

УДК 612.826

З. А. Сорокина

ИССЛЕДОВАНИЕ ИОНОФОРНЫХ СВОЙСТВ Na^+ , K^+ -АТФазы МОЗГА НА ПЛОСКИХ ЛИПИДНЫХ МЕМБРАНАХ

Изучение молекулярных механизмов функционирования натриевого насоса плазматических мембран клеток эукариот осуществляется ныне по нескольким направлениям: непосредственно на мембранах клеток при воздействии на них различных факторов, на выделенных из мембран препаратах фермента Na^+ , K^+ -АТФазы (аденозинтрифосфат фосфогидролаза, КФ. 3.6.1.3) и на реконструированных из липидов и фермента модельных системах (липосомах и плоских бимолекулярных липидных мембранах — БЛМ). Центральная проблема этих исследований — механизм трансмембранного переноса катионов — все еще остается неясной. Одним из наиболее перспективных подходов, значительно расширяющим экспериментальные возможности ее изучения, является попытка встраивания натриевого насоса в БЛМ с последующим исследованием характера ее проводимости. В прежних работах [10, 11] мы показали, что солюбилизованные в луброле WX препараты Na^+ , K^+ -АТФазы мозга крупного рогатого скота, введенные в омывающий мембрану раствор, обуславливают появление у определенного состава БЛМ ионофорных свойств, обнаруживающих зависимость от АТФ. Однако модификация БЛМ Na^+ , K^+ -АТФазой, особенно высокоочищенными препаратами фермента, осуществлялась не вполне однозначно. Кроме того, для нее были необходимы большие концентрации в БЛМ холестерина, которые *in vivo* при физиологических температурах снижают активность фермента. Наконец, в солюбилизованных лубролом препаратах Na^+ , K^+ -АТФазы было много прочно связанного детергента, который может изменять его естественную конформацию. Поэтому, по-видимому, вероятность проявления тормозящего эффекта убаина оказалась в этих опытах весьма низкой.

В настоящей работе проведено дальнейшее изучение ионоформных свойств высокоочищенных препаратов Na^+ , K^+ -АТФазы мозга на БЛМ с низким содержанием холестерина. Для уменьшения в препаратах фермента количества детергента процесс их выделения проводился в присутствии липидов из бобов сои, а модификация БЛМ осуществлялась посредством слияния с бисломом липосом, в мембраны которых был внедрен этот фермент.

Методика исследований

Работа выполнялась на БЛМ, получаемых по методу Мюллера на отверстии диаметром 0,5 мм в стенке вертикального тefлонового сосуда, погруженного в кварцевую ювету. Внутри сосуда (транс-сторона мембраны) находился раствор, содержащий 100 ммоль Na^+ и 5 ммоль K^+ , а снаружи (цис-сторона мембраны) — раствор со 100 ммоль K^+ и 5 ммоль Na^+ . Растворы готовили с 50 ммоль трис-НСI-буфера, pH 7,4 и 2,5 ммоль Mg^{2+} . Периодически их перемешивали магнитными мешалками в течение 30 с.

Измерения флюктуаций тока через БЛМ в присутствии фермента осуществляли посредством хлор-серебряных электродов с агар-агаровыми мостиками, присоединенных к высокоомному операционному усилителю, собранному на интегральных микросхемах, в режиме фиксации напряжения, задаваемого внешней батареей, и регистрировали самопишущим потенциометром. Работа проводилась в термостатированной камере, температура в ячейках которой поддерживалась равной $(38 \pm 0,5)^\circ\text{C}$, лишь в одной серии опытов ее изменяли от 38 до 28°C . При такой температуре мембраны чернели в течение 8–15 мин и, будучи немодифицированными ферментом, оставались стабильными примерно 2–6 ч. В течение этого времени изменений про-

водимости не наблюдалось жизни не менее 90–120 0,5 нСм/см².

Для образования БЛ из яичного желтка по [2] рогатого скота [22], фос крупного рогатого скота дифосфатидилглицерин (Д (Харьковского завода б «Sigma», США) и обще лученных по [13, 19]. Аз лестерин (фирма «Mergsk», нола. После установления матогграфии их применяли фолипидов добавляли α -то их веса и хранили запаян двух месяцев после получ липидов определяли по в в определенной пропорции непосредственно перед оп вания БЛМ составляла 50 бы получить БЛМ, содер теля. В готовые мембрано для полного растворения х

Для формирования Б обычно в микросомах и фосфатидилхолин, фосфат того, в мембранообразую превышающие его концент римую очищенную Na^+ , K^+ проросших соевых бобов и жениям, что для него хар пицы имеют более высок ненасыщенные ацильные р по двойным связям. Мы п фермента и, кроме того, б будет замещена фосфолип

Опыты проводили в протеолипосом и БЛМ: в 0,1 ммоль* [8, 12, 26], в женные фосфолипиды в к увеличивали осмотическое

Процедура проведения ния БЛМ в наружную яче чтобы концентрация белк перемешивали на протяж БЛМ). В раствор вводил н-НФФ), перемешивали е

Солюбилизованные рогатого скота получали, скому фильтрованию на к као [7] в присутствии Na^+ , K^+ -АТФазы концентр ции 0,02%), обрабатывая активностью 600–1800 м станию в среде инкубаци рого определяли методом восстановители. Активност набором ионов-активаторо фрез в полиакриламидно личие в высокоочищенных ных белковых фракций, около 100 000 и 50 000. К ров [18]. В качестве стан ствующих концентраций. (нии в реактив Фолина, уда

Фермент включали фосфатидилсерина (2:1 п шивали на роторном испа тчительно обезжиренной.

* Ca^{2+} — сильный ип ции Ca^{2+} могут блокирова

водимости не наблюдалось. Для работы использовали устойчивые БЛМ со временем жизни не менее 90–120 мин и потенциалонезависимой проводимостью не более 0,5 нСм/см².

Для образования БЛМ и протеолипосом использовали лецитин, полученный из яичного желтка по [20], фосфатидилсерин из белого вещества мозга крупного рогатого скота [22], фосфатидилэтаноламин из яичного желтка [20] или сердца крупного рогатого скота (производства НИС Дальневосточного Госуниверситета), дифосфатидилглицерин (ДФГ или кардиолипин) из сердца крупного рогатого скота (Харьковского завода бактериальных препаратов), фосфатидилинозитид (фирма «Sigma», США) и общие фосфолипиды из проросших соевых бобов (азолектин), полученных по [13, 19]. Азолектин подвергали дополнительной очистке, по [17]. Холестерин (фирма «Merck», ФРГ) дважды перекристаллизовывали из горячего этанола. После установления гомогенности фосфолипидов методом тонкослойной хроматографии их применяли без дополнительной очистки. В спиртовые растворы фосфолипидов добавляли α -токоферол (как антиоксидант) в количестве от 10 до 20 % их веса и хранили запаянными в ампулах при температуре около -10°C не более двух месяцев после получения, а азолектин — не более одной недели. Концентрацию липидов определяли по весу высушенного в вакууме образца. Липиды смешивали в определенной пропорции для получения БЛМ или липосом необходимого состава непосредственно перед опытом. Концентрация липидов в растворах для формирования БЛМ составляла 50–80 мг/мл. Их готовили на нормальном гексадекане, чтобы получить БЛМ, содержащие незначительное количество органического растворителя. В готовые мембранообразующие растворы добавляли от 10 до 20 мкг/мл эфира для полного растворения холестерина.

Для формирования БЛМ использовали фосфолипиды, которые обнаруживаются обычно в микросомах и наиболее очищенных препаратах фермента [5, 14]. Это фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин, кардиолипин. Кроме того, в мембранообразующих растворах были небольшие количества холестерина, не превышающие его концентраций в плазматических мембранах (см. таблицу). Растворимую очищенную Na^+K^+ -АТФазу мозга встраивали предварительно в липосомы из проросших соевых бобов и фосфатидилсерина. Азолектин был выбран по тем соображениям, что для него характерна высокая степень ненасыщенности. Такие фосфолипиды имеют более высокую температуру плавления, образуют «рыхлые» бислои, а ненасыщенные ацильные радикалы способны участвовать в реакциях присоединения по двойным связям. Мы полагали, что в такие липосомы легче встроится молекула фермента и, кроме того, при формировании протеолипосом часть луброла, возможно, будет замещена фосфолипидами азолектина.

Опыты проводили в условиях, обуславливающих наиболее эффективное слияние протеолипосом и БЛМ: в наружную ячейку камеры добавляли Ca^{2+} до концентрации 0,1 ммоль* [8, 12, 26], в состав БЛМ и протеолипосом включали отрицательно заряженные фосфолипиды в количестве от 30 до 50 % общего веса липидов [8, 9, 21] и увеличивали осмотическое давление раствора, заполняющего протеолипосомы [9].

Процедура проведения опытов была следующей. Спустя 10 мин после почернения БЛМ в наружную ячейку камеры добавляли протеолипосомы в таком количестве, чтобы концентрация белка составляла 0,01–10 мкг/мл. Раствор время от времени перемешивали на протяжении 15–30 мин (в зависимости от липидного состава БЛМ). В раствор вводили АТФ (в некоторых опытах ЦТФ, ацетилфосфат, либо н-НФФ), перемешивали его 30 с и начинали регистрацию проводимости мембраны.

Солюбилизованные лубролом WX препараты Na^+K^+ -АТФазы мозга крупного рогатого скота получали, как описано ранее [10, 11], и подвергали хроматографическому фильтрованию на колонке с сефарозой 6В по модифицированному методу Накао [7] в присутствии азолектина. Очищенный солюбилизованный препарат Na^+K^+ -АТФазы концентрировали и убирали водорастворимый луброл (до концентрации 0,02%), обрабатывая раствор несколько раз сефадексом G-50. Препарат обладал активностью 600–1800 мкмоль/л $\text{P}_{\text{неорг}}$ ·мг белка·ч. Активность оценивали по нарастанию в среде инкубации количества неорганического фосфора, концентрацию которого определяли методом Фiske и Суббароу при наличии аскорбиновой кислоты как восстановителя. Активность определяли по разнице активностей в среде с полным набором ионов-активаторов и в той же среде с убаином ($1 \cdot 10^{-3}$ ммоль). Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия показал наличие в высокоочищенных препаратах Na^+K^+ -АТФазы преимущественно двух основных белковых фракций, соответствующих полипептидам с молекулярными массами около 100 000 и 50 000. Концентрацию белка определяли по методу Лоури и соавторов [18]. В качестве стандарта использовали раствор альбумина в луброле соответствующих концентраций. Осадок, образующийся в присутствии луброла при добавлении в реактив Фолина, удаляли путем центрифугирования.

Фермент включали в большие липосомы. Их готовили из смеси азолектина и фосфатидилсерина (2:1 по весу). Спиртовые растворы фосфолипидов (12 мг) высушивали на ротаторном испарителе при 20°C в круглодонной колбе, предварительно тщательно обезжиренной. В колбу вносили затем 1 мл солевого раствора, которым

* Ca^{2+} — сильный ингибитор Na^+K^+ -АТФазы, поэтому более высокие концентрации Ca^{2+} могут блокировать натриевый насос.

СТВ Na^+K^+ -АТФазы МЕМБРАНАХ

ионирования натриевого от осуществляется ныне на мембранах клеток на выделенных из мем- аденозинтрифосфат фос- анных из липидов и фер- их бимолекулярных ли- блема этих исследова- гионов — все еще оста- подходов, значитель- сти ее изучения, явля- в БЛМ с последующим прежних работах [10, луброле WX препараты юта, введенные в омы- вление у определенного вающих зависимость от фазой, особенно высоко- лялась не вполне одно- большие концентрации иологических температу- в солюбилизованных много прочно связанного ственную конформацию. я тормозящего эффек- кой.

е изучение ионоформных -АТФазы мозга на БЛМ шения в препаратах фер- ления проводился в при- ния БЛМ осуществлялась мембраны которых был

методу Мюллера на отверстием ого сосуда, погруженного в ембраны) находился раствор, ки (дис-сторона мембраны) — отовили с 50 ммоль трис-НСI- перемешивали магнитными ме-

тствии фермента осуществляли выми мостиками, присоединен- анному на интегральных мик- го внешней батареей, и реги- оводилась в термостатирован- живалась равной ($38 \pm 0,5$) $^{\circ}\text{C}$, 28°C . При такой температуре одифицированными ферментом, этого времени изменений про-

заполнялась наружная ячейка камеры, 50—100 мкг белка фермента и 130 мг сахара. Смесь встряхивали 30—40 мин и инкубировали при температуре 30 °C в атмосфере азота в течение 14—18 ч. Протеолипосомы получали непосредственно перед опытом и использовали в течение одного дня. Вводили их в наружную ячейку камеры спустя 10 мин после почернения БЛМ микропипеткой порциями по 5—10 мкл в таком количестве, чтобы концентрация белка составляла 0,05—10 мкг/мл.

В работе использовали реактивы: $\text{Na}_2\text{-ATP}$ и $\text{Na}_3\text{-ADP}$ фирмы «Reanal» (ВНР), ЦТФ фирмы «Merk» (ФРГ), убаин — «Sigma» (США), трис — «Reanal» (ВНР) и «Koch-Light» (Англия), сефароза 6В и сефадекс G-50 — «Pharmacia» (Швеция), гексадекан марки «для газовой хроматографии» — «Merk» (ФРГ). Остальные реактивы — «Союзреактив» (СССР) квалификации х.ч., а неорганические соли — о.ч. Все растворы готовили на бидистиллированной воде.

Результаты исследований

Характер флюктуаций трансмембранных токов. Зарегистрированные типы флюктуаций трансмембранных токов показаны на рис. 1. Как и в наших предыдущих работах [10, 11], флюктуации трансмембранных токов в присутствии в растворе с цис-стороны мембраны высокоочищенного препарата Na^+ , K^+ -АТФазы представляли собой дискретные скачки. Они наблюдались лишь в тех случаях, когда в ячейке камеры с белком находились АТФ или ЦТФ. В присутствии в среде ацетилфосфата или н-НФФ изменений проводимости БЛМ не наблюдалось. Довольно часто, особенно на БЛМ, в составе которых не было фосфатидилэтаноламина, можно было наблюдать постепенное формирование дискретных скачков тока (рис. 1, а). Постоянного уровня проводимости модифицированных мембран достигала через 10—60 мин в зависимости от липидного состава БЛМ. Амплитуда скачков тока и время их жизни не были постоянными и колебались при напряжении на БЛМ +50 мВ от 0,6 до 50 пА. Соответственно, проводимость составляла 12—100 пСм.

Ионофорные свойства БЛМ начинали проявляться с некоторой пороговой концентрации белка-фермента, величина которой для большинства исследованных нами мембран составляла 0,025 мкг/мл. С более высокими концентрациями белка (0,5—1 мкг/мл) резко возрастала

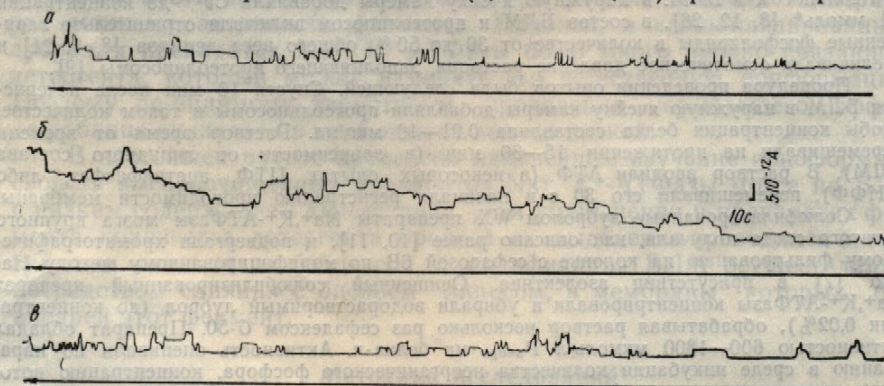


Рис. 1. Флюктуации трансмембранных токов в БЛМ различного состава, индуцируемые высокоочищенными препаратами Na^+ , K^+ -АТФазы мозга.

а — мембрана из фосфатидилхолина, фосфатидилсерина и холестерина (8:5:1); б — мембрана из фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилинозита, фосфатидилэтаноламина и холестерина (6:2:2:3:1); в — мембрана из фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и холестерина (6:4:3:1). Концентрация белка во всех опытах 0,5 мкг/мл. $E = 50$ мВ.

интегральная проводимость мембраны, но величины отдельных флюктуаций на ней оставались теми же. Наконец, при концентрации белка более 10 мкг/мл поведение модифицированных мембран становилось похожим на состояние, наблюдающееся при электрическом пробое и получившее название «стрессового» [1]. Это приводило в конечном итоге к неустойчивости БЛМ и ее разрыву.

При постоянном напряжении на мембране характер флюктуаций тока оставался неизменным в области температур от 38 до 28 °C. В то

же время он зависел от потенциала. На рис. 2 гистерезисной БЛМ в нуле, проявление ионофорного потенциала стала интегральной скачков тока и увеличении флюктуаций тока.

При изменении стороны БЛМ) уже с лась, и значительно у нии (рис. 3, а₁, а₂). Тока наблюдались в теоллипосом с БЛМ лярности подаваемой (рис. 3, б). Правда, влялась в этом случае 60—90 мин после раствор.

Рис. 2. Вольт-амперные ванной высокоочищенной

1 — в непроводящем состоянии мембраны то

Ионофорные свойства суммированы в таблице. Свойства Na^+ , K^+ -АТФазы 20 % общего веса липидов весьма существенны. Фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин должны были находиться в количестве, не менее 2

Вероятность модификации Na^+

Состав БЛМ

ФХ
ФХ:Х (10:1)
ФХ:ФС (3:1)
ФХ:ФС (2:1)
ФХ:ФС:Х (10:2:1)
ФХ:ФС:Х (10:3:1)
ФХ:ФС:Х (8:5:1)
ФХ:ФС:Х (7:6:1)
ФХ:ФС:Х (6:8:1)

ФХ — фосфатидилхолин; Ф — фосфатидилсерин; Х — холестерин

На БЛМ, в составе которых не было свойства Na^+ , K^+ -АТФазы, время: от 2 до 7 мин, что присутствие ионного на Na^+ , K^+ -АТФазы предположение подт

фермента и 130 мг сахарозы при температуре 30 °С в атмосфере непосредственно перед опытами в наружную ячейку камеры инкубации по 5–10 мкл в течение 5–10 мкл/мл.

ДФ фирмы «Reanal» (ВНР), три-«Reanal» (ВНР) и Phagmacia» (Швеция), гекса-РГ). Остальные реактивы — кие соли — о.ч. Все растворы

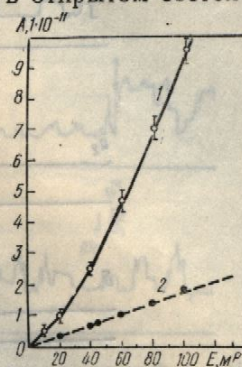
в. Зарегистрированные на рис. 1. Как и в трансмембранных токах мембраны высокоочищенной дисперсией скачков в ячейке камеры с белом в среде ацетилфосфата наблюдалось. Довольно было фосфатидилэтаноламинирование дискретных проводимость модифицированной в зависимости от липидов и время их жизни не на БЛМ + 50 мВ не оставляла 12–100 пСм. златься с некоторой по которой для большинства 0,025 мкг/мл. С более (мл) резко возрастала

же время он зависел от величины напряжения на мембране и знака потенциала. На рис. 2 показана вольт-амперная характеристика модифицированной БЛМ в непроводящем и проводящем состояниях. Как видно, проявление ионофорных свойств Na^+ , K^+ -АТФазы зависело от мембранного потенциала. С увеличением напряжения до +100 мВ возрастала интегральная проводимость БЛМ вследствие роста амплитуды скачков тока и увеличения их числа. Возрастала при этом и частота флюктуаций тока.

При изменении направления разности потенциалов (минус с цистороны БЛМ) уже спустя 50–70 с амплитуда скачков тока уменьшалась, и значительно увеличивалось время их жизни в открытом состоянии (рис. 3, a_1 , a_2). Еще более длительные скачки тока наблюдались в том случае, если слияние протеолипосом с БЛМ происходило при этой же полярности подаваемого на мембрану напряжения (рис. 3, б). Правда, модификация БЛМ осуществлялась в этом случае крайне редко и лишь спустя 60–90 мин после внесения протеолипосом в раствор.

Рис. 2. Вольт-амперные характеристики БЛМ, модифицированной высокоочищенными препаратами Na^+ , K^+ -АТФазы мозга.

1 — в непроводящем состоянии; 2 — в проводящем состоянии. Состав мембраны тот же, что и на рис. 1, б.



Ионофорные свойства и липидный состав БЛМ. Полученные данные суммированы в таблице. Они показывают, что ионофорные свойства Na^+ , K^+ -АТФазы хорошо проявляются на БЛМ с низким (не более 20 % общего веса липидов) содержанием холестерина. По-видимому, весьма существенны для них такие полярные фосфолипиды, как фосфатидилсерин и фосфатидилинозитид. Полярные липиды обязательно должны были находиться как в протеолипосомах, так и в БЛМ, и в количестве, не менее 20–25 % общего содержания липидов.

Вероятность модификации БЛМ различного состава высокоочищенными препаратами Na^+ , K^+ -АТФазы мозга крупного рогатого скота

Состав БЛМ	Вероятность появления флюктуаций тока	Состав БЛМ	Вероятность появления флюктуаций
ФХ	0	ФХ:ФС:ФИ:Х (8:2:2:1)	0,36
ФХ:Х (10:1)	0,025	ФХ:ФС:ФИ:Х (6:3:2:1)	0,43
ФХ:ФС (3:1)	0,10	ФХ:ФС:ФИ:Х (6:4:3:1)	0,43
ФХ:ФС (2:1)	0,12	ФХ:ФС:Х (8:2:2)	0,30
ФХ:ФС:Х (10:2:1)	0,34	ФХ:ФС:Х (8:2:4)	0,20
ФХ:ФС:Х (10:3:1)	0,38	ФХ:ФЭ:Х (8:3:1)	0,02
ФХ:ФС:Х (8:5:1)	0,43	ФХ:ФС:ФЭ:Х (7:4:2:1)	0,48
ФХ:ФС:Х (7:6:1)	0,42	ФХ:ФС:ФИ:ФЭ:Х (6:2:2:3:1)	0,48
ФХ:ФС:Х (6:8:1)	0,43	ФХ:ФС:ФЭ:Х (6:4:3:1)	0,47

ФХ — фосфатидилхолин; ФС — фосфатидилсерин; ФИ — фосфатидилинозит; ФЭ — фосфатидилэтаноламин; Х — холестерин. Соотношения липидов по массе.

ного состава, индуцируемые АТФазы мозга.

ерина (8:5:1); б — мембрана из гидилэтаноламина и холестерина ина, фосфатидилэтаноламина и с 0,5 мкг/мл. $E = 50$ мВ.

ины отдельных флюк-ри концентрации белка; мембран становилось ктрическом пробое и приводило в конечном

характер флюктуаций ур от 38 до 28 °С. В то

На БЛМ, в состав которых входил кардиолипид, ионофорные свойства Na^+ , K^+ -АТФазы обнаруживались весьма непродолжительное время: от 2 до 7 мин, — а затем прекращались. Создавалось впечатление, что присутствие в БЛМ кардиолипидина оказывает негативное влияние на Na^+ , K^+ -АТФазу, подавляя ее ионофорную активность. Это предположение подтвердилось данными о том, что кардиолипид может

действовать как неконкурентный ингибитор АТФ, оказывая воздействие на Na^+ -зависимую стадию фосфорилирования при гидролизе АТФ [24]. Тормозящее действие кардиолипина на Na^+ , K^+ -АТФазу связано с содержанием в нем остатков линолевой кислоты.

Вероятность проявления Na^+ , K^+ -АТФазой ионофорных свойств на БЛМ с фосфатидилсеринем увеличивалась в присутствии фосфатидилэтаноламина. Сам фосфатидилэтаноламин таким эффектом не обладал.

Можно предположить по меньшей мере два механизма влияния определенных липидов на индуцируемые Na^+ , K^+ -АТФазой в БЛМ

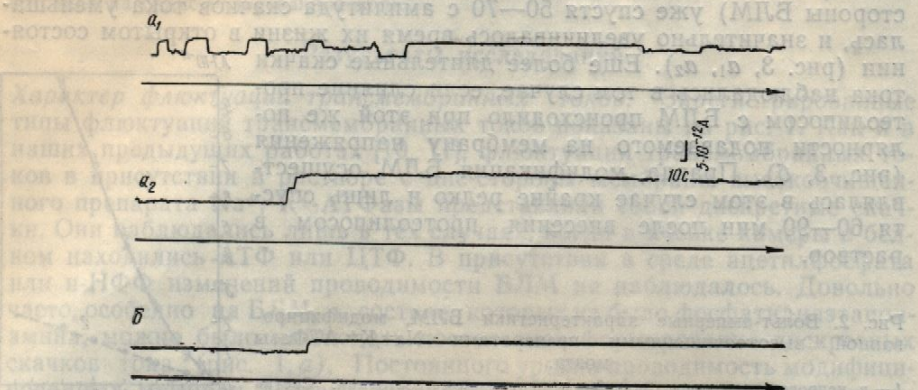


Рис. 3. Флюктуации трансмембранных токов в модифицируемых Na^+ , K^+ -АТФазой БЛМ при изменении полярности напряжения, подаваемого на мембрану.

a_1 и a_2 — полярность напряжения изменена после того, как Na^+ , K^+ -АТФаза встроилась в БЛМ; $б$ — Na^+ , K^+ -АТФаза встроилась в БЛМ при отрицательном потенциале с цис-стороны мембраны. Состав мембраны тот же, что и на рис. 1, в. $E=50$ мВ. a_2 — продолжение записи a_1 .

ионофорные свойства. Один из них — поверхностный заряд, который сообщают мембранам фосфатидилсерин и фосфатидилинозит; плотность заряда играет решающую роль в процессе слияния мембран [2]. Второй — структурная организация биомолекулярного липидного слоя, в частности, плотность его упаковки, структура и величина гидрофобного объема и степень жидкости. В случае БЛМ из фосфатидилхолина, фосфатидилсерина, фосфатидилэтаноламина и холестерина структура бислоя оказывается, по-видимому, наиболее благоприятной для проявления Na^+ , K^+ -АТФазой ионофорных свойств.

Влияние на ионофорные свойства ингибиторов и активаторов натриевого насоса. Индуцируемые Na^+ , K^+ -АТФазой флюктуации тока в БЛМ могли быть устранены ингибиторами натриевого насоса — убаином ($5 \cdot 10^{-5}$ моль) и ванадатом аммония ($0,5 \cdot 10^{-5}$ моль), содержащим пятивалентный ванадий (рис. 4, а, в). Как и в естественной мембране, убаин оказывал влияние с транс-стороны БЛМ, а ванадат — с цис-стороны. Действие их было необратимым и развивалось очень быстро. Через 1–5 мин после внесения ингибиторов в ячейку камеры флюктуации тока исчезали. Эффект убаина развивался быстрее, если одновременно в наружную ячейку камеры вводили ЭДТА ($2 \cdot 10^{-4}$ моль), который удалял с цис-стороны мембраны Ca^{2+} (рис. 4, б). Если же во внутренней ячейке камеры концентрацию K^+ увеличивали до 50 ммоль за счет эквивалентного снижения концентрации Na^+ , то тормозящий эффект убаина не наблюдался. Эти данные подтверждают существующие в литературе предположения о том, что K^+ и сердечные гликозиды являются антагонистами при действии на Na^+ , K^+ -АТФазу и конкурируют за один и тот же участок связывания [23, 24].

Влияние убаина и ванадата на индуцируемые Na^+ , K^+ -АТФазой флюктуации тока весьма сильно зависело от липидного состава БЛМ. Наиболее явно эффект ингибиторов обнаруживался на БЛМ, в

состав которых входил мембранообразующий раствор натриевого насоса. Скорее всего это обуславливает не только АТФазу, но и выполняет функцию матрицы, обеспечивающей определенную пространственную конфигурацию данной системы, при которой становится возможным взаимодействие фермента с блокатором.

Индуцируемые Na^+ , K^+ -АТФазой флюктуации тока возрастали в присутствии в растворе $0,2 \cdot 10^{-3}$ моль дифенилгидантоина (ДФГ), оказывающего в таких кон-

Рис. 4. Влияние ингибиторов и активаторов натриевого насоса на индуцируемые Na^+ , K^+ -АТФазой в БЛМ флюктуации тока.

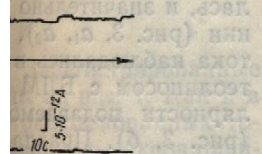
a_1 — a_2 — в раствор с цис-стороны БЛМ введен убаин в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль; $б$ — убаин ($5 \cdot 10^{-5}$ моль) и ЭДТА (2×10^{-4} моль); $в$ — с транс-стороны ванадат ($5 \cdot 10^{-5}$ моль); $г$ — с цис-стороны ДФГ ($0,2 \cdot 10^{-3}$ моль). Состав мембран тот же, что и на рис. 1, б.

центрациях активировать ингибиторы транспорта в клетку пассивно, по электрохимическому градиенту ($5 \cdot 10^{-6}$ моль) и кокаин ($5 \cdot 10^{-6}$ моль). Аналогичные данные получены с ацетилхолином, которые изменяли характера флюктуации АТФазой.

Влияние на ионофорные свойства. опыты были проведены с цис-током, для чего в наружную ячейку вводили другие одновалентные катионы при постоянной концентрации каких-либо сульфидов Na^+ , K^+ -АТФазой (Rb^+ или Cs^+). В то же время флюктуации тока не индуцировались Na^+ в первые 2–5 мин, а затем появились, но были непродолжительными, амплитуды (рис. 5, а) вплоть до 30 ммоль/л более высоких концентраций Na^+ жизни скачков тока, совсем (рис. 5, б).

оказывая воздействие на гидролизе АТФ [24]. АТФазу связано с со-

нофорных свойств на сутствии фосфатидил-ффеком не обладал. механизма влияния +АТФазой в БЛМ



х Na⁺, K⁺-АТФазой БЛМ го на мембрану.

-АТФаза встроилась в БЛМ; але с цис-стороны мембраны. одолжение записи a_1 .

ный заряд, который (длиннозит; плотность ая мембран [2]. Вто- о-липидного слоя, в ычина гидрофобного М из фосфатидилхоли- и холестерина струк- е благоприятной для в.

в и активаторов нат- ой флюктуации тока риевого насоса — уа- (5 · 10⁻⁵ моль), содер- Как и в естественной роны БЛМ, а вана- гимым и развивалось нгибиторов в ячейку аинна развивался бы- меры вводили ЭДТА мембраны Ca²⁺ (рис. онцентрацию K⁺ уве- снужения концентра- аблюдался. Эти дан- предположения о том, нистами при действии тот же участок свя-

ые Na⁺, K⁺-АТФазой идного состава БЛМ. живался на БЛМ, в

состав которых входил фосфатидилэтаноламин. При отсутствии в мембранообразующем растворе этого фосфолипида действие блокаторов натриевого насоса проявлялось нечетко или вообще отсутствовало. Скорее всего это объясняется тем, что липидный состав БЛМ обуславливает не только проявление ионофорных свойств Na⁺, K⁺-АТФазы, но и выполняет функцию матрицы, обеспечивающей определенную пространственную конфигурацию данной системы, при которой становится возможным взаимодействие фермента с блокатором.

Индуктируемые Na⁺, K⁺-АТФазой флюктуации тока возрастали в присутствии в растворе 0,2 · 10⁻³ моль дифенилгидантоина (ДФГ), оказывающего в таких кон-

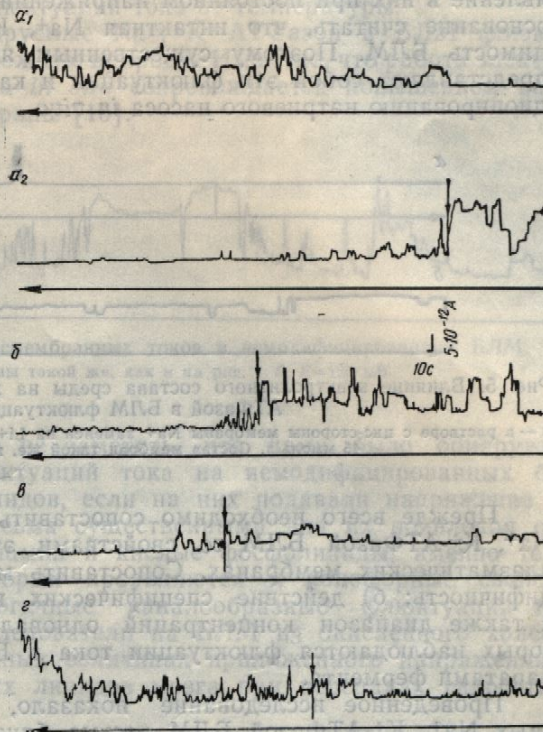


Рис. 4. Влияние ингибиторов и активаторов натриевого насоса на индуцируемые Na⁺, K⁺-АТФазой в БЛМ флюктуации тока.

a_1 — a_2 — в раствор с цис-стороны БЛМ введен уабаин в концентрации 5 · 10⁻⁵ моль; б — уабаин (5 · 10⁻⁵ моль) и ЭДТА (2 × 10⁻⁴ моль); в — с транс-стороны ванадат (5 · 10⁻⁵ моль); г — с цис-стороны ДФГ (0,2 · 10⁻³ моль). Состав мембран тот же, что и на рис. 1, б.

центрациях активизирующее влияние на фермент (рис. 4, в). В то же время ингибиторы транспорта в клеточной мембране K⁺ и Na⁺, осуществляющегося пассивно, по электрохимическим градиентам, таким как ТТХ (1 × 10⁻⁶ моль) и кокаин (1 · 10⁻³ моль), не оказывали на них влияния. Аналогичные данные получены с нейромедиаторами норадреналином и ацетилхолином, которые в концентрациях от 1—5 · 10⁻⁵ до 10⁻³ моль не изменяли характера флюктуаций тока, индуцируемого в БЛМ Na⁺, K⁺-АТФазой.

Влияние на ионофорные свойства катионного состава среды. Эти опыты были проведены с целью выяснения ионной природы флюктуаций тока, для чего в наружной ячейке камеры K⁺ или Na⁺ заменяли другими одновалентными катионами либо изменяли соотношение их концентраций при постоянной ионной силе раствора. Нами не было обнаружено каких-либо существенных изменений характера индуцируемых Na⁺, K⁺-АТФазой флюктуаций тока при полной замене K⁺ на Rb⁺ или Cs⁺. В то же время при отсутствии в растворе Na⁺ флюктуации тока не индуцировались. В растворе, содержащем Li⁺ вместо Na⁺ в первые 2—5 мин после введения в раствор АТФ наблюдались непродолжительные, в виде отдельных пачек, скачки тока разной амплитуды (рис. 5, а). Увеличение в растворе концентрации Na⁺ вплоть до 30 ммоль/л не изменяло характера флюктуаций тока. При более высоких концентрациях Na⁺ сначала резко увеличивалось время жизни скачков тока, а затем (50 и более ммоль/л) они исчезали совсем (рис. 5, б).

Обсуждение результатов исследований

Полученные данные свидетельствуют о том, что изолированная из плазматических мембран нервных клеток и высокоочищенная Na^+ , K^+ -АТФаза модифицирует БЛМ определенного состава, индуцируя появление в них при постоянном напряжении флюктуаций тока, что дает основание считать, что интактная Na^+ , K^+ -АТФаза изменяет проводимость БЛМ. Поэтому существенным является вопрос о том, что представляют собой эти флюктуации и каково их отношение к функционированию натриевого насоса *in vivo*.

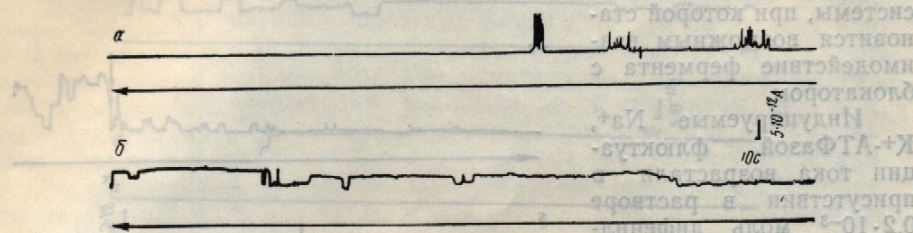


Рис. 5. Влияние электролитного состава среды на характер индуцируемых Na^+ , K^+ -АТФазой в БЛМ флюктуаций тока. а — в растворе с цис-стороны мембраны Na^+ заменен на Li^+ ; б — концентрации Na^+ увеличена до 45 ммоль/л. Состав мембран такой же, как и на рис. 1, б.

Прежде всего необходимо сопоставить свойства модифицируемых Na^+ , K^+ -АТФазой БЛМ со свойствами этого фермента *in vivo* и в плазматических мембранах. Сопоставить можно: а) субстратную специфичность; б) действие специфических ингибиторов и активаторов, а также диапазон концентраций одновалентных катионов, при которых наблюдаются флюктуации тока в БЛМ и гидролиз АТФ препаратами фермента.

Проведенное исследование показало, что свойства модифицируемых Na^+ , K^+ -АТФазой БЛМ весьма близки свойствам фермента *in vivo* и натриевого насоса *in situ*. Так, флюктуации тока наблюдались лишь тогда, когда в растворе находились АТФ или ЦТФ. Гидролиз именно этих субстратов приводит к транслокации ионов при функционировании насоса, а гидролиз других идет «вхолостую». Флюктуации тока полностью устранялись ингибиторами натриевого насоса — убаином и ванадатом, которые в применяемых нами концентрациях снижают до нулевого уровня активность фермента. Напротив, ДФГ, активирующий Na^+ , K^+ -АТФазу, усиливает флюктуации тока. Наконец, индуцируемые Na^+ , K^+ -АТФазой флюктуации тока наблюдались при обязательном присутствии в растворе, где находится фермент, Na^+ , K^+ могли быть заменены Rb^+ или Cs^+ .

Достаточная близость характеристик позволяет считать, что изолированная из клеток Na^+ , K^+ -АТФаза встраивается в БЛМ как интактная структура, осуществляющая, по-видимому, определенную транспортную функцию. В самом деле, убаин действует на индуцируемые Na^+ , K^+ -АТФазой флюктуации тока с транс-стороны мембраны. Значит, фермент пронизывает БЛМ. Как известно, влияние его проявляется лишь в условиях работы фермента. Следовательно, Na^+ , K^+ -АТФаза гидролизует АТФ.

Что же касается индуцируемых ферментом флюктуаций тока, то вначале представлялось вероятным, что они отражают электрогенное действие натриевого насоса, поскольку сопротивление БЛМ весьма велико, на 3—6 порядков выше сопротивления плазматических мембран, и насосный ток может быть выявлен на них весьма отчетливо. Именно к такому заключению пришли и другие исследователи, принимавшие попытки реконструировать Na^+ , K^+ -АТФазу в БЛМ [15].

Однако, анализируя это предположение да такие экспериментальные ации тока в симметриях, у высокоочищенной зависимость характера

По-видимому, инд ации тока имеют более генного натриевого на евой проницаемости м

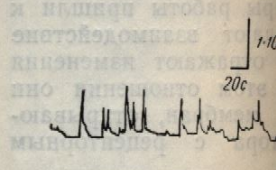


Рис. 6. Флюктуации т Состав мем

В этой связи не появление похожих ф ком БЛМ из тех же лее 100 мВ (рис. 6). зались фосфатидилэта пиды, в присутствии Na^+ , K^+ -АТФазы. А н наблюдали и другие рина [27] при опреде также на БЛМ из об ческого давления [28].

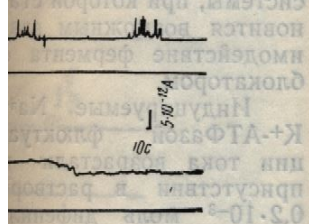
С другой стороны функционировании мем ные в последние годы явить следующие ва контролирует латерал лабильность и взаимо жидкие, ненасыщенные фолипиды и фосфат отдельных реакций фе ляет характер взаимо также между отдельн комплекса, обеспечива тивного переноса ионов

Таким образом, как видим, как струку (регуляторное) воздей

Нам кажется поэт Na^+ , K^+ -АТФазой в Б тер и обусловлены не кислыми фосфолипидам липидный бислой гидро давать катионпроводя носа K^+ и Na^+ и сопр другой — вызывать оп которая тоже вызывает тельную реорганизацию ный слой липидов, имм

дований

том, что изолированная и высокоочищенная Na^+ , K^+ -АТФаза, индуцируя флюктуаций тока, что дает АТФаза изменяет проводится вопрос о том, что о их отношение к функ-



актер индуцируемых Na^+ , K^+ -АТФ-тока.
— концентрация Na^+ увеличена до 100 мМ на рис. 1, б.

Рис. 4. Влияние концентрации Na^+ на свойства модифицируемых фермента *in vivo* и в *in vitro*: а) субстратную специфичность и активаторов, б) катионов, при которых наблюдается гидролиз АТФ пре-

свойства модифицируемых фермента *in vitro* и в *in vivo* на ионизации тока наблюдались при функционировании ионных при функционировании «вхолостую». Флюктуации натриевого насоса — в этих нами концентрациях фермента. Напротив, ДФГ, флюктуации тока. Накопления тока наблюдались где находится фермент,

можно считать, что изолируется в БЛМ как индифферентно, определенную и действует на индуцированные транс-сторона мембраны. Известно, влияние его на. Следовательно, Na^+ , K^+ -АТФаза в БЛМ [15].

Однако, анализируя полученные данные, следует признать, что это предположение далеко не бесспорно, поскольку оно не объясняет такие экспериментальные факты, как одинаковый характер флюктуаций тока в симметричных и асимметричных электролитных условиях, у высокоочищенных и неочищенных препаратов фермента и независимость характера флюктуаций тока от температуры.

По-видимому, индуцируемые Na^+ , K^+ -АТФазой в БЛМ флюктуации тока имеют более сложную природу. Известно, что работа электрогенного натриевого насоса *in situ* сопровождается повышением калиевой проницаемости мембраны [16].

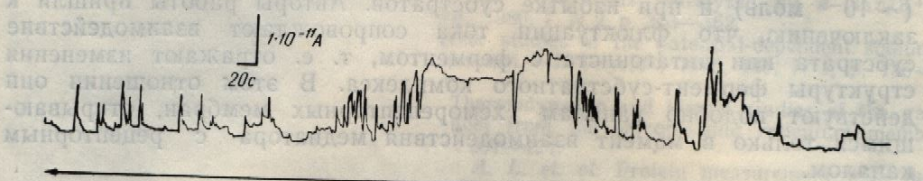


Рис. 6. Флюктуации трансмембранных токов в немодифицированной БЛМ. Состав мембраны такой же, как и на рис. 1, б. $E=120$ мВ.

В этой связи нельзя не заметить, что нами было обнаружено появление похожих флюктуаций тока на немодифицированных белком БЛМ из тех же липидов, если на них подавали напряжение более 100 мВ (рис. 6). Весьма существенными для их появления оказались фосфатидилэтаноламин и кислые фосфолипиды, именно те липиды, в присутствии которых проявляются и ионофорные свойства Na^+ , K^+ -АТФазы. Аналогичные каналоподобные флюктуации тока наблюдали и другие исследователи на БЛМ из окисленного холестерина [27] при определенных величинах приложенного напряжения, а также на БЛМ из общих липидов мозга при перепадах гидростатического давления [28].

С другой стороны, исследования специфической роли липидов в функционировании мембраносвязанных транспортных АТФаз, проведенные в последние годы в различных лабораториях мира, позволили выявить следующие важные моменты: а) липидный состав мембран контролирует латеральную подвижность белка, его конформационную лабильность и взаимодействие между отдельными протомерами; б) жидкие, ненасыщенные фосфолипиды, в первую очередь, кислые фосфолипиды и фосфатидилэтаноламин, — функционально важны для отдельных реакций фермента; в) фазовое состояние липидов определяет характер взаимодействий между субъединицами протомеров, а также между отдельными протомерами олигомерного ферментного комплекса, обеспечивая тем самым сопряжение гидролиза АТФ и активного переноса ионов.

Таким образом, мембранный липидный матрикс осуществляет, как видим, как структурное (ориентационное), так и функциональное (регуляторное) воздействие на транспортные АТФазы [3, 4].

Нам кажется поэтому наиболее вероятным, что индуцируемые Na^+ , K^+ -АТФазой в БЛМ флюктуации тока имеют сложный характер и обусловлены не только белком, но и липидами, и особенно кислыми фосфолипидами и фосфатидилэтаноламином. Погруженный в липидный бислой гидрофобный белок может, с одной стороны, сам создавать катионпроводящие пути через мембрану для активного переноса K^+ и Na^+ и сопровождающей его калиевой проницаемости, а с другой — вызывать определенную реорганизацию липидного бислоя, которая тоже вызывает изменения проницаемости. Наиболее значительную реорганизацию может претерпевать так называемый граничный слой липидов, иммобилизованный белком, с жирнокислотными це-

ниями которого он находится в тесном контакте. Будучи обусловлены белком-ферментом, перестройки в липидном матриксе должны поэтому «отслеживать» любые макроскопические изменения структуры самого фермента.

Нельзя не заметить, что аналогичные результаты были получены на БЛМ определенного состава, модифицируемых ферментами, не несущими транспортных функций (α -химотрипсин, трипсин, холинэстераза) в присутствии в среде субстратов или конкурентных ингибиторов [6]. Правда, каналобразные флюктуации тока наблюдались лишь с большими концентрациями ферментов в ячейке камеры ($\sim 10^{-5}$ моль) и при избытке субстратов. Авторы работы пришли к заключению, что флюктуации тока сопровождают взаимодействие субстрата или антагониста с ферментом, т. е. отражают изменения структуры фермент-субстратного комплекса. В этом отношении они действуют подобно каналам хеморецепторных мембран, открывающимся только в момент взаимодействия медиатора с рецепторным каналом.

Автор благодарен О. М. Рожмановой, Л. Н. Стельмах и Н. В. Гарбуз за помощь в получении фермента и липидов.

Z. A. Sorokina

A STUDY OF IONOPHORE PROPERTIES OF BRAIN Na^+ , K^+ -ATPase USING PLANE LIPID MEMBRANE

Summary

Ionophore properties of high-purified Na^+ , K^+ -ATPase preparations from the cattle brain were studied on biomolecular lipid membranes (BLM) of various phospholipid composition and with a low cholesterol content. The enzyme was isolated in the presence of lipids from germinated soya beans (azolectin), and BLM were modified by fusion with a bilayer of liposomes, whose membranes the enzyme was introduced to. It was found that intact Na^+ , K^+ -ATPase changes the conductivity of BLM of a definite composition, inducing there current fluctuations at constant voltage. Properties of the modified BLM are very close to those of the enzyme in vitro and sodium pump in situ, which permits concluding that Na^+ , K^+ -ATPase is built into the BLM and accomplishes a definite transport function. An analysis of the data obtained allows a conclusion that Na^+ , K^+ -ATPase-induced current fluctuations in the BLM are not only due to protein, but also to lipids, especially acid phospholipids and cholesterol.

A. A. Bogomoletz Institute of Physiology,
Academy of Sciences, Ukrainian SSR, Kiev

Список литературы

1. Абидор И. Г., Аракелян В. Б., Пастушенко В. Ф. и др. Электрический пробой бислойных липидных мембран.— Докл. АН СССР, 1978, 240, № 3, с. 733—736.
2. Айтьян С. Х., Беляя М. Л., Чизмаджев Ю. А. Взаимодействие мембран, несущих постоянный поверхностный заряд.— Биофизика, 1981, 26, № 3, с. 467—473.
3. Болдырев А. А. Na^+ — K^+ -зависимая АТФаза.— Успехи физиол. наук, 1981, 12, № 2, с. 91—130.
4. Болдырев А. А., Швец В. И. Значение олигомерной организации для функционирования транспортных аденозинтрифосфатаз.— Биол. науки, 1981, 21, № 2, с. 31—48.
5. Вавилова Г. Л., Кирсенко О. В., Назаренко В. И. и др. Липидный состав различных препаратов Na^+ , K^+ -АТФазы головного мозга.— Укр. биохим. журн., 1981, 53, № 5, с. 42—48.
6. Коломытский О. В., Ермишкин Л. Н. Электропроводность липидных мембран в присутствии протеолитических ферментов и их субстратов.— Биофизика, 1976, 21, № 6, с. 1008—1013.
7. Рожманова О. М., Стельмах Л. Н. Реконструкция натриевого насоса в липидных везикулах.— Нейрофизиология, 1981, 13, № 3, с. 413—417.
8. Соколов Ю. В., Лишко В. К. Изучение слипания плоских бислойных фосфолипидных мембран с липосомами.— Биохимия, 1979, 44, № 2, с. 317—323.
9. Соколов Ю. В., Лишко В. К. Влияние двухвалентных катионов и фузогенных факторов на взаимодействие липосом с плоскими фосфолипидными бислоями.— Укр. биохим. журн., 1980, 52, № 6, с. 700—705.

10. Сорокина З. А. Реконструкция возможности и проблемы.
11. Сорокина З. А., Говорухина Е. В. Растворимый Na^+ , K^+ Докл. АН СССР, 1978, 240.
12. Breisblatt W., Ohki S. J. cholesterol, divalent ions.
13. Hubman F.-H. Preparative line by using soya beans.
14. Hyman E. S., Electrogen Viol., 1977, 37, N 2, p. 263.
15. Issaurat B., Amblard G. lipidic membranes associated ATPase.— Bioelectrochem.
16. Kononenko N. I., Kostyuk induced membrane-current 152.
17. Labarca P., Coronado R. -ting behavior of a K^+ -rane.— J. Gen. Physiol., 1977, 50, N 3, p. 471—476.
18. Lowry O. H., Rosebrough Folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, N 1, p. 265.
19. Nichols B. W. Separation analysis by thin-layer chromatography.— J. Chromatogr., 1978, 140, N 1, p. 417—423.
20. Pangborn M. C. A similar N 3, p. 471—476.
21. Razien M., Ginzburg H. et biophys. acta, 1980, 598.
22. Salem O. W., Abood L. diol to degree of unsaturation 1976, 76, N 3, p. 407—415.
23. Schoner W., Kirch U., K⁺ with the sodium reo Structure and Kinetics. L.
24. Schwartz A., Adams R. Na-K-ATPase.— Int. J. Biophys., 1981, 9, N 2, p. 15.
25. Toro-Goyco E., Rodriguez inhibitors of rat brain action.— Biochim. et biophys. Acta, 1981, 64, N 2, p. 15.
26. Wilschut J., Düzgunes N. ced by divalent cations, Trans., 1981, 9, N 2, p. 15.
27. Yafuso M., Kennedy S. conductance states and black lipid membranes.— J. Membrane Sci., 1981, 1, N 1, p. 1—10.
28. Yoshida M., Clark A., Sumanes.— J. Membrane Sci., 1981, 1, N 1, p. 1—10.

Ин-т физиологии им. А. А. АН УССР, Киев

Будучи обусловлены икс должны поэтому ия структуры самого
 ьтаты были получены
 ьмых ферментами, не
 ин, трипсин, холинэ
 конкурентных инги
 ации тока наблюда
 тов в ячейке камеры
 ры работы пришли к
 дают взаимодействие
 отражают изменения
 этом отношении они
 мембран, открываю
 ра с рецепторным

и Н. В. Гарбуз за помощь

OF BRAIN
 EMBRANE

preparations from the catt-
 M) of various phospholipid
 e was isolated in the pre-
 and BLM were modified by
 nzyme was introduced to
 tivity of BLM of a definite
 voltage. Properties of the
 and sodium pump in situ,
 the BLM and accomplishes
 ed allows a conclusion that
 re not only due to protein,
 l.

Электрический пробой бис-
 40, № 3, с. 733—736.
 ействие мембран, несущих
 6, № 3, с. 467—473.
 и физиол. наук, 1981, 12,

организации для функциони-
 уки, 1981, 21, № 2, с. 31—

Липидный состав различ-
 Укр. биохим. журн., 1981,

липидных мембран в при-
 Биофизика, 1976, 21, № 6,

иевого насоса в липидных

их бислойных фосфолипид-

317—323.

атионов и фузогенных фак-

липидными бислоями.— Укр.

10. Сорокина З. А. Реконструкция натриевого насоса в плоских липидных бислоях. Возможности и проблемы метода.— Физиол. журн., 1980, 26, № 5, с. 655—670.
11. Сорокина З. А., Говоруха А. В., Рожманова О. М., Стельмах Л. Н. Взаимодействие растворимой Na^+ , K^+ -АТФазы мозга с плоскими липидными мембранами.— Докл. АН СССР, 1978, 241, № 1, с. 223—227.
12. Breisblatt W., Ohki S. J. Fusion in phospholipid spherical membranes. II. Effect of cholesterol, divalent ions and pH.— J. Membr. Biol., 1976, 29, N 1, p. 127—146.
13. Hubman F.-H. Preparation of ^{32}P -phosphatidylcholine and ^{32}P -lysophosphatidylcholine by ussing soia beans.— Biochem. J., 1979, N 3, p. 713—714.
14. Hyman E. S., Electrogenesis from an ATPase-ATP-sodium pseudo pump.— J. Membr. Biol., 1977, 37, N 2, p. 263—275.
15. Issaurat B., Amblard G., Gavach C. Electrical charge fluxes across bimolecular lipidic membranes associated with ATP hydrolysis catalyzed by a Na^+ / K^+ -ATPase.— Bioelectrochem. and Bioenerg., 1980, 7, N 2, p. 353—362.
16. Kononenko N. I., Kostyuk P. G. Further studies of the potential-dependent sodium induced membrane-current in snail neurones.— J. Physiol., 1976, 248, N 1, p. 136—152.
17. Labarca P., Coronado R., Miller Ch. Thermodynamic and kinetic studies of the gating behavior of a K^+ -selective channel from the sarcoplasmic reticulum membrane.— J. Gen. Physiol., 1980, 76, N 4, p. 397—424.
18. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent.— J. Biol. Chem., 1951, 193, N 1, p. 265—268.
19. Nichols B. W. Separation of the lipids of phobosynthetic tissues. Improvements in analysis by thin-layer chromatography.— Biochim. et biophys. acta, 1963, 77, N 3, p. 417—423.
20. Pangborn M. C. A simplified purification of lecithin.— J. Biol. Chem. 1951, 188, N 3, p. 471—476.
21. Razien M., Ginzburg H. Fusion of liposomes with planar lipid bilayers.— Bichim. et biophys. acta, 1980, 598, N 2, p. 285—292.
22. Salem O. W., Abood L. G., Hoss W. Separation of brain phosphatidylserines according to degree of unsaturation by thin-layer chromatography.— Anal. Biochem., 1976, 76, N 3, p. 407—415.
23. Schoner W., Kirch U., Halbwachs C. A study on the interaction of Na^+ and of K^+ with the uabain receptor complex I and II of beef brain.— In: Na, K-ATPase, Structure and Kinetics. London etc., 1979, p. 421—430.
24. Schwartz A., Adams R. J., Ball W. et al. Structure, function and regulation of Na-K-ATPase.— Int. J. Biochem., 1980, 12, N 1/2, p. 287—291.
25. Toro-Goyco E., Rodriguez M. B., Preston A. M. et al. Cardiolipins are *in vitro* inhibitors of rat brain (Na^+ + K^+)-dependent ATPases. A probable mechanism of action.— Biochim. et biophys. acta, 1981, 642, N 1, p. 96—105.
26. Wilschul J., Düzgunes N., Papahadjopoulos D. Fusion of phospholipid vesicles induced by divalent cations, monitored by mixing of aqueous contents.— Biochem. Soc. Trans., 1981, 9, N 2, p. 151—164.
27. Yajuso M., Kennedy S., Freeman A. Spontaneous conductance changes, multilevel conductance states and negative differential resistance in oxydized cholesterol black lipid membranes.— J. Membrane Biol., 1974, 17, N 2, p. 201—212.
28. Yoshida M., Clark A., Swanson Ph. Descreate resistance changes in thin lipid membranes.— J. Membrane Sci., 1980, 7, N 1, p. 101—108.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца Поступила 07.01.83
 АН УССР, Киев