РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 460 524** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 31/205 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2011114007/15, 12.04.2011**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.04.2011

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **12.04.2011**

(45) Опубликовано: **10.09.2012** Бюл. № **25**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2407525 C1, 27.12.2010. RU 2063749 C1, 20.07.1996. RU 2407526 C1, 27.12.2010.**

Адрес для переписки:
119571, Москва, ул. 26 Бакинских Комиссаров, 3, корп.3, кв.514, М.М. Расулову

(72) Автор(ы):
Расулов Максуд Мухамеджанович (RU),
Нурбеков Малик Кубанычбекович (RU),
Воронков Михаил Григорьевич (RU),
Бобкова София Ниазовна (RU),
Беликова Ольга Анатольевна (RU),
Зверева Марина Валентиновна (RU),
Шимановская Наталия Павловна (RU),
Сперанская Ольга Анатольевна (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Расулов Максуд Мухамеджанович (RU)

(54) СРЕДСТВО, СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА КОАКТИВАТОРА PGC-1A

(57) Реферат:

Изобретение относится к области фармакологии медицины и касается применения трекрезана в качестве стимулятора экспрессии гена коактиватора PGC-1, что приводит к увеличению содержания митохондрий в мышечной ткани, росту работоспособности поперечно-полосатой мускулатуры. 2 табл., 3 пр.

RU 2460524 C1

RU 2460524 C1

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 460 524** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
A61K 31/205 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011114007/15, 12.04.2011**

(24) Effective date for property rights:
12.04.2011

Priority:
(22) Date of filing: **12.04.2011**

(45) Date of publication: **10.09.2012 Bull. 25**

Mail address:
119571, Moskva, ul. 26 Bakinskikh Komissarov, 3, korp.3, kv.514, M.M. Rasulovu

(72) Inventor(s):
Rasulov Maksud Mukhamedzhanovich (RU),
Nurbekov Malik Kubanychbekovich (RU),
Voronkov Mikhail Grigor'evich (RU),
Bobkova Sofija Niazovna (RU),
Belikova Ol'ga Anatol'evna (RU),
Zvereva Marina Valentinovna (RU),
Shimanovskaja Natalija Pavlovna (RU),
Speranskaja Ol'ga Anatol'evna (RU)

(73) Proprietor(s):
Rasulov Maksud Mukhamedzhanovich (RU)

(54) AGENT STIMULATING PGC-1A COACTIVATOR GENE EXPRESSION

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to pharmacology, medicine and concerns using Trecresan as a PGC-1 coactivator gene expression stimulator.

EFFECT: invention leads to increasing mitochondrion count in muscular tissue, growing performance of striped muscles.

2 tbl, 3 ex

RU 2460524 C1

RU 2460524 C1

Изобретение относится к биологии и медицине, конкретно к биохимии и фармакологии, и может быть использовано для повышения работоспособности поперечно-полосатой мускулатуры, например, при утомлении либо при атрофиях. Исследуется регуляция ключевого гена? определяющего биогенез митохондрий, пути катаболизма углеводов и жиров в клетке (гомеостаз холестерина и степень ожирения организма) в ответ на внешние стимулы [1, 2, 3]. Предлагается корригировать экспрессию гена коактиватора с помощью препарата трекрезан.

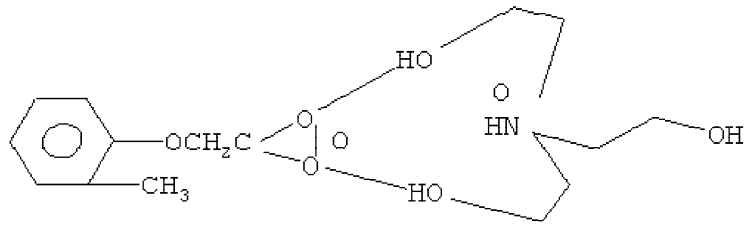
Мышечная и нервная ткани играют центральные роли в реализации физической активности и контроле пределов переносимости нагрузок. Одним из базовых процессов при этом является рост числа и общей метаболической активности митохондрий, например миоцитов. Среди известных факторов стимуляции функций митохондрий кроме упражнений и применения ограничений калорийности пищи можно указать на ряд препаратов природного происхождения - природные флавоноиды, ресвератрол и др. [4, 5, 6, 7, 8].

В настоящее время обнаружены специфические факторы, играющие роль активаторов и коактиваторов ключевых комплексов генов, запускающих каскад процессов биогенеза митохондрий, включения или/и выключения метаболических путей распада или ресинтеза жиров и углеводов, разработаны и испытываются препараты, в сотни раз усиливающие эффект природных стимуляторов. При этом известно, что активация продукта гена коактиватора путем специфической модификации включает адаптивные системы организма, препятствующие развитию сердечно-сосудистых заболеваний, диабета, миопатий [9]. Эти патологии, в свою очередь, тесно связаны с биогенезом митохондрий, а также регуляцией путей распада и синтеза глюкозы и липидов. Важная роль в этих процессах принадлежит ядерным рецепторам пролиферации пероксисом (PPARγ), которые согласно данным литературы являются переносчиками регуляторных сигналов на комплекс транскрипционных факторов. Ключевая роль в запуске каскада процессов, принадлежит коактиватору 1 альфа этих рецепторов, причем стимуляция экспрессии гена коактиватора-1-альфа резко ускоряет процессы биогенеза митохондрий [10, 11].

В качестве ближайшего аналога может быть указан источник [12]. Однако существует необходимость дальнейших исследований и поиска новых эффективных препаратов, обеспечивающих оптимальную эффективность, специфичность и отсутствие побочных эффектов. Это привлекает внимание к триэтаноламмониевым солям ароксиуксусных кислот, имеющим протатрановую структуру с общей формулой $X^-N^+H(CH_2CH_2OH)_3$, уменьшающим пораженность эластических волокон и стабилизирующим клеточные мембраны [13, 14].

Целью изобретения является разработка нового средства, специфически повышающего стимулирующие и регуляторные функции ключевых генов и их продуктов, лежащих в основе запуска каскадов регуляторных процессов биогенеза митохондрий.

Поставленная цель достигается тем, что в качестве активатора биогенеза митохондрий применяют новый отечественный препарат трекрезан, который обладает широким спектром терапевтического действия и отвечает формуле:



Известно применение трекрезана как препарата, повышающего иммунитет и адаптивные свойства организма [13, 14].

Применение трекрезана по новому назначению стало возможным благодаря выявленным нами его новым свойствам. Впервые показано, что введение трекрезана стимулирует экспрессию гена коактиватора PGC-1α.

Свойство трекрезана стимулировать экспрессию гена коактиватора PGC-1α в литературе не описано.

Методика. Эксперименты проводились на крысах (n=60) линии Вистар массой 180-200 г. Животные были разделены на 3 группы: первая получала раствор трекрезана из расчета 10 мг/кг массы внутрибрюшинно в течение 7 дней, вторая получала трекрезан из расчета 25 мг/кг массы внутрибрюшинно в течение 7 дней. Крысы третьей группы являлись контрольными и получали эквиобъемную инъекцию физиологического раствора в те же часы, когда производилась инъекция испытуемого препарата (плацебо), также в течение 7 дней.

Крысы содержались в стандартных условиях. Работа выполнена с соблюдением принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Наблюдения проводились в дневное время (с 11 до 15 ч).

Статическая работоспособность оценивалась при подвешивании крыс на горизонтальный экран-сетку. Крыса помещалась на горизонтальную сетку, плавно отпускалась, экран переворачивался, при этом животное пытается удержаться, противодействуя силе тяжести. Животное оставалось висеть, зацепившись за сетку лапами. Регистрировалась длительность удержания животного на сетке. Если в течение трех минут крыса падала вниз, ее снова сажали на сетку, в общей сложности до трех раз. Подсчитывалось суммарное время удержания по всем трем повторам вместе и латентность первого падения [3].

Динамическую работоспособность животных определяли в тесте принудительного плавания. Учитывалась продолжительность плавания крыс с грузом (8% от массы тела) до появления первых признаков утомления [5, 15].

После курса воздействия трекрезана и плацебо животных декапитировали для взятия образцов тканей. Быстро извлекали 100-200 мг мышечной ткани, выделяли препарат суммарной мРНК и рассматривали экспрессию ключевого гена (в частности - PGC-1α) биогенеза митохондрий методом ПЦР в реальном времени (РТ-ПЦР).

Статистическая обработка данных проводилась с использованием общепринятых методов [16].

Для выделения препарата суммарной мРНК использовали гуанидинизотиоцианатный метод. Поперечно-полосатые мышцы (100 мг мышц бедра) гомогенизировали растиранием после быстрого замораживания в жидком азоте в присутствии 1 мл препарата Trizol®Reagent (фирма Invitrogen, USA) в соответствии с протоколом производителя. Гомогенат инкубировали при 15-30°С в течение 5 мин для полной диссоциации белково-нуклеиновых комплексов. Добавляли 0,2 мл хлороформа на 1 мл препарата TRIzol, встряхивали 15 с и инкубировали 2 мин при 15-30°С. Затем

гомогенат центрифугировали 15 мин при 12000 g при 2-8°С. Супернатант переносили в стерильную пробирку и осаждали РНК, добавляя равный объем изопропанола, инкубировали при 15-30°С в течение 10 мин и центрифугировали 10 мин при 12000 g при 2-8°С. Осадок РНК промывали 75% спиртом, высушивали на воздухе и растворяли в бидистиллированной воде, содержащей 0,5% SDS, затем инкубировали при 55°С в течение 10 мин и замораживали при -70°С. Аликвоту в 2,5 мкл препарата выделенной мРНК растворяли в бидистиллированной воде, обработанной диэтилпирокарбонатом, и спектрофотометрически при 260 нм оценивали количество. Качество препаратов мРНК оценивали по соотношению 260:280 - препараты с соотношением больше 1,6 брали для дальнейшего анализа. Суммарный препарат мРНК подвергали процедуре обратной транскрипции. Для получения кДНК в реакционную смесь в объеме 50 мкл добавляли - 1,5-2,0 мкг мРНК; 5 мкл модифицированного десятикратного РТ буфера «Сибэнзим», обеспечивающего конечные концентрации $MgCl_2$ - 25 мМ; 10 мкл смеси dNTP до конечной концентрации - 1,5 мМ; 2, 5 мкл смеси гексапраймеров фирмы Силекс М (для «рэндом» обратной транскрипции мРНК); 1 мкл ингибиторов РНКаз и добавляли 0,5 мкл препарата обратной транскриптазы фирмы «Сибэнзим» (200 ед.акт. в 1 мкл). Реакцию проводили при 25°С в течение 10 мин, затем 60 мин при 37°С и 5 мин при 95°С. Затем препарат быстро охлаждали в ледяной бане и хранили при -20°С не более 2-3 суток.

Анализ экспрессии генов, участвующих в реакциях биогенеза митохондрий. Специфическую экспрессию гена PGC-1α исследовали методом РТ-ПЦР (ПЦР в реальном времени) на приборе ДНК-технологии ДТ-322.

1. Синтез на матрице РНК кДНК. Для синтеза кДНК с использованием препаратов суммарной РНК применяли реактивы фирмы Силекс М и прилагающиеся протоколы. Для синтеза кДНК в пробирке, помещенной в лед, смешивали следующие компоненты:

- РНК матрица - 2 мкл (тотальная РНК 0.1-5 мкг) (пол$(A)^+$РНК 10-0,5 нг или специфическая РНК - 0.01 пг и менее);
- праймер - 1 мкл (специфический 15-20 пмолей, случайный гексапраймер 0,5 нг);
- вода, свободная от РНКаз - до 18 мкл.

Перемешивали центрифугированием 30 сек при 10000 g. Смесь инкубировали 5 мин при 70°С, переносили пробирку в лед, затем центрифугировали 30 сек при 10000 g.

Помещали пробирку в лед и добавляли:

- ×10-кратный ОТ буфер (фирма «Силекс-М») - 2,5 мкл;
- 1,5 мМ смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (dNTP) - 4 мкл;
- обратная транскриптаза вируса лейкемии мышей Молони - M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) - 0,5 мкл (100 ед. акт., «Сибэнзим»).

Смесь инкубировали в течение 60 мин при 37°С (при использовании случайных гексапраймеров перед инкубацией при 37°С смесь инкубировали в течение 10 мин при 25°С). Реакцию останавливали прогреванием смеси в течение 10 мин при 70°С. Смесь переносили в лед. Полученную кДНК использовали либо сразу же для проведения РТ ПНР, либо для синтеза второй цепи и последующего клонирования. Хранили полученную кДНК при -20°С, либо при -70°С.

2. Количественный анализ специфической мРНК коактиватора-1-альфа гамма-рецептора (PGC-1α). Количественный анализ экспрессии гена коактиватора PGC-1α проводили через оценку уровня специфической мРНК. Критерием уровня мРНК служил количественный анализ суммарной кДНК, проводимый методом РТ-ПЦР. Реакцию РТ ПЦР проводили с использованием наборов реактивов фирмы «Синтол»

(Комплект реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I Кат. №R-402). Количественное определение специфических кДНК для PGC-1 проводили на РТ-ПЦР приборе. Условия амплификации: смесь инкубировали 2 мин при 50°С, затем 10 мин при 95°С. После этого проводили амплификацию в следующем режиме - денатурация при 95°С в течение 15 с, отжиг и элонгация при 60°С - 60 с (сбор данных осуществляли на стадии полимеризации). Затравки конструировали по программе «Праймер Экспресс Версия 3.0»:

для β-актина:

- прямая = 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'
- обратная = 5'-CGGCCACATTGTGAACTTTG-3'

для кДНК копии мРНК PGC-1a:

- прямая = 5'-GTGCAGCCAAGACTCTGTATGG-3'
- обратная = 5'-GTCCAGGTCATTCACATCAAGTTC-3'

Стандарты получали путем амплификации контрольных образцов в ПЦР реакции в условиях, оптимизированных для РТ-ПЦР. Измерения осуществляли относительно стандартных значений, проводя 4-кратные последовательные разбавления для получения стандартной кривой из 8 точек.

Экспоненциальная стадия PCR описывается уравнением:

$$P_n = P_0 * E^n, \quad (1)$$

где P_n - количество молекул продукта (величины репортерной флуоресценции), образовавшихся к циклу n, P_0 - исходное количество молекул, содержащих амплифицируемый фрагмент, E - эффективность амплификации. В идеальных условиях E=2, т.е. на каждом цикле цепной реакции происходит удвоение количества продукта. После логарифмирования обеих частей уравнения 1 можно преобразовать его к виду:

$$n = -(1/\log E) * \log P_0 + \log P_n / \log E \quad (2)$$

Пороговым циклом (threshold cycle, C_T)) называют такой цикл n, на котором достигается некий заданный уровень репортерной флуоресценции - пороговая флуоресценция $P_{C(T)}$=const. Для n=C_T) уравнение 2 принимает вид:

$$C_T = -(1/\log E) * \log P_0 + \log P_{C(T)} / \log E \quad (3)$$

Значение C_T) прямо пропорционально логарифму количества субстрата.

Таким образом, ПЦР-РВ позволяет сравнивать количества субстрата при условии, что эффективность реакции и заданный уровень пороговой флуоресценции одинаковы для каждой из сравниваемых реакций.

3. Определение содержания митохондрий в клетках мышц по содержанию митохондриальной ДНК (мтДНК). Препарат мтДНК выделяли из мышц. Для этого 0,1 г мышц (преимущественно 4-главые мышцы бедра) измельчали из замороженного в жидком азоте состояния. Замороженный порошок ткани переносили в пробирку типа Эппендорф объемом 2 мл и добавляли 800 мкл буфер состава - 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 25 мМ ЭДТА и 400 мМ NaCl), 100 мкл 10% SDS и 20 мкл раствора протеиназы К (10 мг/мл). Смесь перемешивали и инкубировали при 65°С в течение 3 ч. После инкубации, белки и клеточный дебрис осаждали добавлением 300 мкл 6М NaCl, инкубировали при +4°С в течение 15 мин. Центрифугировали смесь при 16000 g в течение 10 мин. 500 мл надосадочной жидкости перенесли в новый Эппендорф, содержащий 500 мкл раствора 8М гуанидина гидрохлорида (pH 8,0) и 0,49 М ацетата аммония, и медленно перемешивали при комнатной температуре в течение 90 мин. Нуклеиновые кислоты осаждали добавлением 800 мкл холодного 100% изопропилового спирта с последующим центрифугированием при 10000 g в течение 5

мин. Осадок промывали 400 мкл 70% изопропилового спирта. После просушивания осадка его ресуспендировали в 150 мл ТЕ-буфера (10 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА и 50 мг/мл РНКазы («Сибэнзим»). Образцы ДНК хранили при t -20°С. Качество и концентрацию ДНК оценивали спектрофотометрически при 260 нм и электрофоретически.

Количественная оценка содержания мтДНК в мышечной ткани. Количественный анализ мтДНК проводили методом количественной РТ ПЦР. Для этого использовали препараты ДНК, выделенные из образцов ткани методом, изложенным в разделе 2.

Для проведения ПЦР в реальном времени использовали реактивы фирмы «Синтол». Для анализа брали 10 нг образца ДНК на реакцию. Относительные количества ядерной и мтДНК определяли путем сравнения кинетики размножения выбранного фрагмента гена β-актина, локализованного в ядерном геноме, и митохондриального гена цитохрома b. Условия реакции: реакционная смесь в объеме 25 мкл содержала те же компоненты, что и при анализе специфической экспрессии гена коактиватора PGC-1. ДНК добавляли в количестве 10 нг и затравки в количестве 50 нмоль. Условия реакции: смесь инкубировали 2 мин при 50°С, затем 10 мин при 95°С. Амплификация включала 40 циклов в режиме - денатурация при 95°С в течение 15 с, отжиг при 60°С в течение 20 с и элонгация при 72°С - 15 с (данные регистрировали на стадии полимеризации). Затравки конструировали с использованием программы «Праймер Экспресс Версия 3.0»

для β-актина:

- прямая = 5'-TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA-3'
- обратная = 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTAC-3'

для цитохрома b:

- прямая = 5'-TATTCCTTCATGTCGGACGA-3'
- обратная = 5'-AAATGCTGTGGCTATGACTG-3'

Все реакции проводились в сериях по 3 раза. Анализ полученных данных проводили с использованием пакета программ SPSS 13.0 (SPSS Inc., США), позволяющего рассчитывать средние значения изменения уровней мРНК генов и стандартные ошибки. Данные считали достоверными при $p<0,05$.

Для количественного анализа содержания митохондрий в тканях мышц по митохондриальной ДНК значения C_T (цикла пересечения с пороговой линией) для ядерного гена β-актина и митохондриального гена цитохрома b определяли в одном и том же амплификационном эксперименте.

В опытах наблюдалась хорошая воспроизводимость в пределах одного и между разными повторными опытами. Значения C_T использовались как мера количества копий анализируемой последовательности ДНК в начале амплификации, а различия в значениях C_T использовались для количественной оценки числа копий мтДНК по отношению к копийности гена β-актина в соответствии со следующей формулой: Относительное количество копий (Rc)=$2\Delta C_T$, где ΔC_T - разница C_T β-актина и C_T цитохрома b.

Результаты

Установлено, что при введении трекрезана в дозе уже 10 мг/кг работоспособность животных увеличивается (таблица 1). Применение препарата в дозе 25 мг/кг усиливало этот эффект (таблица 1).

Соотношения между изучаемым геном - мишенью PGC-1α и мРНК β-актина представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 видно почти двукратное увеличение экспрессии гена PGC-1α в

мышечных волокнах как при введении трекрезана в дозе в 10 мг/кг массы, так и при введении препарата в дозе 25 мг/кг.

Таким образом, нами установлено, что при введении раствора трекрезана в дозе 25 мг/кг внутрибрюшинно в течение 7 дней, достигается максимальная активация экспрессии гена коактиватора PGC-1α в мышечных волокнах. Это значит, что применение препарата трекрезан стимулирует каскад реакций биогенеза митохондрий и увеличение их числа и, соответственно, биоэнергетики миоцитов. Проведенные исследования доказывают возможность контроля числа митохондрий в миоцитах при помощи анализа количества митохондриальной ДНК, что имеет диагностическое значение.

Таблица 1

Время удержания животных на горизонтальной сетке и продолжительности плавания до утомления

Группа	Время удержания на сетке (из 3-х повторов), минут	Продолжительность плавания до утомления, минут
Плацебо - контроль	11,45±0,58	33,50±1,70
Опыт 1 (ТК - 10 мг/кг)	15,45±0,77	48,00±2,40
Опыт 2 (ТК - 25 мг/кг)	16,35±0,82	52,30±2,60

Таблица 2

Соотношения между изучаемым геном - мишенью PGC-1α и мРНК β-актина

Показатель	Группы животных		
	Контроль (плацебо)	Трекрезан в дозе 10 мг/кг	Трекрезан в дозе 25 мг/кг
Относительная индукция, уровень мРНК PGC - 1α/мРНК β актина	0,9±0,1	1,72±0,15	1,9±0,2
Содержание митохондрий в миоцитах по копийности мтДНК/диплоидный геном	0,9±0,1	1,15±0,1	2,25±0,2

ЛИТЕРАТУРА

1. Little J.P., Safdar A., Cermak N., Tarnopolsky M.A., Gibala M.J. Acute endurance exercise increases the nuclear abundance of PGC-1alpha in trained human skeletal muscle // Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2010; 298(4): R912-917.

2. Consitt L.A., Bell J.A., Koves T.R., Muoio D.M., Hulver M.W., Haynie K.R., Dohm G.L., Houmard J.A. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha overexpression increases lipid oxidation in myocytes from extremely obese individuals// Diabetes, 2010; 59(6): 1407-1415.

3. Holloway G.P., Bonen A., Spriet L.L. Regulation of skeletal muscle mitochondrial fatty acid metabolism in lean and obese individuals// Am J Clin Nutr. 2009, 89(1):455S-462S.

4. Rahman S. and Hanna M.G. Diagnosis and therapy in neuromuscular disorders: diagnosis and new treatments in mitochondrial diseases// J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2009, 80: 943-953.

5. Lira V.A., Benton C.R., Yan Z., Bonen A. PGC-1alpha regulation by exercise training and its influences on muscle function and insulin sensitivity//. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2010, 299(2): E145-161.

6. Wallace D.C. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine//. Ann Rev Genetics 2005, 39: 359–407.

7. Saft C., Andrich J., Wieczorek S., Arning L., Taherzadeh-Fard E. PGC-1alpha as modifier of onset age in Huntington disease// Molecular Neurodegeneration 2009, 4:1750-1756.

8. Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. //Cell 2006;127:1109-1122

9. Finck B.N., Kelly D.P. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) regulatory cascade in cardiac physiology and disease. Circulation// 2007, 115(19): 2540-2548.

10. Langenickel I., Bao J., Joseph J.J., Schwartz D.R., Mantell B.S., Xu X., Raghavachari N., Sack M.N. PGC-1alpha integrates insulin signaling, mitochondrial regulation, and bioenergetic function in skeletal muscle //J. Biol. Chem. 2008, 283 (33) : 22464-22472.

11. Sugden M.C., Caton P.W., Holness M.J. PPAR control: it's SIRTainly as easy as PGC // J. Endocrinol., 2010, 204(2): 93-104.

12. Кропотова Е.С., Тычко Р.А., Краснов Г.С., Опарина Н.Ю., Зиновьева О.Л., Ханкин С.Л., Берестень С.Ф., Машкова Т.Д. Определение снижения уровня мРНК гена zg16 как способ диагностики рака толстой кишки и набор для его осуществления // Патент РФ, Б.И., опубл. 27.07. 2010.

13. Воронков М.Г., Расулов М.М. Трекрезан – родоначальник нового класса адаптогенов и иммуномодуляторов // Хим.-фарм.Ж., 2007, №1, с.3-9.

14. Воронков М.Г., Мирскова А.Н., Расулов М.М. Иммуномодуляторная эффективность трекрезана // Химико-фармацевтический ж., 2007, №5, с. 7 – 11.

15. Бобков Ю.Г., Виноградов В.М., Катков В.Ф. и др. Фармакологическая коррекция утомления.— М.: Медицина, 1984.—208 с.

16. Зайцев Г.Н. Математический анализ биологических данных.—М.: Наука, 1991.—184 с.

Формула изобретения

Применение трекрезана в качестве стимулятора экспрессии гена коактиватора PGC-1α.