

© А.Д. ШАЛАБОДОВ¹, М.Н. МАСЛОВА², Д.Н. КЫРОВ³

^{1,3}Тюменский государственный университет

²Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова РАН (г. Москва)

shalabodov@utmn.ru, maslovamn@inbox.ru, kyrovdn@utmn.ru

УДК 577.352(075)

**ВЛИЯНИЕ СОЛЮБИЛИЗИРОВАННЫХ БЕЛКОВ МЕМБРАННОГО
СКЕЛЕТА ЭРИТРОЦИТОВ НА АКТИВНОСТЬ Na_K -АТФАЗЫ**
**THE INFLUENCE OF MEMBRANE SKELETON SOLUBILIZED PROTEINS
OF ERYTHROCYTES ON THE ACTIVITY OF Na_K -ATPase**

Изучено влияние солюбилизованных белков мембранныго скелета (СБМС) безъядерных эритроцитов на активность Na_K -АТФазы. Показано, что СБМС, полученные с использованием сред, не содержащих хелаторы, активируют Na_K -АТФазу головного мозга крысы, при этом ионы Ca^{2+} не изменяют активирующий эффект СБМС. Внесение в среды получения СБМС ЭДТА или ионов Mg^{2+} позволяет сохранить Ca^{2+} — зависимое модулирующее влияние СБМС на активность Na_K -АТФазы головного мозга, а также мембранных препаратов эритроцитов крыс. В зависимости от способа получения теней эритроцитов и СБМС наблюдается как активирование, так и ингибирование Na_K -АТФазы удаленными с мембраны белками цитоскелета. При этом присутствие ионов Ca^{2+} в среде инкубации изменяет процесс активации Na_K -АТФазы солюбилизованными белками мембранныго скелета. Предполагается, что в смеси солюбилизованных белков мембранныго скелета безъядерных эритроцитов содержится фактор (факторы) $\text{Mg}^{2+}, \text{Ca}^{2+}$ — зависимо модулирующие активность Na_K -АТФазы.

The influence of membrane skeleton solubilized proteins of denuclearized erythrocytes on the activity of Na_K -ATPase is studied. It is shown that SPMS obtained using the medium not containing chelators activate Na_K -ATPase of the rat brain, whereas the calcium ions do not change the activating effect of SPMS. The introduction of SPMS EDTA or magnesium ions into the receiving medium allows to save a calcium-dependent modulating influence of SPMS on the activity of the Na_K -ATPase of the brain as well as the activity of the membrane preparations of rats' erythrocytes. Depending on the method of the preparation of erythrocyte ghosts and SPMS, one may observe both activation and inhibition of Na_K -ATPase via removed membrane proteins. Yet, the presence of Ca^{2+} ions in the incubation medium alters the activation of Na_K -ATPase via the membrane skeleton solubilized proteins. It is supposed that a mixture of membrane skeleton solubilized proteins of denuclearized erythrocytes contains the Mg^{2+} , Ca^{2+} factor(s), modulating the activity of the Na_K -ATPase.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА. АТФаза, солюбилизованные белки мембранныго скелета, эритроцит, актин.

KEY WORDS. ATPase, solubilized membrane protein skeleton, erythrocyte, actin.

Безъядерные эритроциты млекопитающих являются высокоспециализированными клетками, которые выполняют функцию переноса кислорода к тканям и органам при сохранении внутриклеточного гомеостаза, в том числе одно- и двухвалентных катионов. Отсутствие ядра лишает эти клетки решать долгосрочные задачи за счет синтеза молекул de novo, что выдвигает на первый план путь краткосрочной регуляции метаболизма клеток в процессе их функционирования. С этой точки зрения эритроцит является уникальным объектом исследования внутриклеточной регуляции ферментов, в том числе и транспортных АТФаз. Кроме того, отсутствие внутриклеточных мембранных структур позволяет исследователям получать однородные препараты мембран, что значительно упрощает интерпретацию полученных результатов. Именно это обстоятельство обусловило проведение ряда исследований по поиску внутриклеточных регуляторов транспортных АТФаз эритроцитов млекопитающих. В цитозоле этих клеток обнаружены ингибиторы и активаторы Na,K-АТФазы, а также модуляторы Ca-АТФазы [1-5]. Кроме того, ранее нами было показано [6-7], что солюбилизированные белки мембранных скелета (СБМС) эритроцитов активируют транспортные АТФазы как теней эритроцитов, так и препаратов мембран клеток, лишенных основных белков цитоскелета — спектрина и актина. Было высказано предположение, что СБМС содержат миорные белковые компоненты, которые вовлечены в регуляцию активности транспортных АТФаз.

В литературе имеются сведения о том, что хелаторы оказывают активирующее действие на Na,K-АТФазу безъядерных эритроцитов [8]. Внесение ЭДТА на стадиях гемолиза эритроцитов и отмывания мембранных препаратов от внутриклеточного способствует удалению из препаратов мембран кальмодулина, кальнактина и тропомиозина, белка, способного контролировать длину актиновых филаментов [9], при этом ионы Ca^{2+} и Mg^{2+} регулируют протекание этого процесса [10]. Отмечено, что короткие филаменты актина стимулируют активность транспортных АТФаз [11-12].

В настоящем исследовании изучалось влияние СБМС, выделенных из мембранных препаратов эритроцитов, полученных в различных средах получения теней эритроцитов, на активность транспортных Na,K-АТФаз из различных источников.

Материалы и методы исследования. Объектом исследования являлись эритроциты крыс-самцов линии Wistar в возрасте 13-14 недель с массой тела 220-240 г. Смешанную венозно-артериальную кровь получали после декапитации животных. В качестве антикоагулянта использовали гепарин (150-200 ед/мл). Все исследования проводили в день забора крови.

Для получения эритроцитов кровь центрифугировали при 300 g в течение 5 минут, затем удаляли плазму и лейкоцитарную пленку. Эритроциты трижды промывали охлажденным изотоническим раствором 0,145 M NaCl в 0,02 M трис-HCl-буфере (рН 7,6 при 25°C) [2].

Грубую микросомально-митохондриальную фракцию из гомогената коры больших полушарий головного мозга крысы получали как описано ранее [13-14].

Мембранные препараты эритроцитов (тени) получали путем гипоосмотического гемолиза по методу Dodge et al. [15]. В качестве гемолизирующей среды использовали 10 mM трис-HCl-буфер (рН 7,6 при 25°C) без ЭДТА и содержащей 1 mM ЭДТА в зависимости от целей эксперимента. Соотношение объемов

эритроцитов и гемолизирующей среды составляло 1:15. Мембранные препараты осаждали центрифугированием при 20 000 g в течение 20 минут. Тени трижды промывали в тех же растворах с последующим осаждением.

Солюбилизацию периферических белков цитоскелета проводили по методу Steck & Kant [16]. Свежеприготовленные тени супензировали в 10 объемах 1 мМ трис-HCl-буфера (рН 7,6 при 25°C) содержащем, в зависимости от целей эксперимента, различное количество ЭДТА (или других компонентов, что оговорено в тексте) и инкубировали в термостате при 37°C в течение 30 минут при постоянном перемешивании. Мембранные препараты осаждали центрифугированием при 20 000g в течение 10 минут. Надосадочная жидкость представляла смесь солюбилизованных белков мембранныго скелета. Осадок, (бесспектриновые мембранны) дважды промывали 10 мМ трис-HCl буфером (рН 7,6). Электрофоретический анализ показал, что бесспектриновые мембранны содержали не более 5-10% спектрина, а надосадочная жидкость (после первого осаждения) — преимущественно спектрин и актин.

Прединкубацию смеси солюбилизованных белков мембранныго скелета с препаратами мембранны проводили при 20°C в течение 30 минут.

Определение активности Na,K-АТФазы проводили как описано [8]. Состав стандартной инкубационной среды (в мМ): Na — 100; K — 10; Mg — 3; трис-HCl-буфер — 50 (рН 7,4 при 25°C); ЭДТА — 0,5; АТФ — 3. В отдельных сериях экспериментов состав инкубационной среды варьировался, что оговорено в тексте.

Активность Na,K-АТФазы рассчитывали по разнице в приросте Фн (неорганического фосфора) в присутствии и отсутствие 1 мМ уабаина. Активность Na,K-АТФазы выражали в мкмоль Фн/час на мл клеток, либо на мг белка. Содержание неорганического фосфора определяли как описано ранее [17]. Интенсивность окраски молибденового синего оценивали по поглощению света при длине волны 720 нм.

Содержание белка в пробах определяли по методу Lowry et al. [18].

Экспериментальные данные были обработаны статистически, сравнение проводили с использованием критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение. При получении мембранных препаратов эритроцитов использовали среды не содержащие ЭДТА, содержащие ЭДТА и среды, в которые вводили двухвалентные ионы Mg^{2+} . Последние среды получения теней эритроцитов и промывающих растворов были использованы, исходя из литературных данных о том, что ионы способствуют сохранению тропомиозина в препаратах мембранны [10-11].

На начальном этапе исследования все эксперименты проводились на ткани головного мозга крысы — ткани, обладающей высокой ферментативной активностью (рис. 1). Видно, что при увеличении концентрации $MgCl_2$ в среде инкубации от 3 мМ до 6 мМ, процент активации фермента белками цитоскелета возрастает в 2 раза. Внесение $CaCl_2$ в среду определения ферментативной активности не изменяет процент активации фермента белками мембранныго скелета. Следует еще раз подчеркнуть, что в этой серии экспериментов СБМС были солюбилизированы из теней эритроцитов, полученных в присутствии ЭДТА в среде гемолиза и промывающих растворах.

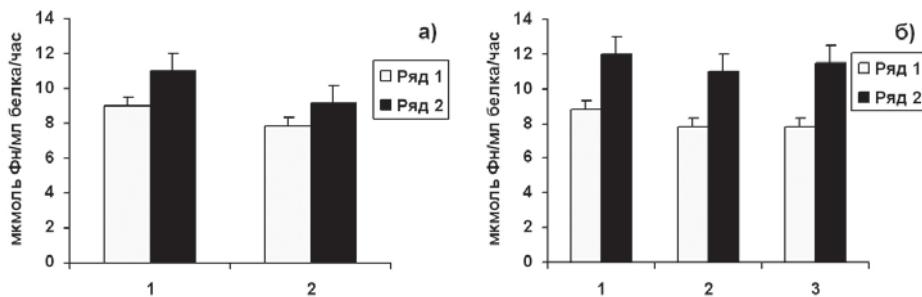


Рис. 1. Активность Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции коры полушарий головного мозга крыс до (Ряд 1) и после (Ряд 2) прединкубации с СБМС.

а) Среда инкубации содержала в mM: 1) $MgCl_2$ — 3; $CaCl_2$ — 0; ЭДТА — 0,5;
2) $MgCl_2$ — 3; $CaCl_2$ — 1; ЭДТА-0,5;

б) Среда инкубации содержала в mM: 1) $MgCl_2$ — 6; $CaCl_2$ — 0; ЭДТА — 0,5;
2) $MgCl_2$ — 6; $CaCl_2$ — 0,5; ЭДТА — 0,5;
3) $MgCl_2$ — 6; $CaCl_2$ — 1; ЭДТА — 0,5.

Примечание: Среда гемолиза эритроцитов и промывающих растворов содержала 10 mM трикс-HCl буфер (рН 7,6 при 25°C) и 1 mM ЭДТА.

Среда удаления белков мембранных скелета содержала 1 mM трикс HCl-буфер (рН 7,6 при 25°C) и 0,1 mM ЭДТА.

В связи с этим представляют интерес данные, представленные на рис. 2 по влиянию на активность Na,K-АТФазы СБМС из теней эритроцитов, полученных в отсутствие ЭДТА в среде гемолиза и промывающих растворах. Видно, что в отсутствии $CaCl_2$ (но в присутствии 6 mM $MgCl_2$) в среде определения ферментативной активности СБМС выраженно активируют Na,K-АТФазу головного мозга крысы; при внесении в среду определения ферментативной активности 0,5 mM и 1 mM $CaCl_2$ активация практически исчезает.

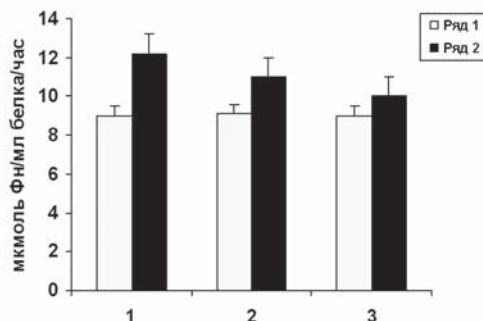


Рис. 2. Активность Na,K-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции коры больших полушарий головного мозга крысы до (Ряд 1) и после (Ряд 2) прединкубации с СБМС.

1 — в отсутствие $CaCl_2$ в среде инкубации; 2 — 0,5 mM $CaCl_2$ в среде инкубации;
3 — 1 mM $CaCl_2$ в среде инкубации.

Примечание: среда гемолиза эритроцитов и промывающих растворов содержала 10 mM трикс HCl- буфер (рН 7,6 при 25°C). Среда удаления белков мембранных скелета содержала 1 mM трикс HCl-буфер (рН 7,6 при 25°C).

Полученные результаты исследования позволяют предположить, что в смеси солюбилизованных белков мембранные эритроциты присутствуют модуляторы (модулятор) активности Na₊,K⁻-АТФазы, которые связаны с мембраной нековалентными взаимодействиями, т.к. удаляются в растворах с низкой ионной силой; при этом внесение ЭДТА в среды получения теней эритроцитов способствует удалению Ca²⁺ — зависимого фактора, снимающего Mg²⁺ — зависимый эффект активации Na₊,K⁻-АТФазы СБМС. Не исключено, что такими свойствами может обладать тропомиозин, который контролирует полимеризацию актина и тем самым — его способность модулировать активность транспортных АТФаз фермента [10].

Учитывая, что ионы Mg²⁺ предотвращают диссоциацию тропомиозина с эритроцитарной мембраной в процессе получения теней эритроцитов [11], была проведена серия экспериментов, в которой в среду гемолиза эритроцитов и промывающие растворы вносили различные концентрации MgCl₂. Данные представлены в табл. 1.

Таблица 1

Активность Na₊,K⁻-АТФазы в микросомально-митохондриальной фракции коры больших полушарий головного мозга крыс до и после прединкубации с солюбилизованными белками мембранных скелетов эритроцитов

АТФаза	Активность ферментов в мкмоль Фн/мг белка/час					
	Контроль	СБМС-А	Контроль	СБМС-В	Контроль	СБМС-С
Na ₊ ,K ⁻ -АТФаза	8,7±0,5	11,0±0,6*	8,9±0,6	10,3±1,1	9,1±0,7	8,0±0,3
	7,9±0,3	9,5±0,5*	7,8±0,4	9,1±0,8	8,0±0,4	6,1±0,5*

Примечание: Гемолиз эритроцитов и промывание мембранных препаратов проводили в 10 мМ трикс-НС1-буфере (рН 7,6 при 25°C), содержащем 1 мМ ЭДТА, а также 0,2 мМ MgCl₂ (СБМС-А), 0,5 мМ MgCl₂ (СБМС-В) или 2 мМ MgCl₂ (СБМС-С). Солюбилизацию белков мембранных скелетов проводили путем инкубации полученных теней эритроцитов при 37°C в течение 30 минут в 1 мМ трикс-НС1-буфере (рН 7,6 при 25°C) + 0,1 мМ ЭДТА, содержащем 0,02 мМ MgCl₂ (СБМС-А), 0,05 мМ MgCl₂ (СБМС-В) или 0,2 мМ MgCl₂ (СБМС-С). Контролем служил гомогенат головного мозга крыс, прединкубированный в соответствующей среде удаления белков мембранных скелетов. В графе "Na₊,K⁻-АТФаза": верхние строчки — активность фермента в отсутствие CaCl₂ в среде инкубации; нижние строчки — активность фермента в присутствии 1 мМ CaCl₂ в среде инкубации. Результаты являются средним значением из 8 экспериментов.

* — достоверность различий по сравнению с контролем ($p<0,05$).

После прединкубации микросомально-митохондриальной фракции коры больших полушарий головного мозга крыс с СБМС А-теней наблюдалась активация Na₊,K⁻-АТФазы в случае отсутствия CaCl₂ в среде определения ферментативной активности на 26%. Внесение CaCl₂ в среду инкубации незначительно снижало процент активации фермента белками СБМС (20%). Предварительная инкубация гомогената головного мозга крысы с СБМС В-теней не вызывала активации Na₊,K⁻-АТФазы. После прединкубации гомогената головного мозга с СБМС С-теней активность Na₊,K⁻-АТФазы оставалась неизменной в том случае, если в среде определения ферментативной активности отсутство-

вали ионы Ca^{2+} ; внесение в среду инкубации 1 мМ позволяло выявить ингибирующий эффект СБМС на активность фермента (24%).

В следующей серии экспериментов проводились исследования на мембранных препаратах эритроцитов с применением того же методического подхода удаления периферических белков мембранныго скелета. Использовались три состава среды гемолиза и промывающих растворов для получения А-, В- и С-теней. Полученные мембранные препараты прединкубировались с солюбилизированными белками мембранныго скелета этих же теней эритроцитов. Полученные результаты исследования представлены в табл. 2

Таблица 2

Активность Na,K -АТФазы теней эритроцитов крысы до и после прединкубации с солюбилизированными белками мембранныго скелета

АТФаза	Активность ферментов в мкмоль Фн/мл клеток/час					
	А-тени эритроцитов		В-тени эритроцитов		С-тени эритроцитов	
	Контроль	СБМС-А	Контроль	СБМС-В	Контроль	СБМС-С
Na, K-АТФаза	7,9±0,3	9,8±0,4*	10,5±0,9	9,8±0,8	7,8±0,6	7,8±1,2
	6,5±0,2	7,6±0,4*	8,3±0,6	6,6±0,5*	5,7±0,4	6,3±0,6

Примечание: Гемолиз эритроцитов и промывание теней эритроцитов проводили в 10 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,6 при 25°C), содержащем 1 мМ ЭДТА и 0,2 мМ MgCl_2 (А-тени эритроцитов), 0,5 мМ MgCl_2 (В-тени эритроцитов), 2 мМ MgCl_2 (С-тени эритроцитов). Удаление белков мембранныго скелета проводили путем инкубации полученных теней эритроцитов при 37°C в течение 30 минут в 1 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,6 при 25°C), содержащем 0,1 мМ ЭДТА и 0,02 мМ MgCl_2 (СБМС-А), 0,05 мМ MgCl_2 (СБМС-В) и 0,2 мМ MgCl_2 (СБМС-С). Контролем служили мембранные препараты, прединкубированные в соответствующей среде удаления белков мембранныго скелета. В графе « Na,K -АТФаза»: верхние строчки — активность фермента в отсутствие CaCl_2 в среде инкубации; нижние строчки — активность фермента в присутствии 1 мМ CaCl_2 в среде инкубации.

Результаты являются средним значением из 7 экспериментов. * — достоверность различий по сравнению с контролем ($p<0,05$).

Прединкубации А-теней эритроцитов с СБМС-А вызывают активацию Na,K -АТФазы на 24%. Внесение 1 мМ CaCl_2 в среду определения ферментативной активности незначительно снижает способность СБМС-А активировать фермент (17%). Представляют интерес данные по прединкубации В-теней эритроцитов с СБМС-В. Отмечен ингибирующий эффект СБМС на Na,K -АТФазу в присутствии 1 мМ CaCl_2 в среде определения ферментативной активности (20%). СА-АТФаза В-теней эритроцитов активировалась СБМС-В на 30%. И, наконец, прединкубация С-теней эритроцитов с СБМС-С не изменяла активность как Na,K -АТФазы.

Таким образом, результаты исследования показали, что внесение ионов Mg^{2+} в среды получения мембранных препаратов, позволяет сохранить Ca^{2+} — зависимое модулирующее влияние СБМС на активность Na,K -АТФазы. Кроме того, учитывая способность ионов Mg^{2+} в среде определения ферментативной активности увеличивать процент активации Na,K -АТФазы белками мембранныго скелета [6], можно предположить, что какие-то миорные белки (белок)

обладают как Mg^{2+} - так и Ca^{2+} - зависимыми свойствами. По-видимому, наличие двухвалентных катионов в средах получения теней эритроцитов позволяет сохранить эти белки на мембране, которые удаляются только в процессе получения солюбилизованных белков мембранных скелета в растворах с низкой ионной силой.

Следует отметить, что внесение Ca^{2+} в среду определения ферментативной активности не изменяло уровень активации СБМС Na,K -АТФазы в препаратах мембран только в том случае, если удаление СБМС проводилось из теней эритроцитов, полученных в присутствии высоких концентраций $MgCl_2$ в среде гемолиза и промывающих растворах. Внесение $MgCl_2$ в среды получения препаратов мембран в концентрации 0,5-2мМ, т.е. концентрации, которая, по мнению некоторых авторов [19], способствует сохранению тропомиозина на мемbrane в процессе получения теней эритроцитов, позволяет получить такие препараты мембран, СБМС которых активируют Na,K -АТФазу, либо, напротив, ингибируют активность фермента в присутствии ионов Ca^{2+} в среде инкубации.

Таким образом, нами показано, что в зависимости от способа получения теней эритроцитов и СБМС наблюдается как активирование, так и ингибирование Na,K -АТФазы удаленными с мембраны белками цитоскелета. При этом присутствие ионов Ca^{2+} в среде инкубации изменяет процесс активации Na,K -АТФазы солюбилизованными белками мембранных скелета. Совокупность полученных результатов позволяет сделать вывод о том, что в смеси солюбилизованных белков мембранных скелета содержится фактор (факторы), Mg^{2+}, Ca^{2+} -зависимо модулирующие активацию Na,K -АТФазы белками мембранных скелета.

Результаты ранее проведенных нами исследований по активации СБМС К-fosфатазы бесспектриновых мембран [7], наряду с литературными данными, позволяют высказать возможную природу этого фактора. Показано, что короткие филаменты актина способны дозависимо стимулировать Na,K -АТФазу [11], [20], что, по мнению авторов, связано с увеличением чувствительности фермента к Na^+ , но не K^+ , Mg^{2+} или АТФ и обусловлено конформационным E_1-E_2 переходом. В наших исследованиях было показано активирующее влияние СБМС на К-fosфатазу бесспектриновых мембран [7], что согласуется с данными этих авторов о конформационном E_1-E_2 переходе фермента.

Эффекты СБМС на Na,K -АТФазу могут быть связаны с активирующим влиянием коротких филаментов актина на фермент. Исходя из классических представлений об участии АТФ, Ca^{2+} и Mg^{2+} в процессе полимеризации G-актина, а также о влиянии тропомиозина на этот процесс, активирующий эффект или его отсутствие определяется концентрацией коротких филаментов актина в среде определения ферментативной активности [20]. При получении теней в среде с низкой ионной силой F-актин диссоциирует на молекулы G-актина. Введение СБМС в среду определения ферментативной активности Na,K -АТФазы сопровождается полимеризацией актина, степень которой (а следовательно, и степень активации Na,K -АТФазы) зависит от соотношения АТФ, Ca^{2+} , Mg^{2+} . Ионы Ca^{2+} препятствуют, а Mg^{2+} способствуют полимеризации актина и их соотношение определяет концентрацию тех форм актина, которые и обладают активирующим действием (короткие филаменты актина). В случае получения теней с сохраненным

тропомиозином (в присутствии высоких концентраций Mg^{2+}), диссоциации F-актина, очевидно, не происходит, т.к. этот катион, кроме того, способствует ассоциации тропомиозина с длинными филаментами актина [19]. Следовательно, СБМС из таких теней не должны обладать сколь-либо существенным активирующим эффектом, что и обнаружено в нашем исследовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yingst, D.R., Marcovitz, M.J. Effect of hemolysate on calcium inhibition of the Na, K-ATPase of human red blood cells // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1983. V. III. № 3. Pp. 970-979.
2. Мацкевич Ю.А., Казеннов А.М., Шалабодов А.Д. Сравнительное исследование внутриклеточной регуляции активности транспортных АТФаз в безъядерных эритроцитах // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1994. Т. 30. № 5. С. 690-697.
3. Wang, H-Y.L., O'Doherty, G a. Modulators of Na/K-ATPase: a patent review // Expert Opin Ther Pat. 2012. № 22. Pp. 587-605.
4. Sen, P.C., Endogenous modulators in the regulation of ion transporting enzymes: structure, function, interaction. Recent advancements and future perspectives // Adv. Biol. Chem. 2011. N 01. Pp. 74-92.
5. Chu, H., Puchulu-Campanella, E., Galan, J a., Tao, W a., Low, P.S., Hoffman, J.F. Identification of cytoskeletal elements enclosing the ATP pools that fuel human red blood cell membrane cation pumps // Proc. Natl. Acad. Sci. 2012. № 109. Pp. 12794-12799.
6. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д., Роль мембранных скелетов безъядерных эритроцитов в функционировании мембранных ферментов // ДАН СССР. 1990. Т. 312. № 1. С. 223-226.
7. Казеннов А.М., Рустамов Ф.А., Фролова О.В., Шалабодов А.Д. Сравнительное изучение свойств убацин-чувствительной фосфатазы в тенях и бесспектриональных мембранах эритроцитов крысы // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. 1996. Т. 32. № 4. С. 393-400.
8. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д. Механизм активирующего действия детергентов и хелаторов на Na, K-АТФазу теней безъядерных эритроцитов // Биохимия. 1986. Т. 51. Вып. 2. С. 224-229.
9. Bennett, V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeleton // Biochem. Biophys. Acta. 1989. V. 988. № 1. Pp. 107-121.
10. Bennett, V., Branton, D. Selective association of spectrin with cytoplasmic surface of human erythrocytes plasma membranes // J. Biol. Chem. 1997. V. 252. № 8. Pp. 2753-2763.
11. Bertorello, A.M., Katz, A.I. Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms // Am. J. Physiol. 1993. V. 265. № 6 (Pt. 2). Pp. 743-755.
12. Vanagas, L., de La Fuente, M.C., Dalghi, M., Ferreira-Gomes, M., Rossi, R.S., Strehler, E.E., Mangialavori, I.C., Rossi, J.P. Differential effects of G- and F-actin on the plasma membrane calcium pump activity // Cell Biochem Biophys. 2013. V. 66(1). Pp. 187-198.
13. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д. Влияние отравления крыс фосфороганическим ингибитором ацетилхолинэстеразы на активность Na, K-АТФазы головного мозга // Нейрохимия. 1983. Т. 2. № 3. С. 146-152.
14. Шалабодов А.Д., Гусева Н.В., Основы мембранных транспорта: Учебное пособие / Науч. ред. А.А. Болдырев. Тюмень: Изд-во ТюмГУ, 2001. 168 с.
15. Dodge, G.T., Mitchell, C., Hanahan, D.G. The preparation and chemical characterization of hemoglobin-free ghosts of human erythrocyte // Atch. Biochem. Biophys. 1963. V. 100. № 1. Pp. 119-130.

16. Steck, T.I., Kant, J.A. Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes // *Meth. Enzymol.* 1974. V. 31. № 1. Pp. 172-180
17. Казеннов А.М., Маслова М.Н., Шалабодов А.Д., Исследование активности Na, K-АТФазы в эритроцитах млекопитающих // *Биохимия*. 1984. Т. 49. Вып. 7. С. 1089-1095.
18. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.K., Randall, P.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* 1951. V. 193. Pp. 265-273.
19. Bennett, V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeleton // *Biochem. Biophys. Acta*. 1989. V. 988. N 1. Pp. 107-121.
20. Bertorello, A.M., Cantiello, H.F. Actin filament organization controls epithelial Na, K-ATPase activity (Abstract) // *J. Am. Soc. Nephrol.* 1992. V. 3. P. 803.

REFERENCES

1. Yingst, D.R., Marcovitz, M.J. Effect of hemolysate on calcium inhibition of the Na, K-ATPase of human red blood cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1983. Vol. 111. № 3. Pp. 970-979.
2. Matskevich, I.A., Kazennov, A.M., Shalabodov, A.D. A comparative study of the intracellular regulation of transport ATPase activity in non-nucleated erythrocytes. *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii — The Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 1994. Vol. 30. № 5. Pp. 690-697. (in Russian).
3. Wang, H-Y.L., O'Doherty, G. Modulators of Na/K-ATPase: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2012. № 22. Pp. 587-605.
4. Sen, P.C., Endogenous modulators in the regulation of ion transporting enzymes: structure, function, interaction. Recent advancements and future perspectives. *Advances in Biological Chemistry*. 2011. № 1. Pp. 74-92.
5. Chu, H., Puchulu-Campanella, E., Galan, J a., Tao, W a., Low, P.S., Hoffman, J.F. Identification of cytoskeletal elements enclosing the ATP pools that fuel human red blood cell membrane cation pumps // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. № 109. Pp. 12794-12799.
6. Kazennov, A.M., Maslova, M.N., Shalabodov, A.D. The role of proteins of membrane skeleton of non-nucleated erythrocytes in functioning of membrane enzymes. *Doklady Akademii nauk SSSR — Reports of the Academy of Sciences USSR*. 1990. Vol. 312. № 1. Pp. 223-226. (in Russian).
7. Kazennov, A.M., Rustamov, F.A., Frolova, O.V., Shalabodov, A.D. A comparative study of the properties of ouabain-sensitive phosphatase in rat erythrocyte ghosts and spectrin-free membranes. *Zhurnal Evolyutsionnoi Biokhimii i Fiziologii — The Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. 1996. Vol. 32. № 4. Pp. 393-400. (in Russian).
8. Kazennov, A.M., Maslova, M.N., Shalabodov, A.D. The mechanism of activating effect of detergents and chelators on Na,K-ATPase of non-nuclear erythrocyte ghosts. *Biokhimiia — Biochemistry*. 1986. Vol. 51. № 2. Pp. 224-229. (in Russian).
9. Bennett, V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1989. Vol. 988. № 1. Pp. 107-121.
10. Bennett, V., Branton, D. Selective association of spectrin with cytoplasmic surface of human erythrocytes plasma membranes. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997. Vol. 252. № 8. Pp. 2753-2763.
11. Bertorello, A.M., Katz, A.I. Short-term regulation of renal Na-K-ATPase activity: physiological relevance and cellular mechanisms. *American Journal of Physiology*. 1993. Vol. 265. № 6 (Pt. 2). Pp. 743-755.
12. Vanagas, L., de La Fuente, M.C., Dalghi, M., Ferreira-Gomes, M., Rossi, R.S., Strehler, E.E., Mangialavori, I.C., Rossi, J.P. Differential effects of G- and F-actin on the plasma membrane calcium pump activity. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 2013. Vol. 66(1). Pp. 187-198.

13. Kazennov, A.M., Maslova, M.N., Shalabodov, A.D. Impact of organophosphorous acetylcholinesterase inhibitor on the activity of Na_xK-ATPase in brain of poisoned rats. *Neirokhimiia — Neurochemistry*. 1983. Vol. 2. № 3. Pp. 146-152. (in Russian).
14. Shalabodov, A.D., Guseva, N.V. *Osnovy membrannogo transporta* [Fundamentals of Membrane Transport]: A student's guide / Ed. A.A. Boldyrev. Tyumen, 2001. 168 p. (in Russian).
15. Dodge, G.T., Mitchell, C., Hanahan, D.G. The preparation and chemical characterization of hemoglobin-free ghosts of human erythrocyte. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1963. Vol. 100. № 1. Pp. 119-130.
16. Steck, T.I., Kant, J.A. Preparation of impermeable ghosts and inside-out vesicles from human erythrocyte membranes. *Methods in Enzymology*. 1974. Vol. 31. № 1. Pp. 172-180.
17. Kazennov, A.M., Maslova, M.N., Shalabodov, A.D. Study of the Na_xK-ATPase activity of erythrocytes in mammals. *Biokhimiia — Biochemistry*. 1984. Vol. 49. № 7. Pp. 1089-1095. (in Russian).
18. Lowry, O.H., Rosebrough, H.J., Farr, A.K., Randall, P.L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951. Vol. 193. Pp. 265-273.
19. Bennett, V. The spectrin-actin junction of erythrocyte membrane skeleton. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1989. Vol. 988. № 1. Pp. 107-121.
20. Bertorello, A.M., Cantiello, H.F. Actin filament organization controls epithelial Na_xK-ATPase activity (Abstract). *Journal of the American Society of Nephrology*. 1992. Vol. 3. P. 803.

Авторы публикации

Шалабодов Александр Дмитриевич — профессор кафедры анатомии и физиологии человека и животных Института биологии Тюменского государственного университета, доктор биологических наук, профессор

Маслова Марина Николаевна — главный научный сотрудник Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН (г. Москва), доктор биологических наук, профессор

Кыров Дмитрий Николаевич — доцент кафедры анатомии и физиологии человека и животных Института биологии Тюменского государственного университета, кандидат биологических наук

Authors of the publication

Alexander D. Shalabodov — Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Human and Animal Anatomy and Physiology, Institute of Biology, Tyumen State University

Marina N. Maslova — Doct. Sci. (Biol.), Professor, Leading Researcher, I. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences

Dmitry N. Kyrov — Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor, Department of Human and Animal Anatomy and Physiology, Institute of Biology, Tyumen State University