

СТАТЬИ

УДК 577.23:577.352:57.043

**ЭНЕРГОТРОПНЫЙ И ПРОТОНОФОРНЫЙ МОЛЕКУЛЯРНЫЙ
МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ САЛИЦИЛАНИЛИДОВ
НА ИСКУССТВЕННЫХ И НАТИВНЫХ МЕМБРАННЫХ СИСТЕМАХ**

Кожокару А.Ф.

Институт биофизики клетки – обособленное подразделение федерального исследовательского центра ПНЦБИ РАН, Пушchino, e-mail: aurelium@inbox.ru

Было показано увеличение электропроводности (G_m) бислоиных липидных мембран (БЛМ) в зависимости от концентрации 16 соединений из класса замещенных салициланилидов (ЗСА) в растворе и доказано их протонифорное действие, которое определяется наличием гидроксильной ОН-группы в основном бензольном кольце молекул. Препараты с линейной зависимостью G_m от концентрации ЗСА осуществляли транспорт протона по мономерному молекулярному механизму подвижных переносчиков A^- . Для препаратов с двумя дополнительными бензольными кольцами в химической структуре, способствующими, вероятно, более высокой растворимости препаратов в липидной мембране, обнаружена квадратичная зависимость G_m БЛМ от их концентрации в растворе и, соответственно, димерный механизм трехстадийного протонного транспорта в виде HA_2^- . Галогенные заместители способствовали диссоциации протона ОН-группы, увеличивая протонифорную активность ЗСА в следующем порядке: $I^- > Br^- > Cl^-$. Препараты разобщали процессы окислительного фосфорилирования АДФ и дыхания в мембранах митохондрий (Мх) печени крыс, что приводило к частичному снижению образования энергии, необходимой для синтеза АТФ. С учетом высокого коэффициента распределения мембрана/среда 10^4-10^5 была получена корреляция протонифорной активности на БЛМ и разобщающей активности на Мх для большинства исследованных соединений, свидетельствующая в пользу протонифорного молекулярного механизма их разобщающего действия на Мх. Соединения из класса ЗСА в концентрациях с низкой протонифорной и разобщающей активностью проявляли антиоксидантные свойства. С помощью флуоресцентных зондов 2,6-ТНС, ДМХ, ДФГТ было показано, что ЗСА уменьшали потенциальный барьер на границе мембрана/среда, снижали микровязкость на 0,5–2,0 сПз и вызывали структурные перестройки мембран эритроцитов, что способствовало увеличению проницаемости мембран для препаратов и их разобщающего действия на Мх. Выявлены соединения ЗСА с более высокой разобщающей активностью, отсутствием токсичности при более низких концентрациях $10^{-8}-10^{-4}$ М, чем классические разобщители типа ДНФ. Экспериментально доказана индукция гипоксии и торможения скорости пролиферации клеток под действием ЗСА. Ранее нами был показан разобщающий механизм антипаразитарной активности двухосновных кислот, для ЗСА – также бактерицидного, фунгицидного, радиозащитного действия.

Ключевые слова: замещенные салициланилиды, бислоиные липидные мембраны, энергетика митохондрий, микровязкость мембран

**ENERGY-TROPIC AND PROTONOPHORE MOLECULAR MECHANISM
OF ACTION OF SALICYLANILIDES ON ARTIFICIAL
AND NATIVE MEMBRANE SYSTEMS**

Kozhokaru A.F.

Institute of Cell Biophysics, a separate subdivision of federal research center «Pushchino Scientific Center for Biological Research of RAS», Pushchino, e-mail: aurelium@inbox.ru

An increase in electrical conductivity (G_m) of bilayer lipid membranes (BLM) was shown, depending on the concentration of 16 compounds from the class of substituted salicylanilides (SSA) in solution, and their protonophore effect has been proven, which is determined by the presence of a hydroxyl OH-group in the main benzene ring of molecules. Preparations with a linear dependence of G_m on the concentration of the SSA carried out proton transport by the monomeric molecular mechanism of mobile A^- carriers. For drugs with two additional benzene rings in the chemical structure, which probably contribute to a higher solubility of drugs in the lipid membrane, a quadratic dependence of G_m BLM on their concentration in solution and, accordingly, the dimeric mechanism of the three-stage proton transport in the form of HA_2^- was found. Halogen substituents contributed to the dissociation of proton of OH-groups, increasing the protonophore activity of the SSA in the following order: $I^- > Br^- > Cl^-$. Preparations have separated the processes of oxidative phosphorylation of ADP and respiration in the membranes of rat liver mitochondria (Mt), which led to a partial decrease in the formation of energy required for ATP synthesis. Taking into account the high membrane/medium distribution coefficient 10^4-10^5 a correlation was obtained between the protonophore activity on BLM and uncoupling activity on Mt for the majority of the compounds studied, which testifies to the protonophore molecular mechanism of their uncoupling effect on Mt. Compounds from the class of SSA in concentrations with low protonophore and uncoupling activity showed antioxidant properties. Using fluorescent probes 2,6-TNS, DMH, DFHT it was shown that SSA reduced the potential barrier on the border membrane/medium, reduced microviscosity by 0.5–2.0 cP and caused structural reorganizations of erythrocyte membranes, which contributed to the increase in membrane permeability for preparations and their uncoupling effect on Mt. SSA compounds with higher uncoupling activity, lack of toxicity at lower concentrations of $10^{-8}-10^{-4}$ M than classical uncouplers like DNP were identified. The induction of hypoxia and inhibition of cell proliferation rate under the influence of SSA has been experimentally proved. Earlier, we showed the uncoupling mechanism of anti-parasitic dibasic acid activity, for SSA also of bactericidal, fungicidal, radioprotective action.

Keywords: substituted salicylanilides, bilayer lipid membranes, mitochondrial energetics, membrane microviscosity

В настоящей работе приводятся сравнительные экспериментальные данные протонофорного и энерготропного молекулярного действия соединений фенольного ряда из класса замещенных салицианилидов (ЗСА) на искусственных БЛМ и нативных мембранах Мх печени крыс. Предпосылкой настоящих исследований являлось наличие протонов в гидроксильных группах их химической структуры, способствующих разобщающему эффекту ЗСА, а также высокий коэффициент распределения мембрана/среда, свидетельствующий о мембранотропности этих препаратов. Препараты ЗСА и аспирин являются различными производными салициловой кислоты (СК), проявляющей по нашим данным разобщающие свойства. Химическая структура СК представляет собой бензол, у которого имеются гидроксильная ОН-группа и карбоксильная СООН-группа в качестве заместителей. В структуре аспирина (ацетилсалициловая кислота) протон гидроксильной группы замещен ацетильной группой. СК и аспирин являются нестероидными противовоспалительными препаратами. СК оказывает сосудосуживающее, противовоспалительное действие, применяется наружно для лечения различных кожных заболеваний, входит в состав многих комбинированных средств (випросала, камфолина, лориндена А). Аспирин в течение многих лет применяется в медицине как жаропонижающий, обезболивающий, противовоспалительный и противоревматический препарат, терапевтическое действие которого обусловлено ингибированием синтеза простагландинов, образующихся при воздействии различных факторов (гормональных, травматических, воспалительных, аллергогенных). При меньших концентрациях (< 325 мг) как антиагрегант, препятствующий тромбообразованию в результате ингибирования циклооксигеназы тромбоцитов, он входит в состав различных фармакологических препаратов – упсарин, кардиомагнил, тромбо АСС. Исследованные автором ЗСА являются анилидами салициловой кислоты, в которой гидроксил карбоксильной группы замещен фениламидной группой, имеются галогенные заместители и дополнительные бензольные кольца. Научный интерес к салициланилидам обусловлен тем, что они также применяются в медицинской практике. Препараты тегалид, никлозамид, рафоксанид, клозантел оказывают противопаразитарное действие, нарушая энергетический обмен и передачу нервного импульса фасциол [1]. Имеются изобретения, в которых представлены

доказательства противопаразитарной активности у салициланилидов и их производных [2]. Механизмом этой активности является специфическое ингибирующее действие препарата на нервную, гуморальную и внутриклеточную регуляцию [2], разобщающее – на Мх паразита [3]. Разобщение окислительного фосфорилирования (ОФ) АДФ и дыхания в Мх гельминтов, улиток и опухолевых клеток с помощью ЗСА, показанное зарубежными авторами на примере никлозамида [4], было обнаружено нами ранее [3, 5]. Показана активность препарата никлозамида в отношении опухоли и опухолевых стволовых клеток [4]. Нами были представлены доказательства специфической протонофорной разобщающей эффективности ЗСА и двухосновных кислот (ДОК) на нативных мембранах Мх фасциолоцидной эффективности, поскольку указанные активности коррелировали [3, 5, 6]. Ранее полагали, что разобщители ОФ (РОФ) являются клеточными ядами, однако нами выявлено их избирательное бактерицидное, фунгицидное [3], радиозащитное [7, 8] действие в низких концентрациях, ЗСА с подобной активностью применяются в медицинских препаратах, например цинкундам и тегалид соответственно. Возможно фунгицидное действие СК у пшеницы за счет образования перекиси водорода [9].

Цель работы: определение эффективности и молекулярного механизма действия препаратов из класса ЗСА на БЛМ и Мх, в соответствии с которой были поставлены следующие задачи:

- 1) исследовать влияние ЗСА на протонную проводимость БЛМ;
- 2) исследовать действие ЗСА на дыхание, процессы ОФ и эффективность запасаемая энергии в Мх печени крыс;
- 3) провести сравнительный анализ активности соединений ЗСА на БЛМ и Мх;
- 4) определить связь химической структуры препаратов с их действием на мембранные системы;
- 5) выявить структурные перестройки и изменения микровязкости мембран при действии ЗСА с помощью флуоресцентных зондов.

Материалы и методы исследования

Бислойные липидные мембраны (БЛМ) формировали по методу Мюллера из *n*-деканового раствора общих липидов бычьего мозга с концентрацией 20 мг/мл на отверстии тефлонового стаканчика диаметром 1 мм. Зависимость электропроводности мембран (G_m) от концентрации модификаторов измерялась в водной среде с 20 мМ трис-буфером. G_m мембран в зависимости от pH при добавлении пре-

парата ЗСА исследовалась в забуференной среде, содержащей 20 мМ цитрат, фосфат, борат калия или натрия. При измерениях G_m на мембрану подавалось постоянное напряжение 20 мВ. G_m БЛМ определяли путем сравнения падения напряжения на БЛМ и на известном сопротивлении. Напряжение сравнения увеличивалось с помощью усилителя постоянного тока У5-6 с большим входным сопротивлением 10^{12} ом и регистрировалось автоматическим электронным потенциометром КСП-4, подключенным к выходу усилителя.

Митохондрии (Мх) выделяли методом дифференциального центрифугирования из печени крыс линии Вистар весом 150–180 г. Для изучения влияния Мх препаратов на скорость дыхания использовали Мх в состоянии 4 с высоким дыхательным контролем, равным 4–5. Скорость дыхания Мх определяли по скорости уменьшения содержания кислорода в среде инкубации. Содержание кислорода определяли полярографическим методом в ячейке объемом 1 мл. Использовали среду инкубации следующего состава: 241 мМ сахара, 20 мМ сукцинат натрия, 1 мМ ротенон, 1 мМ фосфат калия, 2 мМ хлорид магния, 1 мМ ЭДТА, 56 мМ трис-НСl, рН 7,5. Содержание Мх в ячейке составляло от 2–3 до 8 мг белка/мл по методу Лоури. Установка собрана на основе полярографа Лр-7 с самописцем EZ-7.

Антиоксидантная активность измерялась по длительности латентного периода и амплитуде медленной вспышки хемиллюминесценции Fe^{2+} в среде с 20 мМ трис-НСl, рН 7,5 и липосомами из общих фосфолипидов печени крыс в концентрации 1 мг/мл при добавлении исследуемых соединений ЗСА. Опыты проводили при температуре $22 \pm 1^\circ C$.

Микровязкость мембран теней эритроцитов. В суспензию теней эритроцитов (150 мкг/мл белка) добавляли вначале исследуемое соединение ЗСА, а затем флуоресцентные зонды 2,6-ТНС, ДМХ для исследования структурных перестроек или ДФГТ для измерения микровязкости мембран. Концентрация зондов, вводимых в образцы, была для 2,6-ТНС 5–10 мкМ, для ДФГТ и ДМХ – 0,15 мкМ. Исследования проводили в 15 мМ фосфатном буфере, рН 7,4. Спектры флуоресценции зондов регистрировали на спектрофлуориметре MRF-44В, Perkin-Elmer (США). Время инкубации препарата и зондов ТНС, ДМХ 20 мин, ДФГТ – 1,5–2 ч. Все зонды были фирмы Fluka и Serva, они не взаимодействовали с препаратами.

Тени эритроцитов из крови крыс линии Вистар получали по методу Доджа. Для предотвращения сворачивания кровь животных собирали в большом объеме охлажденного до $2-4^\circ C$ физраствора (антикоагулянты не добавляли), гемолиз эритроцитов проводили в среде с 1 мМ ЭДТА, после чего тени эритроцитов трижды отмывали физраствором. Концентрация белка в опытах с флуоресцентными зондами была равна около 150 мкг/мл.

Исследованные соединения. В работе было исследовано 16 соединений из класса ЗСА, являющихся аналогами известного противофасциозного препарата тегалида и отличающихся от него галогенными (I, Br, Cl) и метильными CH_3 заместителями, а также ОН, NH или $COOCH_3$ -группами и количеством бензольных колец. Препараты были синтезированы в Институте медицинской паразитологии им. Е.И. Марциновского (г. Москва) проф. Ф.С. Михайлицыным с учетом наших рекомендаций, автор выражает благодарность за любезное безвозмездное предоставление

ЗСА для экспериментальных исследований. Выбор растворителя ДМСО обусловлен хорошей липофильностью [10] и растворимостью в нем препаратов ЗСА. При исследовании влияния препаратов на G_m БЛМ и дыхание Мх объем ДМСО в среде не превышал 2%. Все исследованные препараты были марки х.ч. или о.с.ч. Статистическая обработка результатов исследований проводилась по критерию Стьюдента. Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Структура и шифры ЗСА приведены в таблице.

Результаты исследования и их обсуждение

Влияние соединений ЗСА на электропроводность (G_m) бислоиных липидных мембран (БЛМ)

Специфическая химическая структура исследуемых препаратов из класса ЗСА, отличающаяся наличием ОН-группы во втором положении первого бензольного кольца, позволила предположить, что такие соединения могут переносить протоны через искусственные и нативные мембраны. Это предположение было подтверждено в экспериментах на модельных БЛМ, в которых было показано, что ЗСА способствуют возрастанию G_m мембран при увеличении концентрации препарата в ячейке (рис. 1) [11]. При концентрации 10^{-5} М для большинства исследованных препаратов величины G_m достигали максимальных значений, которые далее не изменялись: препараты Г-970 и Г-1057 увеличивали G_m на 1–2 порядка, Г-947, Г-882, Г-992 – на 3–4 порядка, а активные протонофоры Г-1021, Г-1024, Г-1028, Г-986, Г-988 и тегалид – на 5–6 порядков. Растворитель ДМСО (2% в пробе) незначительно увеличивал G_m – от $2,7 \cdot 10^{-9}$ до $6,2 \cdot 10^{-9}$ См/см².

На рис. 1, а, видно, что некоторые препараты (Г-944, Г-970, Г-1057, кривые 1, 5, 6) слабо увеличивали G_m БЛМ, другие соединения ЗСА (Г-1032, Г-947, Г-882, Г-1024, кривые 2-4, 7) – существенно. Из сравнения активности препаратов Г-1057 и Г-1032 (кривые 1, 2), сходных по структуре, но отличающихся наличием гидроксильной группы ОН, видно, что эффективность Г-1032 с ОН-группой на 2 порядка выше, чем у препарата Г-1057, содержащего карбоксиметильную группу вместо активной гидроксильной в основном бензольном кольце. Для проявления активности соединений ЗСА на БЛМ важным было наличие в их структуре галогенных заместителей в основном бензольном кольце, расположенных вблизи от ОН-группы и способствующих диссоциации ее протона. Так, препарат Г-889 (№ 16, таблица), содержащий ОН-группу, но не имеющий таких заместителей, оказывается практически неэффектив-

ным, даже при добавлении в среду высоких концентраций Г-889 G_m БЛМ увеличивалась менее чем на порядок. Влияние галогенных заместителей на G_m БЛМ было различным. Роль заместителя брома в увеличении активности препарата можно проследить при сравнении близких аналогов Г-882 и Г-1032 (рис. 1, а, кривые 4 и 2). В формуле Г-882 в третьем и пятом положении бензольного кольца имеются два иона брома. За счет этих заместителей препарат уже при концентрации 10^{-7} М увеличивает G_m на 1,5 порядка, в то время как Г-1032, имеющий в качестве заместителей ион хлора и метильную группу – лишь на полпорядка, это различие на порядок сохраняется и при более высоких концентрациях (до 10^{-4} М). Тегалид, имеющий ионы Vg в качестве заместителя в положении R_2 в первом бензольном кольце (рис. 2, б), также намного активнее на БЛМ по сравнению с препаратом Г-1028 сходной структуры (рис. 1, б, кривая 4), имеющим ион Cl (их максимальная электропроводность более 10^{-2} и 10^{-3} См/см² соответственно). Показана также возможность аминогруппы в первом бензольном кольце молекулы препарата Г-1024 индуцировать G_m БЛМ за счет ее диссоциации, G_m увеличивалась за счет заместителей – ионов иода, и была высокой (рис. 1, а, кривая 7). Препараты Г-947 и Г-970, содержащие амфотерную

гетерогенную пятичленную имидазольную и пиразольную группировку с двумя атомами азота, проявляли низкую активность. Мы полагаем, что низкие значения G_m БЛМ могут быть связаны со способностью этих группировок к образованию прочных межмолекулярных водородных связей, в том числе с атомами водорода ОН-групп, от которых зависит протонный молекулярный механизм активности соединений ЗСА на мембранных системах. Препараты Г-944 (рис. 1, а, кривая 5) индуцировал низкую G_m БЛМ, связанную с наличием гетерогенного кольца с двумя атомами кислорода (токсического соединения 1,4-диоксана), сопряженного со вторым бензольным кольцом. Следует отметить, что зависимость G_m БЛМ от концентрации препаратов, представленных на рис. 1, а, за исключением мало активных препаратов Г-1057 и Г-970 (кривые 1 и 6), является линейной. Это указывает на то, что протон, очевидно, переносится по механизму подвижного переносчика мономерного варианта (А'), описанному Е.А. Либерманом и др. (1968), согласно которому протон H^+ проходит через бислой в виде нейтрального комплекса с отрицательно заряженной молекулой разобщителя, которая возвращается во внешний, положительно заряженный отсек с митохондриями.

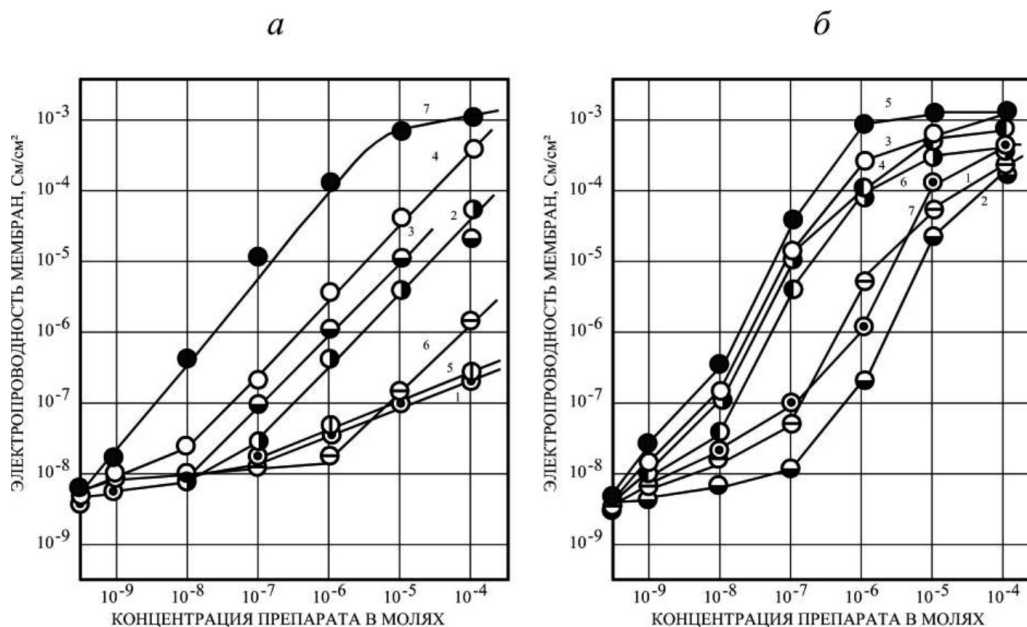
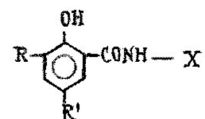


Рис. 1. Зависимость электропроводности БЛМ из ОЛБМ (20 мг/мл в *n*-декане) от концентрации некоторых ЗСА. Среда – 20 мМ трис-НСl, рН 7.5, $t = 22$ °С:
 а) 1 – Г-1057, 2 – Г-1032, 3 – Г-947, 4 – Г-882, 5 – Г-944, 6 – Г-970, 7 – Г-1024.
 б) 1 – Г-1033, 2 – Г-1037, 3 – Г-1021, 4 – Г-1028, 5 – Г-988, 6 – Г-986, 7 – Г-992

Химические структуры и шифры исследованных соединений ЗСА



№ п/п	Препарат, шифры	ОН-	R	R'	Мол. вес	Радикал X
1	Тегалид	ОН	Br	Br	544,4	
2	Г-1028	ОН	Br	Cl	498,5	
3 4	Г-1032 Г-1057	ОН COOCH ₃	CH ₃ CH ₃	Cl Cl	341,0 383,0	
5 6 7	Г-1033 Г-1037 Г-988	ОН ОН ОН	Br - I	Cl Cl I	509,0 430,0 647,6	
8	Г-882	ОН	Br	Br	405,5	
9	Г-944	ОН	Br	Br	463,5	
10	Г-947	ОН	-	Cl	305,8	
11	Г-970	ОН	Br	Br	461,0	
12	Г-986	ОН	Br	Br	578,5	
13	Г-1021	ОН	Br	Br	544,0	
14	Г-992	ОН	Cl	Cl	430,3	
15	Г-1024	NH	I	I	636,0	
16	Г-889	ОН	-	-	311,0	

На рис. 1, б, представлены данные электропроводности искусственных мембран для других препаратов ЗСА, у которых в структуре имеются два дополнительных бензольных кольца, способствующих более высокой растворимости в липидах и, соответственно, проявлению их мембранотропной активности по увеличению G_m БЛМ. Сравнение препаратов сходной структуры, отличающихся двумя заместителями иода (Г-988) и хлора (Г-992) в первом бензольном кольце, выявляет более высокую G_m БЛМ, индуцированную Г-988. Из сравнения G_m БЛМ, индуцированной препаратами Г-1033, Г-1037, Г-988, Г-992 сходной структуры, можно было сделать вывод о том, что эффективность действия ЗСА на G_m БЛМ возрастает с увеличением количества галогенных заместителей в первом бензольном кольце, зависит от их вида и места расположения в этом кольце. Активность всех исследованных ЗСА (рис. 1, а, б) зависела от галогенных заместителей: $I > Br > Cl > CH_3$. Для ЗСА, показанных на рис. 1, б, и тегалида (рис. 2, б) наблюдалась квадратичная зависимость G_m БЛМ от концентрации препарата в среде, характерная для механизма димерного варианта трехстадийного переноса протонов через мембраны, он был предложен Ли и Крогхен (1969), позднее проанализирован в докторской диссертации Л.Н. Ермишкина (1979), согласно которому протон через мембрану переносит димер HA_2^- , образующийся на границе мембрана/раствор из анионной (A^-) и незаряженной (НА) форм протонофора. Димеризация понижает борновскую энергию, в результате увеличивается скорость и эффективность переноса протонов в водную фазу.

Природа электропроводности (G_m) БЛМ для ЗСА

Для выяснения природы ионной проводимости БЛМ, индуцируемой ЗСА, были поставлены опыты, в которых изучалось изменение G_m мембраны, модифицированной исследуемыми препаратами с различной активностью в зависимости от концентрации протонов в среде, т.е. от рН среды. Результаты опытов показали, что эта зависимость имеет куполообразную форму (рис. 2, а).

Тот факт, что изменение рН раствора приводит к изменению G_m БЛМ (рис. 2, а, б), модифицированной соединениями из класса ЗСА, указывает на то, что исследуемые препараты, за исключением препарата Г-1057, у которого ОН-группа заменена на карбоксиметильную $COOCH_3$ -группу, являются эффективными протонофорами. Правильность сделанного вывода подтверждает совпадение максимальных значений G_m

БЛМ с ЗСА и максимальных величин их коэффициентов диссоциации рК, измеренных методом буферной емкости [3]. Величина Нернстовского потенциала при создании десятикратного градиента ионов водорода на БЛМ $\Delta V/\Delta pH$ (мВ) в присутствии 10^{-5} М концентрации тегалида и других ЗСА, с которой наблюдалась максимальная G_m БЛМ, была 58 мВ. Она также свидетельствовала о протонной природе G_m БЛМ, индуцированной этими препаратами, так и ЗСА другой группы [5] и ДОК, исследованными нами ранее [12].

Для суждения о возможной физиологической роли ЗСА в условиях *in vivo* нами были определены их коэффициенты диссоциации (рК), как в случае более ранних экспериментов с ДОК и классическими разбавителями ОФ [6]. Поскольку величины рК препаратов находятся в области физиологических значений рН 4,0–7,0, при которых была выявлена максимальная G_m БЛМ (исходная G_m БЛМ = 10^{-9} См/см²), индуцированная ЗСА, был сделан вывод о том, что эти соединения будут сохранять эту максимальную активность также и в условиях *in vivo*. Для некоторых ЗСА максимальные значения G_m наблюдались в несколько более широком интервале значений рН, для тегалида – 3,5–8,1 (рис. 2, б).

Действие ЗСА на дыхание митохондрий (Mx)

Экспериментальные данные, полученные на БЛМ, указывают на то, что исследуемые соединения ЗСА являются протонофорами, следовательно, согласно хемиосмотической гипотезе Митчела, они должны разобщать ОФ в Мх, шунтируя мембрану Мх по протону без участия АТФ-синтетазы, что приводит к снижению электрохимического потенциала, необходимого для синтеза макроэргических соединений АТФ. Нами было рассчитано высокое значение 350–400 мВ потенциала и его уменьшение в зависимости от концентрации природных и синтетических РОФ [3]. Гипотеза объясняет синтез АТФ из АДФ и фосфата в процессе ОФ АТФ-синтетазой за счет трансмембранного градиента протонов, образующегося при выходе их из Мх и переносе электронов ферментами дыхательной цепи от субстратов окисления кислороду. Протонная помпа и АТФ-синтетаза Мх, участвующие в образовании энергии, находятся под гормональным контролем, участвуют в поддержании жизнедеятельности и обмене клетки с внешней средой веществами, энергией и информацией. На рис. 3 представлены результаты полярографических исследований ЗСА.

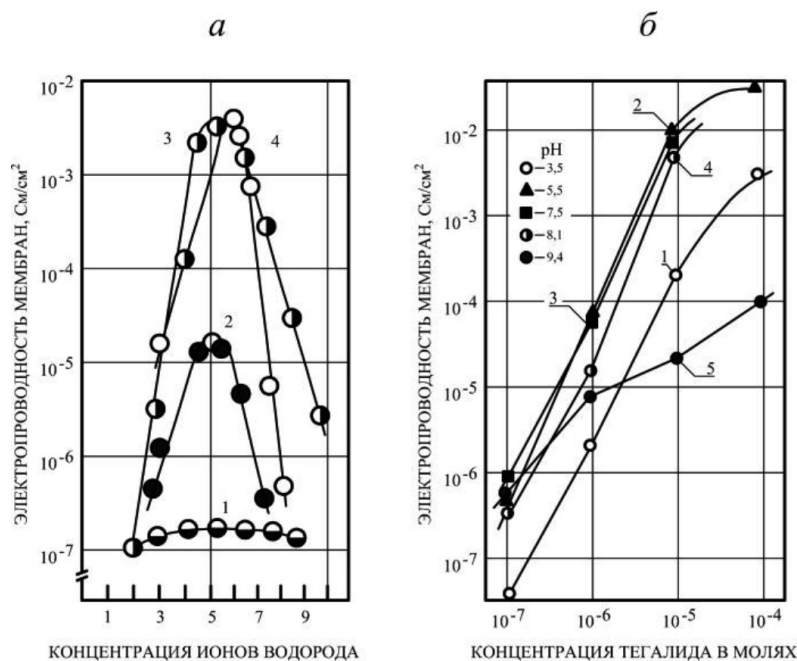


Рис. 2. а) Зависимость G_m БЛМ от pH среды. 1 – Г-1057 (10^{-5} М), 2 – Г-970 (10^{-4} М), 3 – Г-992 (10^{-5} М), 4 – Г-882 (10^{-4} М). Среда исследования: 20 мМ цитрат-фосфат-борат натрия, $t = 20-24^\circ\text{C}$. Препараты добавлялись по обе стороны мембраны. б) Зависимость G_m БЛМ от концентрации тегилида при различных значениях pH. Среда того же состава, что и на рис. 2, а

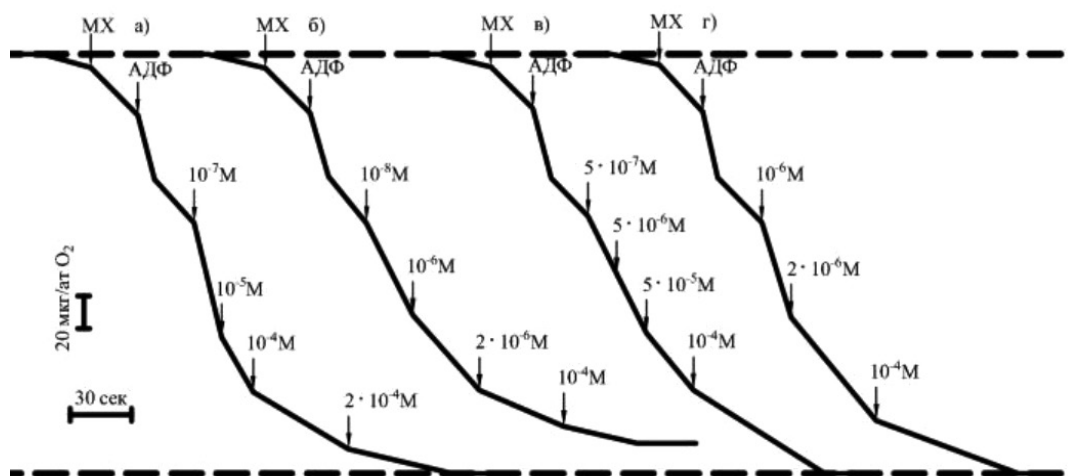


Рис. 3. Скорости потребления кислорода сопряженными митохондриями печени крыс при увеличении концентрации Г-970 (а), Г-1021 (б), Г-992 (в), Г-1032 (г), проводилось термостатирование ячейки ($t = 22^\circ\text{C}$)

При добавлении АДФ и ее фосфорилировании в АТФ скорость потребления кислорода (дыхания Мх) увеличивается в состоянии 3 (V_3), а затем она снижается в состоянии 4 (V_4) при исчерпании АДФ, их отношение (дыхательный контроль ДК) определяет степень сопряженности синтеза АТФ и дыхания, концентрация АДФ контролирует скорость дыхания. При последующем добавлении к Мх возрастающих невысоких концентраций $10^{-8}-10^{-6}$ М

ЗСА, представленных на рис. 3 (Г-970, Г-1021, Г-992, Г-1032) и в таблице, степень увеличения V_4 уменьшалась, так как эффективность фосфорилирования АДФ снижается, исходя из уменьшающихся величин трансмембранного потенциала и ДК. Более высокие концентрации ЗСА $10^{-5}-10^{-4}$ М снижали скорость дыхания Мх при полном снятии потенциала и торможении синтеза АТФ. Менее активные препараты ЗСА стимулировали дыхание Мх

при более высоких концентрациях. Ингибирование скорости дыхания Mx ниже исходной в состоянии 4 было необратимым. Только малоактивный протонофор Г-889 без галогенных заместителей в первом бензольном кольце даже при наличии ОН-группы и относительно высоких концентрациях 10^{-5} – 10^{-3} М слабо стимулировал, но не ингибировал дыхание Mx . На основании данных рис. 3 были построены колоколообразные кривые зависимости скорости дыхания Mx от концентрации препарата в среде (не показано), представленные для тегалида (рис. 4, а), которые свидетельствовали о разобщающем действии ЗСА. В условиях *in vivo* [8] максимальное разобщение ОФ в Mx происходило через 0,25–1,5 ч после введения крысам ЗСА, а еще через 3–5 (максимально через 7–8) часов оно уже не наблюдалось, вероятно, при выведении препаратов из организма животных и в результате их антиоксидантного действия.

Сравнение протонофорной и разобщающей активности ЗСА

Нами было установлено, что концентрация препаратов ЗСА, приведенных на рис. 1, а, индуцирующая в БЛМ протонную проводимость $5 \cdot 10^{-9}$ ом⁻¹ см² в водной среде, равна концентрации, увеличивающей скорость дыхания Mx в 2 раза, таким образом для этих соединений была обнаружена корреляция между протонофорной и разобщающей эффективностью. Для большинства ранее исследованных нами и другими авторами одноосновных кислот (динитрофенол, трихлорфенол, пентахлорфенол, салициловая кислота, дикумарол), являющихся классическими разобщителями, указанные концентрации также равны [13]. При исследовании на БЛМ и Mx нами было выявлено неравенство вышеуказанных концентраций препаратов из другой группы ЗСА с двумя дополнительными бензольными кольцами и тегалида, для которых была выявлена не прямо пропорциональная (рис. 1, а), а квадратичная зависимость G_m БЛМ от концентрации препарата (рис. 1, б). Это ставило под сомнение правильность вывода из хемиосмотической гипотезы о механизме синтеза энергии и протонофорном механизме разобщающего действия препаратов ЗСА на Mx . Дальнейшие исследования показали, что номинальная концентрация тегалида Cn^{Mx} в суспензии, при которой скорость дыхания Mx в 2 раза выше исходной (рис. 4, а), в 12 раз выше концентрации $Cv^{БЛМ}$ этого препарата, индуцирующего в БЛМ протонную проводимость $5 \cdot 10^{-9}$ ом⁻¹ см² в водной среде (рис. 4, б). Для других ЗСА этой группы указанное различие составляло 20–60 раз. Нами было предположено, а затем экспериментально доказано,

что неравенство этих концентраций и, следовательно, отсутствие корреляции между протонофорной и разобщающей эффективностью этих соединений из класса ЗСА обусловлено высокой растворимостью их в мембранах Mx и, соответственно, высоким коэффициентом распределения липид/среда и высокой их проводимостью через БЛМ. На примере тегалида получены данные сдвига вправо вдоль оси абсцисс кривой зависимости скорости дыхания Mx от его концентрации при увеличении концентрации белка Mx от 2 до 8 мг/мл из-за поглощения препарата митохондриями (рис. 4, а). Так, для полного ингибирования дыхания митохондрий, взятых в концентрации 2 мг/мл белка, необходимо $1,7 \cdot 10^{-6}$ М тегалида в растворе, 6 мг/мл – $7,0 \cdot 10^{-6}$ М, а 8 мг/мл – $8,0 \cdot 10^{-6}$ М. Это справедливо также для стимулирующей скорости дыхания концентрации препарата. На рис. 4, б, кривая 1 зависимости протонной проводимости БЛМ от концентрации тегалида в среде в присутствии 2 мг/мл Mx также сдвинута вправо относительно кривой 2, полученной без добавления Mx в среду, что свидетельствует о связывании препарата митохондриями, которое осуществляется в основном с липидами Mx . Это было подтверждено на липосомах из липидов Mx печени крыс, коэффициент распределения был выше 10^4 . Добавление Mx в среду без препарата (Cv^{Mx}) практически не изменяло G_m БЛМ (контроль). Из рис. 4 видно, что номинальная концентрация тегалида Cn^{Mx} , увеличивающая скорость дыхания Mx в 2 раза (рис. 4, а), равна концентрации, увеличивающей G_m БЛМ до $5 \cdot 10^{-9}$ ом⁻¹ см² в присутствии Mx (рис. 4, б). Следовательно, разобщающая активность тегалида осуществляется по протонофорному механизму.

При сравнении концентрации ЗСА, повышающей скорость дыхания Mx вдвое и увеличивающей G_m БЛМ до $5 \cdot 10^{-9}$ См/см² в присутствии Mx , для всех исследованных соединений ЗСА, кроме неактивного Г-889, была выявлена прямо пропорциональная зависимость (рис. 5), как и для препаратов из класса ДОК [6, 7, 13], она свидетельствовала в пользу хемиосмотической гипотезы Митчела механизма синтеза энергии и протонофорного молекулярного механизма разобщающего действия на Mx препаратов из класса ЗСА [3]. Наряду с классическими протонофорными разобщителями ОФ известны ионофоры, способные снижать протонный потенциал, образуя каналы для H^+ , Na^+ , K^+ (антибиотики нигерицин, грамицидин), десопрягающие агенты, способные стимулировать транспорт электронов по дыхательной цепи без снижения мембранного потенциала (анестетики) [14].

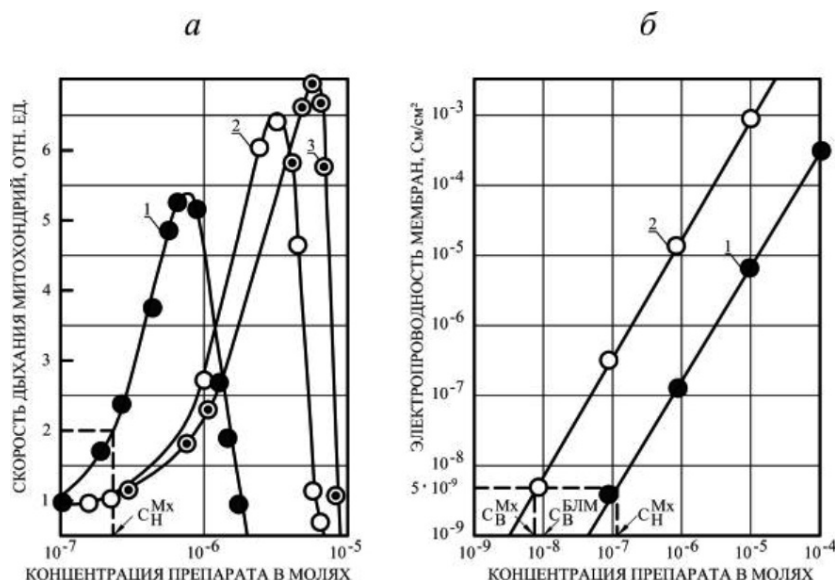


Рис. 4. а) Зависимость относительной скорости дыхания Mx от концентрации тегалида в суспензии при 2 мг/мл (кривая 1), 6 мг/мл (2) и 8 мг/мл (3) белка. Показано, как находили номинальную концентрацию тегалида в среде C_{H}^{Mx} , увеличивающую скорость дыхания Mx в 2 раза. Состав среды указан в методах. За 1 принята скорость дыхания без тегалида. б) Индуцируемая протонная проводимость в БЛМ из ОЛБМ (20 мг/мл в *n*-декане) как функция концентрации тегалида в присутствии 2 мг/мл белка Mx (кривая 1) и в отсутствии Mx (кривая 2). C_{B}^{Mx} – контроль без препарата с добавлением Mx (кривая 2). Показано, как находили концентрацию тегалида в среде, индуцирующую в БЛМ протонную проводимость $5 \cdot 10^{-9} \text{ ом}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ в присутствии Mx (C_{H}^{Mx}) и в их отсутствии ($C_{B}^{БЛМ}$). Среда: 0,3 М сахараза, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-НСl, рН 7,5

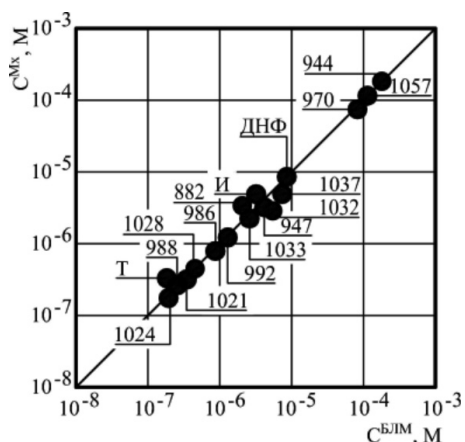


Рис. 5. Корреляция протонофорной активности ЗСА на БЛМ и разобщающей – на Mx . По оси ординат – концентрация препаратов, стимулирующая скорость дыхания Mx в состоянии 4 в 2 раза, по оси абсцисс – концентрация ЗСА, индуцирующая электропроводность G_m БЛМ $5 \cdot 10^{-9} - 10^{-9} \text{ См/см}^2$. На рисунке обозначены: И – ионил, Т – тегалид, ДНФ – динитрофенол

Измерение структурных перестроек мембран в присутствии ЗСА

Было показано, что высокоактивные ЗСА в концентрациях $10^{-6} - 10^{-4}$ М и менее активные

препараты при более высоких концентрациях, снижали микровязкость теней эритроцитов на 0,5–2,0 сПз, что свидетельствует об их способности изменять структуру и трансмембранную проницаемость мембран в отличие от малоэффективных на БЛМ ЗСА, не изменяющих этот параметр. Значительное снижение микровязкости более чем на 2 сПз наблюдалось для препаратов, наиболее значительно увеличивающих G_m БЛМ, или при увеличении их концентраций выше, чем 10^{-4} М, в этом случае некоторые из них становились токсичными. С уменьшением микровязкости сопряжено понижение температуры фазового перехода липидов на 5–8°C или его исчезновение [3, 7]. В других опытах был отмечен различный характер тушения водой флуоресценции зондов ДМХ и 2,6-ТНС, располагающихся в различных частях мембраны теней эритроцитов. Был сделан вывод о том, что тегалид и другие ЗСА вызывают структурные перестройки липидной фазы, позволяющие им преодолеть барьер на границе мембрана/среда и проникнуть вглубь мембраны, в результате может увеличиваться их протонофорное и разобщающее действие [8].

Антиоксидантная активность (АОА) ЗСА

Была исследована АОА при воздействии ЗСА с различной разобщающей активно-

стью на перекисное окисление липидов. Препарат Г-889, содержащий ОН-группу, но не имеющий галогенных заместителей, являющийся малоактивным протонофором на БЛМ и разобшителем на Мх, проявлял высокую АОА при концентрации $2 \cdot 10^{-5}$ М, как и классический антиоксидант ионол при сходной концентрации 10^{-5} М [5]. Некоторые исследованные ЗСА с низкой разобщающей активностью (Г-1057, Г-970) и препараты ЗСА с высокой разобщающей эффективностью при их очень низких концентрациях $< 10^{-8}$ М также проявляли существенную АОА. Нами была обнаружена обратная взаимосвязь протонофорной разобщающей активностей и АОА представленных ЗСА, также другой группы ЗСА [5] и препаратов ДОК [12], она обусловлена различным влиянием на них диссоциации протона ОН-группы, зависящей от галогенных и других заместителей. При увеличении его диссоциации протонофорная разобщающая эффективность ЗСА повышается, а АОА уменьшается из-за снижения их способности окислять ОН-группы в кетогруппы и отдавать отрицательно заряженные электроны перекисным свободным радикалам. Классический разобшитель 2,4-ДНФ в высоких концентрациях 10^{-5} – 10^{-4} М не проявлял АОА [5]. Вероятно некоторые ЗСА, являющиеся слабоэффективными протонофорами, могут также действовать как природные АО через внутриклеточные редокс-системы, индуцируя экспрессию ядерного фактора Nrf2, активирующего гены АО защиты организма [15].

*Практическое применение ЗСА
и других разобшителей ОФ*

Соединения с высокой АОА и низкой разобщающей активностью, которые называют «мягкими» разобшителями, могут быть эффективными терапевтическими препаратами при широком круге заболеваний, при восстановлении последствий воздействия облучения и других внешних факторов. Такие препараты снижают количество образующихся при патологиях токсичных активных форм кислорода (АФК) [16]. Частичное разобшение ОФ исследованными препаратами ЗСА также может снижать образование в Мх АФК, которые играют одну из ключевых ролей в индукции митохондриальных пор [17]. Главным активатором поры является кальций, поглощаемый митохондриями, при этом чувствительность к катиону многократно увеличивается при окислительном стрессе, образование поры приводит к дополнительной генерации АФК и сопровождается различными патологическими состояниями, вызывая в конечном

итоге клеточную гибель [18]. Поскольку Мх являются одним из основных источников АФК при воздействии различных неблагоприятных внешних факторов и при патологиях [18, 19], применение митохондриально-адресованных антиоксидантов и «мягких» природных разобшителей ОФ увеличивает эффективность терапии и профилактики различных патологий [16, 17]. В качестве таких соединений нами могут быть предложены природные протонофоры (кверцетины, рутин, эпигаллокатехин, эхинохром, убихинон), классические антиоксиданты (ионол, токоферол, мексидол) и синтетические двухосновные кислоты с ОН-группами в 4 положении бензольных колец [3, 12]. Показано участие аспартат/глутаматного переносчика и АТФ/АДФ антипортера при разобщении ОФ свободными жирными кислотами в Мх ткани бурого жира зимнеящих сусликов, способствующему теплообразованию при холодовом стрессе [20], при этом снижается скорость фосфорилирующего и разобщенного дыхания, их общего метаболизма [21]. Регулирует состояние спячки у животных соотношение уровня серотонина и норадреналина. Эндогенными разобшителями являются гормоны щитовидной железы, экзогенными – водорастворимые растительные соединения из класса флавонолов [3, 7, 12].

Высокая протонофорная активность на БЛМ из липидов печеночных фасциол и разобщающее действие на Мх паразитов, как было показано нами ранее, являются основными отличиями молекулярного механизма действия фирменных антипаразитарных препаратов (нитроксинил, салициланилиды тегалид, никлозамид, рафоксанид), двухосновных серосодержащих кислот (битионол и др.) [5, 6], ЗСА (другая группа структурных аналогов тегалида) [3, 5]. Была подтверждена возможность использования БЛМ и Мх для скрининга и направленного синтеза новых, более эффективных и менее токсичных противопаразитарных препаратов по их активности на БЛМ и Мх [3, 6]. Препараты диамфенетид и производные ацемидофена проявляют фасциолоцидный эффект по другому механизму. Некоторые ЗСА (Г-1025, Г-1042, Г-1079) проявляли более высокую протонофорную и разобщающую активность, чем фирменные препараты (нитроксинил, фасциолид) [3, 5]. Нами было выяснено, что показателем токсичности может являться величина площади между графиками зависимости электропроводности БЛМ из липидов паразита и хозяина от концентрации препаратов в растворе (10^{-10} – 10^{-6} М): чем эта площадь меньше, тем

более токсичен препарат [5, 6]. Наиболее активные протонофоры и разобщители ОФ из класса исследованных ЗСА (тегалид, Г-1025, Г-1042) [3] и ДОК (битионол, галосфен, сульфен) [6] в нетоксичных концентрациях были нами предложены как перспективные эффективные антипаразитарные (противофасциозные) препараты, ЗСА – также бактерицидного, фунгицидного, радиопрофилактического действия [3, 5, 8].

Заключение

В работе впервые изучено действие большой группы фенольных соединений (16 препаратов) из класса ЗСА. Высокие коэффициенты распределения мембрана/среда более 10^4 – 10^5 указывали на то, что исследованные ЗСА являются мембранотропными соединениями и влияют на их структурные и функциональные свойства. Показано, что эффективность этих веществ на молекулярном уровне, проявляющаяся в протонофорной активности на БЛМ и разобщающем действии на ОФ в мембранах Мх, различна и зависит от их химической структуры. Указанные активности зависели от наличия гидроксильной группы ОН, количества, вида и места положения заместителей (I, Br, Cl, NH, NO₂, CH₃, CH(CH₃)₂, COOCH₃) в бензольных кольцах. Галогенные заместители, находящиеся вблизи от ОН-группы, увеличивали активность ЗСА на БЛМ и Мх путем увеличения диссоциации протона гидроксильной группы за счет притягивания электронного облака атома водорода ОН-группы через систему простых связей углерода и кислорода вследствие отрицательного индукционного эффекта, располагаясь в следующем порядке: I > Br > Cl. Этот принцип известен в химии для различных соединений, в том числе из класса ДОК и ЗСА. В результате экранирование ОН-группы электронами уменьшается, протон этой группы становится более подвижным и свободным. Метильные группы не в состоянии оказывать такое воздействие, как галогенные заместители, которые могут увеличивать также лабильность протона аминогруппы (Г-1024). Два дополнительных бензольных кольца способствовали, вероятно, увеличению растворимости препаратов в мембране, более высокой протонофорной и разобщающей активности препаратов. Была установлена корреляция протонофорного действия на БЛМ и разобщающей эффективности на Мх печени крыс для большинства исследованных соединений ЗСА, с учетом высокого коэффициента распределения мембрана/среда 10^4 – 10^5 и поглощения мембранами Мх препаратов с дополнительными бензольными кольца-

ми, указывающая на протонофорный механизм разобщения ОФ. Эффективность разобщения процессов дыхания и образования энергии в Мх определяли по концентрации препарата из класса ЗСА, увеличивающей скорость дыхания в 2 раза, величине снижения трансмембранного потенциала и дыхательного контроля.

С помощью флуоресцентного зонда ДФГТ было выяснено, что чем в большей степени увеличивалась трансмембранная проницаемость мембран БЛМ для протонов и чем более активным было влияние соединений ЗСА на дыхание Мх, тем больше снижалась микровязкость мембран. Опыты с зондами ДМХ и 2,6-ТНС также подтвердили, что эти соединения способствуют структурным перестройкам липидов, благодаря которым они проникают вглубь мембраны и способствуют проявлению разобщающих свойств на Мх.

Молекулярный разобщающий механизм действия ЗСА влияет на клеточные процессы. Он проявляется в увеличении скорости потребления кислорода митохондриями из внешней среды в полярографической ячейке, что, по всей вероятности, приводит к снижению концентрации кислорода в клетке и возникновению внутриклеточной гипоксии. Разобщение ОФ соединениями ЗСА приводит к снижению синтеза АТФ в Мх, в результате наблюдалось временное угнетение метаболизма и скорости пролиферации клеток, показанное в опытах на синхронной многоядерной культуре миксомицета *Fisarum polycephalum*, способствующее снижению количества активных форм кислорода и свободных радикалов органических молекул, образующихся и повреждающих клеточные структуры при различных патологиях.

Исследованные соединения ЗСА по молекулярному механизму относятся к группе липофильных классических протонофорных разобщителей ОФ с лабильным протоном в ОН или NH-группах. Такие разобщители проявляют различные фармакологические свойства, зависящие от их протонофорной разобщающей активности на Мх. Эффективность их действия на молекулярном и организменном уровне зависит от их химической структуры (количества бензольных колец, количества и свойств заместителей), концентрации в среде коэффициентов диссоциации и распределения мембрана/среда, подвижности в мембране заряженных диссоциированных форм, донорно-акцепторных свойств, эти данные позволяют вести целенаправленный синтез более эффективных и менее токсичных препаратов.

Автор приносит благодарность за оформление и обсуждение результатов к.б.н. Н.Л. Кожокару.

Список литературы

1. Архипов И.А. Антигельминтики: фармакология и применение. М., 2009. 406 с.
2. А.с. 697500 СССР. Салициланилиды, обладающие антигельминтной активностью / Михайлицын Ф.С., Гицу Г.А., Бехли А.Ф., Русак Л.В., Кротов А.И., Шведова В.И., Найденова В.И., Лычко Н.Д., Гладких В.Ф. (СССР). 2456106/24-04; заявлено 14.02.1977; опубл. 15.11.79. Бюл. 42.
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. Москва, 1992. 88 с.
4. Москалева Е.Ю., Перевозчикова В.Г., Жирник А.С., Северин С.Е. Молекулярные механизмы противоопухолевой активности никлосазида // Биомедицинская химия. 2015. Т. 61. № 6. С. 680–693. DOI: 10.18097/PBMC20156106680.
5. Кожокару А.Ф., Гъбев Е.Е. Изучение молекулярного механизма действия некоторых фирменных и новосинтезированных фасциолоцидов на искусственные и биологические мембраны. Пушино: НЦБИ АН СССР, 1983. 36 с.
6. Кожокару А.Ф. Исследование механизма действия фасциолоцидов с помощью бимолекулярных фосфолипидных мембран: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Москва, 1976. 32 с.
7. Кожокару А.Ф. Бислойные липидные и нативные мембраны как тест-системы для исследования природных и синтетических фенольных соединений // Липидология – наука XXI века: материалы I Международной научно-практической Интернет-конференции. Казань: ИП Синяев Д.Н., 2014. С. 119–131.
8. Кожокару А.Ф. Молекулярные и клеточные механизмы радиозащитного действия салициланилидов при их воздействии до γ -облучения лабораторных животных в сублетальных и летальных дозах // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2019. № 8. С. 14–24.
9. Трошина Н.Б., Яруллина Л.Г., Валеев А.Ш., Максимов И.В. Индукция салициловой кислотой устойчивости пшеницы к *Septoria nodorum* Berk // Известия РАН. Серия биологическая. 2007. № 5. С. 545–550.
10. Кулешова Л.Г., Гордиенко Е.А., Коваленко И.Ф. Проницаемость плазматических мембран изолированных гепатоцитов крыс для молекул диметилсульфоксида // Биофизика. 2014. Т. 59. № 3. С. 474–480.
11. Кожокару А.Ф., Чертищев В.В., Фомкина М.Г. Исследование ионной проницаемости и структурных перестроек биомембран под влиянием различных физических, химических и фармакологических факторов // Материалы 5-ой научной Конференции молодых ученых Казанского Института биологии КФАН СССР. Деп. № 2888-B86 ВИНТИ от 21.04.1986. С. 100–104.
12. Кожокару А.Ф. Протонофорное и антиоксидантное действие природных флавоноидов, синтетических серусодержащих двухосновных кислот и других фенольных соединений // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2014. № 11–1. С. 39–49.
13. Топалы Э.Е. Корреляция протонофорной активности разобщителей с их влиянием на параметры окислительного фосфорилирования: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пушино, 1981. 14 с.
14. Рыбакова С.Р., Дубинин М.В., Самарцев В.Н. Особенности активации свободного окисления в митохондриях печени тетрадекандиолевой кислотой // Биологические мембраны. 2013. Т. 30. № 1. С. 30–39.
15. Попов А.М., Осипов А.Н., Корепанова Е.А., Кривошапко О.Н., Артюков А.А., Климович А.А. Изучение антиоксидантной и мембранотропной активности лютеолина с использованием различных модельных систем // Биофизика. 2016. Т. 61. № 6. С. 1079–1087.
16. Скулачев В.П., Скулачев М.В., Зиновкин Р.А., Северин Ф.Ф., Антоненко Ю.Н., Зоров Д.Б., Плотников Е.Ю., Исаев Н.К., Силачев Д.Н., Кнорре Д.А. Мягкие катионные митохондриальные разобщители // Патент РФ № 2527519. Патентообладатель ООО «Митотех». 2011. № публикации WO/2011/162633.
17. Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Усатикова Э.Е., Певзнер И.Б., Бабенко В.А., Гуляев М.В., Пирогов Ю.А., Антоненко Ю.Н., Плотников Е.Ю., Зоров Д.Б. Митохондрии как мишень для нейропротекции // Биологические мембраны. 2015. Т. 32. № 5–6. С. 388–398. DOI: 10.7868/S0233475515050138.
18. Харечкина Е.С., Никифорова А.Б. Механизмы генерации активных форм кислорода при пермеабилзации митохондриальных мембран // Современные проблемы науки и образования. 2018. № 4. [Электронный ресурс]. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=27719> (дата обращения: 27.08.2019).
19. Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. Генерация активных форм кислорода митохондриями // Успехи биологической химии. 2013. Т. 53. С. 245–296.
20. Комелина Н.П. Исследование роли разобщающих белков (UCP) и других митохондриальных белков-переносчиков в терморегуляторном разобщении дыхания митохондрий печени и скелетных мышц сусликов (*SPERMOPHILUS UNDULATUS*): автореф. дис. ... канд. биол. наук. Пушино, 2011. 26 с.
21. Комелина Н.П., Польская А.И., Амерханов З.Г. Искусственная гипотермия у крыс, в отличие от естественной гибернации у сусликов *Spermophilus undulates*, не сопровождается ингибированием дыхания митохондрий печени // Биологические мембраны. 2015. Т. 32. № 5–6. С. 352–362. DOI: 10.7868/S0233475515050060.