paris, France, 2002. P.93-96*
14. *Barrost M. et al. // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279. P. 49883-49888*
15. *Balaban R. S. et al. // Cell. 2005. Vol.120. P. 483-495*