

## НОВЫЙ КАТИОННЫЙ МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ РАЗОБЩИТЕЛЬ C<sub>4</sub>R1 ЭФФЕКТИВЕН В БОРЬБЕ С ОЖИРЕНИЕМ У МЫШЕЙ

© 2015 А.В. Калинович<sup>1,2\*</sup>, И.Г. Шабалина<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Стокгольмский университет, Институт им. Веннера Грена, отдел молекулярно-биологических наук, Швеция, Стокгольм; факс: +46 8 164209, электронная почта: anastasia.kalinovich@su.se, irina.shabalina@su.se*

<sup>2</sup> *Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва*

Поступила в редакцию 19.01.15

После доработки 30.01.15

Ожирение ассоциируется с преждевременной смертностью, пониженным качеством жизни и большими затратами на поддержание здоровья, однако эффективность его терапии в настоящее время крайне низка. Целью данной работы стало изучение влияния нового митохондриального катионного разобщителя C<sub>4</sub>R1 (производного родамина 19) на ожирение у мышей линии C57Bl/6, которые в течение восьми недель содержались на жировой диете в термонеutralных условиях. Экспериментальная группа мышей принимала C<sub>4</sub>R1 в питьевой воде последовательно в двух дозах (30 и 12–14 мкмоль/кг в сутки) в общей сложности в течение 30 дней. Действие препарата зависело от дозы. Через шесть дней после приема C<sub>4</sub>R1 в дозе 30 мкмоль/кг в сутки потребление пищи уменьшилось на 68%, масса тела – на 19%, масса жировой компоненты тела – на 21%. Потеря веса объяснялась как сниженным потреблением пищи, так и ускоренным метаболизмом, вероятно, вследствие разобщения митохондрий. Уменьшение жировой компоненты массы тела под воздействием C<sub>4</sub>R1 сопровождалось снижением дыхательного коэффициента до максимально низкого уровня (0,7). Примечательно, что классический разобщитель 2,4-динитрофенол при суточной дозе 27 мкмоль/кг массы тела не изменял изучаемые параметры. Наша работа вносит вклад в поиск митохондриальных разобщителей как эффективных препаратов в борьбе с ожирением.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** катионный митохондриальный разобщитель, 2,4-динитрофенол, ожирение, скорость метаболизма, энергозатраты.

Количество людей, страдающих ожирением, значительно выросло в течение последних десятилетий – в настоящее время более миллиарда взрослых и детей имеют избыточную массу тела. Ожирение играет существенную роль в развитии многих патологий, таких как диабет, гиперлипидемия, сердечно-сосудистые заболевания и рак [1, 2]. Ожирение можно преодолеть либо повышая энергозатраты с помощью увеличения физической активности и/или теплопродукции, либо уменьшая поступление энергии (пищи). Многочисленные диеты могут успешно снижать массу тела и быть полезными для здоровья в це-

лом, однако более 90% пациентов в конечном итоге набирают потерянный вес [2, 3]. Фармакологическое лечение может стать долгожданным способом преодоления ожирения и его осложнений в тех случаях, когда не удается контролировать вес с помощью физических нагрузок и ограничения питания.

Митохондриальные разобщители окислительного фосфорилирования рассматриваются в качестве возможных средств терапии ожирения [1, 4, 5]. Разобщитель 2,4-динитрофенол (ДНФ) использовался для этой цели в 30-х годах прошлого столетия [6, 7], однако вскоре был запрещен из-за высокой токсичности. ДНФ представляет собой слабую кислоту, которая действует в качестве протонатора: проникая через мембрану внутрь митохондрий в нейтральной протонированной форме, он теряет протон и возвращается в анионной форме, используя энергию трансмембранного потенциала. Таким

Принятые сокращения: ДНФ – 2,4-динитрофенол; МРТ – магнитно-резонансная томография; ДК – дыхательный коэффициент; C<sub>4</sub>R1 – производное родамина с короткой алкильной цепью; UCP1 – разобщающий белок 1 (uncoupling protein 1).

\* Адресат для корреспонденции.

образом, ДНФ увеличивает протонную проводимость мембраны митохондрий и энергозатраты организма [8–10].

В настоящее время ДНФ широко используется как модельный препарат для изучения влияния митохондриального разобщения на энергетический баланс в организме, митохондриальные механизмы адаптации, механизмы развития окислительного стресса и старение [9–13]. Длительное применение низких доз ДНФ уменьшало массу тела подопытных мышей, нормализовывало содержание глюкозы, триглицеридов и инсулина в крови и увеличивало продолжительность жизни [11]. В другом исследовании положительный эффект ДНФ на массу тела и метаболические параметры подтвердился, однако также было показано отрицательное действие препарата на сократительную активность скелетной мускулатуры [9]. В экспериментах на выделенном сердце низкие концентрации ДНФ вызывали значительное укорочение интервала QT на электрокардиограмме и мерцание желудочков сердца [14]. Подобные побочные эффекты в отношении жизненно важных органов в сочетании с узким терапевтическим диапазоном концентраций (небольшой разницей между эффективной и летальной дозами [6, 15]) исключают ДНФ из списка препаратов для борьбы с ожирением [16].

За последние годы были разработаны альтернативные катионные разобщители [17, 18], в т.ч. производные родамина 19 [19, 20]. Положительный заряд позволяет им целенаправленно поступать в митохондрии. Кроме того, действие данных разобщителей линейно зависит от величины мембранного потенциала, т.е. является саморегулирующимся [21]. Благодаря такой саморегуляции, а также способности специфически накапливаться в митохондриях и, предположительно, низкой токсичности новые катионные разобщители рассматриваются в качестве перспективных средств для лечения ожирения.

Производное родамина с длинной алкильной цепью,  $C_{12}R1$ , увеличивает протонную проводимость искусственных липидных мембран и разобщает окислительное фосфорилирование в изолированных митохондриях и целых клетках [19, 20]. Другое производное родамина с более короткой алкильной цепью,  $C_4R1$ , обладает, напротив, низкой протонофорной активностью на искусственных липидных мембранах, однако разобщает митохондрии даже более эффективно, чем  $C_{12}R1$  [20].

Целью данного исследования стало изучение действия нового катионного разобщителя  $C_4R1$  *in vivo* на склонных к ожирению мышах линии C57Bl/6, содержащихся на диете с высоким со-

держанием жира в термонейтральных условиях (30°). Известно, что мыши, живущие при низкой температуре окружающей среды, активно вырабатывают тепло для поддержания нормальной жизнедеятельности [22, 23], и эта дополнительная теплопродукция маскирует эффект разобщителя [10, 24]. Довольно часто препараты, направленные на борьбу с ожирением, снижают потребление пищи. Игнорирование этого фактора приводит к преувеличению роли повышенных энергозатрат в снижении веса [25, 26]. С целью различения эффектов препарата, зависящих и независящих от потребления пищи, в наш эксперимент была дополнительно включена группа мышей попарного кормления. Задачей данного исследования было также сравнение обнаруженных эффектов  $C_4R1$  с эффектами классического разобщителя ДНФ. Известно, что ДНФ разобщает митохондрии в концентрации, в 10 раз большей, чем  $C_4R1$  ([20] и [27] для сравнения). Однако данные о действующей дозе ДНФ *in vivo* очень противоречивы (эффективные дозы отличаются в 1000 раз [9, 11]). В нашей работе мы изучили действие ДНФ в дозе, сравнимой с дозой  $C_4R1$ .

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Содержание животных.** В исследовании было использовано 30 самцов мышей линии C57Bl/6J возраста 7–8 недель (на начало эксперимента). Мыши содержались в термонейтральных условиях (30°) и получали диету с высоким (45%) содержанием жира (D12451, «Research Diets Inc.», США) в течение восьми недель до начала эксперимента, чтобы вызвать ожирение, и на протяжении всего эксперимента. Свет в комнате с животными включался в 8.00 утра и выключался в 20.00. Мыши содержались поодиночке в индивидуальных клетках с добавлением опилок, наличием картонного цилиндра для укрытия и бумаги. Эксперимент одобрен комитетом по этике г. Стокгольм.

**Назначение  $C_4R1$ , ДНФ и измерение основных физиологических параметров.** Перед началом эксперимента с  $C_4R1$  мыши были разделены на три группы согласно массе тела и массе жировой компоненты массы тела: пять мышей в первой контрольной группе, пять мышей во второй контрольной группе и пять мышей в экспериментальной группе. Экспериментальная группа получала еду *ad libitum* и препарат  $C_4R1$  с питьевой водой.  $C_4R1$  был первоначально растворен в 95%-ном этаноле до концентрации 0,25 М и затем разбавлен в 30 мл питьевой воды до определенной концентрации с учетом веса животного.

Концентрация препарата и продолжительность его потребления варьировали на разных этапах: первый этап продолжался шесть дней, [C<sub>4</sub>R1] = 0,39–0,41 мМ (в зависимости от массы тела животного), второй этап – в течение последующих 16 сут, [C<sub>4</sub>R1] = 0,19–0,21 мМ. На 22-й день эксперимент был прерван на шесть дней и затем возобновился в течение восьми суток, [C<sub>4</sub>R1] = 0,19–0,21 мМ. Первая контрольная группа получала еду *ad libitum* и питьевую воду с соответствующей концентрацией бромида натрия и этанолом (0,08–0,16%), поскольку C<sub>4</sub>R1 был в форме бромида и первоначально растворен в этаноле. Вторая контрольная группа получала питьевую воду с теми же добавками, что и первая контрольная группа, но столько еды, сколько экспериментальные мыши съедали за предыдущие 1–2 дня (так называемое попарное кормление).

Воду меняли каждые 4–5 дней. Количество потребляемой еды и воды измеряли каждые 1–2 дня. Потребление воды использовалось для подсчета дозы препарата (мкмоль/кг массы тела в сутки). Вторая контрольная группа получала суточную порцию еды ежедневно в 20.00 перед началом активного ночного периода, чтобы не нарушать естественные суточные ритмы мышей. По этой же причине потребление пищи, воды и массу тела измеряли каждые 1–2 дня также в 20.00. Состав тела – липидную (жировую) компоненту массы тела и безлипидную (безжировую) компоненту массы тела – измеряли с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) на EchoMRI-100 («EchoMRI», США) дважды до начала эксперимента с назначением C<sub>4</sub>R1, а также непосредственно перед его началом (0-й день), на второй, шестой и пятнадцатый дни эксперимента. Следует подчеркнуть, что жировая компонента массы тела, измеряемая с помощью МРТ, – понятие гораздо более широкое, чем масса жировой ткани. Это общее количество всех липидов тела во всех тканях. Подобно этому безжировая компонента массы тела – более широкое понятие, чем мышечная ткань, включающее в себя белки и углеводы всех тканей организма, цитоплазму клеток и межклеточную жидкость, плазму крови (за исключением липидов плазмы) и др. Другими словами, масса безжировой компоненты массы тела – это масса тела за исключением всех липидов и, возможно, минералов костей.

Эксперимент с ДНФ был проведен отдельно в течение восьми дней. Группы мышей формировались аналогично эксперименту с C<sub>4</sub>R1. ДНФ был первоначально растворен в 95%-ном этаноле до концентрации 0,5 М и затем разбавлен в 30 мл питьевой воды до концентрации 0,39–0,41 мМ

(в зависимости от массы тела животного). Бутылки с водой и растворенным в ней ДНФ были защищены от света. Контрольные мыши получали 0,07–0,1% этанола в питьевой воде. Остальные условия – как в эксперименте с C<sub>4</sub>R1.

**Непрямая калориметрия.** Мыши из эксперимента с C<sub>4</sub>R1 в течение первых двух, седьмого и шестнадцатого дней эксперимента были помещены в метаболические камеры («Somedic INCA», Швеция) для измерения газообмена с помощью непрямой калориметрии. Мыши из эксперимента с ДНФ были помещены в метаболические камеры на седьмой день применения препарата. Перед каждым использованием камер кислородный анализатор на основе оксида циркония калибровали с помощью двух смесей кислорода в азоте (18 и 25%). Содержание углекислого газа измеряли с помощью двухканального инфракрасного датчика (модель 0633-1240, «Testo», Германия), соединенного с эталонным инструментом (модель Testo 650, «Testo», Германия). Датчик углекислого газа был откалиброван с помощью двух смесей углекислого газа в азоте (0,02 и 0,2%). Объем метаболических камер составлял 4 л. Воздух подавался в камеру со скоростью 1 л/мин. Воздух, выходящий из камеры, проходил сквозь силикагель (гранулы диаметром 2 мм с диаметром пор 0,3 нм; «Merck», Германия) для просушки. Каждые 2 мин во входящем и исходящем воздухе измеряли содержание кислорода и углекислого газа, поглощение кислорода и выделение углекислого газа рассчитывали как разницу между концентрациями газов в этих двух пробах. Скорость метаболизма в покое определяли как минимальную стабильную в течение 10–15 мин скорость поглощения кислорода. Дыхательный коэффициент (ДК) был рассчитан как отношение скорости выделения углекислого газа к скорости поглощения кислорода. Энергозатраты определяли с помощью уравнения Вейра и нормализовывали на массу безжировой компоненты массы тела:

$$\begin{aligned} \text{Энергозатраты} \\ (\text{мВт/г безжировой компоненты массы тела}) = \\ = (16,3 \times V_{O_2} + 4,57 \times V_{CO_2}) \times 1000 / (60 \times m), \end{aligned}$$

где  $V_{O_2}$  – скорость поглощения кислорода,  $V_{CO_2}$  – скорость выделения углекислого газа,  $m$  – масса безжировой компоненты массы тела.

**Статистический анализ.** Все результаты представлены как средние значения  $\pm$  стандартные ошибки среднего. Данные были обработаны в программе KaleidaGraph (версия 4.5.2). Непарный  $t$ -тест Стьюдента с неравными дисперсиями был использован для расчета статистической значимости,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Динамика потребления пищи и веса тела мышей.** Мыши, получавшие  $C_4R1$ , пили несколько меньше воды, чем контрольные мыши обеих групп (рис. 1, а). Данный эффект не был связан со сниженным потреблением пищи, поскольку потребление воды мышами второй контрольной группы (с попарно ограниченным питанием) не изменялось. Возможность того, что мышам не нравился вкус  $C_4R1$ , и это заставляло их отказываться от воды, должна быть проверена с помощью теста личных предпочтений. С учетом потребления воды была рассчитана фактическая доза  $C_4R1$ , полученная мышами (рис. 1, б).

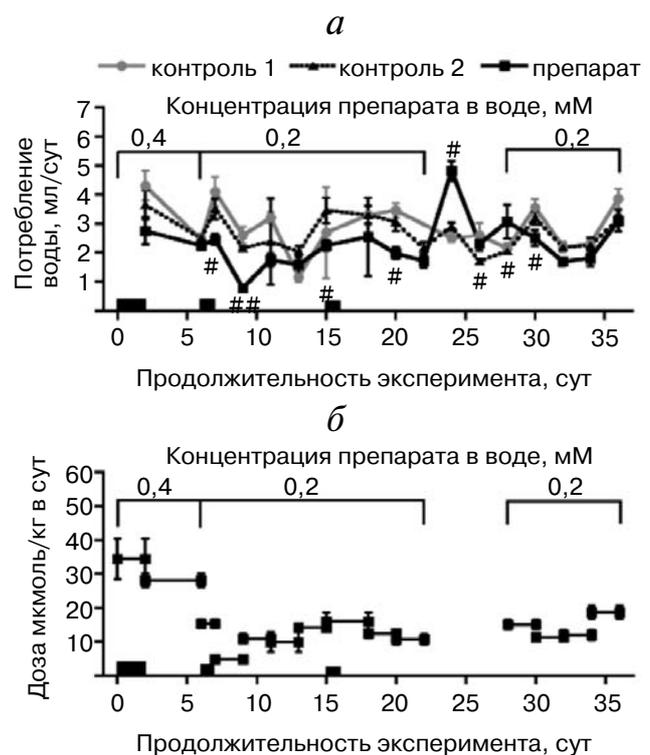
На рис. 2 представлена динамика потребления пищи и массы тела. Следует отметить, что изучение действия  $C_4R1$  на аппетит не являлось задачей данного исследования. В течение первых шести дней средняя суточная доза  $C_4R1$ , получаемая мышами, составляла 30 мкмоль/кг массы тела (рис. 1, б). Эксперимент начался в 20.00 первого дня (соответствует времени 0 на графиках), когда мыши впервые получили воду с  $C_4R1$  или с бромидом натрия и этанолом. В это же время мыши были помещены на два дня в метаболические камеры. Новое окружение вызвало у животных стресс и привело к небольшому снижению массы тела и потребления пищи во всех группах. Потребление пищи в эти дни существенно не различалось между группами, однако экспериментальные мыши потеряли значительно больше веса, чем мыши обеих контрольных групп.

В период между вторым и шестым днями мыши были перемещены из метаболических камер в стандартную комнату. Потребление пищи и масса тела контрольных животных восстановились. Потребление пищи экспериментальными мышами и, соответственно, мышами второй контрольной группы с попарно ограниченным питанием продолжало снижаться, что приводило к потере веса. Однако экспериментальные мыши потеряли за эти четыре дня в 2 раза больше веса, чем мыши с ограниченным питанием (2,54 и 1,24 г соответственно), несмотря на одинаковое количество съеденной еды.

На шестой день потребление пищи у большинства экспериментальных мышей сократилось до 0,5–0,8 г/сут (что составляет 20–30% обычного суточного рациона) без признаков стабилизации. Согласно требованиям комитета по этике экспериментов на животных такое снижение потребления пищи было признано критическим, и с целью предотвращения излишнего воздействия на здоровье мышей концентрация  $C_4R1$  в питьевой воде была уменьшена вдвое. Средняя получаемая доза  $C_4R1$  в пери-

од с 7 по 22-й день составляла 12 мкмоль/кг в сутки. Одновременно со сменой концентрации препарата в 20.00 седьмого дня мыши были помещены в метаболические камеры на 24 ч.

Подобно первым двум дням в камерах потребление пищи и масса тела контрольных мышей несколько уменьшилось. Оба параметра продолжали снижаться в экспериментальной группе без видимого ускорения, вызванного переносом в метаболические камеры. Мыши второй контрольной группы с попарно ограниченным питанием, подобно животным первой контрольной группы, теряли вес вследствие стресса от метаболических камер.



**Рис. 1.** Потребление воды (а) и полученная мышами доза  $C_4R1$  (б). а – потребление воды измеряли каждые 2–3 дня. Каждая точка на графике обозначает потребление воды (мл/сут) в течение предшествующего периода измерения; б – полученная мышами доза  $C_4R1$  (мкмоль/кг в сутки) была рассчитана с учетом выпитой ими воды (см. рис. 1, а). Три группы мышей обозначены как *контроль*, *контроль 2* (группа с попарно ограниченным кормлением) и *препарат* (экспериментальная группа, потребляющая  $C_4R1$  с питьевой водой). Отсчет времени – от начала приема препарата. Периоды нахождения мышей в метаболических камерах обозначены черными прямоугольниками на оси X,  $n = 5$  для каждой группы. Точки на графике представляют собой средние значения  $\pm$  стандартные ошибки. Символы # и ## обозначают статистически значимые различия между группами *препарат* и *контроль 2*,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно. Для удобства восприятия статистически значимые различия указаны только между этими двумя группами

В период с шестого по девятый день потребление пищи стабилизировалось. Параллельно с этим масса тела мышей второй контрольной группы также стабилизировалась. Однако масса тела экспериментальных мышей продолжала снижаться в течение этих трех дней.

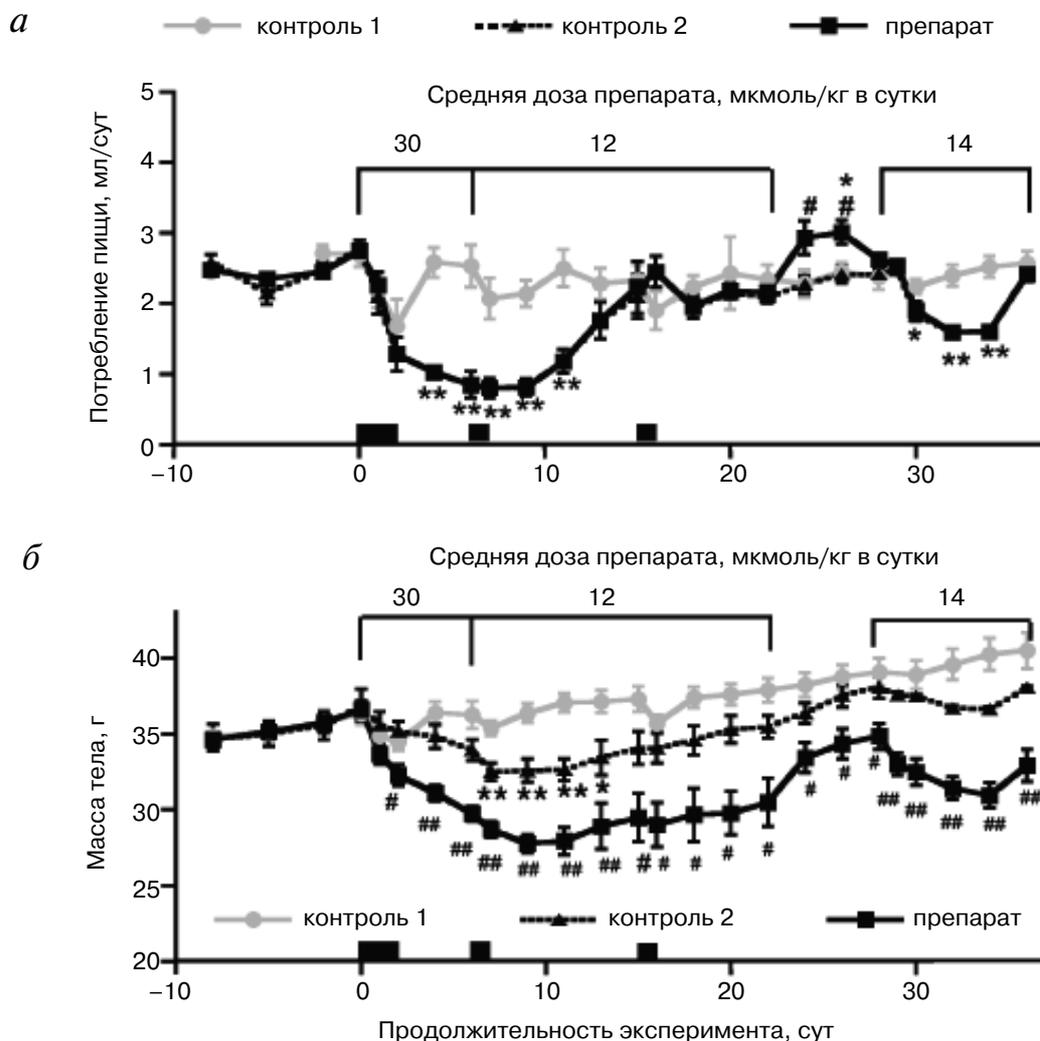
В период с 9 по 15-й день потребление пищи экспериментальными мышами стало спонтанно возрастать, несмотря на постоянный прием препарата C<sub>4</sub>R1. Параллельно приему пищи масса тела экспериментальных мышей и контрольных мышей с попарно ограниченным питанием сначала стабилизировалась на минимальном уровне, а затем стала увеличиваться. На этом этапе с момента начала эксперимента контрольные мыши с ограниченным питанием потеряли 11%

массы тела, в то время как экспериментальные (потребляющие C<sub>4</sub>R1) – 24% массы тела.

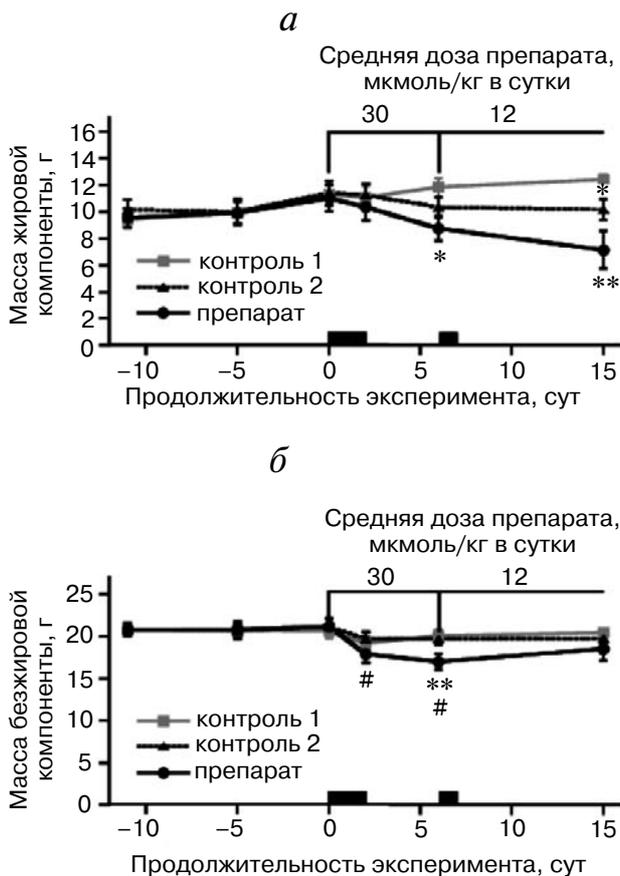
На 15-й день, когда потребление пищи экспериментальными мышами полностью восстановилось, мыши были помещены в метаболические камеры на 24 ч.

В период с 15 по 22-й день потребление пищи экспериментальными мышами стабилизировалось на уровне контрольных мышей. Однако масса их тела была все еще значительно ниже, чем мышей обеих контрольных групп.

На 22-й день эксперимент был прерван на шесть дней, все мыши получили обычную питьевую воду. Непосредственно сразу после этого мыши экспериментальной группы стали потреблять на 35% больше пищи по сравнению с



**Рис. 2.** Эффекты C<sub>4</sub>R1 на потребление пищи (а) и массу тела мышей (б). а – потребление пищи измеряли каждые 2–3 дня, как указано на рис. 1, а; б – масса тела. Условия и обозначения аналогичны приведенным на рис. 1. Символы \* и \*\* обозначают статистически значимые различия с группой *контроль*, символы # и ## – различия с группой *контроль 2*,  $p < 0,05$  (один символ) и  $p < 0,01$  (два символа)



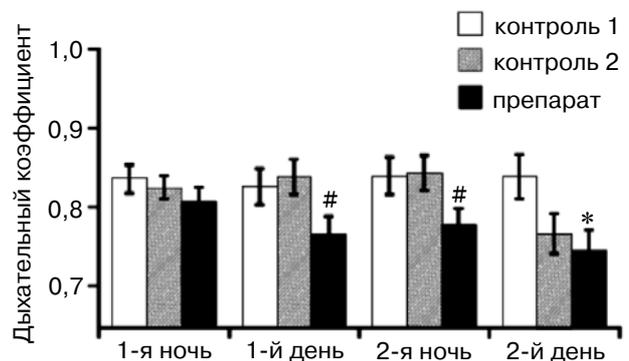
**Рис. 3.** Эффект  $C_4R1$  на состав тела: жировую (а) и безжировую (б) компоненты массы тела. Состав тела определяли с помощью МРТ. Мыши находились в метаболических камерах в течение первых двух дней, а также седьмого дня эксперимента, как это обозначено черными прямоугольниками;  $n = 5$  для каждой группы. Точки на графике представляют собой средние значения  $\pm$  стандартные ошибки. Символы \* и \*\* обозначают статистически значимые различия с группой *контроль*,  $p < 0,05$  и  $p < 0,01$  соответственно; символ # — статистически значимое различие с группой *контроль 2*,  $p < 0,05$

животными первой контрольной группы, имеющими неограниченный доступ к еде. Через четыре дня потребление пищи в экспериментальной группе возвратилось к нормальным значениям. За это время масса тела экспериментальных мышей внезапно возросла на 14%. Подобное быстрое восстановление аппетита и массы тела экспериментальными животными указывает на отсутствие необратимой токсичности  $C_4R1$  и вызванных им поражений пищеварительного тракта. Примечательно, что мыши с ограниченным питанием, которые продолжали получать столько еды, сколько съедали экспериментальные мыши, не увеличили потребление пищи и ели, как животные первой контрольной группы.

На 28-й день после начала эксперимента и через шесть дней «восстановительного» периода начался повторный эксперимент с  $C_4R1$  (доза 14  $\mu\text{моль/кг}$  в сутки), целью которого было проверить действие разобщителя при повторном применении. Как показано на рис. 2, потребление пищи и масса тела мышей экспериментальной группы повторно снизились и затем спонтанно стали возрастать. Однако амплитуда изменений была вдвое меньше, чем в первый раз — если за первые шесть дней первого этапа эксперимента назначение  $C_4R1$  (средняя полученная доза 30  $\mu\text{моль/кг}$  в сутки) привело к снижению потребления пищи на 68% и потере веса на 19% (6,8 г), то за первые шесть дней третьего этапа (средняя полученная доза  $C_4R1$  14  $\mu\text{моль/кг}$  в сутки) — на 38 и 11% (3,8 г) соответственно. Таким образом, во-первых,  $C_4R1$  действует на аппетит и вес тела повторно, несмотря на предшествующее спонтанное восстановление обоих параметров, и, во-вторых, эффекты препарата зависят от дозы.

**Динамика изменений состава тела мышей.** Состав тела измерялся до начала и в течение первого эксперимента (рис. 3). Потеря веса экспериментальными мышами и мышами с ограниченным питанием сопровождалась потерей массы жировой компоненты массы тела (рис. 3, а). За 15 дней эксперимента мыши с ограниченным питанием потеряли в 3 раза меньше жира, чем экспериментальные мыши.

Потребление  $C_4R1$  сопровождалось также потерей массы безжировой компоненты тела (рис. 3, б), более выраженной, чем у мышей второй контрольной группы с попарно ограниченным питанием. Необходимо отметить, что эта разница может объясняться большей потерей воды при похудении, а не только сокращением



**Рис. 4.** ДК в течение первых двух дней потребления  $C_4R1$ . На графике представлены средние значения ( $n = 5$  для каждой группы). Символ \* обозначает статистически значимое различие с группой *контроль*,  $p < 0,05$ ; символ # — с группой *контроль 2*,  $p < 0,05$

содержания белков и углеводов. На 15-й день эксперимента безжировая компонента массы тела была восстановлена.

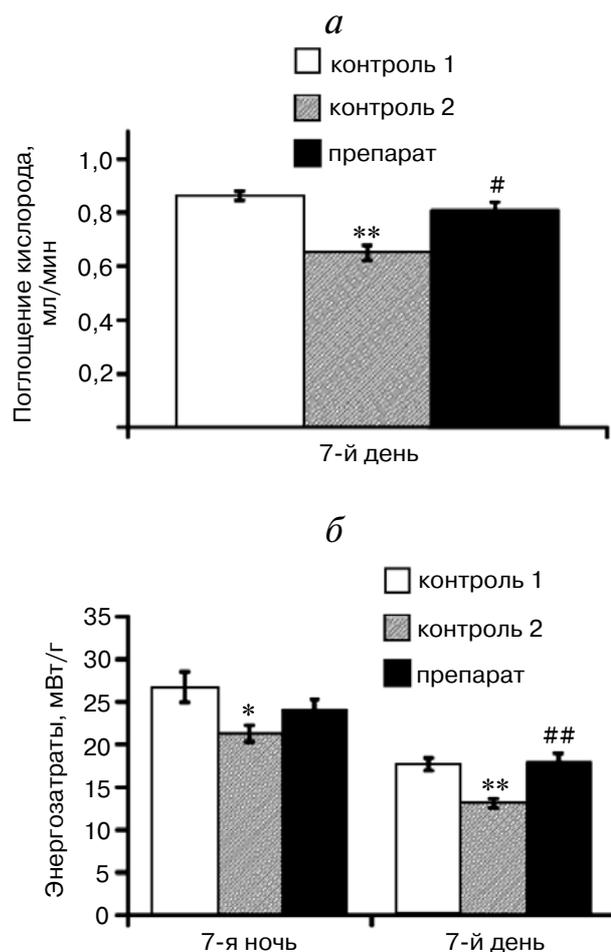
**Динамика изменений метаболизма мышей.** Поглощение кислорода является основным метаболическим параметром, отражающим скорость метаболизма и энергозатраты. Ночью мыши активны и потребляют много кислорода, тогда как в дневные периоды они в основном спят и поглощают гораздо меньше кислорода. За скорость метаболизма в покое была принята минимальная, стабильная в течение 10–15 мин, скорость поглощения кислорода в течение дня. Скорость метаболизма в покое не различалась между тремя группами мышей в первые два дня эксперимента (данные не приведены).

Дыхательный коэффициент (ДК) также является важным метаболическим параметром, значения которого зависят от используемого в данный момент источника энергии (белки, жиры или углеводы). ДК рассчитывается как отношение скорости выделения углекислого газа к скорости поглощения кислорода. По определению теоретические значения ДК могут изменяться между 1 (исключительное использование углеводов) и 0,7 (исключительное использование жиров). Средние значения ДК в ночные и дневные периоды представлены на рис. 4. Значения ДК у контрольных мышей типичны для высокожировой диеты (0,8–0,85 в независимости от времени суток). ДК мышей с ограниченным питанием не отличался от ДК контрольных мышей в первый день эксперимента. Только в конце вторых суток, когда суточный рацион был несколько уменьшен, ДК мышей с ограниченным питанием снизился. Примечательно, что назначение C<sub>4</sub>R1 сопровождалось уменьшением ДК уже через несколько часов после начала эксперимента. Разница с группой ограниченного питания стала статистически значимой уже в первый день, когда потребление еды было еще нормальным. Эти данные хорошо соотносятся с более существенной потерей веса экспериментальными мышами в этот период времени (рис. 2, б) и, вероятно, важны для понимания эффектов C<sub>4</sub>R1, не зависящих от количества потребляемой еды.

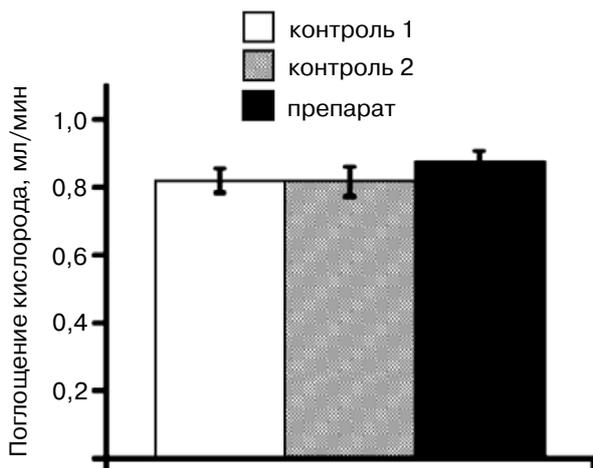
На седьмой день, когда потребление пищи экспериментальными мышами стабилизировалось на минимальном уровне, и масса тела продолжала снижаться, мыши были в очередной раз помещены в метаболические камеры на 24 ч. Поглощение кислорода экспериментальными животными было практически все время выше, чем мышами с попарно ограниченным питанием (данные не приведены). Скорость метаболизма в покое была значительно ниже во второй

контрольной группе (с ограниченным питанием), чем в первой (рис. 5, а), что, вероятно, объясняется низким потреблением пищи. Однако скорость метаболизма в покое у экспериментальных мышей была на 23% выше, чем у мышей с ограниченным питанием, несмотря на одинаковое потребление пищи, и была такой же, как у контрольных животных.

Энергозатраты могут быть рассчитаны на основе газообмена, они пропорциональны объему поглощенного кислорода. Но поскольку коли-



**Рис. 5.** Скорость метаболизма в покое (а) и энергозатраты (б) в течение седьмого дня эксперимента. а – скорость метаболизма в покое, рассчитанная для каждой мыши как минимальная стабильная в течение 10–15 мин скорость поглощения кислорода. Представлены средние значения в каждой группе  $\pm$  стандартные ошибки ( $n = 5$  для каждой группы); б – затраты энергии, рассчитанные с помощью уравнения Вейра и нормализованные на массу безжировой компоненты тела. На рисунке представлены средние значения  $\pm$  стандартные ошибки в ночной и дневной период ( $n = 5$  для каждой группы). Символы \* и \*\* обозначают статистически значимые различия с группой *контроль*, символы # и ## – различия с группой *контроль 2*,  $p < 0,05$  (один символ) и  $p < 0,01$  (два символа)



**Рис. 6.** Эффект ДНФ на скорость метаболизма в покое. Скорость метаболизма в покое была рассчитана на седьмой день приема препарата, как на рис. 5, а. Представлены средние значения в каждой группе  $\pm$  стандартные ошибки ( $n = 5$  для каждой группы). Доза ДНФ составила 27 мкмоль/кг в сутки

чество кислорода, необходимое для сжигания различных источников энергии (жиров, белков, углеводов), не строго пропорционально высвобождающейся при этом энергии, или, другими словами, поскольку энергетический эквивалент кислорода зависит от типа окисляемого субстрата, поглощение кислорода должно быть откорректировано на ДК или выделение углекислого газа. В данном исследовании мы вычисляли энергозатраты с помощью уравнения Вейра и нормализовывали их на массу безжировой компоненты тела, которая является метаболически более активной. Энергозатраты были выше у мышей, принимающих  $C_4R1$ , чем у мышей второй контрольной группы с попарно ограниченным питанием (рис. 5, б).

На 15-й день эксперимента, когда потребление пищи было полностью восстановлено, и масса тела начала увеличиваться, мыши были помещены в метаболические камеры на 24 ч. На этом этапе скорость метаболизма в покое была одинаковой во всех группах мышей (данные не приведены). Значения ДК у экспериментальных мышей и мышей с ограниченным питанием возвратились к контрольному уровню (данные не приведены).

**Эффекты ДНФ на метаболические параметры мышей.** Второй целью данного исследования было сравнение эффектов  $C_4R1$  с эффектами классического разобшителя ДНФ. ДНФ был растворен в питьевой воде подобно  $C_4R1$ . Фактическая доза ДНФ, рассчитанная на основе потребления воды, составила 27 мкмоль/кг в сутки. Прием

ДНФ в этой дозе в течение восьми дней не повлиял ни на потребление воды или пищи, ни на массу тела (данные не приведены) и скорость метаболизма в покое (рис. 6).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы показали, что новый катионный митохондриальный разобшитель  $C_4R1$  эффективен для снижения массы тела у мышей, страдающих ожирением. Попытка экстраполировать полученные результаты на человека затруднена из-за значительных различий в терморегуляции и метаболизме между этими двумя видами млекопитающих. Одной из основных проблем использования мышей в экспериментах по изучению ожирения является существенное повышение их метаболизма в ответ на даже относительно небольшое падение окружающей температуры. Подобное дополнительное теплообразование может маскировать эффекты исследуемых препаратов, действие которых направлено на ускорение метаболизма и борьбу с ожирением [22, 23]. Данная проблема была продемонстрирована в ряде работ [8, 10, 24], где эффекты ДНФ и белка-разобшителя 1 (UCP1) изучались на мышах, содержащих или в термонейтральных условиях (при 30°), или в «стандартных» для вивариев условиях (при 22°). Положительные эффекты ДНФ и UCP1 на ожирение мышей были выявлены только в термонейтральных условиях [8, 10, 24]. Таким образом, температура окружающей среды должна приниматься во внимание при исследовании препаратов, нацеленных на борьбу с ожирением и увеличение энергозатрат. Эксперименты в нашей работе по изучению  $C_4R1$  были проведены в тех условиях, в которых метаболизм человека максимально полно может быть воспроизведен на мышах, а именно при термонейтральных 30° и диете с высоким содержанием жиров и сахаров, идентичной по калорийности западной диете, предрасполагающей к ожирению. Это позволяет предположить, что обнаруженные нами на страдающих ожирением мышах эффекты  $C_4R1$  будут выявлены и у человека.

Нами обнаружены два эффекта  $C_4R1$ . Во-первых, препарат вызвал уменьшение потребления пищи, а во-вторых, ускорение метаболизма в покое. Подобное сочетание двух механизмов действия представляется весьма полезным свойством  $C_4R1$ . Убедительно показано, что политерапия ожирения (т.е. лечение, воздействующее одновременно на несколько механизмов патогенеза) приводит к лучшим результатам, чем односторонняя монотерапия [2]. Подобно

C<sub>4</sub>R1 двумя механизмами действия (уменьшением энергопотребления и увеличением энергозатрат) обладает один из самых востребованных в последние годы препарат сибутрамин, ингибитор обратного захвата моноаминов (норадреналина и серотонина) [28, 29].

Потери веса и жировой компоненты массы тела, вызванные C<sub>4</sub>R1, на разных этапах эксперимента на 25–50% объяснялись сниженным потреблением пищи (вычислялось при сравнении с группой попарно ограниченного кормления). В качестве механизмов снижения потребления пищи можно предположить, что C<sub>4</sub>R1 действует непосредственно на центры насыщения в гипоталамусе или влияет на образование (или на функционирование) гормоноподобных пептидов, влияющих на аппетит. Во многих фундаментальных исследованиях (см. обзор Халфорд с соавт. [30]) был обнаружен целый ряд сигнальных молекул, образующихся в кишечнике (грелин, глюкагонопептидный гормон 1, глюкозозависимый инсулиноотропный полипептид, оксинтомодулин, пептид YY), или поджелудочной железе (инсулин и амилин), или жировой ткани (лептин и адипонектин) и действующих на центры насыщения в гипоталамусе.

C<sub>4</sub>R1 увеличивал скорость метаболизма в покое по сравнению с группой попарного кормления. Механизмом, с помощью которого C<sub>4</sub>R1 увеличивает скорость метаболизма в покое, вероятно, является митохондриальное разобщение. Разобщающая способность C<sub>4</sub>R1 была продемонстрирована в экспериментах *in vitro* на выделенных митохондриях печени [20]. Авторы предположили, что эффект C<sub>4</sub>R1 опосредован взаимодействием с транспортными белками внутримитохондриальной мембраны [20]. Многие транспортные белки обладают разобщающей способностью при определенных условиях [31–33]. Максимально выражена разобщающая способность у транспортного белка UCP1 в митохондриях бурого жира [34]. Ранее нами было показано, что разобщение, вызываемое UCP1, в 3 раза превышает разобщение, опосредованное всей совокупностью других транспортных белков [35, 36]. Представляется интересным изучить возможность взаимодействия C<sub>4</sub>R1 с UCP1 в митохондриях бурого жира. Бурый жир и недавно открытые буроподобные жировые клетки в белом жире (так называемые *brite/beige*) являются наиболее значительной теплообразующей и метаболически активной (за счет UCP1) системой [37–39]. На возможность избирательной активации UCP1 посредством C<sub>4</sub>R1 указывает тот факт, что C<sub>4</sub>R1 быстро начал стимулировать окисление жиров у мышей независимо от эффекта снижения потребления пищи (наблюдае-

мое нами уменьшение дыхательного коэффициента уже через несколько часов после начала эксперимента, см. рис. 4). Хорошо известно, что в буром жире эволюцией была создана наиболее эффективная система для окисления жиров.

Примечательно, что классический анионный разобщитель ДНФ в дозе 27 мкмоль/кг в сутки не вызывал ускорение метаболизма мышцей. Наши результаты согласуются с данными, полученными при изучении дозозависимых эффектов ДНФ [10]: только доза в 19 раз выше, чем доза, используемая нами, снижала массу тела мышцей и ее жировой компоненты и повышала суммарные энергозатраты [10]. Разница между эффективными *in vivo* дозами C<sub>4</sub>R1 и ДНФ согласуется с разницей между эффективными концентрациями этих разобщителей в экспериментах на изолированных митохондриях [20, 27].

Интересно, что в работе Калдейра да Силва с соавт. [11] чрезвычайно низкие дозы ДНФ (в 50–170 раз ниже, чем доза, используемая нами, и в 1000 раз ниже, чем дозы, используемые в работах Шлаговски с соавт. [9] и Голдгоф с соавт. [10]) эффективно снижали массу тела и улучшали симптомы метаболического синдрома. Авторы объяснили свои результаты разобщением окислительного фосфорилирования [11], однако убедительно это не доказали: ни скорость метаболизма в покое, ни характеристики разобщения митохондрий (олигомицин-нечувствительное дыхание в пересчете на количество митохондриального белка) не были измерены. В качестве альтернативного объяснения можно, например, предположить действие ДНФ на микробиоту кишечника при длительном приеме препарата.

Наш эксперимент с двухэтапным назначением C<sub>4</sub>R1 (в общей сложности в течение 30 дней) не выявил никаких видимых токсических эффектов препарата. Поведение мышцей было нормальным даже при исходной высокой дозе разобщителя, существенно понизившей потребление пищи. Интересно, что через девять дней после начала эксперимента потребление пищи и вес тела начали спонтанно возрастать на фоне назначения препарата. Самопроизвольный возврат к нормальному потреблению пищи указывает на отсутствие токсического действия C<sub>4</sub>R1 на пищеварительный тракт. Тот факт, что все выявленные эффекты C<sub>4</sub>R1 (на массу тела, потребление пищи, скорость метаболизма, ДК) были временными и начинали спонтанно восстанавливаться на 9–15-й день назначения препарата, представляется крайне интересным, но малоизученным. Повторный эксперимент с C<sub>4</sub>R1 через шесть дней после перерыва привел к похожим результатам (снижение потребления пищи и массы тела). Это дает основание ис-

пользовать препарат не постоянно, а короткими курсами по несколько дней.

Таким образом, катионный разобщитель C<sub>4</sub>R1 может быть новой ступенькой к созданию эффективного и безопасного лекарства против ожирения.

Авторы выражают глубокую благодарность В.П. Скулачеву, Б. Кэннон, Я. Недергарду за об-

суждение результатов и полезные комментарии, а также К.Г. Лямзаеву и Е.Б. Меньшиковой за редактирование текста и помощь в оформлении рисунков.

Исследование выполнено при финансовой поддержке НИИ Митохондриологии МГУ и компании «Mitotech S.A.» (Люксембург).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tseng, Y.H., Cypess, A.M., and Kahn, C.R. (2010) Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy, *Nature Rev. Drug Discov.*, **9**, 465–482.
2. Rodgers, R.J., Tschop, M.H., and Wilding, J.P. (2012) Anti-obesity drugs: past, present and future, *Dis. Model Mech.*, **5**, 621–626.
3. Wadden, T.A. (1993) Treatment of obesity by moderate and severe caloric restriction. Results of clinical research trials, *Ann. Intern. Med.*, **119**, 688–693.
4. Harper, J.A., Dickinson, K., and Brand, M.D. (2001) Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity, *Obes. Rev.*, **2**, 255–265.
5. Nedergaard, J., and Cannon, B. (2010) The changed metabolic world with human brown adipose tissue: therapeutic visions, *Cell Metab.*, **11**, 268–272.
6. Tainter, M.L., Cutting, W.C., and Stockton, A.B. (1934) Use of dinitrophenol in nutritional disorders: a critical survey of clinical results, *Am. J. Public Health Nations Health*, **24**, 1045–1053.
7. Parascandola, J. (1974) Dinitrophenol and bioenergetics: an historical perspective, *Mol. Cell Biochem.*, **5**, 69–77.
8. Shemano, I., and Nickerson, M. (1963) Mechanisms of thermal responses to 2,4-dinitrophenol, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **139**, 88–93.
9. Schlagowski, A.I., Singh, F., Charles, A.L., Gali Ramamoorthy, T., Favret, F., Piquard, F., Geny, B., and Zoll, J. (2014) Mitochondrial uncoupling reduces exercise capacity despite several skeletal muscle metabolic adaptations, *J. Appl. Physiol.* (1985), **116**, 364–375.
10. Goldgof, M., Xiao, C., Chanturiya, T., Jou, W., Gavrilova, O., and Reitman, M.L. (2014) The chemical uncoupler 2,4-dinitrophenol (DNP) protects against diet-induced obesity and improves energy homeostasis in mice at thermoneutrality, *J. Biol. Chem.*, **289**, 19341–19350.
11. Caldeira da Silva, C.C., Cerqueira, F.M., Barbosa, L.F., Medeiros, M.H., and Kowaltowski, A.J. (2008) Mild mitochondrial uncoupling in mice affects energy metabolism, redox balance and longevity, *Aging Cell*, **7**, 552–560.
12. Quin, C., Robertson, L., McQuaker, S.J., Price, N.C., Brand, M.D., and Hartley, R.C. (2010) Caged mitochondrial uncouplers that are released in response to hydrogen peroxide, *Tetrahedron*, **66**, 2384–2389.
13. Shabalina, I.G., and Nedergaard, J. (2011) Mitochondrial («mild») uncoupling and ROS production: physiologically relevant or not, *Biochem. Soc. Trans.*, **39**, 1305–1309.
14. Hatcher, A.S., Alderson, J.M., and Clements-Jewery, H. (2011) Mitochondrial uncoupling agents trigger ventricular fibrillation in isolated rat hearts, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **28**, 28.
15. McFee, R.B., Caraccio, T.R., McGuigan, M.A., Reynolds, S.A., and Bellanger, P. (2004) Dying to be thin: a dinitrophenol related fatality, *Vet. Hum. Toxicol.*, **46**, 251–254.
16. Grundlingh, J., Dargan, P.I., El-Zanfaly, M., and Wood, D.M. (2011) 2,4-dinitrophenol (DNP): a weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death, *J. Med. Toxicol.*, **7**, 205–212.
17. Severin, F.F., Severina, I.I., Antonenko, Y.N., Rokitskaya, T.I., Cherepanov, D.A., Mokhova, E.N., Vyssokikh, M.Y., Pustovidko, A.V., Markova, O.V., Yaguzhinsky, L.S., Korshunova, G.A., Sumbatyan, N.V., Skulachev, M.V., and Skulachev, V.P. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663–668.
18. Trendeleva, T.A., Sukhanova, E.I., Rogov, A.G., Zvyagil'skaya, R.A., Seveina, I.I., Ilyasova, T.M., Cherepanov, D.A., and Skulachev, V.P. (2013) Role of charge screening and delocalization for lipophilic cation permeability of model and mitochondrial membranes, *Mitochondrion*, **13**, 500–506.
19. Antonenko, Y.N., Avetisyan, A.V., Cherepanov, D.A., Knorre, D.A., Korshunova, G.A., Markova, O.V., Ojovan, S.M., Perevoshchikova, I.V., Pustovidko, A.V., Rokitskaya, T.I., Severina, I.I., Simonyan, R.A., Smirnova, E.A., Sobko, A.A., Sumbatyan, N.V., Severin, F.F., and Skulachev, V.P. (2011) Derivatives of rhodamine 19 as mild mitochondria-targeted cationic uncouplers, *J. Biol. Chem.*, **286**, 17831–17840.
20. Khailova, L.S., Silachev, D.N., Rokitskaya, T.I., Avetisyan, A.V., Lyamsaev, K.G., Severina, I.I., Ilyasova, T.M., Gulyaev, M.V., Dedukhova, V.I., Trendeleva, T.A., Plotnikov, E.Y., Zvyagil'skaya, R.A., Chernyak, B.V., Zorov, D.B., Antonenko, Y.N., and Skulachev, V.P. (2014) A short-chain alkyl derivative of Rhodamine 19 acts as a mild uncoupler of mitochondria and a neuroprotector, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1739–1747.
21. Rokitskaya, T.I., Ilyasova, T.M., Severina, I.I., Antonenko, Y.N., and Skulachev, V.P. (2013) Electrogenic proton transport across lipid bilayer membranes mediated by cationic derivatives of rhodamine 19: comparison with anionic protonophores, *Eur. Biophys. J.*, **42**, 477–485.
22. Lodhi, I.J., and Semenkovich, C.F. (2009) Why we should put clothes on mice, *Cell Metab.*, **9**, 111–112.
23. Nedergaard, J., and Cannon, B. (2014) The browning of white adipose tissue: some burning issues, *Cell Metab.*, **20**, 396–407.
24. Feldmann, H.M., Golozoubova, V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2009) UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality, *Cell Metab.*, **9**, 203–209.
25. Teodoro, J.S., Zouhar, P., Flachs, P., Bardova, K., Janovska, P., Gomes, A.P., Duarte, F.V., Varela, A.T., Rolo, A.P., Palmeira, C.M., and Kopecky, J. (2014) Enhancement of brown fat thermogenesis using chenodeoxycholic acid in mice, *Int. J. Obes. (Lond.)*, **38**, 1027–1034.

26. Watanabe, M., Houten, S.M., Matak, C., Christoffolete, M.A., Kim, B.W., Sato, H., Messaddeq, N., Harney, J.W., Ezaki, O., Kodama, T., Schoonjans, K., Bianco, A.C., and Auwerx, J. (2006) Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation, *Nature*, **439**, 484–489.
27. Jacob, M., Bjarnason, I., Rafi, S., Wrigglesworth, J., and Simpson, R.J. (2001) A study of the effects of indometacin on liver mitochondria from rats, mice and humans, *Aliment. Pharmacol. Ther.*, **15**, 1837–1842.
28. Connolly, I.P., Liu, Y.L., Frost, I., Reckless, I.P., Heal, D.J., and Stock, M.J. (1999) Thermogenic effects of sibutramine and its metabolites, *Br. J. Pharmacol.*, **126**, 1487–1495.
29. Ryan, D.H. (2000) Use of sibutramine and other noradrenergic and serotonergic drugs in the management of obesity, *Endocrine*, **13**, 193–199.
30. Halford, J.C., Boyland, E.J., Blundell, J.E., Kirkham, T.C., and Harrold, J.A. (2010) Pharmacological management of appetite expression in obesity, *Nature Rev. Endocrinol.*, **6**, 255–269.
31. Andreyev, A.Y., Bondareva, T.O., Dedukhova, V.I., Mokhova, E.N., Skulachev, V.P., Tsofina, L.M., Volkov, N.I., and Vygodina, T.V. (1989) The ATP/ADP-antiporter is involved in the uncoupling effect of fatty acids on mitochondria, *Eur. J. Biochem.*, **182**, 585–592.
32. Samartsev, V.N., Smirnov, A.V., Zeldi, I.P., Markova, O.V., Mokhova, E.N., and Skulachev, V.P. (1997) Involvement of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1319**, 251–257.
33. Skulachev, V.P. (1999) Anion carriers in fatty acid-mediated physiological uncoupling, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **31**, 431–445.
34. Nedergaard, J., Golozoubova, V., Matthias, A., Asadi, A., Jacobsson, A., and Cannon, B. (2001) UCP1: the only protein able to mediate adaptive non-shivering thermogenesis and metabolic inefficiency, *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 82–106.
35. Shabalina, I.G., Jacobsson, A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2004) Native UCP1 displays simple competitive kinetics between the regulators purine nucleotides and fatty acids, *J. Biol. Chem.*, **279**, 38236–38248.
36. Shabalina, I.G., Kramarova, T.V., Nedergaard, J., and Cannon, B. (2006) Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively, *Biochem. J.*, **399**, 405–414.
37. Petrovic, N., Walden, T.B., Shabalina, I.G., Timmons, J.A., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2010) Chronic peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) activation of epididymally derived white adipocyte cultures reveals a population of thermogenically competent, UCP1-containing adipocytes molecularly distinct from classic brown adipocytes, *J. Biol. Chem.*, **285**, 7153–7164.
38. Shabalina, I.G., Ost, M., Petrovic, N., Vrbacky, M., Nedergaard, J., and Cannon, B. (2010) Uncoupling protein-1 is not leaky, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 773–784.
39. Shabalina, I.G., Petrovic, N., de Jong, J.M., Kalinovich, A.V., Cannon, B., and Nedergaard, J. (2013) UCP1 in brite/beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic, *Cell Rep.*, **5**, 1196–1203.

## A NOVEL MITOCHONDRIAL CATIONIC UNCOUPLER C<sub>4</sub>R1 IS AN EFFECTIVE TREATMENT TO COMBAT OBESITY IN MICE

A. V. Kalinovich<sup>1,2\*</sup>, I. G. Shabalina<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> *Stockholm University, the Wenner-Gren Institute, Department of Molecular Biosciences, Svante Arrhenius vaeg 22B, SE-106 91 Stockholm, Sweden; fax: +46 8 164209, E-mail: anastasia.kalinovich@su.se, irina.shabalina@su.se*

<sup>2</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia.*

Received January 19, 2015

Revision received January 30, 2015

Obesity is associated with premature mortality, impaired quality of life, and large healthcare costs. However, treatment options remain quite limited. Here we studied potential anti-obesity effects of a novel cationic mitochondrial uncoupler, C<sub>4</sub>R1 (derivative of rhodamine 19) in C57Bl/6 mice. Obesity was induced by long-term (eight weeks) high fat diet feeding at thermoneutrality. The treated group of mice received consecutively two doses C<sub>4</sub>R1 in drinking water (30  $\mu\text{mol/kg/day}$  and 12–14  $\mu\text{mol/kg/day}$ ) during 30 days. Effects of C<sub>4</sub>R1 were dose-dependent. After six days of C<sub>4</sub>R1 treatment in dose 30  $\mu\text{mol/kg/day}$ , food intake was reduced by 68%, body weight by 19%, and fat mass by 21%. Loss of body weight was explained partly by reduced food intake and partly by increased metabolism likely resulting from uncoupling. Body fat reduction upon C<sub>4</sub>R1 treatment was associated with improved lipid utilization estimated from decrease in respiratory quotient to the minimal level (0.7). Interestingly, the classical uncoupler 2,4-dinitrophenol in similar dose (27  $\mu\text{mol/kg/day}$ ) did not have any effect. Our results are relevant to the search for substances causing mild uncoupling of mitochondria, which could be a promising therapeutic strategy to treat obesity.

**Key words:** cationic mitochondrial uncoupler, 2,4-dinitrophenol, obesity, resting metabolic rate, energy expenditure