

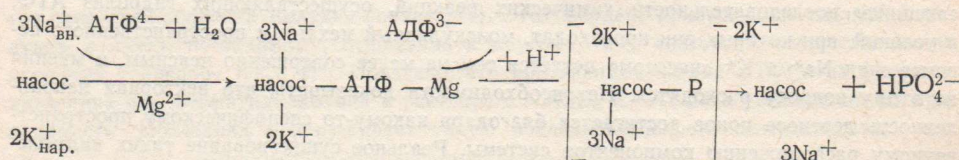
УДК 612.826

З. А. Сорокина

**РЕКОНСТРУКЦИЯ НАТРИЕВОГО «НАСОСА»
В ПЛОСКИХ ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ.
ВОЗМОЖНОСТИ И ПРОБЛЕМЫ МЕТОДА**

Натриевый «насос» эукариотических клеток является мембранным надмолекулярным образованием, или как сейчас называют такого рода системы, «макромолекулярной машиной». Эта «машина» представлена ферментом аденозотрифосфатазой, активируемой Na^+ и K^+ и зависящей от Mg^{2+} (Na^+ , K^+ -АТФаза, КФ 3.6.1.3). Фермент располагается в мембране анизотропно. Он имеет несколько активных центров и разнообразные функциональные группы, согласованное действие которых обеспечивает гидролиз АТФ и одновременный трансмембранный перенос K^+ и Na^+ [4, 6, 106].

В настоящее время большинство исследователей склоняются к тому, что работа «насоса» представляет собой одностадийный процесс:



(Здесь «вн.» и «нар.» соответственно обозначают внутри- и внеклеточное местонахождение транспортируемых ионов). Гидролиз АТФ и транслокация ионов осуществляются после того, как ионы и все необходимые лиганды (кофакторы) занимают свои места. При этом ионы образуют переходные комплексы с определенными участками «насоса», которые после транслокации к противоположным сторонам мембраны диссоциируют. Процесс идет с соблюдением постоянного стехиометрического соотношения: гидролиз одной молекулы АТФ сопровождается выведением из клетки трех Na^+ и входом в нее двух K^+ . При этом специфичность к Na^+ абсолютна, а K^+ может быть заменен другим одновалентным катионом.

По классификации Зингера и Никольсона [98], Na^+ , K^+ -АТФаза относится к внутренним или интегрированным белкам. Это амфифильные белки, характеризующиеся наличием больших гидрофобных участков, погруженных в жидкую углеводородную фазу мембраны, и гидрофильных, обращенных в полярные области внутри и снаружи клеток. Интегральные белки настолько прочно вмонтированы в липидном матриксе мембран, что только лишь некоторыми детергентами или хаотропными агентами, воздействующими непосредственно на гидрофобные связи, удается частично сольubilизировать их и отделить от других соединений. Сольubilизированные препараты невозможно получить свободными от липидов. Более того, присутствие липидов, особенно несущих общий отрицательный заряд в полярной области, абсолютно необходимо, с одной стороны, для определенной пространственной организации фермента, а с другой — для проявления его активности. У Na^+ , K^+ -АТФазы молярное отношение фосфолипиды: белок достигает 90—120:1. Это позволяет предполагать, что натриевый «насос» — сложное образование, состоящее из фермента Na^+ , K^+ -АТФазы и липидов [3, 4, 8, 34, 57, 73, 105].

В последние годы достигнуты определенные успехи в расшифровке молекулярной структуры Na^+ , K^+ -АТФазы. Наиболее чистые препараты фермента содержат белок, мо-

лекулярный вес которого ~ 250 — 280 кД. При электрофорезе в присутствии додецилсульфата натрия он распадается на две субъединицы. Одна из них, большая или α -субъединица, представляет собой липопротейд (мол. вес 84 — 139 кД) в α -спиральном строении, содержащий большое количество аминокислот с неполярными боковыми цепями. Другая, малая или β -субъединица, является сиалогликопротеидом (мол. вес 35 — 60 кД). Основную ее массу составляют нейтральные и заряженные углеводы, причем их состав различен у Na^+ , K^+ -АТФаз из разных тканей. α -субъединица проявляет Na^+ , K^+ -АТФазную активность и несет центры, связывающие ионы. Функциональная роль сиалогликопротеида пока не ясна. Полагают, что он определяет ионную селективность «насоса» [44, 62, 67, 68].

Данные последних лет указывают на то, что функциональная единица «насоса» представляет собой, по-видимому, тетрамер, включающий 2α - и 2β -субъединицы, имеющий один активный АТФ-связывающий центр на одной из двух субъединиц и отстоящий от него фосфатазный центр. Исследования проведенные с гидрофобным светочувствительным реагентом (^{125}I)—иоднафтилазидом [63], а также электронномикроскопические наблюдения чистых мембранных препаратов Na^+ , K^+ -АТФазы [32, 52, 103] дают основание считать, что α - и β -субъединицы образуют структуру, имеющую форму эллипсоида. Ее максимальный диаметр 4 нм, а высота 8 — 12 нм, т. е. несколько превышает ширину гидрофобного слоя мембраны. Таким образом, она должна пронизывать мембрану насквозь, вынося на противоположные гидрофильные поверхности «рецепторные» участки.

Хотя к настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал, касающийся последовательности химических реакций, осуществляющих гидролиз АТФ, и условий, при которых они происходят, молекулярный механизм пространственного перемещения Na^+ и K^+ «насосом» остается тем не менее совершенно неясным, и мнения по этому вопросу расходятся. Нет необходимости доказывать, что векторная направленность переноса ионов достигается благодаря какому-то специфическому пространственному расположению компонентов системы. Реальное существование таких надмолекулярных образований, состоящих из белков-ферментов и липидов, определенным образом ориентированных в мембране, не вызывает сейчас никаких сомнений. Оно подтверждено опытами по частичной реконструкции цепи транспорта электронов и сопряженной с ней системы окислительного фосфорилирования мембран митохондрий и хлоропластов, цепи транспорта электронов микробных мембран и цепи переноса Ca^{2+} саркоплазматического ретикула [18, 82, 83, 84]. Вполне возможно, что воссоздание процесса активного транспорта на искусственных фосфолипидных мембранах поможет понять молекулярный механизм его действия в естественной мембране.

В качестве модели, наиболее приближенной к биологическим мембранам, успешно применяются плоские липидные бислои (ПЛМ). Закономерность и оправданность их использования объясняется целым рядом причин. Во-первых, бимолекулярный слой, толщиной 5 — 7 нм является основным принципом организации липидов в клеточных мембранах, поскольку энергетически эта конфигурация наиболее выгодна [2, 58, 72, 96]. Во-вторых, в клетках сборка функционально полноценных мембран осуществляется путем самопроизвольного образования двойного липидного слоя и внедрения в него специфических белков и полисахаридов, синтезирующихся внутри клетки [17, 22]. В-третьих, ПЛМ обнаруживают такие основные пассивные свойства протоплазматических мембран клеток, как высокое электрическое сопротивление, удельная емкость, межфазное натяжение, высокая проницаемость для воды и небольших молекул и низкая проницаемость для электролитов [12, 23, 37, 51, 67, 80]. Наконец, именно ПЛМ позволяют в строго контролируемых условиях измерить трансмембранную разность потенциалов и ионные токи, которые могут возникать при активном и пассивном переносе ионов, и исследовать влияние на них веществ, эффективность которых обнаружена *in situ*.

Попытки встроить в ПЛМ препараты Na^+ , K^+ -АТФазы предпринимаются в различных лабораториях с 1969 г. Тем не менее, опыты такого рода не дали пока однозначных результатов.

Первые системы АТФазы и проявленных свойств были пассивными препаратами вещества мозга быка. АТФазы из митохондрий вводят в ПЛМ, внося в него вала значительное количество Na^+ , K^+ -АТФазу фракции мембрана в активном состоянии. Характерная реакция в мембране (цис-положение) замыкания* и транспорта заряженной от раствора с транс-сторона эффект наблюдался в мембранах фосфолипиды А и транс-сторона с определенной долей ионизации в ПЛМ Na^+ активный перенос ионов.

Аналогичные результаты с мембраной слизистой оболочки желудка и имеет, по-видимому, активный транспорт дилсерина или фосфолипиды. Последняя мембрана.

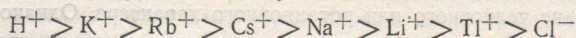
Н⁺ За исключением Tl^+ , в растворе АТФ проявляют разность потенциалов на мембране лишь кратковременно увеличивался непрерывно было наблюдать в течение хранения мембран.

Последующие исследования Na^+ , K^+ -АТФазы [55] показали, что в мембране лиофилизации он образующий раствор в предыдущих работах наблюдалась трансмембранная разность потенциалов. Они достигали стабильности за 25 мин. Повторное измерение было совершенно одинаковым.

* Ток короткого активного переносимых трансмембранного градиента разности потенциалов с мембраны, которая крахается пассивный ионный ток, лишь активный транспорт.

Первые систематические данные о возможности встраивания в бислой Na^+, K^+ -АТФазы и проявлении ею в таких условиях присущих ей ферментативных и транспортных свойств были получены Джейном и сотр. [60, 61]. Исследования проводились с мембранными препаратами Na^+, K^+ -АТФазы из различных тканей (сердце быка, серое вещество мозга быка, кошки и крысы, эритроциты человека, почка кролика) и Mg^{2+} -АТФазы из митохондрий дрожжей на ПЛМ из окисленного холестерина в *n*-алканах. АТФазу вводили в раствор одной из ячеек камеры. Встраивалась в мембраны и вызывала значительное уменьшение их сопротивления (на 2—3 порядка) содержащая Na^+, K^+ -АТФазу фракция синапсом мозга крысы и Mg^{2+} -АТФаза митохондрий, да и то лишь у 20% ПЛМ. Другие препараты тканей, несмотря на содержание в них фермента в активном состоянии, с мембранами не взаимодействовали. Существенной особенностью модифицируемых синапсомальной Na^+, K^+ -АТФазой ПЛМ явилась их характерная реакция на введение в раствор той же ячейки, где был суспензирован фермент (цис-положение), АТФ. В этом случае наблюдалось появление тока короткого замыкания* и трансмембранной разности потенциалов: цис-сторона мембраны оказывалась заряженной отрицательно по отношению к транс-стороне. Оубаин, введенный в раствор с транс-стороны, тормозил развитие тока короткого замыкания. Такой же эффект наблюдался в отсутствие в среде Na^+ , а также при действии на цис-сторону ПЛМ фосфолипазы А и трипсина с любой стороны мембраны. Эти эксперименты позволили с определенной долей вероятности утверждать, что в данном случае имеет место встраивание в ПЛМ Na^+, K^+ -АТФазы. Встроенный фермент осуществляет АТФ-зависимый активный перенос ионов и работает в электрогенном режиме.

Аналогичные результаты были получены с K^+ -АТФазой, выделенной из гомогенатов слизистой оболочки желудка свиньи [47]. Этот фермент присущ лишь слизистой желудка и имеет, по-видимому, отношение к другому типу «насосов», осуществляющих активный транспорт K^+ и H^+ . Показано, что при взаимодействии с ПЛМ из фосфатидилсерина или фосфатидилхолина в растворе с Na_2SO_4 K^+ -АТФаза увеличивает их проводимость. Последняя обнаруживает такую последовательность селективности:



За исключением Tl^+ , она была такой же, как у мембран *in situ*. При добавлении в раствор АТФ появлялась трансмембранная разность потенциалов в 30—50 мВ при отрицательности с цис-стороны. ИТФ и β - α -метилен-АТФ создавали в 5 раз меньшую разность потенциалов. Если АТФ вводили в раствор с транс-стороны, то разность потенциалов на мембране изменяла знак. В растворе с K_2SO_4 АТФ вызывал появление лишь кратковременной разности потенциалов, между тем как ток короткого замыкания увеличивался непрерывно. Индуцируемую K^+ -АТФазой проводимость ПЛМ можно было наблюдать в течение 48 ч после получения препарата фермента. При более длительном хранении фермент терял способность изменять проводимость липидных мембран.

Последующие исследования проводились с солюбилизированными препаратами Na^+, K^+ -АТФазы [55, 56]. Фермент, полученный из микросомной фракции почки собаки, переводился в раствор неионным детергентом лубролом. После предварительной лиофилизации он растворялся в хлороформе и вводился непосредственно в мембранообразующий раствор липидов, состоящий из смеси сфингомиелина и кардиолипина. Как и в предыдущих работах, при введении в раствор АТФ на модифицированной ПЛМ наблюдалась трансмембранная разность потенциалов и появлялся ток короткого замыкания. Они достигали соответственно 90—110 мВ и $2,5 \cdot 10^{-7}$ А/см², и длились обычно 15—25 мин. Повторное введение в раствор АТФ оставалось без ответа. АТФ оказывал совершенно одинаковое действие с обеих сторон ПЛМ. Однако ингибирующее влияние

* Ток короткого замыкания представляет собой результирующую величину всех активно переносимых через мембрану ионов. Он наблюдается в условиях отсутствия трансмембранного градиента ионов, когда обычно существующая трансмембранная разность потенциалов с помощью внешнего источника снижается до нуля. При этом преращается пассивный перенос ионов по электрохимическому градиенту и сохраняется лишь активный транспорт.

оубаина и дигоксина отсутствовало как с цис-, так и транс-стороны мембраны. Более того, эффект АТФ наблюдался и без модифицирующего ПЛМ фермента, если ПЛМ формировали из определенных фосфолипидов. Измерения концентрации неорганического фосфора показали, что гидролиз АТФ в данном случае отсутствовал и эффект АТФ, очевидно, не был связан с работой «насоса».

Подробное исследование природы такого рода электрогенеза позволило установить, что он присущ не только АТФ, но и другим гидрофильным, а также липофильным органическим полианионам, и наблюдается на ПЛМ, в состав которых входит кардиолипин или диизооктилфосфат. Фосфатидилсерин оказался менее эффективным. Все эти фосфолипиды являются неотъемлемой составной частью липидного микроокружения Na^+ , K^+ -АТФазы. Формируемые из них ПЛМ обладают довольно высокой катионно-анионной селективностью [5, 54]. По-видимому, обнаруженные явления могут быть обусловлены тем, что натриевые и калиевые соли АТФ взаимодействуют с кислыми липидами и изменяют поверхностный потенциал цис-стороны мембраны.

В этой связи определенный интерес представляют исследования по встраиванию в ПЛМ очищенных солюбилизованных препаратов Mg^{2+} -АТФазы бактерий *Streptococcus fecalis* [86, 87]. Вначале было обнаружено, что в присутствии в среде АТФ, Na^+ и K^+ фермент увеличивает на 2—4 порядка проводимость ПЛМ, формируемых из синтетического 1,2-дипальмитоил-3-Sn-фосфатидилхолина, яичного лецитина, а также из общих липидов данного штамма бактерий. При очень низких концентрациях фермента (около 10^{-10} М) наблюдаемые изменения проводимости имели характер дискретных флуктуаций. Дальнейшие исследования показали однако, что индуцируемая АТФазой проводимость ПЛМ не обнаруживает селективности. Авторы пришли поэтому к заключению, что скачкообразные изменения проводимости представляют собой заполненные водой каналы в ПЛМ, которые не являются моделью тех функциональных путей, по которым осуществляется активный транспорт ионов.

До недавнего времени полагали, что участки фермента, избирательно связывающие ионы, в процессе функционирования «насоса» совершают прямые и обратные перемещения в мембране челночного или ротационного характера. Однако экспериментальные данные последних лет и термодинамические расчеты показали, что такого рода подвижность белка в мембране с пересечением границы раздела фаз мало вероятна в связи с необходимостью преодоления огромного энергетического барьера. Если бы такой механизм и имел место, то скорость вращения участков фермента была бы ничтожно малой [11, 96, 98]. Весьма демонстративными в этом отношении оказались опыты Кайта [68]. Он обрабатывал мембрану печени антителами, специфическими к каталитической субъединице Na^+ , K^+ -АТФазы, и не обнаружил какого-либо изменения транспорта ионов, хотя жестко связывающееся с ферментом антитело должно было воспрепятствовать его вращению в мембране. Вполне возможно, что активный транспорт Na^+ и K^+ сопровождается минимальными структурными изменениями Na^+ , K^+ -АТФазы [30]; поэтому наиболее вероятно образование в мембране «каналов» из субъединиц фермента. «Канал» может быть сквозной порой, пронизывающей мембрану, либо динамической потенциальной ямой, возникающей в периодических, например, α -спиральных участках «насоса». На сегодняшний день уже имеется несколько моделей такого механизма активного транспорта Na^+ и K^+ [30, 69, 70, 97, 111].

Для доказательства того, что «каналы» или ионофоры являются интегральной частью натриевого «насоса», Шамо и сотрудниками была проведена серия исследований, в которых использовались мембранные препараты фермента из микросомной фракции электрического органа угря и мозгового слоя почек крупного рогатого скота [90, 91]. Эти ткани отличаются высоким содержанием фермента, и из них получены сравнительно высокоочищенные и стабильные Na^+ , K^+ -АТФазы. Фермент подвергали непродолжительному (около 1 ч) воздействию трипсина, избирательно расщепляющего пептидные связи, образованные остатками лизина и аргинина. Полученные продукты гидролиза вносили в одну из ячеек камеры. При этом оказалось, что они встраиваются в ПЛМ и при наличии в среде Na^+ увеличивают ее проводимость. Активность ионофорного материала значительно повышалась после хроматографической очистки на колонке с цел-

люлозой. Напротив, о лось обнаружение авт и концентрацией ион что структурной едини

В дальнейшем [2 триптического гидроли димость ПЛМ сохраня

Важно отметить, 1) Ионофорные веществ или дегидрохолестерин ного рогатого скота ил ких концентрациях ион сколькими дискретным С более высокими кон мости не обнаруживало фрагменты путем прод ность изменять проводи тельного выдерживания названо олигомеризаци форная активность пр Na^+ , K^+ -АТФазы, сборк ивания в мембрану.

Для идентификации АТФазы, было примене меняли ее проводимость

После изучения и возник вопрос, в состав каждой из субъединиц и β -полипептиды, а так каждого из них [91, 93]. в свойствах компоненто также трипсинизированн увеличения проводимост 1:1 и трипсинизированн лишь в том случае, если Максимальная Na^+ -ионо β -полипептидов в соотно доказательство того, что спортивной системы *in vivo*

Есть основания пр также связаны с β -полиг аном при расщеплении и Окисление бромцианом п ных полипептидных фраг остаток метионина. Полу рацией. Пептиды элюируют обнаруживала свойства И

На основании получ гипотетическая модель стр саркоплазматического рет компонентов—большого н браны, селективных «вор «канал», и преобразовате щий центр и обеспечивае ступными для ионов толь

люлозой. Напротив, она исчезала при действии проназы. Важным наблюдением явилось обнаружение авторами экспоненциальной зависимости между проводимостью ПЛМ и концентрацией ионофорного материала в ячейке камеры. Это позволило заключить, что структурной единицей ионофора должен быть олигомер.

В дальнейшем [27, 28, 89, 92] было установлено, что если фермент подвергается триптического гидролизу на протяжении 24 ч, то его способность увеличивать проводимость ПЛМ сохраняется, но избирательность к Na^+ исчезает.

Важно отметить, следующие моменты:

1) Ионофорные вещества взаимодействовали лишь с ПЛМ из окисленного холестерина или дегидрохолестерина; в мембраны из лецитина, общих фосфолипидов мозга крупного рогатого скота или электрического органа угря они не встраивались. 2) При низких концентрациях ионофорных веществ проводимость изменялась скачками между несколькими дискретными значениями, амплитуда которых составляла 100—1000 пкСм. С более высокими концентрациями ионофорных веществ отдельных скачков проводимости не обнаруживалось. 3) При расщеплении ионофорного вещества на более мелкие фрагменты путем продолжительной инкубации в кислом растворе (рН 2) его способность изменять проводимость ПЛМ исчезала. Она могла быть восстановлена после длительного выдерживания полученных фрагментов в растворе с рН 7. Это явление было названо олигомеризацией. По мнению авторов, оно свидетельствует о том, что ионофорная активность принадлежит определенным агрегатам из мелких фрагментов Na^+, K^+ -АТФазы, сборка которых осуществляется только в водном растворе до встраивания в мембрану.

Для идентификации пептидных фрагментов, образующихся при гидролизе Na^+, K^+ -АТФазы, было применено хроматографическое разделение. Встраивались в ПЛМ и изменяли ее проводимость пептиды с молекулярным весом 20 и 55 кД.

После изучения ионофорных свойств фрагментов Na^+, K^+ -АТФазы естественно возник вопрос, в состав какой субъединицы этого фермента они входят и какова роль каждой из субъединиц в транспортных процессах. С этой целью были выделены α - и β -полипептиды, а также фрагменты, образующиеся после триптического гидролиза каждого из них [91, 93]. Полученные данные позволили выявить существенные различия в свойствах компонентов Na^+, K^+ -АТФазы. Оказалось, что: 1) α - и β -полипептиды, а также трипсинизированный α -полипептид, хотя и встраиваются в ПЛМ, но селективного увеличения проводимости не вызывают; 2) смесь α - и β -полипептидов в соотношении 1:1 и трипсинизированный β -полипептид обладают Na^+ -ионофорной активностью, но лишь в том случае, если вводятся в ячейку камеры, имеющей отрицательный потенциал. Максимальная Na^+ -ионофорная активность наблюдается при встраивании в ПЛМ α - и β -полипептидов в соотношении 1:2. Авторы справедливо интерпретируют эти факты как доказательство того, что такая структура более соответствует функционированию транспортной системы *in vivo*.

Есть основания предполагать, что K^+ -селективность и K^+ -ионофорные свойства также связаны с β -полипептидом Na^+, K^+ -АТФазы. Это было обнаружено Шамо и Ринаном при расщеплении интактного фермента либо β -полипептида бромцианом (CNBr). Окисление бромцианом широко применяется как специфический метод получения крупных полипептидных фрагментов. Он разрушает пептидные связи, в которых участвует остаток метионина. Полученную сложную смесь пептидов фракционировали гель-фильтрацией. Пептиды элюировались двумя пиками. Первая фракция при встраивании в ПЛМ обнаруживала свойства K^+ -селективного ионофора.

На основании полученных данных Шамо и Гольдштейном [95] была предложена гипотетическая модель структуры транспортных АТФаз (Na^+, K^+ -АТФазы, и Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулума). Авторы считают, что они состоят из трех основных компонентов—большого неселективного «канала», пронизывающего липидную фазу мембраны, селективных «ворот», расположенных на внешней стороне мембраны у входа в «канал», и преобразователя энергии. Последний компонент содержит АТФ-гидролизующий центр и обеспечивает энергией активный перенос ионов. «Ворота» становятся доступными для ионов только после соединения α -полипептида с β -, либо после обработ-

ки β -полипептида трипсином или бромцианом. *In vivo* они, возможно, не несут ионофорных свойств, обнаруживаемых в опытах с ПЛМ.

Указанные работы Шамо и сотрудников подтверждают образование в мембране при функционировании «насоса» селективных «каналов». В связи с этим предложенный ими метод деградации мембранносвязанной Na^+, K^+ -АТФазы и последующей реконструкции ее ионтранспортной функции из совокупности определенных компонентов имеет несомненную ценность. Такой подход уже оправдал себя при изучении этим же автором молекулярной организации $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ -АТФазы саркоплазматического ретикулула [9]. К сожалению, исследование ионофорных свойств α и β -полипептидов Na^+, K^+ -АТФазы в настоящее время весьма затруднено в связи с отсутствием подходящих методов их разделения и препаративного получения. На это указывает и Шамо [95], подчеркивая низкую воспроизводимость натриевой и, особенно, калиевой селективности изолированного малого полипептида.

Мы исследовали взаимодействие с ПЛМ солюбилизованных в луброле WX препаратов Na^+, K^+ -АТФазы мозга крупного рогатого скота [20]. Мембраны формировали из окисленного холестерина с додецил- или дидодецилфосфатом [61] и из смеси общих фосфолипидов мозга с окисленным холестерином. Фермент встраивался в ПЛМ при постоянном напряжении на ней, если ячейка, куда его вносили, была положительной, ионная сила среды 0,01—0,15 и рН 6—8. В присутствии в среде малых количеств белка (0,005—0,1 мг/мл) на ПЛМ наблюдались флюктуации тока, часто реализуемые как дискретные одиночные уровни проводимости, которые не были селективными для определенных ионов. При введении в раствор с ферментом АТФ у 65% модифицированных мембран проводимость увеличивалась, а вольт-амперные кривые сдвигались на 1—4 мВ в положительную сторону. Эффект АТФ наблюдался лишь при наличии в среде как Na^+ , так и K^+ . Влияние АТФ было специфичным: ни ГТФ, а также АДФ не вызывали подобных изменений. В отсутствие фермента АТФ не влиял на проводимость ПЛМ. Мы предположили поэтому, что индуцируемые АТФ изменения проводимости ПЛМ связаны с активным переносом ионов встроенной в мембрану Na^+, K^+ -АТФазой. Однако, большая часть модифицированных ПЛМ была нечувствительна к действию специфических ингибиторов «насоса» — оубанна и строфантина-К.

Как известно, глюкозидсвязывающие рецепторы входят в структуру натриевого «насоса». Специфическое взаимодействие Na^+, K^+ -АТФазы с кардиоактивными глюкозидами осуществляется с помощью ряда гидрофобных и гидрофильных взаимодействий. Один из участков связывания возникает в результате присоединения к ферменту АТФ [10, 39, 107]. Возможно, что при встраивании натриевого «насоса» в ПЛМ фермент находится в неблагоприятных условиях по сравнению с нативной мембраной. Такими неблагоприятными факторами могут быть: 1) присутствие в ПЛМ молекул неполярных растворителей [12, 25, 41, 110]. Последние могут заполнять углеводородную область бислоя и изменять ряд его характеристик. 2) Отсутствие в ПЛМ пространственной асимметрии. ПЛМ симметричны как в отношении набора липидных молекул, так и структуры монослоев. В протоплазматических же мембранах, напротив, обнаруживаются не только количественные, но и качественные различия в липидном составе их внешней и внутренней сторон. В наружном монослое содержатся преимущественно фосфатидилхолины, сфингомиелины, холестерин и гликолипиды, а внутри — аминифосфатиды, фосфатидилсерины, фосфатидилэтанолламины и фосфатидилинозитолы. Асимметрия затрагивает, по-видимому, и гидрофобную область молекул липидов, главным образом, ненасыщенные жирные кислоты с цис-двойными связями, создающими в цепях жесткие элементы [26, 38, 42, 76]. 3) Различие липидного состава протоплазматических мембран и ПЛМ. Липидный состав протоплазматических мембран весьма сложен, что, по-видимому, необходимо для создания интегральным мембранным белкам благоприятного липидного микроокружения. Липидная специфичность Na^+, K^+ -АТФазы, полностью не выяснена. Имеющиеся на сегодняшний день данные [3, 8, 34, 65, 73, 105] позволяют думать, что в отношении некоторых липидов она довольно высока и касается как природы полярных головок, так и алифатических цепей.

4) Особенность аг из смеси окисленного холестерина, которая влияет на жидкостные свойства мембран. В них фосфолипидов [61] содержание холестерина значительно выше. При этом мембраны характеризуются большей углеводородную область

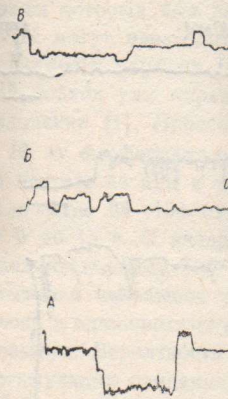


Рис. 1. Флюктуации т

А — симметричные электр 0,035 мг/мл. Мембрана из о пература 32 °С. Б — асим фермент — 0,025 мг/мл. М (6 : 4) на *n*-гексадекане, ный фермент — 0,025 мг/м

сткая упаковка липидн пей. Это, в свою очере фермента, препятствуя условия для функцион кучести мембран необ экспериментальных ука ностью упаковки бисло мембран, или, иными Такого рода факты по ными аналогами мален

В протоплазматич но из специфического излом на аррениусовск ратуры [65]. При мо. Na^+, K^+ -АТФазы снижа энергии активации [64,

Нами были прове го рода неблагоприятн встраивания Na^+, K^+ -АТ ролом WX препаратов. щенный препарат). Во сефарозой 6В по модиф ционирование позволил стью от 900 до 1600 мк ле в присутствии додеп

4) Особенность агрегатного состояния ПЛМ из окисленного холестерина, а также из смеси окисленного холестерина с общими липидами мозга. Холестерин, как известно, влияет на жидкостные и вязкоупругие свойства мембран, их толщину и расположение в них фосфолипидов [33, 59, 74, 88]. В протоплазматических мембранах процентное содержание холестерина не превышает 20. В ПЛМ соотношение холестерин: липид, значительно выше. При физиологических температурах (36—38 °С) такие бислои характеризуются большей упорядоченностью (жесткостью), т. к. холестерин конденсирует их углеводородную область и подавляет флюктуации упаковки углеводородных цепей. Же-

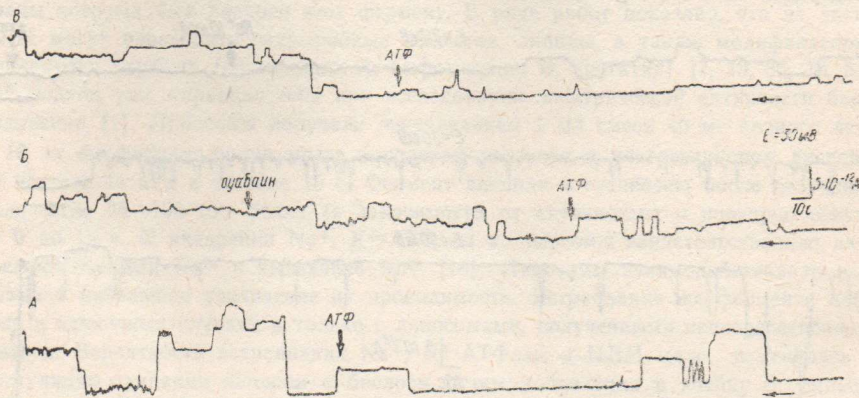


Рис. 1. Флюктуации трансмембранных токов в ПЛМ при встраивании различных препаратов Na^+ , K^+ -АТФазы.

А — симметричные электролитные условия (100 мМ Na^+ ; 10 мМ K^+). Неочищенный фермент — 0,035 мг/мл. Мембрана из окисленного холестерина с общими липидами мозга (4 : 6) на *n*-гептане. Температура 32 °С. Б — асимметричные электролитные условия (подробности в тексте). Неочищенный фермент — 0,025 мг/мл. Мембрана из общих фосфолипидов мозга с окисленным холестерином (6 : 4) на *n*-гексадекане, температура 38 °С. В — асимметричные электролитные условия. Очищенный фермент — 0,025 мг/мл. Мембрана из общих фосфолипидов мозга с окисленным холестерином (6 : 4) на *n*-гексадекане. Температура 38 °С.

сткая упаковка липидных молекул ограничивает допустимые конформации ацильных цепей. Это, в свою очередь, может снизить степень гидрофобного взаимодействия с ними фермента, препятствуя тем самым его встраиванию в ПЛМ и создавая неблагоприятные условия для функционирования. Сейчас полагают [71], что определенная степень текучести мембран необходима для функционирования интегральных белков. Есть ряд экспериментальных указаний на то, что активность Na^+ , K^+ -АТФазы коррелирует с плотностью упаковки бислоя и физическим состоянием липидов: чем меньше микровязкость мембран, или, иными словами, больше их текучесть, тем выше активность фермента. Такого рода факты получены с бирадикальными метками [14], а также со спин-мечеными аналогами малеимида и АТФ [21, 29, 48, 49].

В протоплазматических мембранах холестерин, по-видимому, исключается частично из специфического липидного микроокружения фермента. Об этом свидетельствует излом на аррениусовских кривых зависимости активности Na^+ , K^+ -АТФазы от температуры [65]. При молярном соотношении холестерин: фосфолипид 1 : 1 активность Na^+ , K^+ -АТФазы снижается на 50—100% вследствие двух-трехкратного увеличения энергии активации [64, 65].

Нами были проведены исследования, направленные на устранение действия такого рода неблагоприятных факторов и выявления наиболее оптимальных условий для встраивания Na^+ , K^+ -АТФазы в ПЛМ. Исследовали два типа солюбилизированных лубролом WX препаратов. В первом случае фермент получали, как описано выше (неочищенный препарат). Во втором случае его подвергали фракционированию на колонке с сефарозой 6В по модифицированному методу Накао [79] (очищенный препарат). Фракционирование позволило получить солюбилизированную Na^+ , K^+ -АТФазу с активностью от 900 до 1600 мкмоль P_n /мг белка в час. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия показал наличие в препаратах преимущ-

венно двух основных белковых фракций. Перед тем, как приступить к встраиванию очищенного фермента в ПЛМ, с помощью сефадекса G50 удаляли излишек растворенного в воде и несвязанного белком детергента. Опыты проводили при температуре 38 °С в асимметричных электролитных срезах. Наружная ячейка камеры, в которую добавляли фермент, заполнялась раствором с примерно такой же концентрацией K^+ и Na^+ , как в протоплазме (100 мМ K^+ , 5 мМ Na^+), а в другой ячейке — с такой же, как в наружном растворе (100 мМ Na^+ , 5 мМ K^+). Растворы готовили на tris-HCl буфере, pH 7,2. Они содержали по 5 мМ Mg^{2+} и по 0,01 мМ Ca^{2+} .

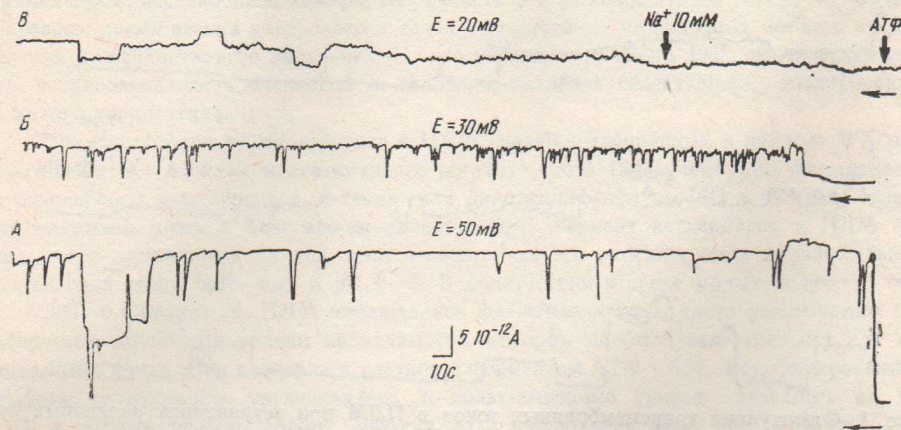


Рис. 2. Флюктуации трансмембранных токов при встраивании очищенных препаратов Na^+, K^+ -АТФазы в ПЛМ различного липидного состава в асимметричных электролитных условиях.

А — мембрана из лецитина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина с окисленным холестерином (3:0, 75:0, 25:1) на *n*-гексадекане, октане, тетрадекане. Концентрация белка-фермента 0,05 мг/мл. В растворе (цис-сторона мембраны) находится АТФ — 5 мМ/л. Б — мембрана из общих липидов митохондрий с окисленным холестерином (4:1) на *n*-гексадекане, октане, тетрадекане. Концентрация белка-фермента 0,05 мг/мл; концентрация АТФ — 5 мМ/л. В — мембрана из окисленного холестерина. В растворе с транс-стороны мембраны отсутствует Na^+ . Реконструируемый «насос» начинает функционировать лишь после введения в раствор Na^+ .

Эксперименты, поставленные с неочищенными препаратами фермента, показали, что как вероятность встраивания его в ПЛМ из окисленного холестерина и из смеси окисленного холестерина с общими липидами мозга, так и характер изменения проводимости существенно не изменятся в асимметричных электролитных средах по сравнению с симметричными условиями. Очищенные препараты фермента вызывали аналогичные изменения проводимости. Чаще всего они представляли собой одиночные, «каналообразные» скачки проводимости, достигающие 80—160 пкСм. Величина скачков зависела от напряжения на мембране и липидного состава ПЛМ (рис. 1 и 2). Средняя длительность скачков не менялась при изменении напряжения на мембране. При добавлении в раствор АТФ увеличивалось количество «каналов», находящихся в открытом состоянии, что приводило к общему увеличению проводимости ПЛМ. Такой эффект был специфичен для АТФ. Другие субстраты, как ацетилфосфат и *n*-нитрофенилфосфат (*n*-НФФ), не влияли на проводимость модифицированных бислоев. Это согласуется с данными о том, что при гидролизе Na^+, K^+ -АТФазой ацетилфосфата и *n*-НФФ не осуществляется процесс активного переноса ионов через мембрану [3].

К сожалению, очищенные препараты Na^+, K^+ -АТФазы встраивались в ПЛМ весьма редко: в среднем 1 раз на 50—100 мембран. При добавлении в ячейку с транс-стороны мембраны оубаина в концентрации от 0,01 до 0,5 мМ проводимость модифицированных мембран в большинстве опытов (более 90 %) не изменялась. Вероятность встраивания не зависела от активности фермента, но очень колебалась от препарата к препарату, и резко снижалась при хранении фермента.

Эти данные дают основание полагать, что, возможно, в состав Na^+, K^+ -АТФазы входят какие-то лабильные компоненты, которые иногда сохраняются при выделении

и облегчают взаимодействие. Такая роль играет фермент, выделяемый ферментальной активностью Mg^{2+}, Ca^{2+} -АТФазы. Предварительное встраивание

В специально подготовленные препараты Na^+ , мембраны которых были встраиваны в ПЛМ могут переходить к начальной стадии мембранной перестройки. Такой подход уже описан в литературе [1]. Липосомы (10 мг фосфатидилсерина) на частоте 44 кГц в количестве 25—100 мкг вводились от 9 до 15 с. О внедрении ионов Na^+ вызывая небольшое увеличение в единичных случаях в опытах. Вероятность стимуляции слипания Ca^{2+} (до 5 мМ), либо

Для изучения у препаратов Na^+, K^+ -АТФазы липидные смеси, приготовленные в ПЛМ (1) уменьшить в ПЛМ (2) липидной фазы (3) фосфолипидные смеси (4) короткими, ненасыщенными (5) в ПЛМ можно несколько (6) посредством понижения (7) ворителем при этом (8) части на края мембраны (9) образующий раствор (10) в водной среде, в котором (11) он уходит в воду [15]. (12) ной цепи (*n*-гексадекане) (13) концентрации липида в мембране (14)

Проведенные на мембранах ворителем (используя) с ферментом из-за малой («осушителя»), то он используется. Для работы использовались растворы (50—80 мг/мл) позволяющей оценить кость поставимы с ПЛМ без сформированных на границе

В табл.1 приведены смеси. В процессе работы в ПЛМ тогда фосфатом (0,1—0,2 мМ) (5—15 %). Весовое соотношение должно быть не менее

и облегчают взаимодействие фермента с ПЛМ. В препаратах Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы такую роль играет протеолипид, содержащийся в небольшом количестве (2—5 %) в ферменте, выделяемом из саркоплазматического ретикулула. Он же обладает и ионофорной активностью для Ca^{2+} [82, 83, 85]. Способствует встраиванию очищенной Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы в ПЛМ ее сукцинирование [94], а в опытах с липосомами — предварительное встраивание цитохромоксидазы [40].

В специально проведенной серии исследований мы попытались встроить очищенные препараты Na^+ , K^+ -АТФазы в ПЛМ, используя их слияние с липосомами, в мембраны которых был внедрен этот фермент. В ряде работ показано, что из липосом в ПЛМ могут переходить гидрофобные вещества, липиды, а также модификаторы проницаемости мембран (грамцидин А, амфотерицин В, нистатин) [7, 19, 36, 78, 81]. Такой подход уже оправдал себя при исследовании электрической активности бактериородопсина [1]. Липосомы получали озвучиванием 1 мл смеси 40 мг яичного лецитина и 10 мг фосфатидилсерина мозга в солевом растворе в ультразвуковом диспергаторе на частоте 44 кГц в течение 15 с. Фермент вносили в суспензию после озвучивания в количестве 25—100 мкг белка (в зависимости от активности) и повторно озвучивали от 9 до 15 с. О внедрении Na^+ , K^+ -АТФазы в липосомы свидетельствовало активное накачивание ими Na^{22} и выведение Rb^{86} [16]. Липосомы взаимодействовали в ПЛМ, вызывая небольшое увеличение их проводимости. Встраивание же фермента наблюдалось в единичных случаях и только с липосомами, полученными непосредственно перед опытом. Вероятность встраивания Na^+ , K^+ -АТФазы в ПЛМ мало изменялась и при стимуляции слияния липосом с бислоем путем добавления в ячейку с липосомами Ca^{2+} (до 5 мМ), либо коллоидной суспензии *n*-декана.

Для изучения условий, при которых в ПЛМ встраиваются солюбилизированные препараты Na^+ , K^+ -АТФазы, мы использовали различные мембранообразующие липидные смеси, приготовленные на разных *n*-алканах. При их выборе мы стремились: 1) уменьшить в ПЛМ количество растворителя; 2) изменить ригидность (жидкость) липидной фазы и упаковку жирнокислотных цепей; 3) ввести в ПЛМ заряженные фосфолипидные молекулы и 4) увеличить в ПЛМ содержание фосфолипидов с короткими, ненасыщенными ацильными цепями. Уменьшить концентрацию растворителя в ПЛМ можно несколькими способами: а) «вымораживанием» растворителя из бислоя посредством понижения температуры в ячейках камеры ниже точки плавления, растворитель при этом собирается в линзы, которые затем выталкиваются из бислоевой части на края мембраны [106]; б) «осушением» бислоя путем добавления в мембранообразующий раствор диоксана, который хорошо растворяет липиды, а сам растворяется в водной среде, в которой формируют бислой — поэтому в процессе образования ПЛМ он уходит в воду [15]; в) применением растворителей с большой длиной углеводородной цепи (*n*-гексадекан, *n*-гексадецилбромид) [12, 24, 25, 41, 109]; г) увеличением концентрации липида в мембранообразующем растворе [104].

Проведенные нами исследования показали, что ПЛМ с вымораживаемым растворителем (использовали *n*-нонадекан, замерзающий при 32 °С) не удобны для работы с ферментом из-за малого «времени жизни» черных мембран (20—30 мин). Что касается «осушителя», то он уже в незначительных концентрациях ингибирует Na^+ , K^+ -АТФазу. Для работы использовались ПЛМ, формируемые из концентрированных липидных растворов (50—80 мг/мл) на *n*-гексадекане. Судя по данным измерения емкости, позволяющей оценить косвенно количество растворителя в бислое, такие ПЛМ вполне сопоставимы с ПЛМ без растворителя. Последние получают из двух липидных монослоев, сформированных на границе раздела воздух — вода [24, 25, 77].

В табл.1 приведен состав применявшихся нами мембранообразующих липидных смесей. В процессе работы было обнаружено, что оба препарата Na^+ , K^+ -АТФазы встраиваются в ПЛМ тогда, когда в их состав входит окисленный холестерин с додецилфосфатом (0,1—0,2 мкг/мл) или каким-либо отрицательно заряженным фосфолипидом (5—15 %). Весовое соотношение липид: холестерин в мембранообразующем растворе должно быть не менее 5:1 — 4:1.

Присутствие холестерина, по-видимому, весьма важно для встраивания в ПЛМ луброльных препаратов фермента. Можно думать, что причиной этого является изменение холестерином электрического поля внутри мембраны, поскольку он снижает дипольный момент липидных молекул [53, 101, 102]. Что же касается додецилфосфа-

Таблица 1
Встраивание растворимых Na^+ , K^+ -АТФаз мозга в ПЛМ различного состава

Состав ПЛМ	Вероятность встраивания		Вероятность ингибирования оубаином	
	Неочищенная	Очищенная	Неочищенная	Очищенная
Окисленный холестерин с ДДФ* на октано, декано, тетрадекане	0,22	0,03	0,20	0,01
Общие липиды мозга и окисленный холестерин с ДДФ на н-гексадекане, октано, тетрадекане	0,26	0,03	0,20	0,06
Общие фосфолипиды мозга и окисленный холестерин с ДДФ на н-гексадекане, октано, тетрадекане	0,25	0,03	0,18	0,03
Общие липиды мозга на н-гептано	0	0	—	—
Общие липиды мозга на н-гексадекане	0	0	—	—
Общие фосфолипиды мозга на н-гексадекане	0	0	—	—
Общие фосфолипиды мозга с неокисленным холестерином на н-гексадекане	0	0	—	—
Яичный лецитин на н-гексадекане	0	0	—	—
Яичный лецитин с неокисленным холестерином на н-гексадекане	0	0	—	—
Яичный лецитин и неокисленный холестерин с ДДФ на н-гексадекане	0,16	0,02	0,15	0
Фосфатидилсерин мозга на н-гексадекане	0	0	—	—
Фосфатидилсерин мозга и неокисленный холестерин с ДДФ на н-гексадекане, октано, тетрадекане	0,28	0,05	0,20	0,05
Фосфатидилсерин мозга и неокисленный холестерин на н-гексадекане	0	0	—	—
Яичный лецитин, фосфатидилсерин и неокисленный холестерин на н-гексадекане	0	0	—	—
Яичный лецитин с фосфатидной кислотой на н-гексадекане	0	0	—	—
Яичный лецитин с фосфатидилэтаноламином на н-гексадекане	0	0	—	—
Яичный лецитин с лизофосфатидилхолином на н-гексадекане	0	0	—	—
Яичный лецитин, фосфатидилсерин и окисленный холестерин с ДДФ на н-гексадекане, октано, тетрадекане	0,24	0,04	0,20	—
Яичный лецитин, фосфатидилэтаноламин и окисленный холестерин с ДДФ на н-гексадекане, октано, тетрадекане	0,24	0,04	0,18	—
Общие липиды митохондрий, фосфатидилсерин и окисленный холестерин с ДДФ на н-гексадекане, октано, тетрадекане	0,36	0,19	0,30	0,08
Общие липиды митохондрий с неокисленным холестерином на н-гексадекане	0	0	—	—
Общие липиды митохондрий и окисленный холестерин с ДДФ на н-гексадекане, октано, тетрадекане	0,34	0,18	0,28	0,05

* ДДФ — додецилфосфат

та и отрицательно децилфосфат и кислые заряженные группы, наличие липидов и углеводов, осуществление ферментом, активация с другой — гидрофобное изменение гидрофобных свойств встраивания Na^+ , K^+ в присутствии стабилизирующего раствора солей. Упакованы наименее эффективно (время инкубации 50—80 мин), обладающие высокой активностью (время инкубации 20—30 мин). Источники: [1, 2].

Встраивание очищ

Яичный лецитин, холестерин с ДДФ на октано, декано, тетрадекане
Яичный лецитин, мин и окисленный холестерин на октано, тетрадекане
Общие липиды митохондриального холестерина на октано, тетрадекане

Важное значение имеет в него фермента быстрое получение путем увеличения концентрации эфиров фосфолипидов (увеличение концентрации липидных растворов липидных видов фосфолипидов из заряженных липидов в отсутствие этого отрицательного влияния двумя монослоями ПЛМ. Концентрация Ca^{2+} добавлялась в концентрации от 0,5 до 1,0 мМ, но оказалась неустойчивыми.

Как следует из данных, Na^+ , K^+ -АТФазы встраиваются в ПЛМ с высокой эффективностью.

На сегодняшний день достигнуты в опытах с дисперсиями липидов [45], которому удалась кинетика ионной хемиостазии и успешной реконструкции гидрофобной области. Эт

та и отрицательно заряженных фосфолипидов, то их роль скорее не однозначна. Додецилфосфат и кислые фосфолипиды создают на поверхности ПЛМ отрицательно заряженные группы, что, в свою очередь, разрыхляет бислои, изменяет фазовое состояние липидов и увеличивает их жидкость. Поэтому можно думать, что с одной стороны, осуществляется электростатическое взаимодействие между алкилфосфатом и ферментом, активирующее Na^+, K^+ -АТФ и обуславливающее ее связывание с ПЛМ, а с другой — гидрофобное, способствующее уже внедрению фермента в бислой. На значение гидрофобных взаимодействий указывает тот факт, что наибольшая вероятность встраивания Na^+, K^+ -АТФазы в ПЛМ наблюдается в том случае, когда мембранообразующий раствор содержит митохондриальные липиды, углеводородные цепи которых упакованы наименее плотно. К сожалению, эти мембраны очень медленно чернеют (до 50—80 мин), обладают низкой механической прочностью и время их жизни не превышает 20—30 мин. Поэтому для систематических исследований с ферментом они непригодны.

Таблица 2

Встраивание очищенной растворимой Na^+, K^+ -АТФазы мозга в асимметричные ПЛМ различного состава

Состав ПЛМ	Вероятность встраивания	Вероятность ингибирующего эффекта оуабайна
Яичный лецитин, фосфатидилсерин и окисленный холестерин с ДДФ на н-гексадекане, октане, тетрадекане	0,08	0,03
Яичный лецитин, фосфатидилсерин, фосфатидилэтаноламин и окисленный холестерин с ДДФ на н-гексадекане, октане, тетрадекане	0,08	0,03
Общие липиды митохондрий, фосфатидилсерин и окисленный холестерин на н-гексадекане, октане, тетрадекане	0,23	0,1

Важное значение состояния гидрофобной части бислоя для процесса встраивания в него фермента было обнаружено также в опытах с асимметричными ПЛМ. Их можно получить путем увеличения в одной из ячеек камеры концентрации Ca^{2+} . Связывание ионами Ca^{2+} эфиров фосфорной кислоты и карбоксильных групп приводит к уменьшению подвижности (увеличивается плотность упаковки) углеводородных цепей. В ПЛМ из смешанных растворов липидов этот эффект приводит к латеральному разделению молекулярных видов фосфолипидов в пределах монослоя. Образуются плотноупакованные агрегаты из заряженных липидов и отделенные от них кластеры других липидов. Вследствие этого отрицательно заряженные липиды распределяются асимметрично между двумя монослоями ПЛМ [13, 35, 75].

Ca^{2+} добавляли во внутреннюю ячейку камеры (транс-сторона мембраны) в концентрации от 0,5 до 5 мМ. При более высоких концентрациях Ca^{2+} мембраны становились неустойчивыми и время их жизни значительно сокращалось.

Как следует из данных, представленных нами в табл. 2, вероятность встраивания Na^+, K^+ -АТФазы в асимметричные ПЛМ и ее ингибирования оуабайном была наиболее высокой.

На сегодняшний день наибольшие успехи по реконструкции натриевого «насоса» достигнуты в опытах с липосомами, получаемыми ультразвуковой обработкой водных дисперсий липидов. Особенно демонстративны в этом отношении исследования Голдина [45], которому удалось воспроизвести не только активный перенос Na^+ и K^+ , но и стехиометрию ионов и АТФ при транспорте. Нам кажется, что одна из основных причин успешной реконструкции «насоса» в липосомы состоит именно в состоянии их гидрофобной области. Это предположение подтверждается данными, полученными при ис-

следовании ПЛМ и липосом физическими и физико-химическими методами. Так, рамановская спектроскопия, флуоресцентные исследования, дифференциальная и сканирующая калориметрия свидетельствуют о различиях в фазовых переходах между плоскими и везикулярными бислоями [43, 100]. ЯМР и ЭПР исследования демонстрируют разницу в латеральном фазовом разделении смешанных липидных мембран и их жидкости [31]. Сейчас есть все основания считать, что эти различия обусловлены термодинамическими факторами, возникающими вследствие разного радиуса кривизны ПЛМ и везикул [26].

Итак, натриевый «насос» может быть встроен в определенные ПЛМ из раствора, омывающего мембрану. В то же время необходимость для встраивания больших концентраций холестерина создает, как указывалось выше, неблагоприятные условия для функционирования фермента. По-видимому, поэтому вероятность проявления ингибирующего эффекта оубаина оказывается весьма низкой. Скорее всего, в таких ПЛМ комплементарная поверхность молекулы фермента изменена до такой степени, что к ней затруднен доступ ингибитора. Аналогичная ситуация наблюдается при работе Na^+ , K^+ -АТФазы *in vivo* и *in vitro* при 0 °С [50].

В связи с этим нельзя не отметить, что естественную конформацию Na^+ , K^+ -АТФазы изменяет также детергент, довольно значительные количества которого прочно связываются ферментом (в среднем 0,27 мг/мг белка) [46] и не замещаются фосфолипидами [46, 99]. Недавно Копсил [66] показал, что солюбилизованные лубролом препараты Na^+ , K^+ -АТФазы теряют чувствительность и к ионному составу среды инкубации при ингибировании антителами.

Совершенно очевидно, таким образом, что при реконструкции натриевого «насоса» в ПЛМ не выполняется одно из основных методологических требований такого рода исследований [67], а именно, сохранение естественной конформации и нативной природы окружения Na^+ , K^+ -АТФазы. Дальнейшие исследования в этой области должны, несомненно, вестись в двух основных направлениях. Первое — поиск других солюбилизирующих агентов, не нарушающих четвертичную структуру белка и, главное, легко замещаемых липидами. И второе — подбор мембранообразующих смесей, создающих наиболее оптимальные условия для встраивания Na^+ , K^+ -АТФазы в ПЛМ и проявления ею ферментативной и транспортной активности. Основным компонентом ПЛМ должны быть фосфолипиды, построенные из цис-полиненасыщенных жирных кислот типа линолевой и линоленовой, играющие большую роль в физиологической активности этого фермента.

Литература

1. Барский Е. А. и др. Прямые изменения генерации электрического тока липопротеидными комплексами.— Биоорганическая химия, 1975, № 1, с. 113—126.
2. Бергельсон Л. Д. Ультраструктура биологических мембран.— Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1975, 20, № 3, с. 322—334.
3. Болдырев А. А. Роль липидов в функционировании Na^+ — K^+ -активируемой аденозинтрифосфатазы.— Биологические науки, 1979, № 3, (183), с. 5—17.
4. Болдырев А. А., Твердислов В. А. Молекулярная организация и механизм функционирования натриевого насоса.— Биофизика, 1978, 10, сер. Итоги науки и техники. М., с. 3—124.
5. Бужинский Э. П. Высокая ионная селективность бимолекулярных фосфолипидных мембран без введения модификаторов.— Цитология, 1974, 16, № 5, с. 641—650.
6. Веренинов А. А. Транспорт ионов через клеточную мембрану. Анализ потоков. Л.: Наука, 1978.—285 с.
7. Гришин А. Ф., Ненашев В. А., Берестовский Г. Н. Взаимодействие липосом с бимолекулярными мембранами.— Биофизика, 1979, 24, № 3, с. 467—472.
8. Кирсенко О. В., Вавилова Г. Л. О роли липидов в структуре Na^+ , K^+ -АТФазы.— Молекулярная биология, Киев: Наукова думка, 1976, 13, с. 44—57.
9. Курский М. Д., Силакова А. И. Молекулярная организация Mg^{2+} , Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикула.— Укр. биохим. журн., 1979, 51, № 2, с. 185—200.
10. Лышко В. К. Натриевый насос биологических мембран. Киев: Наукова думка, 1977.—144 с.
11. Маркин В. С., Чизмаджев Ю. А. Индуцированный ионный транспорт.— М.: Наука, 1974,—167 с.

12. Ненашев В. А., липидных мембр. № 1888—76 Деп.
13. Радда Дж. К. К энергии.— Биолог. и функций мемб. и функций мемб. зависимой АТФазе.
14. Райхман М. Л., плоской АТФазе.
15. Ровин Ю. Г., плоских бислоями.
16. Рожманова О. Л. мах.— Нейрофизи.
17. Салеев Р. К., Ч. бирск: Наука, 1974, № 3, с. 47—
18. Скулачев В. П. 1974, № 3, с. 47—
19. Соколов Ю. В., ных мембран с л.
20. Сорокина З. А., ствие растворимыми.— ДАН СССР.
21. Табак М., Смирных характерист. магнитных зондо.
22. Aizawa Y., Kobalformed on the p. p. 393—399.
23. Bamberg E. Rhodics of Structure and of lipid bilayers. N 3, p. 323—334.
24. Benz R., Frölich carrier-mediated. 464, N 3, p. 465—
25. Bergelson L. D., nes.— Science, 1974, N 3, p. 323—334.
26. Blumenthal R., St rations. II. Electri.
27. Blumenthal R., St tance—inducing r. Sci., 1975, 264, p.
28. Boldyrev A., Russ lipids and Mg-ion.
29. Boldyrev A., Russ lipids and Mg-ion.
30. Chandler H. D., V a mechanisms for.
31. Chrezeszczyk A., of highly curved. 470, N 2, p. 161—1
32. Deguchi N., Jorge parison of thin s brane-bond (Na^+ , de k. Acta, 1976, 457, N
33. De-Pont J. J., Pr lipids in highly p. Biochim. Biophys.
34. Dijk van P. W., studies on the effi phospholipids and 1978, 512, N 1, p.
35. Düzgunes N., Ohk lipid membranes.— BioScience, 1976,
36. Eisenberg M., Mo BioScience, 1976,
37. Emmelot P. The c in relation to fu. p. 112—132.

12. Ненашев В. А., Берестовский Г. Н. Физико-химические свойства бимолекулярных липидных мембран (обзор). Рукопись депонирована в ВИНТИ 27 мая 1976 г. № 1888—76 Деп.—82 с.
13. Радда Дж. К. Конформационные изменения мембраны в процессе трансформации энергии.— Биологические мембраны. Двенадцать очерков о структуре, свойствах и функциях мембран. М.: Атомиздат, 1978, с. 106—117.
14. Райхман М. Л., Мошковский Ю. Ш. Конформационные переходы в Na^+ — K^+ -зависимой АТФазе.— Биохимия, 1975, 40, № 1, с. 150—158.
15. Ровин Ю. Г., Багавеев И. А., Руднева В. С. Формирование и свойства «сухих» плоских бислойных липидных мембран.— Биофизика, 1980, 25, № 1, с. 183.
16. Рожманова О. М., Стельмах Л. И. Реконструкция натриевого насоса в липосомах.— Нейрофизиология, 1980, 12, № 6.
17. Салаяв Р. К., Чернышов В. И. Мембраны изолированной протоплазмы. Новосибирск: Наука, 1978.—95 с.
18. Скулачев В. П. Роль мембранных структур в биоэнергетике.— Вестник АН СССР, 1974, № 3, с. 47—59.
19. Соколов Ю. В., Лишко В. К. Изучение слияния плоских бислойных фосфолипидных мембран с липосомами.— Биохимия, 1979, 44, № 2, с. 317—324.
20. Сорокина З. А., Говоруха А. В., Рожманова О. М., Стельмах Л. И. Взаимодействие растворимой Na^+ , K^+ -АТФазы мозга с плоскими фосфолипидными мембранами.— ДАН СССР, 1978, 241, № 1, с. 223—227.
21. Табак М., Смирнова И. Н., Рууге Э. К., Твердислов В. А. Исследование структурных характеристик мембранных препаратов Na^+ , K^+ -АТФазы с помощью парамагнитных зондов.— Биофизика, 1977, 22, № 2, с. 217—222.
22. Aizawa Y., Kobatake Y. A theory of self-organization of an excitable membrane formed on the protoplasmic droplet from Nitella.— J. Theor. Biol., 1976, 60, N 3, p. 393—399.
23. Bamberg E. Rhodopsin and other protein in artificial lipid membranes.— Biophysics of Structure and Mechanisms, 1977, 3, N 1, p. 39—42.
24. Benz R., Frölich O., Läuger P., Montal M. Electrical capacity of black lipid films and of lipid bilayers formed from monolayers.— Biochim. Biophys. Acta, 1974, 394, N 3, p. 323—334.
25. Benz R., Frölich O., Läuger P. Influence of membrane structure on the kinetics of carrier-mediated ion transport through lipid bilayers.— Biochim. Biophys. Acta, 1977, 464, N 3, p. 465—481.
26. Bergelson L. D., Barsukov L. I. Topological asymmetry of phospholipids in membranes.— Science, 1977, 197, N 4300, p. 224—230.
27. Blumenthal R., Shamoo A. E. Ionophoric material derived from eel membrane preparations. II. Electrical characteristics.— J. Membrane Biol., 1974, 19, N 1—2, p. 141—162.
28. Blumenthal R., Shamoo A. E. The lipid bilayer membrane as an assay for ionconductance—inducing materials isolated from biological membranes.— Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, 264, p. 483—485.
29. Boldyrev A., Ruuge E., Smirnova I., Tabak M. Na^+ , K^+ -ATP-ase: the role of state of lipids and Mg-ions in activity regulation.— FEBS Letters, 1977, 90, N 3, p. 303—308.
30. Chandler H. D., Woolf C. J., Hepburn H. R. Gliding edge dislocations in proteins as a mechanisms for active ion transport.— Biochem. J., 1978, 169, N 3, p. 559—565.
31. Chrezeszczyk A., Wishnia A., Springer Ch. S. The intrinsic structural asymmetry of highly curved phospholipid bilayer membranes.— Biochim. Biophys. Acta, 1977, 470, N 2, p. 161—169.
32. Deguchi N., Jorgensen P., Maunsbach A. B. Ultrastructure of the sodium pump. Comparison of thin sectioning, negative staining and freeze-fracture of purified, membrane-bound (Na^+ , K^+)-ATP-ase.— J. Cell. Biol., 1977, 75, N 3, p. 619—634.
33. Demel R. A., de Kruijff B. The function of sterols in membranes.— Biochim. Biophys. Acta, 1976, 457, N 1, p. 109—132.
34. De-Pont J. J., Prooijen van E. A., Bonting S. L. Role of negatively charged phospholipids in highly purified (Na^+ , K^+)-ATP-ase from rabbit kidney outer medulla.— Biochim. Biophys. Acta, 1978, 508, N 3, p. 464—477.
35. Dijk van P. W. M., de Kruijff B., Verkleij A. J., van Deenen L. L. M. Comparative studies on the effects of pH and Ca^{2+} on bilayers of various negatively charged phospholipids and their mixtures with phosphatidylcholine.— Biochim. Biophys. Acta, 1978, 512, N 1, p. 84—96.
36. Düzgunes N., Ohki S. Calcium-induced interaction of phospholipid vesicles and bilayer lipid membranes.— Biochim. Biophys. Acta, 1977, 467, N 3, p. 301—308.
37. Eisenberg M., McLaughlin S. Lipid bilayers as models of biological membranes.— BioScience, 1976, 26, N 7, p. 436—443.
38. Emmelot P. The organization of the plasma membrane of mammalian cells: structure in relation to function.— In: Mammalian Cell Membrane, 1977, Butterworth, 2, p. 112—132.

39. Erdmann E., Krawietz W., Presek P. Receptor for cardiac glycosides.— In: Miocardial Failure. Int. Symp., Rottach—Egern/Tegernsee, Berlin e. a., 1977, p. 120—131.
40. Eytan G. D., Racker E. Selective incorporation of membrane proteins into proteoliposomes of different compositions.— J. Biol. Chem., 1977, 252, N 10, p. 3208—3213.
41. Fahey P. F., Koppel D. E., Barak L. S., Wolf D. E., Elson E. L., Webb W. W. Lateral diffusion in planar lipid bilayers.— Science, 1977, 195, N 427, p. 305—307.
42. Fontane R. N., Harris R. A., Schroeder F. Neuronal membrane lipid asymmetry.— Life Sci., 1979, 24, N 5, p. 395—400.
43. Gaber B. P., Peticolas W. L. On the quantitative interpretation of biomembrane structure by Raman spectroscopy.— Biochim. Biophys. Acta, 1977, 465, N 2, p. 260—275.
44. Giotta G. J. Quaternary structure of Na^+ , K^+ -dependent adenosine triphosphatase.— J. Biol. Chem., 1976, 251, N 8, p. 1247—1252.
45. Goldin S. M. Active transport of sodium and potassium ions by the sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase from renal medulla.— J. Biol. Chem., 1977, 252, N 14, p. 5630—5642.
46. Goldman S., Wheeler K. Ouabain binding to phospholipid-dependent ATP-ase.— Biochem. J., 1978, 169, N 2, p. 313—320.
47. Goodall M. C., Sachs G. Reconstitution of proton pump from gastric mucosa.— J. Membrane Biol., 1977, 35, N 4, p. 285—301.
48. Gordon L. M., Sauerheber R. D., Esgate J. A. Spin label studies on rat liver and heart plasma membranes: effects of temperature, calcium and lanthanum on membrane fluidity.— J. Supramol. Struct., 1978, 9, N 3, p. 299—310.
49. Grishan C. M., Barnett R. E. The role of lipid-phase transitions in the regulation of the (sodium+potassium)-adenosine triphosphatase.— Biochemistry, 1973, 12, N 14, p. 2635—2637.
50. Gruener N., Avi-Dor Y. Temperature-dependence of activation and inhibition of rat-brain adenosine triphosphatase activated by sodium and potassium ions.— Biochem. J., 1966, 100, N 3, p. 762—767.
51. Gruppe R. Biologische Forschung an künstlichen Membranen.— Wissenschaft und Forschung, 1976, 25, N 10, p. 444—450.
52. Haase W., Koepsell H. Substructure of membrane-bound Na^+ , K^+ -ATP-ase protein.— Pflügers Arch., 1979, 381, N 2, p. 127—135.
53. Hladky S. B., Haydon D. A. Membrane conductance and surface potential.— Biochim. Biophys. Acta, 1973, 318, N 3, p. 464—468.
54. Hyman E. S. Ion-selectivity of sphingomyelin-cardiolipin-oxidized cholesterol membranes.— Fed. Proc., 1973, 32, p. 233.
55. Hyman E. S. An ATP-sodium pseudo pump.— Biophys. J., 1975, 15, N 2, part 2, p. 304a.
56. Hyman E. S. Electrogenesis from an ATP-ase-ATP-sodium pseudo pump.— J. Membrane Biol., 1977, 37, N 2, p. 263—275.
57. Isern de Caldentey M., Wheeler K. P. Requirement of negatively charged dispersions of phospholipids for interaction with lipid-depleted adenosine triphosphatase.— Biochem. J., 1979, 177, N 1, p. 265—273.
58. Israelachvili J. N. Refinement of the fluid-mosaic model of membrane structure.— Biochim. Biophys. Acta, 1977, 469, N 2, p. 221—225.
59. Jain M. K. Role of cholesterol in biomembranes and related systems.— In: Current Topics in Membranes and Transport. New York, San Francisco and London: Academic Press, 1975, p. 1—41.
60. Jain M. K., Strickholm A., Cordes E. H. Reconstitution of an ATP-mediated active transport system across lipid membranes.— Nature (London), 1969, 222, N 4564, p. 871—873.
61. Jain M. K., White F. P., Strickholm A., Williams E., Cordes E. H. Studies concerning the possible reconstitution of an active cation pump across an artificial membrane.— J. Membrane Biol., 1972, 8, N 2, p. 363—388.
62. Jørgensen P. L. Purification and characterization of Na^+ , K^+ -ATP-ase. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in presence of NaCl and KCl .— Biochim. Biophys. Acta, 1977, 466, N 1, p. 97—108.
63. Karlisch S. J. D., Jørgensen P. L., Gitler C. Identification of a membrane-embedded segment of the large polypeptide chain of the (Na^+ , K^+)-ATP-ase.— Nature (London), 1977, 269, N 5630, p. 715—717.
64. Kimelberg H. Alteration in phospholipid-dependent Na^+ , K^+ -ATP-ase activity due to lipid fluidity. Effect of cholesterol and Mg^{2+} .— Biochim. Biophys. Acta, 1975, 413, N 1, p. 143—146.
65. Kimelberg H. (Sodium plus potassium ion)-dependent adenosine triphosphatase activity in reconstituted systems and in cultured cells.— Biochim. Soc. Trans., 1976, 4, N 4, p. 755—757.
66. Koepsell H. Conformational changes of membrane-bound (Na^+ + K^+)-ATP-ase as revealed by antibody inhibition.— J. Membrane Biol., 1979, 45, N 1—2, p. 1—20.

67. Korenbrot J. I. Locating proteins. p. 19—49.
68. Kyte J. E. Structure of the Na⁺ pump. The relationship to transport.— J. Biol. Chem., 1977, 252, N 10, p. 3208—3213.
69. Kyte J. E. The Na⁺ pump. Amer. Phys. Soc., 1977, p. 1—10.
70. Läufer P. A. The Na⁺ pump. Biochim. Biophys. Acta, 1979, 552, N 1, p. 1—10.
71. Lee A. G. Functional properties of the Na⁺ pump. Progr. Biophys. Mol. Biol., 1977, 32, N 1, p. 1—10.
72. Malhotra S. K. The Na⁺ pump. Subcellular localization.— Subcellular Biochem., 1977, 1, p. 1—10.
73. Mandersloot J. G. The Na⁺ pump as an activator of the Na⁺ pump. Phys. Acta, 1978, 50, N 1, p. 1—10.
74. McIntosh T. J. The Na⁺ pump in bilayers.— Biochim. Biophys. Acta, 1977, 465, N 2, p. 260—275.
75. McQuarrie D. A. The Na⁺ pump. Biophys. J., 1977, 29, N 4, p. 523—531.
76. Michalak M., Sauerheber R. D., Esgate J. A., Gordon L. M., Sauerheber R. D., Esgate J. A. Spin label studies on rat liver and heart plasma membranes: effects of temperature, calcium and lanthanum on membrane fluidity.— J. Supramol. Struct., 1978, 9, N 3, p. 299—310.
77. Montal M., Mueller R. Membrane fusion and a study of the Na⁺ pump. p. 3561—3566.
78. Moore M. R. Fluorescence films.— Biochim. Biophys. Acta, 1977, 465, N 2, p. 260—275.
79. Nakao T., Nakao T., Nakao T. Transport ATP-ase. I. p. 609—619.
80. Neumcke B. Some properties of the Na⁺ pump in bilayers.— Biophys. J., 1977, 29, N 4, p. 523—531.
81. Pohl G. W., Starobinets A. M., Racker E. Branches.— Biochim. Biophys. Acta, 1976, 79, N 4, p. 409—419.
82. Racker E., Knowlton J. R., Racker E. Reconstitution of adenosine triphosphatase. N 16, p. 8191—8200.
83. Racker E. Reconstitution of the Na⁺ pump. 1976, 79, N 4, p. 409—419.
84. Racker E., Knowlton J. R., Racker E. Reconstitution of the Na⁺ pump. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1975, 250, N 12, p. 1—10.
85. Racker E., Eytan G. D., Racker E. Translocation of the Na⁺ pump. 1975, 250, N 12, p. 1—10.
86. Redwood W. R., Racker E., Racker E. Reconstitution of the Na⁺ pump with phospholipids. p. 989—992.
87. Redwood W. P., Racker E., Racker E. Reconstitution of the Na⁺ pump with lipids. p. 10—22.
88. Sakanishi A., Miyazawa T., Racker E. Reconstitution of the Na⁺ pump in dimyristoylphosphatidylcholine vesicles. 1978, 50, N 12, p. 2636—2646.
89. Shamoo A. E. Isolation and reconstitution of the Na⁺ pump. p. 1—10.
90. Shamoo A. E., Racker E., Racker E. Reconstitution of the Na⁺ pump in organ and kidney. p. 1—10.
91. Shamoo A. E., Racker E., Racker E. Reconstitution of the Na⁺ pump in the presence of cholesterol. 1979, 19, N 1, p. 163—171.
92. Shamoo A. E., Racker E., Racker E. Reconstitution of the Na⁺ pump from eel membrane. 1974, 19, N 1, p. 1—10.
93. Shamoo A. E., Racker E., Racker E. Reconstitution of the Na⁺ pump. N. Y. Acad. Sci., 1975, 250, N 12, p. 1—10.
94. Shamoo A. E., Racker E., Racker E. Reconstitution of the Na⁺ pump activity in 20000 M^w reticulium.— J. Biol. Chem., 1977, 252, N 10, p. 3208—3213.

67. Korenbrot J. I. Ion transport in membranes: incorporation of biological ion-translocating proteins in model membrane systems.—*Ann. Rev. Physiol.*, 1977, **39**, N 1, p. 19—49.
68. Kyte J. E. Structural studies of sodium and potassium ion-activated adenosine triphosphatase. The relationship between molecular structure and the mechanism of active transport.—*J. Biol. Chem.*, 1975, **250**, N 16, p. 7443—7449.
69. Kyte J. E. The molecular structure of a protein involved in active transport.—*Bull. Amer. Phys. Soc.*, 1978, **23**, N 3, p. 350—359.
70. Läuger P. A channel mechanism for electrogenic ion pumps.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1979, **552**, N 1, p. 143—161.
71. Lee A. G. Functional properties of biological membranes. A physicochemical approach.—*Progr. Biophys. Molec. Biol.*, 1975, **29**, N 1, p. 5—56.
72. Malhoira S. K. Molecular structure of biological membranes: functional characterization.—*Subcellular Biochem.*, 1978, **5**, N 1, p. 221—259.
73. Mandersloot J. G., Roelofsens B., De Gier J. Phosphatidylinositol as the endogenous activator of the Na^+ , K^+ -ATP-ase in microsomes of rabbit kidney.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1978, **508**, N 3, p. 478—485.
74. McIntosh T. J. The effect of cholesterol on the structure of phosphatidylcholine bilayers.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1978, **513**, N 1, p. 43—58.
75. McQuarrie D. A., Mulas P. Asymmetric charge distributions in planar bilayer systems.—*Biophys. J.*, 1977, **17**, N 1, p. 103—109.
76. Michalak M., Sarzala M. G. Asymmetria błon biologicznych.—*Post. Biochem.*, 1977, **23**, N 4, p. 523—539.
77. Montal M., Mueller P. Formation of bimolecular membranes from lipid monolayers and a study of their electrical properties.—*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1972, **69**, N 8, p. 3561—3566.
78. Moore M. R. Fusion of liposomes containing conductance probes with black lipid films.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1976, **426**, N 4, p. 765—771.
79. Nakao T., Nakao M., Fujita M. Purification and some properties of Na^+ , K^+ -transport ATP-ase. I. Solubilisation and lubrol extracts.—*J. Biochem.*, 1973, **73**, N 3, p. 609—619.
80. Neumcke B. Some similarities between processes at biological membranes and lipid bilayers.—*Biophys. Struct. and Mech.*, 1976, **2**, N 1, p. 93—94.
81. Pohl G. W., Stark G., Trissl H.—W. Interaction of liposomes with black lipid membranes.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1973, **318**, N 3, p. 478—481.
82. Racker E. Reconstitution of a calcium pump with phospholipids and purified Ca^{2+} adenosine triphosphatase from sarcoplasmic reticulum.—*J. Biol. Chem.*, 1972, **247**, N 16, p. 8191—8200.
83. Racker E. Reconstitution and mechanism of ion translocation systems.—*J. Biochem.*, 1976, **79**, N 4, p. 46—69.
84. Racker E., Knowles A. F., Eytan E. Resolution and reconstitution of ion-transport systems.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, **264**, p. 17—31.
85. Racker E., Eytan E. A coupling factor from sarcoplasmic reticulum required for the translocation of Ca^{2+} ions in a reconstituted Ca^{2+} -ATP-ase pump.—*J. Biol. Chem.*, 1975, **250**, N 12, p. 7533—7534.
86. Redwood W. R., Muedner H., Thompson T. E. Interaction of bacterial adenosine triphosphatase with phospholipid bilayers.—*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1969, **64**, N 3, p. 989—992.
87. Redwood W. P., Gibles D. C., Thompson T. E. Interaction of solubilized membrane ATP-ase with lipid bilayer membranes.—*Biochim. Biophys. Acta*, 1973, **318**, N 1, p. 10—22.
88. Sakanishi A., Mitaku Sh., Ikegami A. Stabilizing effect of cholesterol on phosphatidylcholine vesicles observed by ultrasonic velocity measurement.—*Biochemistry*, 1979, **18**, N 12, p. 2636—2642.
89. Shamoo A. E. Isolation of a sodium-dependent ionophore from $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATP-ase preparations.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1974, **242**, p. 389—405.
90. Shamoo A. E., Albers R. W. Na^+ -selective ionophoric material derived from electric organ and kidney membranes.—*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1973, **70**, N 4, p. 1191—1196.
91. Shamoo A. E., Myers M. Na^+ -dependent ionophore as part of the small polypeptide of the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)$ -ATP-ase from eel electroplax membrane.—*J. Membrane Biol.*, 1974, **19**, N 1, p. 163—178.
92. Shamoo A. E., Myers M. M., Blumenthal R., Albers R. W. Ionophoric material derived from eel membrane preparation. I. Chemical characteristics.—*J. Membrane Biol.*, 1974, **19**, N 1, p. 129—140.
93. Shamoo A. E., Ryan T. Isolation of ionophores from ion-transport systems.—*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1975, **264**, p. 83—96.
94. Shamoo A. E., Ryan T. E., Steward P. S., McLennan D. H. Localization of ionophore activity in 20000-Dalton fragment of the adenosine triphosphatase of sarcoplasmic reticulum.—*J. Biol. Chem.*, 1976, **251**, N 13, p. 4147—4154.

95. Shamoo A. E., Goldstein D. A. Isolation of ionophores from ion-transport systems and their role in energy transduction.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, **472**, N 1, p. 13—53.
96. Singer S. J. The molecular organization of membranes.— *Ann. Rev. Biochem.* 1974, **43**, p. 805—833.
97. Singer S. J. Thermodynamics, the structure of integral membrane proteins, and transport.— *J. Supramol. Struct.*, 1977, **6**, N 3, p. 313—323.
98. Singer S. J., Nicolson G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.— *Science*, 1972, **175**, N 265, p. 720—731.
99. Sood C., Sweet C., Zull J. Interaction of kidney Na⁺, K⁺-ATP-ase with phospholipid model membrane system.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1972, **282**, N 2, p. 429—434.
100. Spiker R. C., Levin I. W. Effect of bilayer curvature on vibrational raman spectroscopic behavior of phospholipid-water assemblies.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, **455**, N 2, p. 560—575.
101. Szabo G. Dual mechanism for the action of cholesterol on membrane permeability.— *Nature*, 1974, **252**, N 5478, p. 47—49.
102. Szabo G. The influence of dipole potentials on the magnitude and the kinetics of ion transport in lipid bilayer membranes.— In: *Extreme Environment: Mechanisms of Microbial Adaptation*. M. R. Heinrich, editor, Academic Press. N. Y., 1976, p. 321—329.
103. Vogel F., Meyer H. W., Grosse R., Repke K. Electron microscopic visualization of the arrangement of the two polipeptide component of (Na⁺+K⁺) ATP-ase.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, **470**, N 3, p. 497—502.
104. Waldbillig R., Szabo G. Solvent-depleted bilayer membrane from concentrated lipid solutions.— *Nature*, 1978, **272**, N 5656, p. 839—840.
105. Walker J. A., Wheeler K. R. Polar head-group and acyl side-chain requirements for phospholipid-dependent (Na⁺+K⁺)-ATP-ase.— *Biochim. Biophys. Acta*, 1975, **394**, N 1, p. 135—144.
106. Wallick E. T., Lane L. K., Schwartz A. Biochemical mechanism of the sodium pump.— *Ann. Rev. Physiol.*, 1979, **41**, p. 397—411.
107. Wallick E. T., Anner B. M., Ray M. V., Schwartz A. Effect of temperature on phosphorylation and ouabain binding to N-ethylmaleimide-treated (Na⁺+K⁺)-ATP-ase.— *J. Biol. Chem.*, 1978, **253**, N 24, p. 8778—8789.
108. White S. H. Temperature dependent structural changes in planar bilayer membranes. «Solvent freeze-out».— *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, **358**, N 1, p. 8—14.
109. White S. H. Phase transitions in planar bilayer membranes.— *Biophys. J.*, 1975, **15**, N 1, p. 94—102.
110. White S. H., Petersen D. C., Simon S., Yafuso M. Formation of planar bilayer membranes from lipid monolayers. A critique.— *Biophys. J.*, 1976, **16**, N 5, p. 481—489.
111. Yager P. A novel mechanism for the Na⁺, K⁺-ATP-ase.— *J. Theor. Biol.*, 1977, **66**, N 1, p. 1—11.

Институт физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Поступила в редакцию
24.III 1980 г.

УДК 616.089.583.29:612.822.2

ИЗМЕНЕНИЯ И АЦЕТИЛ ГИПОТАЛАМУСА

Работами многих исследователей установлено, что в течение жизни и моноаминоксидазы (Д) в течение жизни как основная функция в организме человека и животных биогенные амины и их метаболиты участвуют в регуляции многих процессов, в том числе в окислительно-восстановительных процессах. Учитывая важное значение этих процессов в регуляции деятельности при изучении влияния гипоталамуса.

Эксперименты выполнены на 2 кг. Поставлено шесть крыс, которые охлаждали до уровня ртутного столба +26 °С (глубокая гипотермия) в аппарате «Флюидокрани» для проведения гипотермии. Для угнетения высшей нервной деятельности в проведении гипотермии в эксперименте использовались кроликам в краевую часть гипоталамуса (ГОМК) из расчета 1,5 мг/кг. Рафиновые срезы ткани гипоталамуса по Гомори. На криостатах проводились исследования [7] в нейронитах супраоптического отдела гипоталамуса.

Результаты

Введение ГОМК в эксперименте вызвало значительные изменения в активности ферментов, значительно снижалась, в том числе в выдыхающим нашим исследователям организма животных, по сравнению с контролем. О снижении нейросекреторной функции при положительного материального соотношения к контролю, и количества дегенерированных нервных клеток. В условиях краниоэктомии проявлялась в увеличении активности ферментов, согласуется с литературными данными. Глубокая, проводимая на протяжении 72 часов гипотермия вызывает еще большее снижение активности ферментов.