

УДК 577.352.3;581.132;577.38

ПРОТОНОФОРНОЕ И АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРИРОДНЫХ ФЛАВОНОИДОВ, СИНТЕТИЧЕСКИХ СЕРУСОДЕРЖАЩИХ ДВУХОСНОВНЫХ КИСЛОТ И ДРУГИХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Кожокару А.Ф.

ФГБУН Институт биофизики клетки РАН, Пушкино, e-mail: aurelium@inbox.ru

Известно, что клеточные мембраны являются компонентами, определяющими структурную целостность и устойчивость клетки к неблагоприятным внешним факторам. Наружная цитоплазматическая мембрана клетки защищает ее от вредных воздействий внешней среды, осуществляет избирательную проницаемость клетки для различных веществ, наряду с различными клеточными рецепторами и генетическим аппаратом принимает участие также в регуляции синтеза белков клетки. Наружная мембрана нервных клеток принимает участие в передаче нервного импульса и внутриклеточной сигнализации. Внутренняя сопрягающая мембрана клеточных органелл – митохондрий (Мх) и хлоропластов (Хл), ответственна за образование энергии в клетке. Структурные белки мембран определяют их прочность, упругость, а ферментные белки – проведение ряда биохимических процессов, в частности, синтеза макроэргических молекул АТФ в Мх и Хл, активный транспорт ионов. Липидная составляющая мембран определяет в основном их жидко-кристаллическое состояние и эластичность, липиды осуществляют пассивный трансмембранный транспорт ионов. Бислойные липидные мембраны (БЛМ) были взяты нами в качестве липидной модели мембран, поскольку структура липидов, некоторые функции и физико-химические свойства БЛМ и нативных клеточных мембран близки. На БЛМ можно получить экспериментальные данные, отражающие действие химических и физических факторов на клеточные мембраны. Нами показано, что многие лекарственные препараты (70–80%) – мембранотропные соединения, по молекулярному механизму действия они являются разобщителями окислительного фосфорилирования (РОФ) и протонифорами (ПФ), антиоксидантами (АО) и регуляторами окислительно-восстановительных процессов [3].

Ключевые слова: клеточные мембраны, цитоплазматическая мембрана, липиды

PROTONOPHORIC AND ANTIOXIDANT ACTION OF NATURAL FLAVONOIDS AND SULFUR-CONTAINING DIBASIC ACID SYNTHETIC AND OTHER PHENOLIC COMPOUNDS

Cojocar A.F.

FGBUN Institute of Cell Biophysics, Pushchino, e-mail: aurelium@inbox.ru

It is known that cell membranes are the components that determine the structural integrity and cell resistance to unfavorable external factors. Outside the cytoplasmic membrane of the cell protects it from the harmful effects of the environment, provides selective permeability of the cell for different substances, along with various cell receptors and genetic apparatus is also involved in the regulation of protein synthesis of the cell. The outer membrane of nerve cells is also involved in the transmission of nerve impulses, and intracellular signaling. Internal coupling membranes of cell organelles - mitochondria (Mi) and chloroplasts (Chl), responsible for the formation of energy in the cell. Structural membrane proteins determine their strength, elasticity, and enzyme proteins - a series of biochemical processes, including the synthesis of high-energy ATP molecules in Mx and chlorophyll, the active transport of ions. The lipid component of the membrane determines mainly their liquid-crystalline state and elasticity, lipids exercise passive transmembrane ion transport. Bilayer lipid membranes (BLM) were taken by us as a model lipid membranes, since the structure of lipids, some features and physico-chemical properties of BLM and native cell membranes close. On BLM can obtain experimental data, reflecting the action of chemical and physical factors on cell membranes. We have shown that many drugs (70–80%) - membranotropic compounds on the molecular mechanism of action they are uncouplers of oxidative phosphorylation (RUF) and the protonophore (PF), antioxidants (AO) and regulators of redox processes [3].

Keywords: cell membrane, cytoplasmic membrane lipids

Обобщение литературных данных и результатов наших многолетних научных исследований позволили заключить, что физико-химические изменения клеточных мембран (электропроводности, текучести липидной фазы, транспортных свойств) и мембрано-связанные процессы (энергетики, пролиферации, передачи нервного импульса, сигнализации, и метаболизма клетки) могут являться ключевыми в проявлении биологической активности физических факторов и ряда химических соединений на целом организме. Ранее нами было показано, что некоторые природные

фенольные соединения (ПФС) из класса флавоноидов и многие синтетические фенольные соединения (СФС) из класса замещенных салициланилидов (ЗСА), бензимидазолов, а также двухосновных кислот (ДОК) группы ДОК₁, содержащих гидроксильные группы во втором положении и различные заместители (NO₂, галогены Cl, Br) в 3,4,5 и 6 положении двух бензольных колец, обладают свойством транспортировать протоны через БЛМ, являясь ПФ [3,6,8]. Индукция протонной проводимости биологических мембран Мх и Хл под действием этих соединений приводила

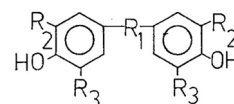
к снижению образования энергии в этих органеллах клетки путем разобщения процессов окисления субстратов и запасания энергии (окислительного фосфорилирования АДФ), а также к снижению образования активных форм кислорода (АФК). В опытах на лабораторных животных было обнаружено фармакологическое действие некоторых изученных препаратов – фасциолоцидное, бактерицидное, радиопротекторное, геропротекторное и противоопухолевое, оно коррелировало с их мембранотропным действием на БЛМ и митохондриях [3]. При γ -облучении лабораторных животных показано профилактическое (ферментно-ингибиторное) радиозащитное действие при относительно высоких концентрациях ДОК₁, ЗСА и терапевтическое (адаптогенно-антиоксидантное) – при относительно низких концентрациях ДОК₁ и природных флавоноидов [3, 5]. Был сделан вывод о том, что БЛМ и клеточные мембраны Мх могут служить тест-системой для отбора биологически активных соединений (БАС), проявляющих фармакологическое действие. Предложен экспресс-метод тестирования физиологического действия фенольных соединений (ФС) и других БАС на лабораторных животных по величине индуцированной ими ионной (протонной) проводимости БЛМ и по их действию на окислительное фосфорилирование Мх. В связи с перспективностью фармакологического использования ДОК при различных заболеваниях возникла целесообразность синтезировать и провести сравнительное изучение эффективности и механизма действия препаратов группы ДОК₂, других СФС и ПФС на различных модельных и клеточных мембранных системах.

Целью исследования являлось дальнейшее исследование активности и механизма действия на ионный транспорт в модельных мембранных системах БЛМ и антиоксидантной активности (АОА) на липосомах потенциально эффективных фармакологических препаратов широкого спектра действия – новосинтезированных ароматических серусодержащих соединений класса ДОК из группы ДОК₂ с гидроксильной OH^- -группой в четвертом положении двух бензольных колец и более широким кругом заместителей (Br ; NO_2 , COOH , COOCH_3) в третьем и пятом положениях бензольных колец по сравнению с ДОК₁, а также ПФС – флавоноидов (эпигаллокатехинов, кверцетинов, убикинона), каротиноидов (ликопина) и СФС (тегалида, битианола, ионола и мексидола). Для достижения указанной цели предполагалось исследовать:

- 1) способность препаратов модифицировать ионную проводимость БЛМ,
- 2) природу этой проводимости,
- 3) АОА препаратов на липосомах по их влиянию на параметры хемилюминесценции (ХЛ),
- 4) зависимость протонотропной активности (ПФА) и АОА препаратов от их химической структуры (расположения OH^- группы и различных заместителей в бензольных кольцах), состава и pH среды, от концентрации препарата,
- 5) провести сравнительный анализ ПФА и АОА препаратов.

Материалы и методы исследования

Для исследования было использовано 21 химическое соединение из класса ДОК, синтезированное в ВИГИСе (Москва), степень их чистоты «х.ч.». Эта группа соединений ДОК₂ содержала ароматические сульфиды, сульфоксиды и сульфоны с гидроксильными группами в четвертом положении бензольных колец с общей формулой



где R_1 – S, SO, SO_2 – группы; R_2 , R_3 – Br, NO_2 , COOH , COOCH_3 – группы в третьем и пятом положении бензольных колец. Химическая структура, условные обозначения и их действие на ионный транспорт – удельную электропроводность (проводимость) (G_m) БЛМ – приведены в таблице. ДОК₂ сравнивались с ДОК₁, среди которых исследовался битионол (ТХСД) [3]. Ранее приводится строение других соединений – ЗСА, катехинов, ИУК [3, 8].

Зависимость G_m БЛМ от концентрации модификаторов измерялась в водной среде с трис-буфером (20 мМ трис HCl фирмы «Sigma», США, pH 7,5). Для формирования БЛМ на отверстия диаметром 1 мм в тефлоновой ячейке были использованы n-декановые растворы с концентрацией 20 мг/мл общих липидов бычьего мозга (ОЛБМ), которые готовили непосредственно перед опытом. Для измерения электрического сопротивления мембраны R_m и трансмембранной разности потенциалов (ΔV) использовалась модифицированная нами электрическая схема [3]. Сопротивление R_m измеряли путем сравнения падения напряжения на стандартном (эталонном) резисторе и мембране. R_m и G_m рассчитывали по формулам $R_m = U_m R_{ct} / E - U_m$ и $G_m = I \cdot S_m / R_m$, где E – подаваемое на мембрану напряжение, S_m – площадь мембраны, U_m – падение напряжения на мембране, R_{ct} – стандартное сопротивление мембраны. Для работы в линейной части вольтамперной характеристики БЛМ на мембрану подавали напряжение 20 мВ, его переключали с «+» на «–» во избежание асимметрии регистрации величины R_m . В вычислениях использовали среднюю величину.

Токи измерялись неполяризуемыми хлорсеребряными электродами. Падение напряжения на мем-

бране регистрировали электронным потенциометром КСП-4. Мембрану наблюдали в отраженном свете при помощи стереомикроскопа МБС-2. Площадь мембраны измеряли при помощи специального оку-

ляра, укомплектованного измерительной микросеточкой, она составляла $7,9 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2$. Каждый опыт проводили на одной мембране с повтором 2–3 раза при комнатной температуре 22°C .

Химические названия, условные обозначения и биологическая активность ДОК₂ на БЛМ (в графе «Химическое название» условные обозначения: дифенилсульфид – СД, дифенилсульфоксид – СО, дифенилсульфон – СН)

№ п/п	R ₁	R ₂	R ₃	Химическое название	Усл. обозн. препа-рата.	Макс. иссл. конц. (М)	Макс. провод. на БЛМ (См/см ²)
1	S	-	-	4,4'-диокси-дифенилсульфид	СД	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-9}$
2	SO	-	-	4,4'-диокси- дифенилсульфоксид	СО	$2 \cdot 10^{-3}$	$2 \cdot 10^{-9}$
3	SO ₂	-	-	4,4'-диокси-дифенилсульфон	СН	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-9}$
4	S	Br	Br	4,4'-диокси-3,5, 3',5'-тетрабром-СД	ТБСД	10^{-3}	10^{-6}
5	SO	Br	Br	4,4'-диокси-3,5, 3',5'-тетрабром-СО	ТБСО	10^{-3}	$5 \cdot 10^{-8}$
6	SO ₂	Br	Br	4,4'-диокси-3,5, 3',5'-тетрабром-СН	ТБСН	10^{-3}	$1,5 \cdot 10^{-7}$
7	S	COOH	-	4,4'-диокси-3,3'-дикарбокси-дифенилсульфид	ОКСД	$2 \cdot 10^{-3}$	$1,2 \cdot 10^{-8}$
8	SO	COOH	-	4,4'-диокси -3,3'-дикарбокси- дифенилсульфоксид	ОКСО	$2 \cdot 10^{-3}$	$2,5 \cdot 10^{-8}$
9	SO ₂	COOH	-	4,4'-диокси-3,3'-дикарбокси- дифенилсульфон	ОКСН	$2 \cdot 10^{-3}$	$1,15 \cdot 10^{-8}$
10	S	COOCH ₃	-	4,4'-диокси-3,3'-диметил-карбокси-дифенилсульфид	ОМСД	10^{-3}	$1,3 \cdot 10^{-8}$
11	SO	COOCH ₃	-	4,4'-диокси-3,3'-диметил-карбоксидифенилсульфоксид	ОМСО	$5 \cdot 10^{-4}$	$1,08 \cdot 10^{-8}$
12	SO ₂	COOCH ₃	-	4,4'-диокси-3,3'-диметил-карбокси-дифенилсульфон	ОМСН	$5 \cdot 10^{-4}$	$4,12 \cdot 10^{-9}$
13	S	COOH	Br	4,4'-диокси-3,3'-дикарбокси-5,5'-дибром-дифенилсульфид	ОКДС	10^{-3}	$7,74 \cdot 10^{-9}$
14	SO	COOH	Br	4,4'-диокси-3,3'-дикарбокси-5,5'-дибром-дифенилсульфоксид	ОКДО	$2 \cdot 10^{-3}$	$6,59 \cdot 10^{-8}$
15	SO ₂	COOH	Br	4,4'-диокси-3,3'-дикарбокси-5,5'-дибром-дифенилсульфон	ОКДН	$5 \cdot 10^{-4}$	$1,3 \cdot 10^{-8}$
16	S	COOCH ₃	Br	4,4'-диокси-3,3'-диметил-карбокси-5,5'-дибром-СД	МБСД	$3 \cdot 10^{-4}$	$5,8 \cdot 10^{-9}$
17	SO	COOCH ₃	Br	4,4'-диокси-3,3'-диметил-карбокси-5,5'-дибром-СО	МБСО	$5 \cdot 10^{-4}$	$1,94 \cdot 10^{-8}$
18	SO ₂	COOCH ₃	Br	4,4'-диокси-3,3'-диметил-карбокси-5,5'-дибром-СН	МБСН	$2 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-9}$
19	S	COOCH ₃	NO ₂	4,4'-диокси-3,3'-диметил-карбокси-5,5'-динитро-СД	МНСД	10^{-3}	$8,4 \cdot 10^{-9}$
20	SO	COOCH ₃	NO ₂	4,4'-диокси-3,3'-диметил-карбокси-5,5'-динитро- СО	МНСО	$5 \cdot 10^{-4}$	$1,25 \cdot 10^{-8}$
21	SO ₂	COOCH ₃	NO ₂	4,4'-диокси-3,3'-диметил-карбокси-5,5'-динитро-СН	МНСН	10^{-3}	$5,7 \cdot 10^{-9}$

Мембрана и все высокоомные цепи были защищены от внешних электромагнитных полей дюралевым экраном, для защиты от механических воздействий вся система была установлена на массивной металлической основе. Все приборы и экран были надежно заземлены. Предохранительные меры сводили до минимума электромагнитные наводки и механические вибрации, что давало возможность длительное время (8–10 часов) работать на одной мембране. Зависимость G_m от pH среды определялась в буферной водной среде, содержащей по 20 мМ цитрата, фосфата и бората калия. Препараты, растворенные в этаноле или диметилсульфоксиде (ДМСО), вводились в водную среду, омывающую БЛМ. Процент ошибки во всех опытах не превышал 10–15%.

АОА соединений измерялась при добавлении двухвалентных ионов Fe^{2+} по изменению интенсивности ХЛ липосом, отражающей скорость перекисного окисления липидов (ПОЛ). Исследовались различные концентрации препаратов на липосомах из яичного лецитина или из общих фосфолипидов печени крыс, взятых в концентрации 1 мг/мл [4]. Ионы Fe^{2+} (10^{-6} – 10^{-4} М) в небольшой концентрации существенно ускоряли ПОЛ в опытах, в клетке они являются прооксидантами, в результате взаимодействия Fe^{2+} с гидроперекисами липидов происходит разветвление свободнорадикальных липидных цепей, приводящее к увеличению количества свободных радикалов (СР) [1]. Средой измерения являлся раствор 20 мМ трис-НСl, pH 7,5. Высвеченные кванты света регистрировали фотоэлектрическим умножителем ФЭУ-38. Об активности препаратов судили по длительности латентного периода и величине амплитуды медленной вспышки ХЛ. Стандартным источником свечения ХЛ для определения чувствительности прибора служило урановое стекло.

Результаты исследования и их обсуждение

Влияние соединений ДОК₂ на электропроводность БЛМ

Измерение удельной электропроводности G_m БЛМ ($См/см^2$) при действии ДОК₂ (рис. 1–3) в диапазоне концентраций 10^{-5} – 10^{-3} М показало, что сульфиды, сульфоксиды и сульфоны, имеющие такие заместители как карбоксильные ($COOH$) и карбоксиметильные ($COOCH_3$) группы в 3,3'-положении, а также Br или нитро-

группу в положении 5,5' бензольных колец, являются малоэффективными (СД, ОКДС, ОМСД, ОМСО, ОКСН, ОКСО, МБСО, МНСО) или практически неэффективными (СН, ОКДН, ОМСН, МБСН, МНСН). Низкая эффективность действия препаратов, указанных на рис. 1–3, на G_m БЛМ объясняется, по-видимому, их незначительным коэффициентом распределения ДОК₂ липид/среда (10^2 – 10^3), а в случае 4,4'-диокси-3,3'-дикарбоксидифенильных (ОКСД, ОКСО, ОКСН) (рис. 2, б) и 4,4'-диокси-3,3'-диметилкарбоксидифенильных (ОМСД, ОМСО, ОМСН) производных (рис. 2, а) также затрудненной диссоциацией, «экранизацией» OH^- -группы положительно заряженными карбоксильной или карбоксиметильной группами. Препараты, содержащие сульфоксидный (SO) мостик между бензольными кольцами (ОКДО, ОКСО и МБСО) (рис. 1–3, кривые 2), были более эффективны на БЛМ.

Вещества, аналогичные вышеперечисленным, но с двумя бромами в положениях 3,3' и 5,5' бензольных колец, были наиболее эффективными и имели, в отличие от неактивных и малоэффективных препаратов, указанных на рис. 1–3, линейную зависимость проводимости (G_m) БЛМ от концентраций 10^{-5} – 10^{-3} М (рис. 4). Пунктирные линии (прямые) 1–3 проведены на основе теоретических расчетов.

Увеличение проводимости БЛМ под влиянием этих наиболее активных по величине G_m препаратов из группы ДОК₂ при их концентрации 10^{-3} М происходило максимально до $5 \cdot 10^{-8}$ (ТБСО), $1,5 \cdot 10^{-7}$ (ТБСН) и 10^{-6} $См/см^2$ (ТБСД) и было обусловлено увеличением кислотных свойств протона препарата за счет отрицательного индукционного эффекта, создаваемого галогенными заместителями, согласно теории строения органических соединений [2]. В таблице приведены эффективности остальных препаратов (см. «Материалы и методы»).

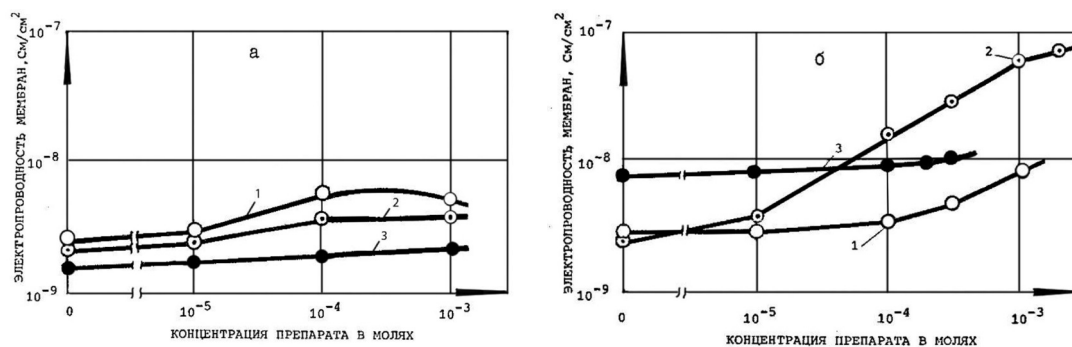


Рис. 1. Зависимость проводимости БЛМ из ОЛБМ (20 мг/мл в *n*-декане) от концентрации ДОК₂, вводимых в водную среду (20 мМ трис-НСl, pH 7,5) растворенными в ДМСО. Препараты: а) 1 – СД, 2 – СО, 3 – СН; б) 1 – ОКСД, 2 – ОКДО, 3 – ОКСН

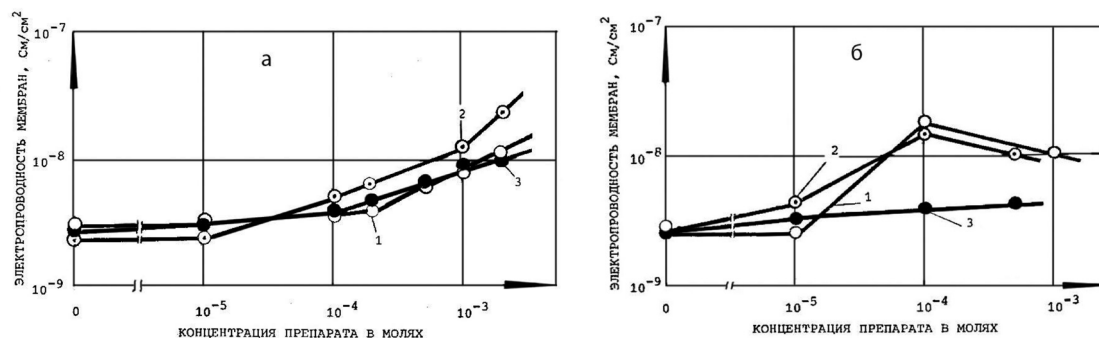


Рис. 2. Условия те же, как и на рис. 1. Препараты: а) 1 – ОМСД, 2 – ОМСО, 3 – ОМСН, б) 1 – ОКСД, 2 – ОКСО, 3 – ОКСН

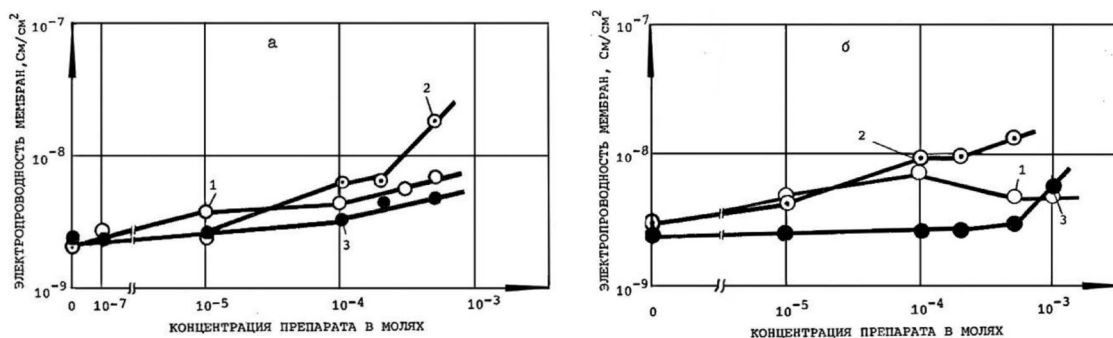


Рис. 3. Условия те же, как и на рис. 1. Препараты: а) 1 – МБСД, 2 – МБСО, 3 – МБСН, б) 1 – МНСД, 2 – МНСО, 3 – МНСН

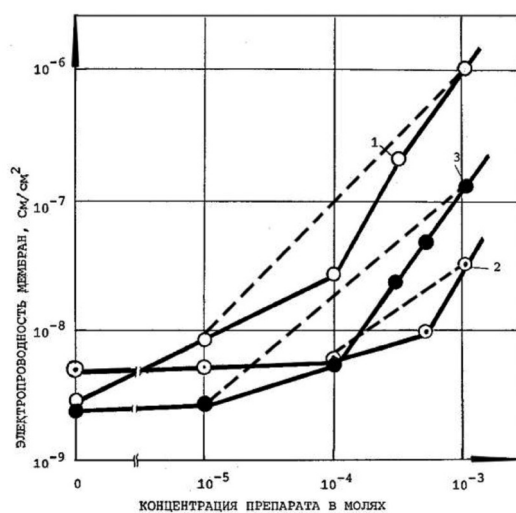


Рис. 4. Условия те же, как и на рис. 1. Препараты: 1 – ТБСД, 2 – ТБСО, 3 – ТБСН

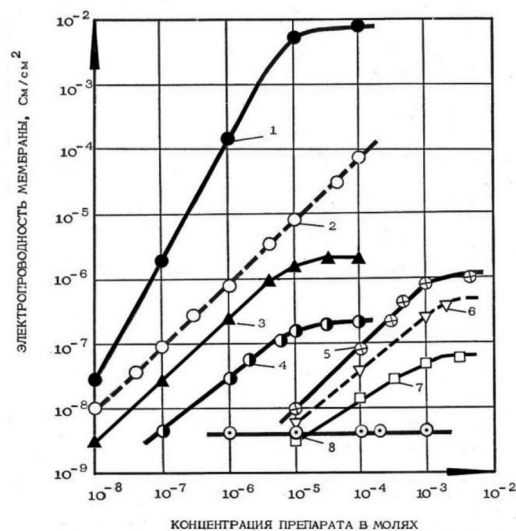


Рис. 5. Условия те же, как и на рис. 1. Препараты: 1 – тегалид, 2 – фенилбарен, 3 – ТХСД в ДМСО, ТХСД в этиловом спирте, 5 – ионол, 6 – ИУК, 7 – ЭГК, 8 – 2-фенилоказол

На рис 5 представлено действие ряда СФС и ПФС на проводимость G_m мембран из ОЛБМ. Самым эффективным препаратом является тегалид (Т) из класса ЗСА (химическое название 3,5-дибром-N-4-хлор-3/4-хлорбензоил/фенил/-2-оксибензамид),

в присутствии которого (кривая 1) G_m мембраны квадратично зависит от его концентрации. Проводимость имеет линейную зависимость от концентрации остальных препаратов, указанных на рис. 5 (фенилбарена (ФБ), ТХСД, ионола, ИУК, ЭГК,

кривые 2–7). Малоэффективными препаратами на БЛМ оказались ликопин, коэнзим Q_{10} , мексидол, аскорбиновая кислота (АК) (на рис не показано). Сравнение активности ПФС и СФС на БЛМ, приведенных на рис. 5, показало, что наиболее активные препараты, относящиеся к СФС (Т и ФБ), при концентрации 10^{-4} М индуцируют максимальную G_m в мембранах, которая намного выше, чем G_m БЛМ для катехинов (ЭГК, ЭГКГ) при той же концентрации (для Т – на 6 порядков, для ФБ – на 4). Проводимость БЛМ при введении ТХСД в водный раствор в ДМСО на порядок выше, чем при введении его в этиловом спирте (кривые 3, 4). Для активных СФС 10^{-7} См/см² является одним из начальных значений проводимости, для ее достижения в случае ФБ достаточно очень низкой концентрации 10^{-7} М, тегалида – $2 \cdot 10^{-8}$ М, а для малоэффективных ПФС такая G_m не достигалась даже при гораздо большей концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ М. Ионол (кривая 5) – слабоэффективный ПФ при низких концентрациях (10^{-6} – 10^{-5} М), как и препараты ДОК₂, но более эффективен на БЛМ, чем ПФС при концентрации 10^{-4} – 10^{-3} М. Препарат 2-фенилоксазол (кривая 8) без OH^- – групп и галогенных заместителей в бензольных кольцах являлся неэффективным на БЛМ при концентрации 10^{-6} – 10^{-3} М.

Таким образом, исследованные фенольные соединения по своей ионофорной активности образуют следующий ряд: Т > ФБ > ТХСД в ДМСО > ТХСД в этиловом спирте > ионол > ИУК > ЭГК > ЭГКГ > Q_{10} > мексидол > АК > каротиноид ликопин (рис. 5). Очевидно, что ПФС (убихинон, ликопин, катехины, кверцетины и др.) являются слабыми по эффективности на БЛМ соединениями по сравнению с СФС, они незначительно (в 5–10 раз) увеличивали G_m БЛМ при концентрациях 10^{-5} – 10^{-3} М. Среди СФС также имеются слабоэффективные ПФ на БЛМ – ионол и мексидол, которые, как и ПФС, относятся к классу замещенных фенолов и их производных. Другие СФС (ТХСД, Т, трихлорфенол, пентахлорфенол, 2,4-ДНФ, ТТФБ, ЗСА с галогенными заместителями Cl, Br под шифром Г-1042, Г-1049) являются более эффективными протонофорами на БЛМ, действующими при значительно меньших концентрациях, начиная с милли (10^{-6} М) или наномолярных концентраций (10^{-9} М) [3, 5, 8].

Природа электропроводности БЛМ

Для определения природы G_m БЛМ в присутствии ДОК₂, были проведены отдельные опыты по измерению зависимости G_m БЛМ от концентрации ионов водорода водной среды в присутствии исследован-

ных веществ. Измерения величины разности мембранного потенциала от pH среды проводились в буферной водной среде без подачи напряжения (20 мВ) на мембрану, в условиях нулевого тока. Непроницаемость БЛМ для протонов позволяла создавать на мембране градиент ионов водорода опытным путем. Внутренняя мембрана Мх, моделью которой является БЛМ, также непроницаема для протонов, что необходимо для поддержания градиента ионов водорода как составляющей компоненты (наряду с электрической компонентой) трансмембранной разности потенциалов, используемой для образования энергии в клетке в виде макроэргических молекул АТФ. Если по одну сторону БЛМ добавляли кислоту или щелочь, таким образом создавая градиент pH на мембране на одну единицу (в пределах 6,5–7,5), то добавление эффективного препарата ДОК₁ или ДОК₂ в концентрации 10^{-8} – 10^{-4} М в раствор измерительной ячейки приводило к возникновению разности потенциалов 58 мВ, причем знак «плюс» всегда был на стороне более высокого pH. Экспериментально было доказано, что в области кислых pH = 1,0–7,0, включающей область pH = pK (константы диссоциации) препарата, эта разность потенциалов ΔV хорошо описывалась уравнением Нернста:

$$\Delta V = \Delta V_n = \Delta pH \cdot 2,3 RT/F,$$

где ΔV_n – диффузионный водородный потенциал, ΔpH – разность ионов водорода по обе стороны мембраны, имеющая знак, соответствующий трансмембранному градиенту ионов водорода или гидроксила, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура, F – число Фарадея. Возникновение нернстовского трансмембранного потенциала при добавлении препарата, зарегистрированная при наличии градиента pH на мембране, равного единице при низких значениях pH менее 8,0 в условиях нулевого тока, позволила убедиться в том, что проведение тока через мембрану в присутствии препаратов ДОК осуществляется ионами водорода (H^+), а не ионами гидроксила (OH^-). Следовательно, в присутствии более эффективных препаратов ДОК₂ мембрана ведет себя как избирательный водородный электрод с сопротивлением 10^3 ом/см². В щелочной области pH 8–12, где концентрация ионов водорода меньше, мембранный потенциал полностью исчезает. Таким образом, наши экспериментальные данные по исследованию ФС с близкой структурой из класса ДОК_{1,2} (OH^- -группа во втором и четвертом положении бензольного кольца и заместители Cl, NO₂, Br, COOH, COOCH₃) дают основание считать,

что большинство из исследованных препаратов индуцируют протонную проводимость, т.е. они являются истинными ПФ на БЛМ (трансмембранными переносчиками протонов) при данных условиях.

Проводимость G_m БЛМ при добавлении других исследованных препаратов также зависела от концентрации ионов водорода. Для большинства СФС, в частности, для изученных нами Т и ТХСД, максимумы G_m БЛМ расположены при физиологических $pH = 7,8$ и $pH = 6,1$, которые равны pK препаратов, а при более кислых или щелочных pH величины G_m резко снижены, поэтому G_m при $pH = 7,5$ имела высокие значения. Для ПФС (ЭГК, ЭГКГ, АК) и СД, СО, СН из группы ДОК₂ без заместителей в бензольных кольцах максимумы G_m находятся в щелочной области pH , совпадающие с pK данных веществ, с чем связаны низкие значения проводимости при физиологическом значении $pH = 7,5$. Для ФБ в связи с отсутствием OH^- групп максимум G_m был не столь выражен. В отдельных опытах было показано, что проводимость БЛМ в присутствии ПФС и СФС не зависела от концентрации других одновалентных катионов (K^+ , Na^+) и анионов (Cl^-), двухвалентных катионов (Ca^{2+}). Эти опыты доказывали протонную природу проводимости БЛМ и способность ФС к переносу протонов.

Механизм трансмембранного транспорта протонов

Для высокоактивного на БЛМ препарата тегалида из класса ЗСА (рис.5, кривая 1) была получена квадратичная зависимость проводимости БЛМ от концентрации препарата. Это означает, что тегалид осуществляет транспорт протонов через мембрану по механизму подвижных переносчиков димерного (HA_2) варианта. Согласно принятой на сегодняшний день трехстадийной модели протон переносится димером между анионной (A^-) и протонированной (HA) формой препарата, при этом димер образуется на межфазной границе мембрана/раствор.

На рис. 5 показана также линейная зависимость G_m БЛМ от концентрации исследованных СФС (ФБ, ТХСД в ДМСО и в этаноле, ионол, кривые 2–5) и ПФС (ИУК, ЭГК, кривые 6–7) при физиологическом значении $pH 7,5$. Кривые G_m для мексидола, АК, ликопина и коэнзима Q_{10} на рисунке не указаны. Молекулярный механизм ионного транспорта через мембрану для этих препаратов, как и для классических протонаторов, осуществляется по механизму подвижного переносчика мономерного варианта (A^-) [8, 12]. Известно, что БЛМ непроницаема для H^+ , поэтому протоны могут проходить

через бислой только в виде нейтрального комплекса (HA) с ПФ. Перенос H^+ происходит следующим образом. Под влиянием электрического поля указанной полярности анионы (A^-) движутся справа налево через углеродную фазу мембраны, вследствие чего концентрация анионов на левой стороне мембраны увеличивается. Такой перенос, со своей стороны, ведет к гетерогенной реакции следующего типа: $A^- + H^+ \leftrightarrow HA$. Вследствие такой реакции, протекающей на границе раздела мембрана/раствор, концентрация HA в одном из отсеков ячейки увеличивается. В результате этого концентрационного градиента нейтральная форма ПФ диффундирует через бислой к правой стороне, где происходит освобождение протона в водной фазе вследствие уменьшения концентрации A^- под воздействием приложенного потенциала и протон из одного отсека с водной средой переносится в другой отсек ячейки через липидный бислой.

Наиболее эффективные препараты на БЛМ из группы ДОК₂ (ТБСД, ТБСО и ТБСН) с двумя галогенными заместителями (Bg^-) в бензольном кольце, имеющие линейную зависимость G_m БЛМ от концентрации препарата 10^{-4} – 10^{-3} М (рис. 4), также осуществляют протонный перенос через мембрану по механизму переносчиков мономерного варианта (A^-), как и ранее исследованные нами препараты из группы ДОК₁ 2,2'-диокси-3,3',5,5'-тетрахлордифенилсульфид (ТХСД – битионол), 2,2'-диокси-5,5'-дихлордифенилсульфид (ДХСД – оксид), 2,2'-диокси-3,3'-дибром-5,5'-дихлордифенилсульфид (БХСД – галосфен), 2'-диокси-3,3',5,5',6,6'-гексахлордифенилсульфид (ГХСД – гексид) и др. [3, 8].

ПФС и СФС, не имеющие линейной зависимости проводимости БЛМ от их концентрации, осуществляют неспецифическое действие на мембрану. Среди них ДОК₂, которые практически не повышают G_m БЛМ – СН, СД, СО без заместителей в бензольных кольцах и препараты с карбоксильной, карбоксиметильной и нитрогруппой в качестве заместителей. Существенных отличий в механизме протонного транспорта сульфидов, сульфоксидов и сульфонов ДОК₂ не наблюдалось в связи с тем, что OH^- -группы, ответственные за кислые свойства молекул, расположены достаточно далеко от серного мостика, и степень его окисленности заметно не влияет на диссоциацию протона OH^- группы. 2-фенилоказол без OH^- -групп и без галогенных заместителей был практически неактивен на БЛМ (рис. 5, кривая 8), что указывает на необходимость гидроксильных групп для проявления протонаторной активности (ПФА) препаратов.

Зависимость протонофорной активности препаратов на БЛМ от различных факторов

Как следует из вышеизложенного экспериментального материала, ПФА исследованных ФС определяется структурой соединения – количеством и расположением OH^- групп, а также типом и расположением заместителей, влияющих на степень диссоциации OH^- групп, о которой судили по величине константы диссоциации pK . Возможность переноса протонов соединениями определяется также их способностью образовывать комплексы с H^+ .

Было показано, что эффективность препаратов ДОК_2 на БЛМ зависит от величин коэффициента их диссоциации pH/pK , которые были измерены нами методом титрования. Наблюдалось значительное увеличение проводимости БЛМ при исследовании препаратов в области pH , близких к pK , в частности, для ДОК_2 , ТБСД, ТБСО, ТБСН при $\text{pH} = 8,2, 7,8, 6,5$ в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М. Таким образом, активность ФС зависела от pH среды измерения.

Эффективность ПФС и СФС на БЛМ, как было показано ранее с помощью флуоресцентных зондов (ДМХ), определяется также способностью изменять структуру липидной фазы, причем липидной фазы низкой полярности, способствуя увеличению ее текучести [9]. Об этом свидетельствовала корреляция между способностью ФС изменять структуру липидов и активностью ФС на БЛМ. Для эффективного действия на проводимость мембран препарат должен быть способен связываться с липидами, что было выявлено по конкуренции между препаратом и зондом (ДМХ) [9]. Эффективный протонофор, как и его диссоциированные формы (A^- , AH) и их комплексы с протонами, должны хорошо растворяться в липидах (для оценки растворимости определялся коэффициент распределения липид/среда) и обладать подвижностью в мембране.

Сравнение протонофорной активности ДОК_1 и ДОК_2

ДОК_2 оказались менее эффективными на БЛМ, чем ДОК_1 , что может быть связано с положением OH^- -группы. Можно предположить, что OH^- -группы, расположенные в 4ом положении бензольных колец, образуют более устойчивые связи с соседними заместителями, чем во 2ом положении, что в меньшей степени способствует диссоциации OH^- -группы ДОК_2 и индукции проводимости БЛМ, чем ДОК_1 . ДОК_2 были менее активны также из-за их более низкого

сродства к липидам (у них более низкий коэффициент распределения липид/среда, равный 10^2 – 10^3). Их небольшое сродство к липидам можно объяснить тем, что при нейтральном pH большая часть этих молекул представлена двухзарядными анионами. В отличие от сильных кислот и оснований, ДОК_1 и ДОК_2 являются слабыми кислотами и неполярными соединениями, поэтому проникают через БЛМ и нативные клеточные мембраны, однако при увеличении у них количества полярных групп растворимость их в липидах и проницаемость мембран для них уменьшается. Более высокая протонофорная эффективность ДОК_1 по сравнению с ДОК_2 может объясняться наличием у ДОК_1 более эффективных галогенных заместителей, оттягивающих на себя электронное облако положительно заряженных протонов и увеличивающих их диссоциацию. Карбоксильная и карбоксиметильная группы ДОК_2 , наоборот, затрудняли, экранировали диссоциацию OH^- -группы, протонофорная эффективность препаратов с этими заместителями была ниже, чем с галогенными (Br). Эффективность ДОК по степени их влияния на G_m БЛМ определяется типом, количеством и расположением заместителей в бензольных кольцах и убывает в ряду: $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{NO}_2 > \text{COOH} > \text{COOCH}_3$.

Антиоксидантные свойства ДОК_2

Учитывая важную роль АО для лечения различных заболеваний, были исследованы антиоксидантные свойства ДОК_2 по их действию на ПОЛ и их прооксидантная активность, для чего было проведено исследование их влияния на параметры ХЛ, стимулированной добавлением в среду солей двухвалентных ионов Fe^{2+} . Добавление Fe^{2+} к искусственным (липосомам) и биологическим мембранным системам (митохондриям, эритроцитам) усиливает высвечивание квантов света, обусловленное ПОЛ [1].

Были получены сравнительные экспериментальные данные определения ПФА и АОА исследованных препаратов по влиянию их на проводимость G_m БЛМ и параметры ХЛ на липосомах, соответственно. Слабоэффективные препараты ОКДО, ОМСД, ОМСО, МНСО, незначительно увеличивающие G_m БЛМ (в 5–10 раз) при концентрации 10^{-4} – 10^{-3} М (рис. 1–3), являются менее эффективными АО, чем препараты, не проявляющие протонофорную активность на БЛМ (СО , СН , ОКДН , ОМСН , МНСН , МБСН). Препараты, увеличивающие электропроводность БЛМ на 1,5–2 порядка (ТБСО, ТБСН, ТБСД, ОКДО) при концентрациях 10^{-5} – 10^{-3} М (рис. 3, 4),

проявляли невысокую АОА. Таким образом, препараты ДОК₂, не эффективные или слабо эффективные на БЛМ, являлись более эффективными АО, они в большей степени увеличивали латентный период медленной вспышки ХЛ при введении соли Fe²⁺ в исследуемый раствор по сравнению с этим периодом, измеренным при добавлении препаратов ДОК₂ более высокой ПФА на БЛМ. Сравнительное исследование ПФА и АОА классических антиоксидантов (ионола, токоферола, убихинона, АК, мексидола) и растительных флавоноидов (кверцетина, ликопина, стильбена и эпигаллокатехина) выявило аналогичную закономерность отсутствия корреляции ПФА и АОА. Сравнительный анализ данных, полученных по действию препаратов на G_m БЛМ и ХЛ липосом, позволяет заключить, что некоторые из ДОК₂, как и препараты из других классов, проявляющие низкую ПФА, обладают высокой АОА и, наоборот, более эффективные ПФ были мало эффективными АО. ОН⁻-группа необходима для проявления ПФА, она может участвовать также и в проявлении АОА у ПФС (флавоноидов) и СФС (исследованных нами ДОК). ФС, являющиеся протонофорами за счет диссоциации протона ОН⁻-группы, осуществляют перенос Н⁺ через мембрану при наличии трансмембранного градиента рН. АОА этих соединений обусловлена окислением их гидроксильной группы в кетогруппу, при этом АО являются донорами отрицательно заряженных электронов для свободных радикалов (СР) – молекулярных частиц с неспаренными электронами, являющихся АФК и азота, продуктами окисления липидов. Отсутствие корреляции между ПФА препаратов на БЛМ и их влиянием на ПОЛ может быть связано с наличием или отсутствием галогенных, карбоксильных, карбоксиметильных заместителей, с количеством и положением ОН⁻-групп в бензольных кольцах. Наличие галогенных заместителей в химической структуре ДОК₁, несущих отрицательный заряд, способствует повышению протонофорной эффективности этих ФС при увеличении способности положительно заряженного протона к диссоциации, а АОА, наоборот, уменьшается из-за снижения способности соединения отдавать отрицательно заряженные электроны перекисным СР. Другие заместители (карбоксильные и карбоксиметильные группы в молекуле ДОК₂ или метильные группы в молекуле классического антиоксиданта ионола), несущие положительный заряд, наоборот, уменьшают («экранируют») диссоциацию ОН⁻-группы и снижают эффективность этих соединений как ПФ,

но способствуют увеличению их АОА. Отмечено, что различные группы ФС обладают способностью восстанавливать сильно окисленные продукты, в первую очередь СР, за счет своего низкого восстановительного потенциала, который для большинства ФС колеблется в диапазоне 250–750 мВ [11]. ФС за счет высокой разницы восстановительных потенциалов легко вовлекаются в одноэлектронные реакции с различными радикалами (супероксидный, пероксидный, гидроксильный, алкоксильный), значения восстановительных потенциалов которых существенно выше – 0,9–2,13 В. Их АОА сопровождается разрывом цепи свободно-радикального окисления $RO_2 + FCOH \rightarrow ROOH + FCO$, где RO_2 и FCO – нерадикальные продукты окисления ФС, а R – алкильная или арильная группа [1,4]. Отсутствие заместителей в бензольных кольцах ведет к снижению ПФА и увеличению АОА препарата как у ПФС, так и СФС [3]. Низкая диссоциация протона различных молекулярных групп наблюдается при отсутствии различных заместителей у химических соединений: ОН группы у ФС, SH группы у водорастворимых тиолов и NH группы у замещенных салициланилидов. АОА этих соединений, однако, высокая, поскольку отсутствие заместителей не уменьшает их эффективность в качестве доноров электронов для активных акцепторов этих частиц – СР. При отсутствии ОН⁻ группы или замене ее на ONa⁺, на ОК препараты ДОК₁ и ЗСА были неэффективны как ПФ, но были активны как АО, возможно, вследствие их действия, связанного со способностью ингибировать активность прооксидантных ферментов, ответственных за генерацию активных форм кислорода [7, 11].

В заключение следует сказать, что исследованные мембранотропные препараты – переносчики протонов – активно влияют не только на параметры искусственных БЛМ, но также и на клеточные мембраны и связанные с ними биохимические процессы [3, 8]. В настоящем сообщении показана их АОА, обнаруженная у многих лекарственных соединений. Приводятся экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что ряд природных и синтетических антиоксидантов фенольной природы, уже применяемых в медицине, являются слабыми протонофорами на модельных мембранных системах – ионол, кверцетин, катехины, убихинон, мексидол, аскорбиновая кислота. Для поиска и отбора активных АО предложен экспресс-метод исследования их проводимости на БЛМ и их хемилюминесценции на липосомах среди ФС с протонофорным механизмом действия, несущественно

увеличивающих электропроводность мембран. Активными АО являлись слабо эффективные на БЛМ исследованные нами ранее препараты ДОК₁ при относительно низких концентрациях (10^{-8} – 10^{-6} М), они могут являться перспективными для использования в медицинской практике. Высокие концентрации ДОК₁ (10^{-4} – 10^{-3} М), приводили в наших опытах к выявлению у этих соединений прооксидантных свойств, способствующих ПОЛ и снижению трансмембранного потенциала митохондрий, необходимого для образования энергии в клетке. Нами показан высокий профилактический и терапевтический эффект для СФС дибунола (10^{-4} – 10^{-5} М), ПФС дигидрокверцетина, β-каротина и ликопина, флавонолов и антоцианов (10^{-3} – 10^{-6} М) при действии летальных доз γ-облучения и адронов высоких энергий [10]. Важным результатом работы является возможность применения в качестве потенциальных терапевтических препаратов при лечении широкого спектра различных заболеваний (в том числе изученных нами патологий, вызванных ионизирующим и неионизирующим облучением) более эффективных на БЛМ СФС при очень низких, совершенно нетоксических концентрациях 10^{-8} – 10^{-6} М, при которых они обладают, по нашим данным, высокой АОА. Выявленные зависимости ПФА от химической структуры позволяют, как мы полагаем, синтезировать более эффективные протонаторы, которые возможно будет применять в медицинской практике как радиопротекторы профилактического действия, радиосенсибилизаторы для лечения онкозаболеваний, бактерициды, фасциоциды и фунгициды.

Выводы

1. Были исследованы величины и механизмы ионной проницаемости модельных мембранных систем БЛМ под действием ряда ПФС и СФС. Выяснено, что ароматические сульфиды, сульфоксиды и сульфоны (21 вещество), являющиеся аналогами препарата ТХСД (битионола), содержащие гидроксильную ОН⁻ группу в 4ом положении и 4 иона галогена Вг в 3,3' и 5,5'-положениях бензольных колец (ТБСД, ТБСО, ТБСН из группы ДОК₂), являются наиболее эффективными индукторами протонной проводимости на БЛМ, линейно зависящей от их концентрации (10^{-5} – 10^{-3} М), что свидетельствовало о переносе протонов по механизму подвижных переносчиков мономерного варианта (А⁻). Аналогичные результаты получены для других СФС (ФБ, ТХСД, ионол, мексидол) и ПФС (ИУК, ЭГК, ЭГКГ, АК, убихинон Q₁₀, ликопин). Высокоактивный

на БЛМ тегалид (Т) из класса ЗСА имел квадратичную зависимость проводимости БЛМ от концентрации (10^{-9} – 10^{-5} М), которая свидетельствовала об осуществлении транспорта протонов через мембрану этим препаратом по механизму подвижных переносчиков димерного варианта (НА₂⁻). Вышеупомянутые препараты являются истинными протонаторами на БЛМ и образуют следующий ряд активности: Т > ТХСД в ДМСО > ТХСД в этиловом спирте > ионол > ИУК > ЭГК > ЭГКГ > АК > убихинон Q₁₀ > мексидол > ликопин. В целом, СФС были более эффективны, чем ПФС. Среди СФС выявлены высокоэффективные протонаторы, такие как тегалид и фенилбарен, но нами были обнаружены также малоэффективные СФС – мексидол, ДОК₂, сходные по активности с ПФС (АК, ИУК, катехины, кверцетины, убихиноны).

2. Протонаторная активность исследованных ФС зависит от химической структуры соединения и определяется количеством и расположением ОН⁻ групп, типом, наличием и расположением заместителей, влияющих на степень диссоциации ОН⁻ групп, от которой судили по величине константы диссоциации рК. Галогенные заместители Вг⁻ ДОК₂, Cl⁻ ДОК₁, нитрогруппа (NO₂) ДОК₁, ДОК₂ формировали ряд активностей Вг⁻ > Cl⁻ > I⁻ > NO₂ > COOH > COOCH₃ и способствовали увеличению диссоциации протонов ОН⁻ группы и, таким образом, повышению их протонаторной эффективности. Карбоксильная и карбоксиметильная (препаратов ОКДН и ОМСН) группы, наоборот, затрудняли ее диссоциацию, протонаторная эффективность была ниже, чем с галогенными заместителями. Препараты ДОК₂ без заместителей (СД, СО и СН) или с карбоксильной группой (ОКДН и ОМСН) в концентрации 10^{-4} М были практически неэффективными на БЛМ при исследовании их в диапазоне рН 3,0–11,5 из-за того, что у этих соединений рК ОН⁻ группы находились только в очень щелочной области рН (для СД, СО и СН рК равны 13,9, 12,8 и 11,7), в отличие от ДОК₂, имеющих 2 рК в нейтральной и щелочной областях. Эффективность действия ФС на проводимость БЛМ, таким образом, зависела от концентрации ионов Н⁺ (рН среды измерения), но не зависела от концентрации других одно- и двухвалентных ионов (K⁺, Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺). Эти данные свидетельствовали о протонной природе проводимости БЛМ.

3. Эффективность ПФС и СФС на БЛМ, как было показано ранее с помощью флуоресцентных зондов (ДМХ), определяется также способностью изменять структуру липидной фазы, причем липидной фазы низ-

кой полярности, способствуя увеличению ее текучести и более высокой растворимости препарата в липидах, которая оценивалась величиной коэффициента распределения липид/среда. Более низкая эффективность действия ДОК₂ на БЛМ по сравнению с ДОК₁, содержащими ОН- группу во 2 положении бензольных колец, связана с их более низким коэффициентом распределения 10²–10³. Более высокая протонотворная эффективность ДОК₁ по сравнению с ДОК₂ может объясняться наличием у ДОК₁ более эффективных галогенных заместителей, оттягивающих на себя электронное облако положительно заряженных протонов и увеличивающих их диссоциацию.

4. Была исследована АОА ДОК₂ при определении параметров хемилюминесценции ионов Fe²⁺, связанной с действием препаратов на ПОЛ в липосомах. Препараты, увеличивающие электропроводность БЛМ на 1,5–2 порядка (ТБСО, ТБСН, ТБСД, ОКДО), проявляли невысокую АОА. Препараты ДОК₂, не эффективные и слабо эффективные на БЛМ, являлись активными АО. Показана обратная корреляция между протонотворной активностью ДОК₂, СФС, являющихся классическими АО (ионола, АК, убихинона, мексидола), ПФС (кверцетина, ликопина, стильбена, ЭГК, ЭГКГ) на БЛМ и их АОА на липосомах. В случае ДОК₂ такая закономерность может быть связана с различным действием заместителей, несущих положительный или отрицательный заряд, на способность ДОК₂ к диссоциации протона ОН- группы, влияющей на протонотворную эффективность и на их способность отдавать отрицательно заряженные электроны перекисным СР, влияющей на АОА.

5. Некоторые ДОК₂ ранее изученные СФС из группы ДОК₁, ПФА и АОА могут быть потенциально эффективными фармакологическими средствами при различных заболеваниях (сердечно-сосудистым, неврологическим, онкологическим). Активные протонотворы, индуцирующие высокую протонную проводимость на БЛМ, могли бы оказаться эффективными фармакологическими препаратами: противомасляными и бактерицидными средствами при инвазивных и инфекционных заболеваниях, радиопрофилактическими защитными препаратами при действии облучения, радиосенсибилизаторами при лечении онкозаболеваний. Активные антиоксиданты

с низкой протонотворной активностью могли бы оказаться эффективными терапевтическими препаратами при лечении последствий действия облучения (γ-радиации, УФ излучения, адронов высоких энергий) и других внешних воздействий. Особенностью биологического действия соединений фенольного комплекса является широкий спектр молекулярных мишеней, на которые они могут воздействовать в организме, и, следовательно, большие потенциальные возможности их фармакологического действия и применения в медицине.

Список литературы

1. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. – М.: Наука, 1972. – 252 с.
2. Жданов Ю.А. Теория строения органических соединений. – М.: Высшая школа, 1971. – С. 62–67.
3. Кожокару А.Ф. Направленная модификация структурно-функционального состояния мембран с целью изменения устойчивости клеток и организма к факторам окружающей среды: дис.... докт. физ.-мат. наук. – М.: 1992. – 88 с.
4. Кожокару А.Ф. Антиоксидантный и протонотворный молекулярный механизм радиозащитного действия фенольных соединений: тезисы докл. IV Съезда биофизиков России. Симпозиум III: Физика – медицине и экологии. (Нижний Новгород, 20-26 авг. 2012 г.). – Нижний Новгород, 2012. – С. 123.
5. Кожокару А.Ф. Бислойные липидные и нативные мембраны как тест-системы для исследования природных и синтетических флавоноидов: сб. ст. Первой междунар. научно-практ. Интернет-конф. «Липидология – наука XXI века». Казань, 2014. – С. 119–131.
6. Кожокару А.Ф., Алексеева Л.В., Акоев И.Г. Модификация радиационного поражения двухосновными серо-содержащими кислотами фенольного ряда // Радиобиология. – 1981. – Т. 22. – № 4. – С. 545–548.
7. Кожокару А.Ф., Гъбев Е.Е., Владимиров Ю.А. и др. Действие нового класса замещенных салициланилидов на ионную проницаемость липидных мембран // Биофизика. – 1981. – Т. 26. – № 6. – С. 995–997.
8. Кожокару А.Ф., Либерман Е.А., Топалы В.П. и др. Исследование механизма действия фасциолоцидов с помощью бимолекулярных мембран // Биофизика. – 1976. – Т. 21. – № 2. – С. 711–713.
9. Кожокару А.Ф., Фомкина М.Г., Чертищев В.В. и др. Механизм действия катехинов чая и синтетических фенольных соединений на бислойные липидные и нативные мембраны // Свойства флавоноидов и их функции в метаболизме растительной клетки. – Пушкино: АН СССР, 1986. – С. 47–75.
10. Кожокару А.Ф., Юров С.С., Ревин А.Ф. Медико-биологические и биофизические основы действия и радиозащиты от γ-излучения и адронов высоких энергий: тезисы докл. XVI Росс. нац. конгр. «Человек и лекарство». (Москва, 6-10 апр. 2009 г.). – Москва, 2009. – С. 540.
11. Костюк В.А., Потапович А.И. Биорадикалы и биоантиоксиданты. – Мн.: БГУ, 2004. – 179 с.
12. Mc Laughlin S.G.A., Dilger J.P. Transport of protons across membranes by weak acids // Physiol. Reviews. – 1980. – Vol. 60, № 3. – P. 825–863.