

ВЛАДИМИР ПЕТРОВИЧ АНДРЕЕВ

доктор химических наук, профессор кафедры молекулярной биологии, биологической и органической химии эколого-биологического факультета, Петрозаводский государственный университет (Петрозаводск, Российская Федерация)

andreev@psu.karelia.ru

АННА ВЛАДИМИРОВНА ЗАЧИНЯЕВА

доктор биологических наук, старший преподаватель кафедры микробиологии, Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова (Санкт-Петербург, Российская Федерация)

anvzanna@aol.com

ЭНДОГЕННЫЕ И ЭКЗОГЕННЫЕ МОДИФИКАТОРЫ АКТИВНОСТИ Na,K -АТФАЗЫ*

Преинкубация гомогената мозга или печени крыс с ацетилхолином (норадреналином) приводит к уменьшению (увеличению) активности Na,K -АТФазы и высвобождению диализуемого низкомолекулярного активатора (ингибитора) фермента интактных микросом. Ацетилхолин (норадреналин) индуцирует синтез фактора-активатора (ингибитора) и вызывает ускорение (замедление) синтеза фермента. Низкомолекулярный ингибитор из мозга крупного рогатого скота выделен в индивидуальном состоянии и охарактеризован. Некоторые производные N-оксидов пиридина и хинолина в концентрациях 10^{-4} – 10^{-10} М ингибируют активность Na,K -АТФазы микросом мозга. Обнаружен новый активатор (N-оксид 2-(2,4-диметоксистирил)хинолина) Na,K -АТФазы, способный активировать фермент в концентрациях 10^{-6} – 10^{-9} М. Так как эти соединения изменяют активность фермента в очень низких концентрациях, они могут оказаться эффективными препаратами при лечении заболеваний, связанных с нарушениями функций Na,K -АТФазы.

Ключевые слова: Na,K -АТФаза, нейромедиаторы, ацетилхолин, норадреналин, эзерин, ингибиторы, активаторы, мозг, печень, гетероароматические N-оксиды

Предположение о прямом влиянии нейромедиаторов на процессы биосинтеза РНК и белков нервных клеток появилось в середине 60-х годов прошлого века. Оно основывалось на допущении возможности поступления этих соединений в нервные клетки, так как известно, что 20–30 % общего количества ацетилхолина (АХ) и норадреналина (НА) в нервной ткани составляет фонд так называемого свободного медиатора, находящегося в цитоплазме, содержание которого изменяется в зависимости от чередования возбуждения и покоя [9].

При изучении вопроса об их влиянии на процессы транскрипции было обнаружено, что АХ и НА в низких концентрациях (с максимумом при 10^{-7} – 10^{-5} М) изменяют включение предшественников в РНК клеточных ядер [9]. Однако для подтверждения вывода о прямом воздействии медиаторов на экспрессию генов нервных клеток необходимо было детальное исследование синтеза продуктов индивидуальных генов. В качестве такого объекта нами был выбран фермент Na,K -АТФаза.

Na,K -АТФаза – интегральный белок, встроенный в цитоплазматическую мембрану и обеспечивающий асимметричное распределение ионов Na^+ и K^+ между клеткой и внеклеточной средой, играет исключительно важную роль в поддерж-

ании процессов возбудимости и водно-солевого обмена в организме животных и человека. Поэтому не удивительно, что большое количество публикаций посвящено изучению механизмов регуляции функционирования этого фермента.

Особенное внимание в последнее время уделяется поиску и выделению эндогенных (природных) и экзогенных (искусственного происхождения) модификаторов активности Na,K -АТФазы, которые могут оказывать на нее как прямое, так и опосредованное воздействие. Решение этой проблемы имеет не только научное, но и практическое значение. В частности, изменение концентрации таких веществ в организме человека, как полагают, связано с развитием и течением гипертонии, сердечной недостаточности, некоторых форм рака и многих других заболеваний [27].

Имевшиеся до наших работ литературные данные [1] не давали основания для достаточно обоснованного заключения о возможности регуляции этими нейромедиаторами АТФазы *in situ*, так как, во-первых, были противоречивы, а во-вторых, действующие концентрации слишком высоки – 10^{-2} – 10^{-3} М [9]. Очевидно, что наблюдаемое *in vitro* обычно небольшое изменение активности фермента было обусловлено сдвигом ионных или буферных свойств среды при добавлении нейромедиатора, поскольку в таком же

диапазоне изменялась активность энзима в зависимости от природы буфера.

В качестве модельной системы, позволяющей выяснить механизмы воздействия на Na,K -АТФазу ацетилхолина, норадреналина и ксенобиотиков, мы выбрали гомогенат мозга крыс, в котором имеются все вещества и органеллы нервных клеток, необходимые для биосинтетических процессов.

Проведенные нами исследования [12] показали, что регуляторное влияние АХ на уровень активности Na,K -АТФазы в гомогенате мозга крыс заключается в индукции синтеза низкомолекулярного фактора-активатора при одновременном снижении синтеза самого фермента.

Однако в опытах *in vivo* нами было обнаружено, что внутрибрюшинное введение крысам эзерина в нетоксических дозах (0,2 и 0,4 мг/кг), но вызывающих многократное увеличение содержания АХ в мозге [26], оказывает действие, противоположное тому, которое АХ индуцирует в гомогенате: снижение Na,K -АТФазной активности недиализованных микросом и существенное увеличение активности диализованных.

Оказалось, что в этом случае добавление к интактным микросомам лиофилизированного материала, прошедшего через мембрану при диализе микросомно-цитоплазматической фракции, выделенной из мозга животных, получавших эзерин, вызывает снижение их Na,K -АТФазной активности, то есть при воздействии эзерина *in vivo* имеет место образование фактора-ингибитора и активация синтеза самого фермента.

Свидетельством того, что при воздействии эзерина происходит увеличение количества молекул фермента в мембранах, служит факт прироста числа центров связывания ^3H -убаина микросомами (рис. 1а). Обнаружено, что ^3H -убаин имеет два типа центров связывания в мемbrane с различным сродством (что соответствует лите-

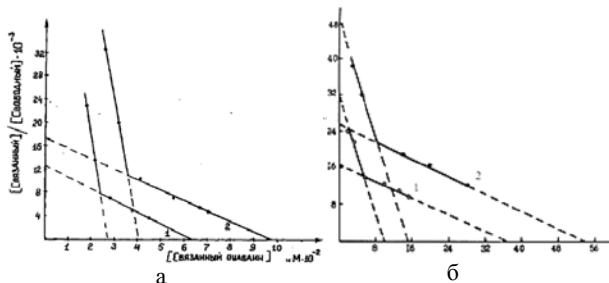


Рис. 1. Связывание ^3H -убаина (в координатах Скэтчарда) диализованными микросомами: (а) мозга контрольных животных (1) и животных, получавших эзерин (2), (б) контрольного гомогената (1) и гомогената, преинкубированного с НА в концентрации 10^{-4} М (2). По оси абсцисс – связанный убаин (а) в $\text{nM} \cdot 10^{-2}$, (б) в $\text{nM} \cdot 10^{-3}$, по оси ординат – отношение связанныго убаина к свободному (а) $\cdot 10^{-3}$, (б) $\cdot 10^{-4}$

ратурным данным [19], [23]), причем количество тех и других увеличивается после воздействия эзерина.

Различия в действии эзерина *in vivo* и *in vitro* (в концентрациях, полностью подавляющих активность холинэстераз, его влияние в гомогенате подобно АХ) дают основание предположить, что при нарушении целостности мозга из процессов регуляции уровня активности Na,K -АТФазы исключаются какие-то звенья. Одним из них может быть нарушение межклеточных взаимодействий, например исчезновение влияния на холиноцептивные клетки вставочных нейронов, высвобождающих тормозные медиаторы (норадреналин, дофамин), оказывающих противоположное АХ действие на синтетические процессы [10], [11].

С целью проверить данное предположение мы изучили влияние преинкубации гомогената мозга крыс с норадреналином (НА) на активность Na,K -АТФазы микросом [2], [3] и обнаружили, что при этом происходит снижение активности фермента (табл. 1).

Таблица 1
Влияние преинкубации гомогената мозга и микросомно-цитоплазматической фракции с НА на активность Na,K -АТФазы микросом

Преинкубированная клеточная фракция	Добавленный агент и его концентрация	Условия обработки клеточной фракции	Активность фермента, % от контроля
Гомогенат	НА 10^{-6} М	Без диализа	93 ± 4 (4)
	НА 10^{-5} М		86 ± 7 (13)*
	НА 10^{-4} М		81 ± 6 (15)**
	НА 10^{-3} М		95 ± 4 (10)
	НА 10^{-4} М	Диализ	132 ± 10 (9)**
Микросомно-цитоплазматическая фракция	НА 10^{-4} М + актиномицин D (50 мкг/мл)	Без диализа	128 ± 9 (6)*
	НА 10^{-4} М + актиномицин D (50 мкг/мл)	Диализ	127 ± 10 (9)*
	НА 10^{-4} М + рибонуклеаза (100 мкг/мл)	Без диализа	102 ± 8 (9)
	НА 10^{-4} М + рибонуклеаза (100 мкг/мл)	Диализ	98 ± 8 (10)

Примечание. * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; в скобках – число опытов.

Эффект зависит от концентрации НА, и максимум угнетения наблюдается при концентрации 10^{-4} М. После диализа микросомно-цитоплазматической фракции, полученной из преинкубированного с норадреналином гомогената, изолированные микросомы обладают более высокой по сравнению с контролем Na,K -АТФазной активностью. Этот факт можно интерпретировать в том смысле, что при преинкубации гомогената с НА имеет место образование диализуемого ин-

гибитора Na,K-АТФазы; сам же фермент при этом претерпевает либо активацию, либо количество его в мембранах увеличивается. Справедливость настоящего предположения подтверждается тем, что: а) диализуемый материал при добавлении к интактным микросомам ингибирует их Na,K-АТФазную активность (на 30 %), б) преинкубация гомогената с НА на фоне ингибитора транскрипции актиномицина D вызывает увеличение активности фермента как у недиализованных, так и диализованных микросом (на 20–25 %) (см. табл. 1). Таким образом актиномицин D полностью препятствует появлению фактора-ингибитора Na,K-АТФазы и не затрагивает активирующее действие НА на фермент. Ингибитор же трансляции (рибонуклеаза) полностью снимает влияние норадреналина на активность Na,K-АТФазы как недиализованных, так и диализованных микросом.

Полученные нами экспериментальные результаты позволяют предполагать существование следующих путей воздействия норадреналина на уровень активности Na,K-АТФазы: ускорение синтеза фермента на уровне трансляции и одновременная индукция биосинтеза низкомолекулярного фактора-ингибитора с первичным эффектом норадреналина на уровне транскрипции.

Эффект норадреналина при преинкубации недиализованной микросомно-цитоплазматической фракции является подтверждением справедливости предлагаемой интерпретации. В этом случае наблюдалась активация фермента, то есть при удалении ядер из гомогената НА не индуцирует появление фактора-ингибитора, но сохраняется его активирующий эффект на Na,K-АТФазу.

Свидетельством того, что при воздействии НА происходит увеличение количества молекул Na,K-АТФазы в мембранах, служит факт прироста числа центров связывания ^3H -убаина микросомами (рис. 1б). После преинкубации гомогената с НА (как и в опытах с эзерином *in vivo*) увеличивается количество центров связывания обоих типов.

Полученные результаты дают основание предполагать, что в нервных клетках существует система норадреналиновой регуляции уровня Na,K-АТФазной активности мембран, состоящая в активации синтеза фермента на уровне трансляции и одновременной индукции синтеза низкомолекулярного ингибитора его каталитической активности на уровне транскрипции.

Таким образом, нами показано, что *in vitro* и *in vivo* существует сложная система медиаторной регуляции уровня Na,K-АТФазной активности нервных клеток, основные черты которой можно представить следующим образом: при активации синтеза энзима параллельно синтезируется фактор-ингибитор, и наоборот – при угнетении синтеза Na,K-АТФазы образуется фактор-активатор. Очевидно, что эти разнонаправленные процессы

являются звенями единой саморегулирующейся системы поддержания активности фермента на оптимальном функционально обусловленном уровне.

С целью сравнить влияние нейромедиаторов на активность фермента нейрональных и других типов клеток мы провели опыты с гомогенатом печени крыс (табл. 2).

Как и ожидалось, в первом приближении биосинтетические процессы в печени и мозге довольно похожи. Например, преинкубация гомогената с АХ в обоих случаях индуцирует синтез низкомолекулярного диализуемого активатора(ов) Na,K-АТФазы и ингибирует процесс синтеза самого фермента. Внутрибрюшинное же введение эзерина крысам вызывает снижение активности энзима. Однако анализ данных табл. 2 позволяет сделать вывод, что при использовании печени эффект выражен более резко, чем для мозга: эзерин *in vivo* приводит к гораздо более сильному ингибированию (на 70 %), а АХ – к значительно ярче выраженной активации (на 42 %) фермента и несколько сильнее (на 13 %) подавляет синтез молекул Na,K-АТФазы.

Следует отметить, что данные факты не противоречат литературным данным. В кровь (вследствие их синаптической «утечки» при проведении нервного импульса) поступают АХ, НА и другие нейромедиаторы, которые в дальнейшем могут попадать в клетки тканей со слабо выраженной или отсутствующей медиацией соответствующего типа [9].

Согласно данным работы [13], действие АХ на активность ацетилхолинэстеразы микросом мозга и печени также идентично. Однако бесклеточная система печени более чувствительна к АХ, чем система мозга (хотя максимальный эффект

Таблица 2
Влияние эзерина *in vivo* и НА и АХ *in vitro*
на активность Na,K-АТФазы микросом
и РНКаз гомогената печени и мозга крыс

Условия опыта	Объект исследования			
	Печень		Мозг	
	Без диализа	Диализ	Без диализа	Диализ
Na,K-АТФазная активность				
Эзерин (0,2 мг/кг)	20 ± 8 (6)**	–	90 ± 3 (14)*	139 ± 6 (9)**
НА (10^{-4} М) гомогенат	–	–	95 ± 4 (10)	132 ± 10 (9)**
АХ (10^{-4} М) гомогенат	172 ± 21 (6)**	78 ± 9 (9)*	130 ± 7 (11)***	91 ± 4 (9)*
РНКазная активность				
Эзерин (0,2 мг/кг)	83 ± 4 (10)**	–	77 ± 3 (8)***	–
Эзерин (0,4 мг/кг)	85 ± 6 (7)*	–	87 ± 4 (7)**	–

Примечание. * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$; в скобках – число опытов.

наблюдался при одной и той же концентрации АХ – 10^{-5} М). Этот факт имеет свой биологический смысл, учитывая, что содержание АХ в крови ниже, чем в нервной ткани.

Обратимый ингибитор холинэстераз эзерин в нетоксичной дозе, повышающей содержание АХ в крови, существенно снижает РНКазную активность гомогената как печени, так и мозга крыс (этот эффект подобен его влиянию на Na,K -АТФазу, табл. 2), но увеличивает [13] активность АХЭ микросом печени.

Нам представлялись закономерными постановка и решение вопроса о том, универсально ли действие обнаруженных низкомолекулярных факторов – модификаторов активности Na,K -АТФазы, или же они воздействуют на фермент только тех клеток, в которых сами вырабатываются, то есть не существуют ли для каждого типа клеток особые соединения – регуляторы. С этой целью материал, прошедший через мембранны при диализе микросомно-цитоплазматической фракции, полученной после преинкубации гомогената печени с АХ (10^{-4} М), инкубировали с микросомами мозга. Наблюдавшееся в этих опытах существенное увеличение активности Na,K -АТФазы (150 %, $n = 52$, $p < 0,0001$), по-видимому, свидетельствует о том, что фактор – активатор фермента не обладает строгой тканевой специфичностью.

Поскольку в организме животных и человека существуют различные типы низкомолекулярных модификаторов активности Na,K -АТФазы, мы попытались выделить соединения, обладающие подобными свойствами в индивидуальном состоянии.

На первом этапе очистки микросомно-цитоплазматическую фракцию, полученную из гомогената головного мозга крупного рогатого скота, диализовали против 10 объемов дистиллированной воды. Диализат концентрировали в вакууме и разделяли на колонке, заполненной силикагелем. Содержимое полученных фракций анализировали методом ТСХ на силуфоле (рис. 2а) и проверяли их способность изменять активность Na,K -АТФазы.

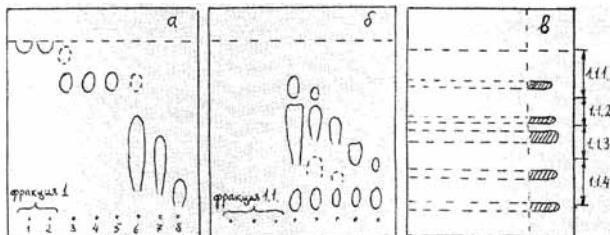


Рис. 2. Анализ методом ТСХ на силуфолах фракций, полученных при разделении колоночной хроматографией на силикагеле диализата микросомно-цитоплазматической (а) и элюата фракции 1 (б) и препаративное разделение на силуфолах соединений фракции 1.1 (в). Проявление: нингидрином (а, б), «боковое» парами йода (в). Подвижная фаза: вода (а), хлороформ-этанол-вода = 5 : 13 : 5 (б), хлороформ-этанол-вода = 13 : 20 : 5 (в)

Материал первой фракции, полученный с использованием в качестве элюента дистиллированной воды и обладающий способностью ингибировать фермент ($M = 66\%$, $n = 13$, $p < 0,01$), вновь фракционировали на силикагеле, используя в качестве подвижной фазы систему растворителей хлороформ – этанол – вода (5 : 13 : 5) (рис. 2б).

Далее содержимое фракции 1.1 ($M = 68\%$, $n = 8$, $p < 0,005$), не проявляемое нингидрином, разделяли методом ТСХ на силуфоле с использованием системы растворителей хлороформ – этанол – вода (13 : 20 : 5) (рис. 2в).

После «бокового» проявления парами йода вещества с пластинки элюировали водой и вновь анализировали их способность модифицировать активность Na,K -АТФазы (табл. 3).

Таблица 3
Влияние соединений, содержащихся в элюате с силуфола (см. рис. 2), на активность Na,K -АТФазы микросом мозга крупного рогатого скота

Фракции	Эффект в % к контролю	Число опытов	Коэф. Стьюдента	Уровень значимости
1.1.1	100 ± 11	5	0,42	
1.1.2	63 ± 10	7	2,48	$< 0,05$
1.1.3	75 ± 5	9	5,77	$< 0,001$
1.1.4	74 ± 7	7	4,13	$< 0,005$

Согласно данным табл. 3, фракция 1.1 содержит или несколько веществ, способных ингибировать фермент, или одно соединение, существующее в нескольких формах [14].

Далее мы исследовали некоторые свойства компонентов фракции 1.1.3 (самое сильное проявление парами йода). Как было показано методом масс-спектрометрии, эта фракция включает хлористый аммоний, который может иметь как эндогенное, так и экзогенное (в химических лабораториях в воздухе всегда содержатся HCl и аммиак, которые при концентрировании больших объемов растворов загрязняют выделяемые соединения) происхождение. Использование цветной реакции между хлористым аммонием и реагентом Несслера [17] позволило количественно оценить содержание этой соли (70 %).

В ИК-спектре фракции 1.1.3 (рис. 3) наблюдаются следующие полосы поглощения (cm^{-1}): 3600–2800 (шир., с.), 1615 (с.), 1400 (с.), 1110 (сл.), 1040 (сл.). Их положение соответствует наличию C-H, O-H, C-N и N-H (в аммонийной форме) связей.

При кратковременном нагревании компонентов данной фракции при 180 °C вместо одной широкой полосы при 3140 cm^{-1} появляются две (3430 и 3135 cm^{-1}), что, возможно, вызвано разложением менее устойчивого, чем хлорид аммония, органического соединения, содержащего в своем составе аммонийные группы.

В спектре ^1H ЯМР ингибитора в D_2O (рис. 4) присутствуют дублет при 1,38 м. д. и мультиплет

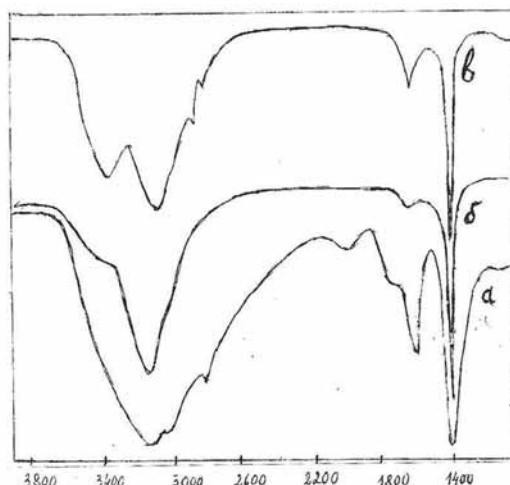


Рис. 3. ИК-спектры в KBr фракции 1.1.3 (а), NH₄Cl (б) и фракции 1.1.3, прогретой 20 секунд при 180 °С (в)

в области 3,31–3,82 м. д. (за счет электроотрицательных атомов, например азота и кислорода, дезакренирующих протоны). Наличие широкого и мощного пика в области 4,0–5,5 м. д. обусловлено примесью HOD и H₂O в дейтерированном растворителе. Этот факт не позволил сделать однозначный вывод о наличии или отсутствии гидроксильных групп в исследуемом образце.

Спектр ¹³C ЯМР фракции 1.1.3 в D₂O (рис. 5) содержит четыре сигнала при 20,66, 63,11, 69,02 и 72,68 м. д. (четыре типа атомов углерода); слабая интенсивность поглощения в ИК-спектре в области, соответствующей валентным колебаниям C-H связей (рис. 5), свидетельствует об их малом количестве. Регистрация спектра ¹³C ЯМР в режиме dept 135 указывает на отсутствие четвертичных атомов углерода и позволяет сигнал при 63,11 м. д. приписать CH₂ группе, а остальные сигналы – CH и CH₃ группам.

Данные спектроскопии ¹³C ЯМР однозначно указывают на то, что молекула ингибитора не содержит двойные связи и ароматические кольца ввиду отсутствия сигналов в соответствующих им слабых полях, но не исключают наличия гидроксильных, простых эфирных или аминогрупп, а также дизамещенной тройной связи. Однако поскольку все известные к настоящему времени природные ацетиленовые соединения имеют растительное происхождение, а мы выделили ин-

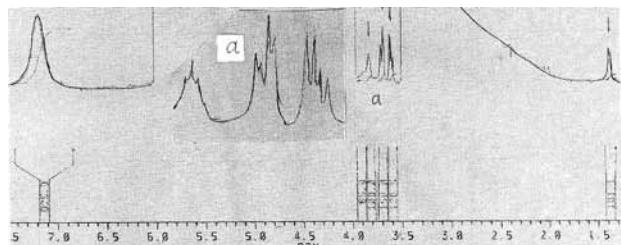


Рис. 4. Спектр протонного магнитного резонанса фракции 1.1.3 в D₂O

гибитор из мозга животных, присутствие в нем тройной связи кажется маловероятным. Кроме того, нагревание водного раствора ингибитора на кипящей водяной бане с 6N HCl в течение 30 мин. не приводит к изменениям в его хроматографическом поведении в тонком слое (ТСХ). Это указывает на отсутствие в молекуле фрагментов, способных к гидролизу или реакциям электрофильного присоединения (для ацетиленовых соединений характерны реакции A_E с галогенводородными кислотами).

Методом гель-хроматографии на молиселекте Г-10 нам удалось освободиться от хлорида аммония во фракции 1.1.3 и оценить молекулярную массу ингибитора (около 200 Да). В качестве первых веществ использовали глутатион, углекислый натрий и глицин.

После обработки 4 кг мозга крупного рогатого скота нами было выделено около 2 мг белого твердого вещества, содержащего активное начало фракции 1.1.3 и обладающего выраженной способностью ингибировать Na,K-АТФазу. Индивидуальность данного соединения доказана методами ТСХ, ВЭЖХ и гель-хроматографии. Оно хорошо растворимо в воде и метаноле и очень плохо в хлороформе.

Нами также были зарегистрированы масс-спектры самого ингибитора и его силицированного аналога (рис. 6), в которых не удалось идентифицировать пики молекулярных ионов. Интерпретация этих спектров согласуется с приведенными выше данными, а соотношение количеств изотопов кремния ²⁸Si, ²⁹Si и ³⁰Si указывает на то, что силицированию в молекуле исследуемого соединения, по-видимому, подверглись три функциональные группы.

Суммируя имеющиеся данные, мы склонны считать, что выделенный ингибитор содержит

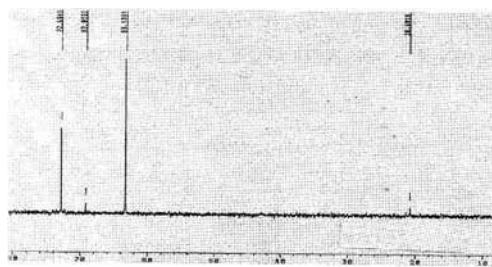
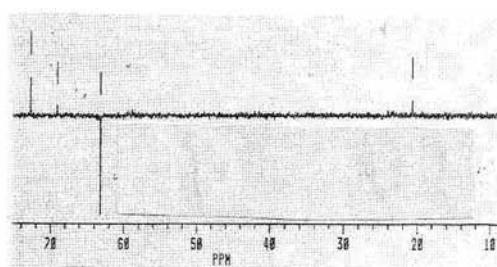


Рис. 5. Спектры ¹³C ЯМР в обычных условиях (слева) и в режиме dept 135



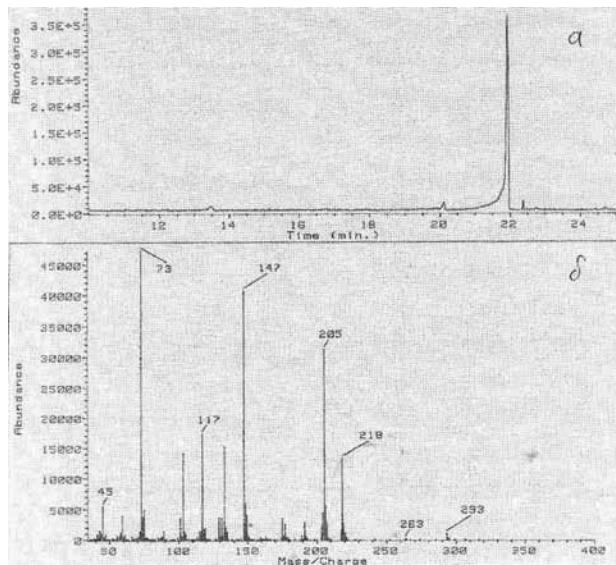


Рис. 6. Хроматограмма силилированного ингибитора (а) и его масс-спектр (б)

как минимум четыре атома углерода, три амино- (в аммонийной форме) и гидроксильные группы. Возможно, он является ациклическим аминоспиртом или его производным, содержащим простую эфирную связь.

К настоящему времени известны различные эндогенные ингибиторы Na,K -АТФазы – катионы Ca^{2+} [16], [18], ванадат-ион [20], нейромедиаторы (ацетилхолин, норадреналин и др. [1], [3], [9], [12], [18]), гистидил-пролилдикетопиперазин [20] и «куабайнподобные» гликозиды [25]. В работе Елаева и Байгильдиной [14] сообщалось об эндогенном ингибиторе с молекулярной массой около 190 Да, который, по мнению авторов, является амидом, содержащим морфолиновую структуру.

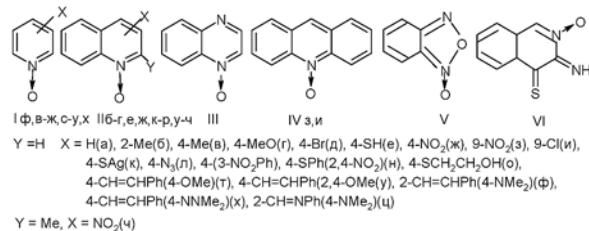
Анализ полученных нами данных позволяет сделать вывод о том, что выделенный нами из мозга крупного рогатого скота ингибитор [4] Na,K -АТФазы не имеет аналогов в литературе. Выяснение в деталях его структурной формулы, а также механизмов биосинтеза и взаимодействия с Na,K -АТФазой является предметом дальнейших наших исследований.

Кроме того, мы исследовали способность влиять на активность Na,K -АТФазы некоторых других кислород- и азотсодержащих экзогенных соединений.

Гетероароматические N-оксиды показывают широкий спектр биологической активности и образуются в организме животных и человека при инактивации гетероциклических соединений. Однако их влияние на Na,K -АТФазу практически не исследовалось. Мы нашли лишь несколько работ, в которых они используются как лекарственные препараты [1] и при изучении ЭПР-спектров (например, 5,5-диметил-1-пирролин N-оксид [25]), а N-оксид 2-гептил-4-гидроксихинолина

применяют как ингибитор цитохромных систем [21], [22].

Ввиду того, что нами в последние годы синтезировано большое количество гетероароматических N-оксидов (I–V), мы проверили способность соединений этого класса в физиологических концентрациях (10^{-4} – 10^{-10} М) изменять *in vitro* активность Na,K -АТФазы мозга крупного рогатого скота.



N-оксиды 4-метокси- и 4-бромпиридина, 2-метил-, 4-метокси-, 4-меркапто-, 3-нитрофенокси, 4-стирил и 2-стирилхинолина,mono-N-оксида хиноксалина и соединение IV в концентрации 10^{-4} М не изменяли ($n = 10$) активность, и поэтому для них при более низких концентрациях исследования не проводили. Данные для других соединений представлены в табл. 4.

Полученные результаты [5] показали, что 16 из них являются ингибиторами (на 67–20 %) Na,K -АТФазы даже при концентрациях 10^{-8} М, что сопоставимо или превышает эффективность строфантинов К и Г. Активность 15 ингибиторов (за исключением № 9) сохраняется постоянной в диапазоне концентраций 10^{-4} – 10^{-8} М и только при дальнейшем уменьшении их концентрации претерпевает изменения. По-видимому, этот феномен можно объяснить образованием прочных комплексов N-оксидов с Na,K -АТФазой. Так, если предположить существование таких аддуктов состава 1 : 1, то до тех пор, пока число молекул N-оксида будет превышать число центров связывания фермента, его ингибирование не должно изменяться. Это мы и наблюдаем в указанном диапазоне концентраций. Как только число молекул N-оксида станет меньше числа молекул фермента, не связанные с ингибитором молекулы Na,K -АТФазы будут повышать общую активность энзима, и тем в большей степени, чем больше будет соотношение фермент / N-оксид. В этом случае даже двукратное изменение указанного соотношения должно приводить к заметным изменениям активности фермента. Например, для соединений № 5–7, 14, 20 при переходе от 10^{-8} к 10^{-9} М ингибиторный эффект пропадает полностью и только для № 14 активен даже при 10^{-10} М. Активирующее действие соединения № 9 при 10^{-4} М, по-видимому, является неспецифическим и может быть обусловлено значительной концентрацией ионов Ag^+ .

Особо следует отметить резко выраженный (180–190 %) активирующий эффект соединения

Таблица 4

Влияние гетероароматических N-оксидов на активность Na,K-АТФазы микросом

№	X	Активность фермента, % от контроля				
		Концентрация N-оксида				
		10 ⁻⁴ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻¹⁰ M
РуO						
1	4-Me	78 ± 1 (10)***	81 ± 2 (10)***	83 ± 1 (10)***		
2	4-NO ₂	91 ± 2 (9)***				
3	4-[CH=CHC ₆ H ₅ (4-OCH ₃)]	63 ± 2 (10)***	83 ± 1 (10)***	80 ± 1 (10)***		
4	2-[CH=CHC ₆ H ₅ (4-OCH ₃)]	96 ± 1 (10)**				
5	4-[CH=CHC ₆ H ₃ (2,4-OCH ₃)]	34 ± 3 (9)***	34 ± 1 (10)***	37 ± 1 (10)***	97 ± 2 (10)	97 ± 4 (15)
6	4-[CH=CHC ₆ H ₄ (4-N(CH ₃) ₂)]	22 ± 2 (20)***	29 ± 1 (9)***	37 ± 1 (10)***	97 ± 2 (10)	102 ± 2 (10)
QO						
7	H	39 ± 3 (10)***	22 ± 2 (10)***	27 ± 3 (10)***	99 ± 2 (10)	93 ± 5 (10)
8	4-Me	104 ± 1 (10)**				
9	4-SAg	170 ± 5 (9)***	76 ± 3 (10)***	74 ± 3 (9)***		
10	4-N ₃	64 ± 1 (10)***	72 ± 1 (10)***	65 ± 9 (7)**		
11	4-Cl ^a	68	72	77		76
12	4-Br ^a	75	77	85		82
13	4-NO ₂	33 ± 2 (9)***	32 ± 1 (10)***	33 ± 1 (10)***		101 ± 4 (10)
14	2-Me-4NO ₂	41 ± 1 (10)***	43 ± 1 (10)***	46 ± 1 (10)***	94 ± 2 (10)*	90 ± 4 (15)*
15	4-SC ₆ H ₄ (2,4-NO ₂)	62 ± 3 (10)***	72 ± 1 (10)***	73 ± 1 (9)***		
16	4-SCH ₂ CH ₂ OH	91 ± 2 (10)**				
17	4-[CH=CHC ₆ H ₃ (2,4-OCH ₃)]	56 ± 4 (10)***	188 ± 2 (10)***	179 ± 1 (10)***	108 ± 2 (10)**	100 ± 2 (10)
18	4-[CH=CHC ₆ H ₄ (4-(CH ₃) ₂)]	47 ± 1 (10)***	44 ± 1 (10)***	50 ± 1 (10)***		96 ± 4 (10)
19	2-[CH=CHC ₆ H ₄ (4-N(CH ₃) ₂)]	59 ± 2 (10)***	58 ± 2 (10)***	69 ± 3 (10)***		104 ± 3 (10)
20	2-[CH=NC ₆ H ₄ (4-N(CH ₃) ₂)]	56 ± 2 (10)***	60 ± 1 (10)***	57 ± 1 (10)***	98 ± 2 (10)	90 ± 2 (15)**
AcrO						
21	9-NO ₂	87 ± 3 (10)**	104 ± 4 (10)	98 (10)		111 ± 5 (15)*
22	9-Cl	108 ± 4 (15)*	99 ± 4 (10)	114 ± 5 (15)*		97 ± 2 (10)
Другие соединения						
23	Фуроксан IV	66 ± 1 (10)***	65 ± 1 (10)***	64 ± 1 (10)***		97 ± 3 (10)
24	V	28 ± 1 (10)***	29 ± 1 (10)***	31 ± 1 (10)***		99 ± 2 (9)
25	Фталимид	39 ± 3 (10)***	22 ± 2 (10)***	27 ± 3 (10)***	99 ± 2 (10)	93 ± 5 (10)

Примечание. ^aДанные работы [15], n = 10, P < 0,05. * – P < 0,05, ** – P < 0,01, *** – P < 0,001; в скобках – число опытов.

№ 17 (№ 22 – менее активен), так как в настоящее время неизвестны вещества, обладающие подобным действием на фермент. Ввиду того что данное воздействие вызывается очень низкими его концентрациями (10⁻⁶–10⁻⁸ M), можно предположить, что в составе Na,K-АТФазы имеется, по крайней мере, один особый центр, ответственный за взаимодействие с соединениями, активирующими фермент. Таким образом, следует ожидать открытия и других эндогенных активаторов данного энзима. Ингибирующая способность соединения № 17 при более высокой концентрации (на 42 % при 10⁻⁴ M), по-видимому, является неспецифической.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение эндогенного ингибитора Na,K-АТФазы

2 кг мозга, полученного на Петрозаводском мясокомбинате [4] в день забоя животных, гомогенизировали в дистиллированной воде (из расчета 1 мл на мозг). Гомогенат центрифугировали 15 мин. при

12 000 g, супернатант диализовали против 10 объемов дистиллированной воды в течение 12 ч. при +4 °C. Полученный диализат концентрировали в вакууме при 30–35 °C до объема 10 мл и использовали для дальнейших исследований. Материал, не прошедший через мембранны, центрифугировали 60 мин. при 30 000 g. Осадок микросом суспензировали в 0,05 M трип-НCl (pH 7,55) и хранили при –20 °C (в течение 1 месяца активность Na,K-АТФазы оставалась почти неизменной). Определение способности выделенных соединений модифицировать активность Na,K-АТФазы осуществляли, как описано ранее [12]. Выделение ингибитора из диализата состояло из следующих этапов.

1. В колонку диаметром 20 мм, содержащую 20 г силикагеля L 100/250 мкм фирмы Chemapol, вносили 1 мл диализата от 200 г мозга и элюировали водой, собирая аликовты объемом 5 мл. Содержимое фракций анализировали методом ТСХ на си-луфоле (подвижная фаза – вода, проявление 0,1 % спиртовым раствором нингидрина, рис. 1a).

2. Материал первой фракции концентрировали до объема 1 мл, наносили на 20 г силикагеля L 40/100, помещенного в колонку диаметром 20 мм, и элюировали системой растворителей хлороформ – этанол – вода (5 : 13 : 5). Анализ содержимого фракций осуществляли методом ТСХ на силуфоле (подвижная фаза хлороформ – этанол – вода (5 : 13 : 5), проявление 0,1 % спиртовым раствором нингидрина, рис. 1б). Для дальнейшей работы использовали непроявляемую нингидрином фракцию 1.1.
3. Содержимое фракции 1.1 высушивали в вакууме. Сухой остаток растворяли в 0,5 мл H_2O и разделяли методом ТСХ на силуфолах (нанесение полоской, подвижная фаза хлороформ – этанол – вода (13 : 20 : 5), рис. 1в). После «бокового» проявления парами йода вещества с пластинки элюировали водой и анализировали их способность модифицировать активность Na,K -АТФазы.
4. Содержимое фракции 1.1.3 высушивали в вакууме, сухой остаток растворяли в 1 мл H_2O и вносили в колонку (2 × 75 см) с гелем молселект Г-10 (тонкий), уравновешенный дистиллированной водой. Элюирование проводили со скоростью 15 мл/ч, аликвоты объемом 2 мл отбирали с помощью коллектора фракций.

Доказательство индивидуальности выделенных веществ

Об индивидуальности выделенного нами ингибитора Na,K -АТФазы свидетельствует наличие лишь одного регистрируемого компонента при использовании описанных ниже хроматографических методов разделения.

1. ТСХ на силуфолах и на силикагеле L 5/40 (фирмы Chemapol) с 13 % гипса. Использовали следующие системы растворителей: хлороформ – этанол – вода (13 : 20 : 5, 5 : 13 : 5), бензол – этанол (2 : 1), бутанол – уксусная кислота – вода (4 : 1 : 1). Проявление пластинок во всех случаях осуществляли парами йода.
2. ВЭЖХ (насос HPP-5001, УФ-детектор LCD 2040, самописец TZ 4620, фирмы Laboratori pristroje, Praha, $\lambda = 235$ нм). Хроматографирование осуществляли с использованием колонок Separon C₁₈, CN, NH₂ и следующих систем растворителей: ацетонитрил – вода (84 : 16), вода, хлороформ – этанол – вода (13 : 20 : 5), хлороформ – этанол (10 : 1).

* Работа выполнена при поддержке Программы стратегического развития ПетрГУ в рамках реализации комплекса мероприятий по развитию научно-исследовательской деятельности на 2012–2016 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. А н д р е е в В. П. Молекулярные комплексы гетероароматических N-оксидов и ацетиленовых аминов с v-акцепторами как модель исследования нуклеофильности и основности соединений с пространственно доступными реакционными центрами: Дисс. ... д-ра химич. наук. Петрозаводск, 2007. 427 с.
2. А н д р е е в В. П., Е л а е в Н. Р., У н ж а к о в А. Р. Регуляция норадреналином биосинтеза Na,K -АТФазы и ее низкомолекулярного ингибитора // Нейрохимия. 1984. Т. 3. № 4. С. 443.
3. А н д р е е в В. П., Е л а е в Н. Р., У н ж а к о в А. Р. Регуляция норадреналином биосинтеза Na,K -АТФазы и ее низкомолекулярного ингибитора. Деп. в ВИНИТИ 12.11.84, № 7248–84.
4. А н д р е е в В. П., П л а т о н о в А. В. Выделение и характеристика нового эндогенного низкомолекулярного ингибитора Na,K -АТФазы из мозга крупного рогатого скота. Деп. в ВИНИТИ 02.04.97, № 1066-В97.

3. Газожидкостная хроматография:

а) Силирирование.

Смесь 0,2 мг сухого остатка (фракции 1.1.3), 1 мкл пиридина и 100 мкл N-метил-N-(trimетилсилил) трифтормаслянида (MSTFA) нагревали при 60 °C в течение 20 мин.

б) Условия ГЖХ-анализа.

Газовый хроматограф HP 5890 фирмы Hewlett-Packard (USA), оснащенный пламенно-ионизационным детектором и кварцевой капиллярной колонкой 12,5 м × 0,2 мм (внутренний диаметр), неподвижная фаза HP-1 с толщиной слоя 0,33 мкм.

Расход газа-носителя (гелий) – 1,5 см³/мин, водорода и воздуха к детектору – 25 и 250 см³/мин соответственно. Температуру колонки изменяли от 40 до 280 °C со скоростью 10 °C/мин. Температура испарителя и детектора – 250 и 300 °C соответственно. Объем вводимых проб составлял 0,5–1,0 мкл в режиме разделения потока 1 : 10. Регистрацию результатов проводили с использованием интегратора HP 3396A фирмы Hewlett-Packard (USA).

Исследование структуры ингибитора Na,K -АТФазы

ИК-спектр соединения, представленного фракцией 1.1.3, снимали в KBr на приборе Specord M 80, ПМР- и ¹³C ЯМР-спектры в D₂O – на приборе Bruker AM (500 МГц), масс-спектр ингибитора – на приборе MX 1321 (70 eV), а его силирированного производного – на хромато-масс-спектрометре GC/MS 5988A (70 eV) фирмы Hewlett-Packard (кварцевая капиллярная колонка 25 м × 0,32 мм, толщина пленки неподвижной фазы HP-1–0,52 мкм. Температуру колонки программировали от 40 до 270 °C со скоростью 4 °C/мин. Остальные условия аналогичны тем, которые описаны в разделе ГЖХ).

Гетероароматические N-оксиды были синтезированы в соответствии с методами, описанными в работах [1], [6], [7], [8]. Их способность *in vitro* модифицировать активность Na,K -АТФазы была исследована, как описано в работах [1], [2]. Написание данной статьи отчасти вызвано тем, что в работах [8], [15] были использованы экспериментальные данные, касающиеся выделения и характеристики ингибитора Na,K -АТФазы и влияния полученных нами гетероароматических N-оксидов на его активность, без разрешения авторов и без ссылок на соответствующие работы [4], [5].

5. А ндреев В. П., Кор вачева Е. Г., Ни жник Я. П. О влиянии N-оксидов пиридина и хинолина на активность Na,K-АТФазы микросом мозга крупного рогатого скота // Химико-фармацевтический журнал. 2006. Т. 40. № 6. С. 96–97.
6. А ндреев В. П., Б атоцыренова Е. Г., Ры жаков А. В., Р одина Л. Л. Процессы внутримолекулярного переноса заряда в ряду стирильных производных N-оксидов пиридина и хинолина // Химия гетероциклических соединений. 1998. № 8. С. 1093–1102.
7. А ндреев В. П., Ры жаков А. В., Теканова С. Г. Стирильные производные N-оксида хинолина // Химия гетероциклических соединений. 1995. № 4. С. 518–521.
8. Б атоцыренова Е. Г. Влияние эндогенных и экзогенных модификаторов на активность Na,K-АТФазы: Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. СПб., 2005. 23 с.
9. Г оликов С. Н., Д олго-Сабуров В. Б., Елаев Н. Р., Ку лешов В. И. Холинергическая регуляция биохимических систем клетки. М.: Медицина, 1985. 224 с.
10. Елаев Н. Р. О характере синаптической регуляции синтеза белков в нервных клетках // Доклады АН СССР. 1975. Т. 222. № 6. С. 1477–1479.
11. Елаев Н. Р. Норадреналин как регулятор синтеза РНК и Na,K-АТФазы в нервных клетках // Проблемы эндокринологии. 1981. Т. 27. № 1. С. 58–62.
12. Елаев Н. Р., А ндреев В. П., Шаврина Н. В. Эндогенные ингибиторы и активаторы Na,K-АТФазы // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1983. Т. 95. № 2. С. 40–42.
13. Елаев Н. Р., Ры леева Е. А., Судакова Н. М., О негина Л. К. Регуляция уровня АХЭ микросом печени и мозга как проявление трофической функции ацетилхолина // Физиологический журнал СССР. 1983. Т. 69. № 4. С. 554–556.
14. Елаев Н. Р., Б айгильдина А. А. Ингибитор Na,K-АТФазы из мембраны нервных клеток. Выделение и общие характеристики // Биохимия. 1994. Т. 59. № 3. С. 389–394.
15. Ко мов В. П., Б атоцыренова Е. Г. Влияние гетероароматических N-оксидов на активность мембранный Na⁺, K⁺-АТФазы // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2008. № 2. С. 32–34.
16. П етрунка В. В., Пани юшкина Е. А., Северина Е. П. Активация и ингибирование Na,K-АТФазы мембран эритроцитов эндогенными Ca²⁺-зависимыми регуляторами. Ca²⁺-зависимое действие убацина на Ca²⁺-АТФазу // Биологические мембранны. 1990. Т. 7. № 4. С. 352.
17. Резников А. А., Муликовская Е. П. Методы анализа природных вод. М., 1954. 135 с.
18. A bashidze S., Jariashvili T., Komelian i Z. The effect of EGTA and Ca⁺⁺ in regulation of the brain Na,K-ATPase by noradrenaline // BMC Biochemistry. 2001. Vol. 2. № 8. URL: <http://biomedcentral.com/471-209/2/8>
19. Adams M., Heffron J. J. Na⁺-K⁺-ATPase content of fast- and slow-twitch muscle fibres // Biochem. Soc. Trans. 1981. Vol. 9. № 2. P. 220.
20. Battani F., Peterkofsky A. // Biochem. Biophys. Res. Comm. 1980. Vol. 94. № 1. P. 240.
21. Dibrov P. A., Lazarova R. L., Skulachev V. P., Verkhovskaya M. L. The sodium cycle. I. Na⁺-dependent motility and modes of membrane energization in the marine alkalotolerant vibrio Alginolyticus // Biochim. Biophys. Acta. 1986. Vol. 850. № 3. P. 449–457.
22. Dibrov P. A., Lazarova R. L., Skulachev V. P., Verkhovskaya M. L. The sodium cycle. II. Na⁺-coupled oxidative phosphorylation in Vibrio alginolyticus cells // Biochim. Biophys. Acta. 1986. Vol. 850. № 3. P. 458–465.
23. Goodfrain T., de Poyer A., Lutete D. N. Identification with potassium and vanadate of two classes of specific ouabain binding sites in a Na⁺, K⁺-ATPase preparation from the guinea-pig heart // Biochem. Pharmacol. 1980. Vol. 29. № 8. P. 1195–1199.
24. Taga R., Okabe E. Hydroxyl radical participation in the in vitro effects of gram-negative endotoxin on cardiac sarcolemmal Na,K-ATPase activity // Jpn J. Pharmacol. 1991. Vol. 55. № 3. P. 339–349.
25. Schneider R., Wray V., Nimitz M., Lehmann W. D., Kirch U., Antolovic R. Schoner Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump // The Journal of Biological Chemistry. 1998. Vol. 273. № 2. P. 784–792.
26. Torda C. Effect of convulsion inducing agents on the acetylcholine content and on the electrical activity of the brain // Am. J. Physiol. 1953. Vol. 173. № 1. P. 179–183.
27. Xie Z., Askari A. Na⁺-K⁺-ATPase as a signal transducer // Eur. J. Biochem. 2002. Vol. 269. P. 2434–2439.

Andreev V. P., Petrozavodsk State University (Petrozavodsk, Russian Federation)
Zachinyaeva A. V., Military Medical Academy named after S. M. Kirov (St. Petersburg, Russian Federation)

ENDOGENOUS AND EXOGENOUS MODIFIERS OF Na,K-ATPASE ACTIVITY

Preincubation of the rat brain and liver homogenates with acetylcholine (noradrenaline) leads to a decrease (increase) in Na,K-ATPase activity and to a release of dialysate of the low-molecular factor activating (desactivating) Na,K-ATPase of intact microsomes. The acetylcholine (noradrenaline)-induced synthesis of activating (desactivating) factors and inhibition (activation) of Na,K-ATPase synthesis were revealed. A new low-molecular factor activating enzymes was isolated and characterized. Some N-oxides of pyridine and quinoline derivatives in concentrations ranging from 10⁻⁴ to 10⁻¹⁰ M inhibit Na,K-ATPase activity in cattle brain microsomes. A new Na,K-ATPase activator, 2-(2,4-dimethoxystyryl) quinoline-N-oxide), has been found, which is capable of acting at concentrations within 10⁻⁶–10⁻⁹ M. Since these compounds activate enzymes in very low concentrations, they can probably be effective in treatment of some disorders involving violation of the Na,K-ATPase function.

Key words: Na,K-ATPase, neurotransmitters, acetylcholine, noradrenaline, eserine, inhibitors, activators, brain, liver, heteroaromatic N-oxides

REFERENCES

1. A ndreev V. P. Molekulyarnye kompleksy geteroaromaticeskikh N-oksidov i atsetilenovykh aminov s v-aktseptorami kak model' issledovaniya nukleofil'nosti i osnovnosti soedineniy s prostranstvenno dostupnymi reaktsionnymi tsentrmi: Diss. ... d-ra khim. nauk [Molecular complexes of heteroaromatic N-oxides and acetylenic amines with v-acceptors as model

- of investigation of nucleophylicity and basicity of compounds with steric free reactive centers. Dr. chem. sci. diss.]. Petrozavodsk, 2007. 427 p.
2. Andreev V. P., Elaev N. R., Unzhakov A. R. Regulation of Na,K-ATPase biosynthesis with noradrenaline [Regulyatsiya noradrenalinom biosinteza Na,K-ATFazy i ee nizkomolekulyarnogo ingibitora]. *Neyrokhimiya*. 1984. Vol. 3. № 4. P. 443.
 3. Andreev V. P., Elaev N. R., Unzhakov A. R. *Regulyatsiya noradrenalinom biosinteza Na,K-ATPazy i ee nizkomolekulyarnogo ingibitora* [Regulation of Na,K-ATPase biosynthesis with noradrenaline]. Departm. VINITI: 12.11.84, № 7248-84.
 4. Andreev V. P., Platonov A. V. *Vydelenie i kharakteristika novogo endogenного nizkomolekulyarnogo ingibitora Na,K-ATFazy iz mozga krupnogo rogatogo skota* [Isolation and characterization of new endogenous lowmolecular inhibitor of Na,K-ATPase from the brain of cow]. Departm. VINITI: 02.04.97, № 1066-897.
 5. Andreev V. P., Korvacheva E. G., Nizhnik Ya. P. Molecular-biological problems of drug design and mechanism of drug action. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2006. Vol. 40. № 7. P. 347-348.
 6. Andreev V. P., Batotsyrenova E. G., Ryzhakov A. V., Rodina L. L. Intramolecular charge transfer processes in a series of styryl derivatives of pyridine and quinoline N-oxides. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 1998. Vol. 34. № 8. P. 941-949.
 7. Andreev V. P., Ryzhakov A. V., Tekanova S. V. Styryl derivatives of quinoline N-oxides. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. 1995. Vol. 31. № 4. P. 453-456.
 8. Batotsyrenova E. G. *Vliyanie endogennykh i ekzogennykh modifikatorov na aktivnost' Na,K-ATPasy: Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk* [Influence of Endogenous and exogeneous modifiers on Na,K-ATPase activity. Author's abstract, PhD. biol. sci. diss.]. St. Petersburg, 2005. 23 p.
 9. Golikov S. N., Dolgo-Saburov V. B., Elaev N. R., Kuleshov V. I. *Kholnergicheskaya regulyatsiya biokhimicheskikh sistem kletki* [Holinergic regulation of biochemical systems of cell]. Moscow, Meditsina Publ., 1985. 224 p.
 10. Elaev N. R. About character of synaptic regulation of synthesis of protein in nervous cells [O kharaktere sinapticheskoy reguljatsii sinteza belkov v nervnykh kletkakh]. *Doklady AN SSSR*. 1975. Vol. 222. № 6. P. 1477-1479.
 11. Elaev N. R. Noradrenaline as regulator of Na,K-ATPase synthesis in nervous cells [Noradrenalin kak reguljator sinteza RNK i Na,K-ATFazy v nervnykh kletkakh]. *Problemy endokrinologii*. 1981. Vol. 27. № 1. P. 58-62.
 12. Elaev N. R., Andreev V. P., Shavrina N. V. Endogenous acetylcholine-induced Na,K-ATPase activators and inhibitors. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1983. Vol. 95. № 2. P. 209-212.
 13. Elaev N. R., Ryleeva E. A., Sudakova N. M., Onegina L. K. Regulation of the acetylcholine nivel of microsomes of liver and brain as expression of trophic function of acetylcholine [Regulyatsiya urovnya atsetilkolinesterazy mikrosom pecheni i mozga kak proyavlenie troficheskoy funktsii atsetilkholina]. *Fiziologicheskiy zhurnal SSSR*. 1983. Vol. 69. № 4. P. 554-556.
 14. Elaev N. R., Baygildina A. A. Inhibitor of Na,K-ATPase from membrane of nervous cells/ Isolation and general characteristics [Ingibitor Na,K-ATFazy iz membrany nervnykh kletok. Vydelenie i obshchie kharakteristiki]. *Biokhimiya*. 1994. Vol. 59. № 3. P. 389-394.
 15. Komov V. P., Batotsyrenova E. G. Influence of heteroaromatic N-oxides on activity of membranous Na,K-ATPase [Vliyanie heteroaromaticeskikh N-oksidov na aktivnost' membrannoy Na⁺, K⁺-ATFazy]. *Voprosy biologicheskoy meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2008. № 2. C. 32-34.
 16. Petrunyaka V. V., Pan'yushkina E. A., Severina E. P. Activation and inhibition of membranous Na,K-ATPase of erythrocytes with endogenous Ca²⁺-dependent regulators. Ca-dependent action of ouabaine on Ca²⁺-ATPase [Aktivatsiya i inaktivatsiya Na,K-ATFazy membrany eritrocytov endogennymi Ca²⁺-zavisimymi reguljatorami. Ca-zavisimoe deystvie ouabaina na Ca²⁺-ATFazu]. *Biologicheskie membrany*. 1990. Vol. 7. № 4. P. 352-358.
 17. Reznikov A. A., Mulinovskaya E. P. *Metody analiza prirodnnykh vod* [Methods of analysis of natural waters]. Moscow, 1954. 135 p.
 18. Abashidze S., Jariashvili T., Kometiani Z. The effect of EGTA and Ca²⁺ in regulation of the brain Na,K-ATPase by noradrenaline // *BMC Biochemistry*. 2001. Vol. 2. № 8. URL: <http://biomedcentral.com/471-209/2/8>
 19. Adams M., Heffron J. J. Na⁺-K⁺-ATPase content of fast- and slow-twitch muscle fibres // *Biochem. Soc. Trans.* 1981. Vol. 9. № 2. P. 220.
 20. Battani F., Peterkofsky A. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1980. Vol. 94. № 1. P. 240.
 21. Dibrov P. A., Lazarova R. L., Skulachev V. P., Verkhovskaya M. L. The sodium cycle. I. Na⁺-dependent motility and modes of membrane energization in the marine alkalotolerant vibrio *Alginolyticus* // *Biochim. Biophys. Acta*. 1986. Vol. 850. № 3. P. 449-457.
 22. Dibrov P. A., Lazarova R. L., Skulachev V. P., Verkhovskaya M. L. The sodium cycle. II. Na⁺-coupled oxidative phosphorylation in *Vibrio alginolyticus* cells // *Biochim. Biophys. Acta*. 1986. Vol. 850. № 3. P. 458-465.
 23. Goodfrain T., de Poyer A., Lutete D. N. Identification with potassium and vanadate of two classes of specific ouabain binding sites in a Na⁺, K⁺-ATPase preparation from the guinea-pig heart // *Biochem. Pharmacol.* 1980. Vol. 29. № 8. P. 1195-1199.
 24. Taga R., Okabe E. Hydroxyl radical participation in the in vitro effects of gram-negative endotoxin on cardiac sarcolemmal Na,K-ATPase activity // *Jpn J. Pharmacol.* 1991. Vol. 55. № 3. P. 339-349.
 25. Schneider R., Wray V., Nimitz M., Lehmann W. D., Kirch U., Antolovic R. Schoner Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump // *The Journal of Biological Chemistry*. 1998. Vol. 273. № 2. P. 784-792.
 26. Torda C. Effect of convulsion inducing agents on the acetylcholine content and on the electrical activity of the brain // *Am. J. Physiol.* 1953. Vol. 173. № 1. P. 179-183.
 27. Xie Z., Askari A. Na⁺-K⁺-ATPase as a signal transducer // *Eur. J. Biochem.* 2002. Vol. 269. P. 2434-2439.

Поступила в редакцию 28.12.2011