

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«ТЮМЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ
кафедра анатомии и физиологии человека и животных

РЕКОМЕНДОВАНО К ЗАЩИТЕ В ГЭК
Заведующий кафедрой
к.б.н., доцент

_____ А. В. Елифанов
_____ 2021 г.

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА
магистерская диссертация

ВЛИЯНИЕ АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ И
СВОЙСТВА РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФОРМ Na^+/K^+ -АТФАЗЫ СМЕШАННОЙ
МЕМБРАННОЙ ФРАКЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ОТДЕЛОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС В
УСЛОВИЯХ СТРЕССА, ВЫЗВАННОГО ДЕЙСТВИЕМ ЭКСТРЕМАЛЬНОЙ
ФИЗИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ

06.04.01 «Биология»
Магистерская программа «Биотехнология»

Выполнила работу
студентка 2 курса
очной
формы обучения

Кураева
Мария
Андреевна

Научный руководитель
к.б.н., доцент

Дубровский
Виталий
Николаевич

Рецензент
к.б.н., доцент
кафедры экологии и генетики ФГАОУ
ВО «Тюменский государственный
университет»

Трофимов
Олег
Владимирович

Тюмень

2021

АННОТАЦИЯ

с.54, рис.7, табл.3, библи.79.

Изучена общая активность Na^+/K^+ -АТФазы в неочищенной мембранной фракции коры больших полушарий, хвостатого тела и мозжечка головного мозга крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами. Показано, что при стрессе происходит повышение активности Na^+/K^+ -АТФазы в коре больших полушарий и хвостатого тела головного мозга крыс. Рассмотрено влияние антихолинэстеразных препаратов на изменение активности Na^+/K^+ -АТФазы в условиях стресса. Отмечено более выраженное влияние стресса на общую активность Na^+/K^+ -АТФазы и активность её изоформ под действие эзерина. Исследованы магнийзависимые свойства Na^+/K^+ -АТФазы в смешанной мембранной фракции коры больших полушарий, хвостатого тела и мозжечка головного мозга крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами. Изменений в зависимости активности магнийзависимых свойств Na^+/K^+ -АТФазы не выявлено.

Ключевые слова: Na^+/K^+ -АТФаза, изоформы, стресс, антихолинэстеразные препараты, прозерин, эзерин.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Плазматическая мембрана	7
1.2 Строение Na ⁺ /K ⁺ -АТФазы.....	9
1.3 Механизм действия Na ⁺ /K ⁺ -АТФазы	13
1.4 Регуляция активности Na ⁺ /K ⁺ -АТФазы	15
1.5 Изоформы Na ⁺ /K ⁺ -АТФазы.....	19
1.6 Кардиотонические стероиды	21
1.7 Связывание Na ⁺ /K ⁺ -АТФазы с убаином.....	23
1.8 Na ⁺ /K ⁺ -АТФаза как рецептор к кардиотоническим стероидам.....	25
1.9 Концепция стресса и общий адаптационный синдром	27
1.10 Роль холинергической системы в стресс-реакции	30
1.11 Антихолинэстеразные препараты	32
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	34
2.1. Материалы исследования.....	34
2.2. Методы исследования	Ошибка! Закладка не определена.
2.2.1. Получение смешанной мембранной фракции	Ошибка! Закладка не определена.
2.2.2. Количественное определение фракций аскорбиновой кислоты.	Ошибка! Закладка не определена.
2.2.3. Метод определения активности Na ⁺ /K ⁺ -АТФазы	Ошибка! Закладка не определена.
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	Ошибка! Закладка не определена.
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	35
БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК.....	36

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ – аденозиндифосфат

АКТГ – адренокортикотропный гормон

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

АХ – ацетилхолин

АХЭ – ацетилхолинэстераза

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

КТС – кардиотонические стероиды

нХР – никотиновый ацетилхолиновый рецептор

ОАС – общий адаптационный синдром

СТГ – соматотропный гормон

цАМФ – циклический аденозинмонофосфат

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

ВВЕДЕНИЕ

Под термином стресс подразумевают неспецифическую реакцию организма на различные неблагоприятные факторы окружающей среды. Известно, что стресс сопровождается изменением внутренней среды организма. Адаптация организма к стрессовым воздействиям является основным условием для живых организмов. Под действием стресса запускаются адаптивные механизмы, которые понижают воздействие стрессора, совокупность защитных реакции называют Общим адаптационный синдромом (ОАС). Развитие ОАС характеризуется включением симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой систем, активирующих выделение в кровь катехоламинов [Киселева, с.81].

Также стресс влечет за собой активацию холинергической системы в головном мозге. Имеются многочисленные данные, что при стрессе наблюдается повышенный уровень ацетилхолина в различных областях головного мозга [Picciotto, Higley, Mineu, с.122]. Ацетилхолин в свою очередь оказывает влияние на функционирование мембранных ферментов в то числе и на Na^+/K^+ -АТФазу. Были выявлены регуляторные механизмы действия ацетилхолина на транспортную активность Na^+/K^+ -АТФазы и её компонентов [The Nicotinic Acetylcholine..., с.28614].

Na^+/K^+ -АТФаза является основным мембранным ферментом клеток организма, который осуществляет перенос ионов натрия из клетки и калия в клетку за счёт гидролиза АТФ против градиента концентрации. Данный фермент обеспечивает гомеостаз клеток и играет огромную роль в проведении нервного импульса. Так же известно, что Na^+/K^+ -АТФазы участвует в рецепторной функции клеток. Различные функции фермента обеспечиваются разнообразием его изоформ, которые экспрессируются в зависимости от типа ткани [Болдырев, 2008, с.207]. Предполагают, что убаин-чувствительные изоформы фермента также во многом подвержены регуляции другими гормонами и медиаторами в частности ацетилхолином. Имеются работы, указывающие на то, что эти регуляторные влияния могут быть опосредованы

никотиновыми рецепторами ацетилхолина. Действие антихолинэстеразных препаратов выражается в увеличении уровня базального ацетилхолина в межклеточном веществе, что позволяет оценить его влияние на исследуемый фермент [The Nicotinic Acetylcholine..., с.28618].

В связи с вышесказанным, была поставлена следующая основная цель исследования: изучить влияние антихолинэстеразных препаратов – прозерин и эзерин на активность и свойства Na^+/K^+ -АТФазы в смешанной мембранной фракции различных отделов головного мозга крыс линии Wistar в условиях действия экстремальной физической нагрузки.

Для выполнения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. определить количественное содержание фракций аскорбиновой кислоты в гомогенате надпочечников крыс, подвергнутых действию стресса и животных, обработанных антихолинэстеразными препаратами;

2. определить активность Na^+/K^+ -АТФазы в смешанной мембранной фракции различных отделов головного мозга крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами;

3. определить соотношение изоформ Na^+/K^+ -АТФазы в смешанной мембранной фракции различных отделов головного мозга крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами;

4. оценить магнийзависимые свойства фермента в смешанной мембранной фракции различных отделов головного мозга крыс, подвергнутых действию стресса и обработанных антихолинэстеразными препаратами.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Плазматическая мембрана

Биологическая мембрана не только ограничивает живое от неживого, но и в силу особенностей своего строения определяет функционирование всех живых клеток. Мембрана обладает селективной проницаемостью и является барьером для различных веществ, с помощью которого поддерживается состав внутриклеточной среды. Избирательная проницаемость обеспечивается работой каналов, транспортирующих различные ионы и субстраты, и специфическими рецепторами. В мембране локализованы ферменты, функционирующие как элементы процесса возбуждения и ответа на него, а также ферменты, участвующие в преобразовании энергии в процессах фосфорилирования [Марри, Гинопман, Т.2. – 127 с.].

Основные компоненты биологических мембран – липиды (30%), белки (60%), углеводы (10%). Минорные компоненты представлены неорганическими компонентами, полиаминами, нуклеиновыми кислотами. Также в состав мембран входит вода (30% от всего веса), которая обеспечивает различные фазовые состояния мембраны [Болдырев, 1990, с.6].

Плазматическая мембрана представляет собой жидкостно-мозаичную модель, которую предложили в 1972 году С. Джонатан Сингер и Гарт Николсон. По их представлению мембрана представляет собой двойной липидный слой, который при обычной температуре находится в жидкокристаллическом состоянии. Такое состояние обеспечивается соотношением между ненасыщенными и насыщенными жирными кислотами в гидрофобных хвостах полярных липидов. В липидный слой погружены интегральные белки на поверхности, которых имеются гидрофобные радикальные группы аминокислотных остатков, благодаря которым они «растворяются» в гидрофобной части бислоя. На поверхности периферических белков имеются гидрофильные радикальные группы, которые притягиваются к гидрофильным головам липидов [Ленинджер, с 345].

Липидный состав мембраны представлен: фосфолипидами, гликолипидами и стероидами. Основными липидами мембран являются фосфолипиды (65–70% в мозге от общего веса всех липидов), они создают достаточно стойкие двухслойные мембранные структуры, обладающие в то же время необходимой текучестью и обеспечивающие нормальную работу белковых мембранных структур, регулирующих проницаемость ионов и веществ. Фосфолипиды подразделяются на - глицерофосфолипиды и сфингофосфолипиды. Гликолипиды мембран представлены цероброзидами, сульфатидами и ганглиозидами. Стероиды мембран у животных представлены в основном холестерином [Болдырев, 1990, с.7].

Гидрофобные белки благодаря особенностям своей структуры легко встраиваются в мембрану. Гидрофильные области белка взаимодействуют с примембранным слоем по одну или обе стороны мембраны. Белковые молекулы фиксируются в бислое с помощью двух взаимодействий - электростатических и гидрофобных. Мембранные белки могут включать в свой состав липидные или углеводные фрагменты. Углеводная часть находится с внешней стороны мембраны [Болдырев, 1990, с.8].

Мембранные белки выполняют различные функции, наиболее распространенные это белки-ферменты, к ним относятся как интегральные белки, так и периферические. К интегральным белкам, погруженным в бислой, относят ферменты и транспортные белки, то есть функционирующие как ионные насосы и ионные каналы. Функциональная активность белков определяется их конформационной лабильностью. От плотности упаковки мембранных липидов зависит энергия конформационного перехода. То есть, аннулярный слой образует конформационно удобную среду для функционирования фермента. Так же было обнаружено, что сродство фосфолипидов к реконструированному белку определяется специфичностью липидных молекул [Болдырев, 1990, с.9].

На данный момент времени жидкостно – мозаичную модель строения мембраны вытесняет теория о микродоменной организации мембраны,

которая принимает во внимание влияние микроокружения на белок - белковое и липид-белковое взаимодействие [Плескова, Крылов, Дерюгина, с 609].

Липидные рафты представляют собой платформу для функционирования белков. Рафты имеют большое содержание сфинголипидов, холестерина и специализированных белков, всё это делает рафт более плотным по отношению к другим участкам мембраны. Рецепторы, входящие в состав микродоменов лучше взаимодействуют с лигандами и обеспечивают лучшую сигнальную реакцию в клетке [Lingwood, Simons, p. 48-50]. Липиды, которые входят в состав рафтов, так же способны принимать участие в сигнальных функциях и являются первичными и вторичными посредниками в сигнальных каскадах клетки [Catala, p.102-103]. Частым случаем липидных рафтов являются кавеолы, которые представляют собой инвагинации плазматической мембраны, образованную за счёт полимеризации белка кавеолина [Sowa, p.2-4].

1.2 Строение Na^+/K^+ -АТФазы

В 1957 году Скоу обнаружил фермент в гомогенате нервной ткани, им оказалась аденозинтрифосфатаза, специфически активирующаяся ионами натрия и калия, требующая ионов магния и ингибирующаяся убаином и другими сердечными гликозидами. Скоу назвал её (Na^+/K^+) - активируемой Mg- зависимой АТФазой [Skou, p.399-401].

Na^+/K^+ -АТФаза представляет собой трансмембранный олигомерный белок, который выкачивает 3 иона Na^+ из клетки и закачивает 2 иона K^+ в клетку за счёт макроэргической связи АТФ. Фермент содержит центры связывания и гидролиза АТФ, центры связывания ионов Na^+ и K^+ , и обладает высокой конформационной лабильностью - способностью принимать несколько устойчивых конформаций. Na^+/K^+ -АТФаза относится к семейству Р-типа, в процессе функционирования, у которых терминальный фосфат АТФ, переносится на карбоксил аспарагиновой кислоты активного центра, при этом образуется фосфорилированный интермедиат EP [Болдырев, 2008, с.206].

Фермент состоит из двух полипептидных цепей: большей (α -субъединицы) и меньшей (β -субъединицы), входящих в состав ферментного комплекса в соотношении 1:1, а также γ -субъединица (рис.1). Большая субъединица массой около 100 кДа состоит из гидрофобных аминокислот, позволяющие пронизывать плазматическую мембрану 10 раз образуя 5 петель, при этом оба конца пептидной цепи обращены в цитоплазму, как и гидрофильные, петли между 2-м и 3-и; 4-м и 5-м сегментами. α -субъединица обладает каталитической активностью, содержит связывающие центры для ионов и АТФ, сердечных гликозидов, фосфорилирующие центры для протеинкиназы А и С. Активным центром является карбоксильные группы дикарбоновых аминокислот на 3-м и 6-м сегментах обращенных в цитоплазму и доступных для цитоплазматического АТФ [Болдырев,2008, с.207] [Na + / K + -ATPase:..., p.5-6].

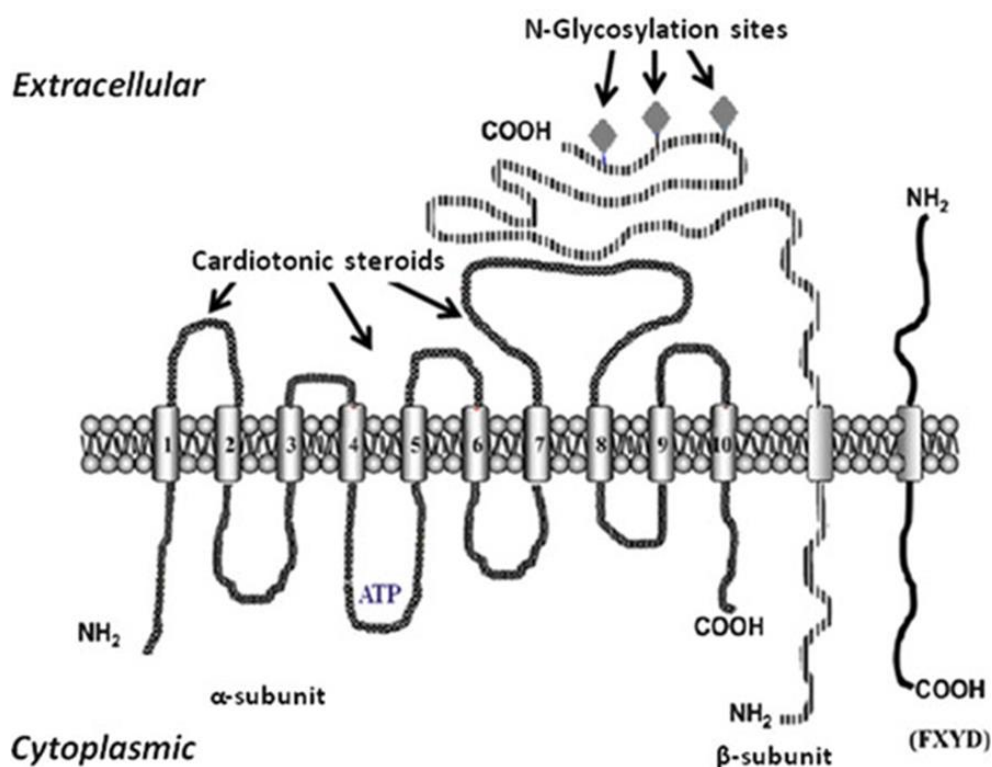


Рис. 1. Структура Na⁺/K⁺-АТФазы [Na + / K + -ATPase:..., p.6].

β -субъединица представляет собой гликопротеин, белковая часть которого соответствует молекулярной массе 35 кДа, а полная масса колеблется в зависимости от типа ткани и других факторов в пределах 45-55 кДа. Эта субъединица пронизывает мембрану один раз, и ее N-конец обращен в

цитоплазму [Kirley, p.7185]. С-концевая часть содержит четыре цистеиновых остатка, соединенных двумя дисульфидными связями. Эта часть пептидной цепи смотрит во внешнюю среду и содержит участки, подвергаемые гликозилированию [Beggah, Jaunin, Geering, p.10323-10325]. По массе и наличию углеводов этот полипептид можно отнести к лектинам – мембранным гликопротеинам, которые отвечают за межклеточное узнавание и адгезию. В процессе белкового синтеза обе субъединицы встраиваются в мембрану одновременно. Таким образом, β -субъединица необходима для введения каталитической субъединицы в мембрану, но не участвует в каталитическом процессе непосредственно [Schmalzing, Gloor, p.102-103].

Помимо α и β -субъединиц была также идентифицирована во фракциях Na^+/K^+ -АТФазы обнаружена γ -субъединица, представляющая собой маленький, гидрофобный полипептид с молекулярной массой 8-14 кДа. Данная субъединица состоит из 96 аминокислот, содержит один трансмембранный домен из 19 аминокислот, с внеклеточным N-концом и сильно заряженным внутриклеточным С-концом. [The gamma subunit..., p.6521]. Данная субъединица экспрессируется совместно с α - и β -субъединицей Na^+/K^+ -АТФазы и принимает участие в регуляции активности фермента, при фосфорилировании субъединиц протеинкиназами. Предположительно взаимодействие с Na^+/K^+ -АТФазой осуществляется за счет связывания с 2, 6 и 9- сегментами α - субъединицы [FXVD1 phosphorylation..., p.1352].

Активность Na^+/K^+ - АТФазы зависит от липидного окружения. Центральную роль в стабилизации фермента, его активности принимают различные фосфолипиды и холестерин. Регуляция осуществляется за счёт липид- белковых взаимодействий, где физические свойства бислоя, такие как гидрофобная толщина, модуль упругости, напряжение кривизны, влияют на конформационную подвижность фермента [General and specific..., p.10-14].

Липиды, окружающие Na^+/K^+ -АТФазу называются кольцевыми липидами, которые определяют гидрофобное окружение белка. В состав

кольцевых липидов входит чуть больше 30 молекул, в основном это фосфатидилхолин и фосфатидилсерин. Менее подвижные липиды, расположенные между α -спиралями Na^+/K^+ -АТФазы называются специфически связанными. Наиболее плотно с белками связаны такие липиды как фосфатидилхолин и холестерин [Crystal structure of..., p.5].

Na^+/K^+ -АТФаза имеет большую молекулярную массу, поэтому липидное окружение приспосабливается к белку, но в то же время при конформационных перестройках белки также подстраиваются к липидам путём перестроек боковых цепей аминокислот и наклоном доменов альфа-субъединицы. Во время конформационных переходов Na^+/K^+ -АТФазы, движение трансмембранных спиралей изменяет толщину мембраны, тем самым нарушая взаимодействия белка с липидами, и изменяет поперечное сечение трансмембранной области фермента, что приводит к давлению липидов на Na^+/K^+ -АТФазу. Холестерин способен смещать $\text{E}2\text{P} / \text{E}1\text{P}$ -конформационное равновесие Na^+/K^+ -АТФазы в направлении $\text{E}1\text{P}$. Скорее всего холестерин специфически регулирует активность Na^+/K^+ -АТФазы, повышая сродство фермента к АТФ. Также известно, что холестерин не входит в кольцевое пространство фермента [Cornelius, Turner, Christensen, p.8543-8549].

Показано, что нервной ткани Na^+/K^+ -АТФаза при связывании с кардиотоническими стероидами вызывают колебания кальция только в особых участках кластеризации - микродоменах. В состав микродомена входит Na^+/K^+ -АТФаза, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник и различные кальциевые каналы, которые прилегают к саркоплазматическому ретикулуму. Расположение фермента в микродоменах является изоформ-специфичной, известно, что альфа-2 субъединицы имеют структурные участки, которые отвечают за способность к кластеризации в микродоменах [Calcium oscillations triggered...,p.5451-5454][N-terminal sequence...,p. 12938- 12939].

Также появляется всё больше доказательств о существовании определенного пула Na^+/K^+ -АТФазы, которые расположены в кавеолах и этот

пул фермента принимает участие в сигнальных функциях. В данных микродоменах липиды способны принимать участие в регуляторных реакциях, например, холестерин. Установлено, что альфа-1 изоформа тоже принимает участие в кластеризации, так как имеет места связывания с кавеолином-1. Предположительно существует два места связывания, один из которых является цитоплазматическим, а второй внеклеточный, связывание Na^+/K^+ - АТФазы осуществляется за счёт N-конца кавеолина-1. Кавеолин в свою очередь с холестерином, тем самым образуя кавеолу. Взаимодействие Na^+/K^+ - АТФазы с холестерином и имеет огромное значение в регуляции содержания холестерина в плазматической мембране [Regulation of intracellular..., p. 14888- 14890].

В результате исследований было обнаружено, что размеры белковой молекулы Na^+/K^+ -АТФазы на электронно-микроскопических фотографиях значительно превышают молекулярную массу энзима. Данные предполагают образование олигомеров, то есть в состав входят четыре – $(\alpha + \beta)$ - протомера. Олигомеризация протомеров Na^+/K^+ -АТФазы приводит к большей скорости фермента, что и объясняет биологическую роль образования данного ансамбля. Известно, что Na^+/K^+ -АТФаза объединяется в олигомеры, для использования в качестве субстрата молекулу АТФ. Для использования в качестве субстрата молекулу, допустим ГТФ, размеры фермента равны с размерами $(\alpha + \beta)$ - протомера. Из чего можно сделать вывод, что фермент объединяется в олигомеры для гидролиза АТФ, что и приводит к более высокой активности [Болдырев, 2001, с.216-220].

1.3 Механизм действия Na^+/K^+ -АТФазы

Na^+/K^+ -АТФаза существует в двух конформационных состояниях E1 и E2, где E - конформация каждой α - субъединицы (рис. 2). Эти состояния характеризуются главным образом в зависимости от взаимодействия с Na^+ , K^+ , АТФ и с сердечными гликозидами, такими как убаин. Конформация E1

обладает высоким сродством к ионам натрия, а E2 к ионам калия [Болдырев, 2001, с.207].

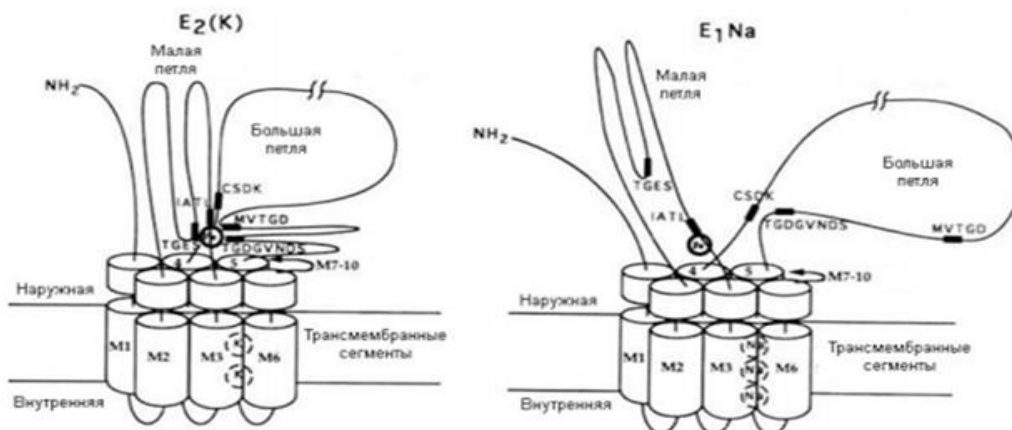


Рис. 2. Конформации Na^+/K^+ -АТФазы [Болдырев, 2001, с.208].

Исходной конформацией можно считать E1, поскольку примерно 70 % молекул находится в этой конформации в среде, где не присутствуют ни натрий, ни калий. Переход между конформациями можно индуцировать добавлением соответствующих катионов, хотя для этого требуются значительно большие концентрации ионов, чем имеются в клетке. E2 – E1 переход существенно ускоряется при защелачивании среды. АТФ также служит активатором этого перехода, причем активными являются концентрации, соответствующие физиологическим ($>0,5$ мМ). АТФ увеличивает сродство фермента к ионам натрия и снижает сродство к ионам калия. Таким образом, по завершении гидролитического цикла трансформация E2 в E1 усиливается при связывании ферментом АТФ, если он присутствует в концентрациях свыше 0,5 мМ [Болдырев, 2001, с.208].

На данный момент времени реакционный цикл Na^+/K^+ -АТФазы описан наиболее подробно (рис. 3). Фермент способен взаимодействовать во внутриклеточной среде с ионами натрия и АТФ в конформационном состоянии E1. В результате фосфорилирования фермента образуется интермедиат E1P и тем самым АДФ высвобождается в цитоплазму. При фосфорилировании натрий не способен высвободиться из активного центра фермента. Для перехода фермента в другую конформацию необходим ион магния, который ускоряет данный процесс и Na^+/K^+ -АТФаза переходит в

конформацию E2. Происходит перемещение частей белка, центры связывания ионов становятся более гидрофобными, и тем самым ионы натрия переносятся на внешнюю сторону мембраны. После высвобождения натрия, ионные центры занимают ионы калия. Образованный комплекс E2P становится более гидрофильным в окружении фосфатной группировки. Происходит дефосфорилирование фосфофермента, так как фосфат доступен для воды и высвобождается внутрь клетки. Вместе с этим во внутриклеточную среду высвобождаются ионы калия [Болдырев, 1998, с.5-6].

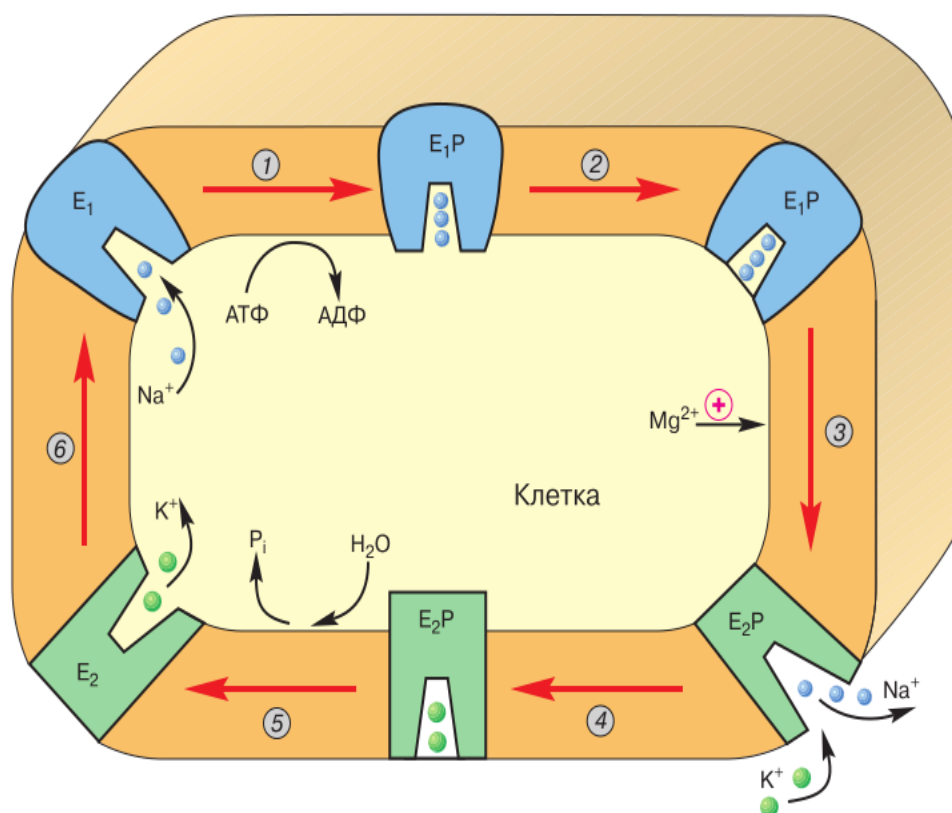


Рис. 3. Реакционный цикл Na⁺/K⁺-АТФазы [Болдырев, 1998, с.6].

1.4 Регуляция активности Na⁺/K⁺-АТФазы

Регуляция активности Na⁺/K⁺-АТФазы бывает краткосрочная и долгосрочная. К краткосрочной регуляции относят соотношение ионов и доступность основного субстрата АТФ, а также фосфорилирование и дефосфорилирование протеинкиназами. Соотношение концентрации Na⁺ и K⁺ в клетке является основным регулирующим фактором для Na⁺/K⁺-АТФазы,

также необходимо достаточное содержание АТФ для нормальной активности фермента. Изменение в содержание ионов и АТФ может служить множество факторов. Гормональная регуляция Na^+/K^+ -АТФазы, может быть, как долгосрочной, так и краткосрочной [Болдырев, 1998, с.8].

Среди кортикостероидов альдостерон, как было показано, опосредует повышение активности Na^+/K^+ -АТФазы. Долгосрочная активация Na^+/K^+ -АТФазы наблюдается только у изоформы α 1, но не изоформы α 2, в клетках гладких мышц сосудов [Regulation of..., p.171]. Однако α 3-изоформа является основной мишенью для альдостерона - опосредованной регуляции в мозге [Aldosterone up-regulates...,p.125].

Катехоламины действуют по-разному на активность Na^+/K^+ -АТФазы. Первое свидетельство α -адренергической стимуляции сердечной Na^+/K^+ -АТФазы было получено на миоцитах Пуркинье собак. Агонисты α -адренорецепторов снижают внутриклеточный Na^+ , что согласуется со стимуляцией Na^+/K^+ -АТФазы в миоцитах Пуркинье. Более того, в изолированной папиллярной мышце крысы гиперполяризация мембранного потенциала покоя, индуцированная α -агонистами, устранялась в присутствии убаина. Опосредованное α -рецептором увеличение удерживающего тока в изолированных желудочковых миоцитах крыс было устранено убаином. Существуют прямые доказательства того, что все α -эффекты на Na^+/K^+ -АТФазы происходят через протеинкиназа С-опосредованное фосфорилирование [α -Adrenergic effects..., p.126].

Одними из известных регуляторов Na^+/K^+ -АТФазы являются КТС, которые являются биологическими ингибиторами фермента, существуют различные изоформы с разной чувствительностью к основному ингибитору убаину. Сердечные гликозиды применяются в медицине, для положительного инотропного эффекта в сердечной мышце, так как ингибирование убаином приводит к усилению мышечных сокращений. Так же известно о эндогенных дигиталис – подобных факторов, вырабатываемых в

надпочечниках, которые избирательно ингибируют изоформы Na^+/K^+ -АТФазы [Болдырев, 1998, с.8].

Многочисленные исследования подтверждают, что нейромедиаторы влияют на активность Na^+/K^+ -АТФазы. Регуляция опосредуется через нейротрансмиттерные рецепторы, модулирующие активность протеинкиназ через вторичные мессенджеры. Как известно протеинкиназа А активирует цАМФ, протеинкиназа G активирует цГМФ, протеинкиназа С активирует кальций и фосфолипиды. Протеинкиназы способны фосфорилировать остатки треонина и серина, как каталитической субъединицы, так и белков фосфолеммы. В зависимости от типа протеинкиназ возможно ингибирование фермента или его активация. Также Na^+/K^+ -АТФаза может подвергаться дефосфорилированию белка со стороны фосфатаз [Phosphorylation of..., p.2592].

Влияние основного возбуждающего нейромедиатора глутамата на активность Na^+/K^+ -АТФазы было тщательно исследовано, поскольку глутамат обеспечивает почти 80% синаптической передачи в головном мозге [Benarroch, p.206]. Выраженная и быстрая активация Na^+/K^+ -АТФазы наблюдалась после инкубации нейронов мозжечка с глутаматом и активации рецепторов [Na, K-ATPase activity..., p.4503]. Наблюдаемое увеличение активности Na^+/K^+ -АТФазы было связано со снижением фосфорилирования фермента. В культивируемых нейронах головного мозга активация ионотропных глутаматных рецепторов оказывает дифференцированное влияние на активность изоформ Na^+/K^+ -АТФазы. Таким образом, глутамат вызывал заметное увеличение активности высокочувствительной изоформы Na^+/K^+ -АТФазы к убаину, в то время как небольшое снижение активности было обнаружено для изоформы, слабо чувствительной к убаину [The cellular..., p.791].

Как правило, дофамин оказывает ингибирующее влияние на активность Na^+/K^+ -АТФазы в полосатом теле, по крайней мере, когда он связывается с рецепторами D1. С другой стороны, D2-рецепторы в нейронах полосатого

тела, могут быть предположительно вовлечены в повышении активности Na^+/K^+ -АТФазы, так как активация этих рецепторов дофамином увеличивает активность натриевых каналов и, увеличивая внутриклеточную концентрацию натрия, может стимулировать активность Na^+/K^+ -АТФазы [Anatomical and ..., p.228-229].

Было обнаружено, что модуляция активности Na^+/K^+ -АТФазы серотониновыми рецепторами в головном мозге является двунаправленной, указывая на участие сложных и взаимосвязанных сигнальных путей. Ранние биохимические исследования показали, что введение серотонина повышает активность Na^+/K^+ -АТФазы в коре головного мозга развивающихся и взрослых крыс. Однако серотонин -индуцированное ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы, опосредованное каскадом цАМФ, наблюдалось в тактильных сенсорных нейронах пиявки [Serotonin transport..., p.1850].

Так же известно, что норадреналин через $\alpha 1$ - адренорецепторы, активировал фосфолипазу и тем самым стимулировал активность Na^+/K^+ -АТФазы нейронов [Mallick, Adya, Faisal, p.1576-1577]. Однако было подтверждено, что норадреналин действует противоположным образом на активность нейральной и глиальной формы фермента, то есть активность Na^+/K^+ -АТФазы в клетках глии снижалась при воздействии норадреналина [REM sleep..., p.70].

Известно о функциональном взаимодействии Na^+/K^+ -АТФазы и никотинового ацетилхолинового рецептора, оба белка являются интегральными и регулируют мембранный потенциал в нейронах. Как Na^+/K^+ -АТФаза, так и никотиновый ацетилхолиновый рецептор (нХР) представляют собой интегральные мембранные белки, которые играют ключевую роль в мембранном возбуждении. Механизм регуляции, где нХР и Na^+/K^+ -АТФаза функционально взаимодействуют для модуляции мембранного потенциала, были показаны в ганглиозных нейронах и в мышечных клетках. В клетках головного мозга, микромолярные концентрации ацетилхолина индуцируют быструю деполяризацию, после его удаления наблюдается последующая

гиперполяризация. Это обеспечивается за счёт увеличения ионов натрия, которые активируют Na^+/K^+ -АТФазу. Было высказано предположение, что эта гиперполяризация ослабляет скорость работы постсинаптических нейронов, действуя как механизм автоматического регулирования возбудимости нейронов. Накопленный в синаптической щели ацетилхолин способен избирательно активировать фермент, например, изоформу $\alpha 2$. Известно, что при взаимодействии Na^+/K^+ -АТФазы с убаином переводящего фермент в конформационное состояние E2 и десенситизированное состояние ацетилхолинового рецептора, является необходимым для взаимодействия между белками [Afterhyperpolarization induced by..., p.170].

1.5 Изоформы Na^+/K^+ -АТФазы

Na^+/K^+ -АТФаза характеризуется сложной молекулярной неоднородностью, которая является результатом выражения и дифференциальной ассоциации множественных изоформ как его α -, так и β -субъединиц. В настоящее время в клетках млекопитающих идентифицировано целых четыре различных α -полипептида ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ и $\alpha 4$) и три различных β -изоформы ($\beta 1$, $\beta 2$ и $\beta 3$). Существуют различные гены, кодирующие различные изоформы α -, и β - субъединиц [Clausen, Hilbers, Poulsen, p.5].

Впервые о наличии различных изоформ субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы узнали в 1978 году при титровании убаином гомогената мозга мышей. Результаты показали двухфазную кривую активности фермента, что говорит о различном сродстве субъединиц к убаину. Более высоким сродством к убаину обладают субъединицы α -2 и α -3, сниженным сродством к убаину обладает субъединица α -1, что отличает её от других изоформ. Между видами изоформ α - 1, 2 и 3 существует идентичность, примерно 87%. Наиболее разнообразной частью белка является поверхность N-домена, которая и определяет специфичность изоформ к сердечным гликозидам. Помимо этого, α - изоформы различаются по кинетическим свойствам. Наличие различных изоформ позволяет изменять активность фермента в зависимости от её

характеристики и роли в клетке. Также имеет огромное значение локализация различных изоформ и их взаимодействие с различными компонентами клетки [Clausen, Hilbers, Poulsen, p.5-6].

Самой маленькой изоформой α - субъединицы является $\alpha 3$, она состоит из 1014 аминокислотных остатков, $\alpha 1$ 1024 остатка, $\alpha 2$ обладает 1021, а $\alpha 4$ -самая большая с 1028 аминокислотными остатками. Степень идентичности для $\alpha 1$ -и $\alpha 2$ -изоформ составляет 92%, $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ - изоформ 96%, $\alpha 1$ - и $\alpha 4$ -изоформ идентичность составляет 78%. $\beta 1$ -изоформа имеет 304 аминокислотных остатка, $\beta 2$ - имеет 290, и $\beta 3$ - 279 аминокислотных остатка. Все β -изоформы имеют общую базовую структуру. Идентичность $\beta 1$ -, $\beta 2$ -изоформ 58%, тогда как $\beta 1$ -, $\beta 3$ -субъединицы идентичность составляет 39% [Blanco, p.294].

Изоформы субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы экспрессируются в разных тканях. Субъединица $\alpha 1$ по существу вездесуща на тканевом и клеточном уровнях. Изоформа $\alpha 2$ преимущественно экспрессируется в мышцах (сердечной и скелетной) и мозге (в астроцитах и глиальных клетках). Примечательно, что в то время как астроциты, культивируемые совместно с нейронами, легко экспрессируют $\alpha 2$, очищенные астроциты, выращенные без нейронов, редко его экспрессируют данную изоформу. $\alpha 3$ сильно выражена в головном мозге в нейронах [Retamales-Ortega, Vio, Inestrosa, p.1347] [Кривой, 2014, с.872]. В сперматозоидах экспрессируется $\alpha 4$ изоформа совместно с $\alpha 1$ изоформой. Самцы мышей полностью стерильны, если им не хватает $\alpha 4$, и их сперматозоиды не могут оплодотворять яйца *in vitro*, хотя их жизнеспособность не изменяется [Na/K-ATPase $\alpha 4$..., p.646].

Все β -изоформы сильно гликозилированы. $\beta 1$ -изоформа млекопитающих имеет три N-связанных гликозилированных сайта. Предполагаемые N-связанные места гликозилирования для $\beta 2$ -изоформ различаются в зависимости от вида [Blanco, p.295]. Удаление гликозилированных участков вызывает нарушение связывания $\beta 2$, но не других изоформ β - субъединицы, что позволяет предположить, что

гликозилированные участки играют индивидуальную роль в различных изоформах. Также $\beta 2$ -изоформа влияет на кинетические свойства фермента, уменьшая кажущееся сродство калия и увеличивая внеклеточное сродство натрия [Кривой, 2016, с. 869].

В сердце мыши основной β - изоформой является $\beta 1$. Тем не менее, специфическая инактивация его гена в кардиомиоцитах приводит к фенотипу, который выглядит здоровым примерно до 10 месяцев, а снижение сократимости и увеличение сердца обнаруживаются только через дополнительные 3-4 месяца [Clausen, Hilbers, Poulsen, p.377].

Интересно, что $\beta 1$ и $\beta 2$ изоформы обнаружены в мозге, причем астроциты экспрессируют $\alpha 1$ и $\alpha 2$ в комбинации с $\beta 2$, в то время как нейроны экспрессируют $\alpha 1$ и $\alpha 3$ в комбинации с $\beta 1$ или $\beta 2$ [Subunit isoform selectivity..., p.26122].

γ -субъединица (FX γ D) так же экспрессируются в различных тканях. Изоформы отличаются сродством к другим субъединицам фермента. Самой распространённой изоформой является FX γ D1, которая обнаружена в скелетной мышце, сердце и мозге. Изоформа FX γ D2 наблюдается у мышей с нарушенной репродуктивной функцией, FX γ D4 экспрессируется в почках. Функции изоформ FX γ D3 и FX γ D5 неизвестны, возможно, данные типы экспрессируются в большом количестве в раковых клетках [Clausen, Hilbers, Poulsen, p.380].

1.6 Кардиотонические стероиды

Кардиотонические стероиды или сердечные гликозиды являются ингибиторами Na^+/K^+ -АТФазы, которые специфически связываются с её каталитической субъединицей. Сердечные гликозиды состоят из стероидного ядра- агликона, лактонного и гиконного фрагмента. В зависимости от структуры лактоновой группы кардиотонические стероиды подразделяются на два класса. Карденолиды имеют 5-членную лактоновую группу в положении

C17 (уабаин, дигоксин, и дигитоксин), тогда как другая группа, буфадиенолиды имеют шестичленное лактоновое кольцо в этом же положении (маринобуфагенин, буфалин) [Cardiotonic steroids..., p.3].

Лактоновые кольца и сахарные фрагменты (гликозидные боковые цепи) являются необходимыми структурами для связывания с Na^+/K^+ -АТФазой [Toxic cardenolides:..., p.38].

Из человеческой плазмы был выделен эндогенный уабаин, позднее в плазме и моче был выделен ещё один сердечный гликозид маринобуфагенин. Оба вещества являются мощными вазоконстрикторами [Binding of ouabain..., p. 2668].

Функционально, было показано что уровни и деятельность эндогенных кардиотонических стероидов меняется от различных заболеваний. Уабаин был обнаружен в сыворотке крови с артериальной гипертензией и застойной сердечной недостаточности. Маринобуфагенин был обнаружены в сыворотке крови пациентов с терминальной стадией почечной недостаточности [Cardiotonic steroids..., p.3].

Первоначально кардиотонические стероиды играют в клетке роль регулятора активности Na^+/K^+ -АТФазы, что вызывает антиапоптотический эффект и стимуляцию клеточного роста при низких концентрациях. При концентрациях уабаина выше физиологических ингибирование фермента ведет к апоптозу клеток и некрозу тканей, это все опосредуется маркерами апоптоза и некроза. Производство эндогенных ингибиторов возможно связано с активностью натриевого насоса, но также могут быть и задействованы другие механизмы [El-Mallakh, Brar, Yeruva, p.107].

Давно установлено клиническое применение уабаина для лечения сердечной недостаточности и фибрилляции предсердий. Кроме того, ряд исследований показал, что уабаин обладает противоопухолевой активностью. Исследования показали, что ингибирование фермента приводит к пролиферации клеток или индуцирует апоптоз по средствам повышения внутриклеточного Ca^{2+} и активных форм кислорода. Это говорит о том, что

Na^+/K^+ -АТФаза играет огромную роль в росте и выживании клеток [Сердечные гликозиды..., с.49].

Изоформы Na^+/K^+ -АТФазы имеют разное сродство к убаину, предполагается, что $\alpha 3$ -изоформа более чувствительна к убаину, так как её связывание с сердечным гликозидом нарушает антипролиферативный эффект [Ouabain targets..., p. 6678].

1.7 Связывание Na^+/K^+ -АТФазы с убаином

Связывание убаина с ферментом зависит от водородных связей между аминокислотами энзима и гидроксильными группами карденолида. Убаин является самым гидрофильным сердечным гликозидом, стероидное ядро содержит четыре гидроксильные группы, и гидроксильную группу у пятичленного лактонового кольца и фрагмент рамнозы (Рис. 4) [Crystal structure..., p. 10958].

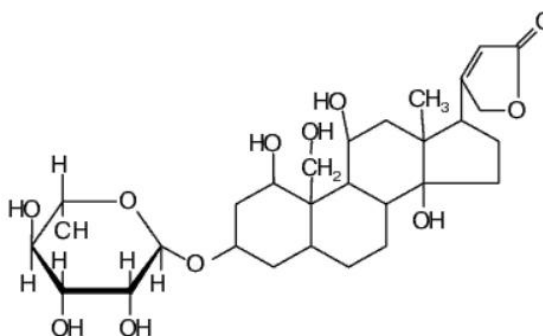


Рис. 4. Строение убаина [Болдырев, 1998, с.3].

Связывание убаина с внеклеточным участком опосредуется дальнейшим движением молекулы в цитоплазматическую сторону. При связывании происходят структурные перестройки доменов каталитической субъединицы, что обеспечивает перемещение молекулы ингибитора в сторону катионного участка, углубляясь все дальше в полость. Карты электронной плотности определяют положение убаина между трансмембранными каталитической субъединицы сегментами 1-6, при этом лактонная часть обращена к цитоплазматической части. Стероидное ядро участвует во взаимодействии с полярными боковыми цепями энзима. Гидроксильная ОН-

группа убаина в положении С19 образует водородную связь с глутамином и аспарагином, между первым и вторым трансмембранными доменами. Данные аминокислоты определяют чувствительность к убаину, замещение этих остатков в изоформах $\alpha 1$ грызунов, приводит к значительному снижению аффинности убаина [Binding of ouabain..., p.2670].

Предполагается, что связывание фермента с убаином не изменяет его сайт фосфолирования, скорее всего убаин стабилизирует фермент в конформации E2P. Данная стабилизация в определенной конформации объясняется ковалентным связыванием убаина с доменами α -субъединицы, что приводит к образованию убаин-связывающего «кармана», который препятствует дальнейшей конформационной перестройке [Crystal structure..., p.10959].

Гликозилирование убаина не играет существенной роли в его связывании с ферментом, а скорее всего, влияет на сродство и специфичность убаина по отношению к различным изоформам Na^+/K^+ -АТФазы. Различия между различными формами гликозилирования возможно являются стерической и гидрофильной природы сахара в составе гликозида, которая облегчает правильную ориентацию молекулы в образовании высокоаффинного комплекса [Crystal structure..., p.10960].

Связывание убаина и Na^+/K^+ -АТФазы происходит в присутствии ионов Mg^{2+} , но наличие моновалентных катионов в катионных транспортных узлах, ингибирует связывание кардиотонических стероидов с ферментом. Пятичленное лактонное кольцо, располагается в гидрофобном кармане и находится в напряженном состоянии, что способствует увеличению частичного отрицательного заряда на карбонильной группе. Облегченная, гидрофобной окружающей средой, карбонильная группа может взаимодействовать с ионами Mg^{2+} [Crystal structure..., p.10960].

Ионы магния и калия конкурируют за связывание в ионном участке α -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, также предполагается, что конкуренция возникает из-за того, что оба иона входят в субъединицу с внеклеточной

стороны. Известно, что высокие концентрации свободного Mg^{2+} превращают калий чувствительный фосфофермент в калий нечувствительный фосфофермент. Конкурентное взаимодействие ионов подтверждается также тем, что ионы магния и калия оказывают противоположное влияние на связывания убаина с ферментом. Убаин имеет высокое сродство к конформации E2P в присутствии только 3 мМ ионов магния, при добавлении высоких содержаниях ионов калия 10 мМ приводит к ухудшению связывания фермента с ингибитором. Увеличение концентрации магния до 12 мМ показывает обратный результат. Из чего можно сделать вывод, что снижение сродства убаином индуцируются внеклеточным калием [Crystal structure..., p.10960].

Имеются данные, что ионы магния образуют комплекс с убаином и изменяют место фосфорилирования. Связывание фермента с убаином изменяет скорость фосфорилирования фермента, которое зависит от состава инкубационной среды. Скорость фосфорилирования в присутствии высокой концентрации калия было быстрее, но медленнее чем в присутствии убаина. Магний в комплексе с убаином закрывает доступ к связывающему центру калию, но не полностью, он позволяет проходить ионам, но с меньшей скоростью [Crystal structure..., p.10961].

1.8 Na^+/K^+ -АТФаза как рецептор к кардиотоническим стероидам

Изначально Na^+/K^+ -АТФаза считалась ферментом, который за счёт гидролиза АТФ переносит ионов натрия и калия, то есть выступает в роли насоса ионов и поддерживает клеточный градиент. Частичное ингибирование фермента приводит к набуханию клетки за счёт большого притока натрия, тем самым повышая концентрацию Ca^{2+} , главным образом, через Na^+ /Ca^{2+} -обменник, что может приводить к возбуждению нейронов [Blaustein, p.1369].

Последние исследования выявили существенные различия в физиологических функциях каждой изоформы Na^+/K^+ -АТФазы. $\alpha 1$ -изоформа

регулирует эндоцитоз, пролиферацию и экспрессию генов. Изоформа $\alpha 2$ играет важную роль в регуляции внутриклеточных уровней Ca^{2+} в миоцитах, поскольку она связывается с $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ - обменником. В то же время $\alpha 1$ Na^+/K^+ -АТФазы представляет собой важный сигнальный механизм во многих различных типах клеток, включая сердечные миоциты. В сердце, активация $\alpha 1$ изоформы Na^+/K^+ -АТФазы с помощью кардиотонических стероидов способна защитить мышцы от ишемически-реперфузионного повреждения [Srikanthan, Shapiro, Sodhi, p.4]. Подтверждено, что $\alpha 1$ изоформа Na^+/K^+ -АТФазы отличается от $\alpha 2$ изоформы своей способностью взаимодействовать с семейством Src- киназой не связанных с рецепторами, и регулировать внутриклеточный сигнал [Yu, Cui, Xie, p.5].

Ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы повышает уровень Na^+ в цитоплазме, что активирует обмен Na^+ и Ca^{2+} в обратном режиме. Повышенная концентрация Ca^{2+} вызывает высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточного депо, которое вызывает дальнейшее повышение уровня этого катиона в цитоплазме. Другой способ увеличить внутриклеточный Ca^{2+} с убаином-мобилизовать депонированный Ca^{2+} , высвобождая его из внутриклеточных Ca^{2+} депо через активацию инозитол-3-фосфата [Orellana, p.6].

Na^+/K^+ -АТФаза образует функциональные комплексы, в которых фермент и рецептор-передатчик влияют друг на друга в клетке, что приводит к запуску сигнальных каскадов. В нейронах, влияние Na^+/K^+ - насоса на постсинаптические рецепторы обеспечивает контроль над эффективностью синаптической передачи в головном мозге. Последние участвуют в высших когнитивных функциях-нейронной пластичности, обучении и памяти [Pivovarov, Calahorra, Walker, p.9].

Известно, что убаин активирует фосфоинозитид-3-киназу, впервые это обнаружили при контроле апоптоза в эпителиальных клетках почек. Вероятным механизмом является взаимодействие домена богатым пролином α -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, ингибированной убаином [Cell signaling..., p.9063].

Известно, что Na^+/K^+ -АТФаза связывается с киназами семейства Src. Ингибирование фермента, низкими дозами убаина, запускает каскад реакций по следующему пути Ras/Raf/MEK/Erk1/2, данный путь приводит к продукции активных форм кислорода. Различные члены семейства Src- киназ различно регулируют активность Na^+/K^+ -АТФазы [The effect..., p.2558]. Также было показано, что зависимость от протеинкиназы А и протеинкиназы С модуляция активности Na^+/K^+ -АТФазы происходит при фосфорилировании белков FXRD, которые регулируются тканевым специфическим образом [Role of protein..., p.997].

Также имеются данные о возможном повышении толерантности нейронов к окислительному стрессу при ингибировании Na^+/K^+ -АТФазы убаином, что может говорить об антиоксидантном механизме. Установлена связь Na^+/K^+ -АТФазы опосредованной сигнальной трансдукции с генерацией активных форм кислорода, и получены убедительные доказательства того, что эта регуляция происходит независимо от изменений внутриклеточных концентраций кальция и натрия. В частности, убаин не вызывал изменения концентрации кальция при инкубации миоцитов сердца в среде, свободной от кальция, в то время как он вызывал генерацию АФК в тех же условиях. В то же время увеличение генерации АФК может окислять α -и β -субъединицы Na^+/K^+ -АТФазы, а также ее независимые регуляторные белки FXRD. Окисление Na^+/K^+ -АТФазы ингибирует ее активность [Влияние модуляции активности..., с.54].

1.9 Концепция стресса и общий адаптационный синдром

Стресс является неспецифическим ответом организма на любой, воздействующий на него стресс фактор. Вне зависимости от качества ситуации, неспецифическая перестройка организма имеет одинаковый характер. Важным является интенсивность требований к приспособлению организма в стрессовой ситуации. Так как стресс не всегда результат

повреждения и негативных факторов, принято неприятный или вредоносный стресс называть «дистресс» [Селье, с.10].

На фоне воздействующих, на организм стресс факторов, развиваются неспецифические приспособительные реакции, совокупность которых называется синдром биологического стресса или общий адаптационный синдром (ОАС), который имеет три фазы - реакция тревоги, фаза сопротивления и фаза истощения.

ОАС характеризуется тремя признаками, которые получили название «Триада Селье»:

1. Гипертрофией коры надпочечников, что сопровождается повышением адреналина в крови.
2. Инволюцией тимуса, селезёнки и лимфатических узлов.
3. Возникновением кровоточащих язв в ЖКТ [Порядина, с.4].

Постоянство внутренней среды, является обязательным условием живого организма. Факторы, влияющие на организм, способны генерировать всевозможные процессы внутри организма для постоянной поддержки внутренней среды. Стрессоры могут быть переносимы живым организмом в течение определенного срока, так как способность организма к адаптации имеет свой предел [Селье, с.12].

«Общий адаптационный синдром» был обозначен Гансом Селье как совокупность общих ответных реакций организма на действие различных раздражителей, которые, которые в первую очередь, имеют защитное значение.

Стресс факторы отличаются друг от друга своим специфическим воздействием, но эффект их действия на организм всегда один и тот же. Основной путь регулирования реакции на стрессор включает в себя следующие звенья - это стрессор, гипоталамус, надпочечники, желудок, тимус. Гипоталамус в ответ на стрессор продуцирует адренотропный гормон (АКТГ). АКТГ влияет на корковую часть надпочечников, которая продуцирует глюкокортикоиды. Продукция глюкокортикоидов приводит к

сморщиванию тимуса, а затем атрофии лимфатических узлов, так же отличительной чертой является возникновение язвочек в желудке и кишечнике [Селье, с.14].

Второе звено составляют катехоламины, воздействие которых приводит к продукции соматотропного гормона, что в свою очередь усиливает анаболические процессы в тканях организма. Адаптивный эффект глюкокортикоидов заключается в противовоспалительном действии, что обеспечивает адаптацию организма. Адаптивный эффект катехоламинов приводит к мобилизации психической активности, формированию новых условных рефлексов и притупление боли [Селье, с.9].

Развитие ОАС протекает в 3 стадии:

Стадия тревоги - характеризуется мобилизацией защитных сил организма. В этой стадии выделяют подстадию шока и противошока, когда происходит либо снижение, либо увеличение адаптационных возможностей организма. На стадии тревоги происходят изменения в системах жизнеобеспечения путем перестроек их функционирования. Повышается функциональная деятельность клеток, которые принимают участие в реализации ответа организма на стресс фактор. Стадия развивается через несколько минут после воздействия стрессора и продолжается от 6–48 часов. В ней участвуют такие гормоны, как адреналин, окситоцин, вазопрессин, кортизол, кортиколиберин. Для ответной реакции на стресс-фактор все части организма, которые в этом задействованы, направляют все свои пластические и энергетические ресурсы на реализацию ответа.

Стадия резистентности – характеризуется перестройкой защитных систем организма и адаптацией к воздействию стресса. В данной стадии участвуют кортизол, соматотропный гормон (СТГ). Происходит образование новых межэндокринных связей и усиление выработки адаптивных гормонов – катехоламинов, глюкокортикостероидов, однако уровень их секреции значительно ниже. Преобладает катаболизм, атрофия, некроз. После

устранения угрозы организм возвращается к исходному или сбалансированному уровню гормонов и нейромедиаторов.

Стадия истощения. При длительном воздействии раздражителя все резервы организма начинают истощаться, поддержание организма происходит путем деструкции жизненно важных структур организма. Начинается последняя стадия- стадия истощения, которая может закончиться летальным исходом. Характерными проявлениями данной стадии являются выделение секреторных гранул из коры надпочечников, катаболизм тканей, гипогликемия и эрозии желудочно-кишечного тракта. Эти проявления могут исчезать или изменяться на стадии резистентности, но вновь появляются на стадии истощения [Киселева, с.81].

1.10 Роль холинергической системы в стресс-реакции

Как известно в условиях стресса и в результате адаптивного изменения организма, активируется также холинергическая система в различных отделах головного мозга. М. Гилад в 1987 г показал, что через несколько минут после воздействия стресса на организм включается адаптивная реакция ЦНС посредством активации выработки ацетилхолина нейронами гиппокампа. Дж. Марк и соавт. В 1996 году показали быструю секрецию ацетилхолина в гиппокампе и префронтальной коре головного мозга в ответ на стресс. Введение в организм ингибитора ацетилхолинэстеразы эзерина вызывает симптомы тревоги и изменение поведения, что обусловлено повышением уровня ацетилхолина в головном мозге. В результате введения физостигмина в организм повышается уровень кортизола, что повышает количество нейротрансмиттера в мозге и активирует ось «гипоталамус – гипофиз – надпочечники» [О роли холинергической..., с.3].

Ацетилхолин воздействует на клетки при взаимодействии его с рецепторами двух типов: мускариновым и никотиновым. При связывании ацетилхолина с мускариновым рецептором запускаются каскады внутриклеточных посредников, что проявляется в медленном и длительном

изменении процессов в клетках-мишенях (железы внутренней секреции, нейроны, гладкие мышцы, кардиомиоциты). Никотиновые рецепторы при взаимодействии с АХ вызывают деполяризацию мембран, которая приводит к возбуждающему действию на мышцы и нейроны. В большинстве случаев в головном мозге м-холинорецепторы и н-холинорецепторы являются пресинаптическими. Наличие пресинаптических н-холинорецепторов в головном мозге говорит о диффузном механизме холинергической передачи в головном мозге, а не синаптической трансмиссии, что объясняется специфическими изоформами ацетилхолинэстеразы. Все вышесказанное доказывает, что ацетилхолин функционирует как нейромодулятор, что объясняет активацию холинергической системы в процессе адаптации [О роли холинергической..., с.5].

Множество исследований показали, что стресс сопровождается увеличением ацетилхолина в зависимости от отдела головного мозга. Например, уровни АХ в гиппокампе и коре могут повышаться после стресса у крыс, в то время как уровни ацетилхолина в миндалевидном теле не изменяются. Способность АХ вызывать синаптическую пластичность посредством его воздействия на пре- и постсинаптические холинорецепторы, вероятно способны модулировать обучение и память, в том числе память о стрессовых событиях. Стресс также индуцирует альтернативный сплайсинг мРНК ацетилхолинэстеразы в гиппокампе, что приводит к изменению передачи сигналов ацетилхолина в этой структуре. Усиление передачи сигналов ацетилхолина у людей приводит к усилению симптомов депрессии, данные подтверждались назначением пациентам ингибиторов АХЭ. Так же исследования показали, что повышенное количество связывания ацетилхолина с Н-ХР наблюдается у людей, которые находятся в активной депрессии [Picciotto, Higley, Mineu, с.122-123]. Исследования на грызунах подтверждают, что повышение уровня АХ путем лечения физостигмином может вызвать тревожное и депрессивное поведение. Местное введение физостигмина или ингибирование АХЭ в гиппокампе приводит к

деполяризации постсинаптических нейронов через мускариновые холинорецепторы. Эти исследования показывают, что гиперактивная передача сигналов ацетилхолина в гиппокампе может способствовать развитию симптомов депрессии [Higley, Picciotto, с.91]

В ряде исследований была показана адаптивная реакция холинергической системы головного мозга в условиях стресса. В головном мозге ацетилхолин является нейромодулятором, который осуществляет медленные процессы объемной передачи информации. Ацетилхолин функционирует как в ганглиях, так и в межнейральном пространстве, активируя мускариновые и никотиновые рецепторы ацетилхолина, локализованные вне синапсов. Ацетилхолинэстераза в головном мозге имеет специфические молекулярные формы, что вызывает фазные изменения активности крупных ансамблей нейронов [О роли холинергической..., с.4].

1.11 Антихолинэстеразные препараты

Антихолинэстеразными средствами называют вещества, угнетающие активность холинэстераз, взаимодействуя с теми же участками связывания фермента, что и ацетилхолин. Ингибирование ЭХЭ замедляется гидролиз ацетилхолина, следствием этого является накопление данного медиатора в холинергических синапсах и стимуляция в организма холинергических процессов. [Лемина, Чурюканов, с. 40].

К препаратам данной группы относится ряд алкалоидов (физостигмин, галантамин и др.) и синтетических соединений (прозерин, аминостигмин и др.)

В зависимости от химической структуры, физико-химических свойств и фармакокинетических параметров среди ингибиторов холинэстеразы выделяют: третичные и четвертичные, обратимые и необратимые, короткого и длительного действия. Препараты, содержащие третичный амин (физостигмин, галантамин, амиридин, такрин и др.), проникают через гематоэнцефалический барьер и оказывают влияние на центральную нервную систему. Препараты, основанные на четвертичных аммониевых соединениях

(прозерин, оксазил и др.), трудно проникают через гематоэнцефалический барьер и способны оказывать влияние на периферическую нервную систему [Машковский, Т.1, с. 196].

Прозерин или неостигмина метилсульфат – является синтетическим антихолинэстеразным веществом. Характерной особенностью прозерина является наличие в его молекуле четвертичной аммониевой группы.

Прозерин обладает сильной обратимой антихолинэстеразной активностью. Подобно другим четвертичным аммониевым соединениям, плохо проникает через гематоэнцефалический барьер и оказывает влияние преимущественно на периферические системы.

Прозерин является антагонистом антиполяризующих курареподобных препаратов. Однако в больших дозах сам способен вызывать нарушение нервно-мышечной проводимости в результате накопления ацетилхолина и стойкой деполяризации в области синапсов. [Машковский, Т.1, с. 196].

Препарат используется для ускорения отмены недеполяризующей нервно-мышечной блокады никотиновых рецепторов в нервно-мышечном соединении в конце операции [Reevaluation and..., p 2398].

Физостигмин является третичным амином и обратимым холинергическим препаратом, наиболее часто используемым в лечении антиму斯卡риновой токсичности и глаукомы. Физостигмин происходит из бобов Калабара, широко распространенных в африканских тропиках. Несмотря на небольшой размер, его фатальность была впервые обнаружена сэром Робертом Кристисоном в 1855 году. Несколько десятилетий спустя, в 1863 году, сэр Томас Ричард Фрейзер написал диссертацию о медицинском применении физостигмина. С 1863 года и по сей день были проведены обширные исследования по применению физостигмина, изучая его применение в лечении глаукомы и его применение в лечении септического шока. [Proudfoot, p 104-105] [Nature as..., p 444].

Физостигмин действует как холинергическое лекарство, увеличивая количество ацетилхолина, присутствующего в холинергических синапсах

центральной и периферической нервной системы. Этот препарат ингибирует действие ацетилхолинэстеразы и бутирилхолинэстеразы, ферментов, которые обычно расщепляют ацетилхолин. Благодаря этому механизму ацетилхолин накапливается в синапсах мускариновых или никотиновых рецепторов, вызывая потенциалы действия. Это действие приводит к эффектам мускариновых рецепторов в виде уменьшения размера зрачка, увеличения выработки водной влаги, увеличения слюноотделения, увеличения желудочно-кишечных выделений, увеличения мочеиспускания и потливости [In vivo effects..., p 2].

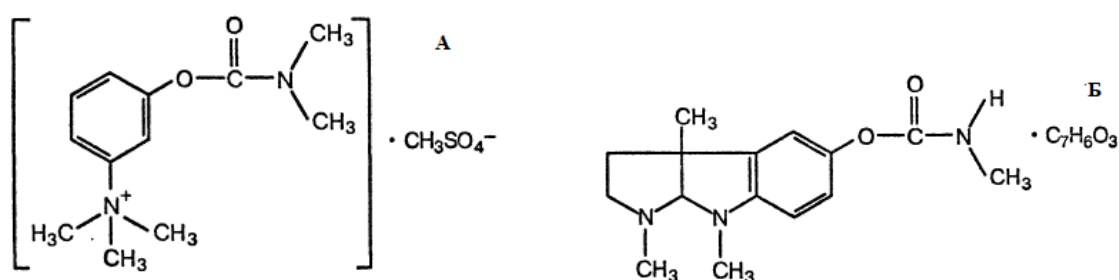


Рис. 5. Строение прозерина (А) и эзерина (Б) [Машковский, Т.1, с. 194,196].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Опыты проводились на кафедре анатомии и физиологии человека и животных ТюмГУ в период с 2019 по 2020 года. Исследования проводились на самцах белых крыс линии «WISTAR» массой 160-200 г, в возрасте 10-12 недель, которые были разделены на четыре группы: контрольные животные, крысы подвергнутые действию стресса, и животные подвергнутые действию стресса после предварительной внутримышечной инъекции эзерина из расчета 0,15 мг/кг массы тела животного, и прозерина из расчета 0,08 мг/кг массы тела животного. Стресс вызывали воздействием экстремальной физической нагрузки, путем плавания в воде с грузом на хвосте массой 3,3% от массы тела. Крыс забивали путем декапитации.

Для исследования использовали неочищенную мембранную фракцию коры больших полушарий, мозжечка и хвостатого тела головного мозга крыс.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показано достоверное снижение концентрации аскорбиновой кислоты в гомогенате надпочечников крыс, подвергнутых действию стресса, по сравнению с контрольной группой животных.

2. Отмечено увеличение активности Na^+/K^+ -АТФазы в смешанной мембранной фракции коры больших полушарий и хвостатого тела головного мозга крыс, подвергнутых действию стресса, по сравнению с контрольной группой животных.

3. В группе животных, подвергнутых действию стресса и обработанных эзеринном, наблюдается достоверное увеличение активности фермента в коре больших полушарий и мозжечке головного мозга крыс.

4. Отмечается более высокая активность убаинчувствительных изоформ Na^+/K^+ -АТФазы в смешанной мембранной фракции различных отделов головного мозга крыс по сравнению с убаинрезистентной изоформой фермента.

5. Исследование магнийзависимых свойств фермента в смешанной мембранной фракции различных отделов головного мозга крыс не выявило изменений способности фермента к конформационной лабильности во всех группах животных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Болдырев А. А. Na^+, K^+ -АТФаза как олигомерный ансамбль // Биохимия, 2001. Т 66, №8. С. 1013-1025.
2. Болдырев А. А. Na/K -АТФаза–свойства и биологическая роль // Соросовский образовательный журнал, 1998. Т. 4. С. 1-8.
3. Болдырев А. А. Роль Na/K -насоса в возбудимых тканях (обзор) // Журнал Сибирского федерального университета. Биология, 2008. Т. 1. №. 3. С. 206-225.
4. Введение в биомембранологию / А. А. Болдырев, С. В. Котелевцев, М. Ланио [и др]. М.: Изд-во МГУ, 1990. 208 с.
5. Влияние модуляции активности Na^+/K^+ -АТФазы на жизнеспособность зернистых нейронов мозжечка при индукции окислительного стресса *in vitro* / Е. В. Стельмашук, Н. К. Исаев, Е. Е Генрихс [и др.] // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2018. Т.12.№4. С. 52–56.
6. Ганс С. Стресс без дистресса // М.: Прогресс. 1982. 125 с.
7. Гуреева Н. В. Аскорбиновая кислота как стресс-реализующий фактор и биотест в экологических исследованиях // Вестник Тюменского государственного университета. Экология и природопользование, 2011. №. 12. С. 56-61.
8. Идентификация белков, взаимодействие которых с Na, K -АТФазой активируется убаином / О. А. Акимова, Л. В. Капилевич, С. Н. Орлов [и др.] // Биохимия. 2016. Т. 81. № 9. С. 1269- 1279.
9. Киселёва Т. П. Общий адаптационный синдром // Академический журнал Западной Сибири, 2013. Т. 9. №. 5. С. 81-83.
10. Кривой И.И. Изоформ - специфические функции Na, K - АТФазы в скелетной мышце / Биофизика, 2016. Т. 61, № 5. С. 865- 878.
11. Кривой И.И. Функциональные взаимодействия Na, K -АТФазы с молекулярным окружением / Биофизика, 2014. Т. 59. №5. С. 871–882.

12. Лемина Е. Ю., Чурюканов В. В. Антихолинэстеразные средства: современная оценка // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2019. Т. 82. № 5. С. 40-44.
13. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985. Т. 1. 369 с.
14. Марри Р. Биохимия человека. М.: Мир, 1993. Т.2. 416 с.
15. Маслова М. Н., Климова В. К. Гипербария и стресс // Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 2012. Т. 48. № 5. С. 461-466.
16. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 15-е изд., перераб. и доп // М.: ООО "Издательство Новая Волна, 2005. Т.1. 1200 с.
17. О роли холинергической системы в стресс-реакции организма и депрессии / М. Х. Гайнутдинов, Д. М. Хакимова, Т.Б Калинникова [и др.] // Ульяновский медико-биологический журнал. 2019. № 1. С. 93-103.
18. Плескова С. Н., Крылов В. Н., Дерюгина А. В. Функциональные особенности планарных рафтов и кавеол в клеточной физиологии // Успехи современной биологии. 2015. Т. 135. № 6. С. 590-598.
19. Порядина Г.В. Стресс и патология: методическое пособие // под ред. проф. Г.В. Порядина. М.: РГМУ, 2009. – 23 с.
20. Сердечные гликозиды в противоопухолевой терапии / А.В Куликов, Е. А Слободкина, В. Г. Гогвадзе [и др.] // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. 2016. Т. 27, № 2. С. 47-55.
21. A specific and essential role for Na,K-ATPase $\alpha 3$ in neurons co-expressing $\alpha 1$ and $\alpha 3$ / G. Azarias, M. Kruusmägi, S. Connor [et al.] // Journal of Biological Chemistry. 2013. Vol. 288. № 4. P. 2734-2743. URL: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)46540-8/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)46540-8/abstract) (Дата обращения: 24.04.2021).
22. Afterhyperpolarization induced by the activation of nicotinic acetylcholine receptors in pelvic ganglion neurons of male rats / K.S. Park, S.K. Cha, M.J. Kim [et al.] // Neuroscience letters. 2010. Vol. 482. № 2. P. 167-171. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394010009274> (Дата обращения: 04.04.2021).

23. Aldosterone up-regulates mRNA for the $\alpha 3$ and $\beta 1$ isoforms of (Na, K)-ATPase in several brain regions from adrenalectomized rats / C. Grillo, G. Piroli, A. Lima [et al.] // Brain research. 1997. Vol. 767. №. 1. P. 120-127. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0006899397005416> (Дата обращения: 10.05.2021).
24. Anatomical and physiological evidence for D 1 and D 2 dopamine receptor colocalization in neostriatal neurons / O. Aizman, H. Brismar, P. Uhlen [et al.] // Nature neuroscience. 2000. Vol. 3. № 3. P. 226- 230. URL: https://www.nature.com/articles/nn0300_226 (Дата обращения: 24.04.2021).
25. Apell H. J., Hitzler T., Schreiber G. Modulation of the Na, K-ATPase by magnesium ions //Biochemistry. 2017. Т. 56. №. 7. P. 1005-1016.
26. Beggah A. T., Jaunin P., Geering K. Role of glycosylation and disulfide bond formation in the β subunit in the folding and functional expression of Na, K-ATPase //Journal of Biological Chemistry. 1997. Т. 272. №. 15. P. 10318-10326. URL: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)40888-5/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)40888-5/abstract) (Дата обращения: 10.05.2021).
27. Benarroch E. E. Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease //Neurology. 2010. Т. 74. №. 3. P. 259-264. URL: <https://n.neurology.org/content/74/3/259.short> (Дата обращения: 04.04.2021).
28. Binding of ouabain and marinobufagenin leads to different structural changes in Na/K-ATPase and depends on the enzyme conformation / E.A. Klimanova, I.Y. Petrushanko, V.A. Mitkevich [et al.] // FEBS letters. 2015. Vol. 589. № 19. P. 2668-2674.
29. Blanco G. Na, K-ATPase subunit heterogeneity as a mechanism for tissue-specific ion regulation //Seminars in nephrology. WB Saunders, 2005. Т. 25. №. 5. P. 292-303.
30. Blanco G., Mercer R. W. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function //American Journal of Physiology-Renal Physiology. 1998. Т. 275. №. 5. P. F633-F650. URL:

<https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633> (Дата обращения: 15.04.2021).

31. Blaustein M.P. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca^{2+} stores and cell responsiveness / M. P. Blaustein // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 1993. Vol. 264, № 6. P. 1367-1387.

32. Calcium oscillations triggered by cardiotonic steroids / J.M. Fontana, I. Burlaka, G. Khodus [et al.] // *The FEBS journal*. 2013. Vol. 280.№ 21. P. 5450-5455.

33. Cardiotonic steroids and the sodium trade balance: new insights into trade-off mechanisms mediated by the $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase / F. Khalaf, P. Dube, A. Mohamed [et al.] // *International journal of molecular sciences*. 2018. Vol. 19. № 9. P. 1-13.

34. Cardiotonic Steroids as Modulators of Neuro in flammation / A. M. Orellana, P. F. Kinoshita, J. A. Leite [et al.] // *Frontiers in endocrinology*. 2016. Vol.7. №10. P.1-10.

35. Catala, A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the «Fluid Mosaic Model» to the «Lipid Whisker Model» // *Biochimie*. 2011. Vol.94. №1. P.101-109.

36. Cell signaling associated with $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase: activation of phosphatidylinositide 3-kinase IA/Akt by ouabain is independent of Src / J. Wu, EE Akkuratov, Y Bai [et al.] // *Biochemistry*. 2013. Vol. 52. № 50. P. 9059-9067. URL: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi4011804> (Дата обращения: 17.05.2021).

37. Chronic nicotine modifies skeletal muscle Na^{+} , K^{+} -ATPase activity through its interaction with the nicotinic acetylcholine receptor and phospholemman/ A. V. Chibalin, J. A. Heiny, B Benziane [et al.] // *PLoS One*. 2012. T. 7. №.3.P.e33719.

38. Clausen M. V., Hilbers F., Poulsen H. The structure and function of the Na^{+} , K^{+} -ATPase isoforms in health and disease // *Frontiers in physiology*. 2017. T. 8. P. 371.

39. Cornelius F., Turner N., Christensen H. R. Z. Modulation of Na, K-ATPase by phospholipids and cholesterol. II. Steady-state and presteady-state kinetics // *Biochemistry*. 2003. T. 42. №. 28. P. 8541-8549.
40. Crystal structure of a Na⁺-bound Na⁺, K⁺-ATPase preceding the E1P state / R. Kanai, H. Ogawa, B. Vilsen [et al.] // *Nature*. 2013. Vol. 502. № 7470. P. 201-206.
41. Crystal structure of the high-affinity Na⁺,K⁺-ATPase–ouabain complex with Mg²⁺ bound in the cation binding site. / M. Laursen, L. Yatime, P. Nissen [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. Vol. 110. № 27. P. 10958-10963.
42. El-Mallakh R. S., Brar K. S., Yeruva R. R. Cardiac Glycosides in Human Physiology and Disease: Update for Entomologists // *Insects*. 2019. Vol. 10. № 4. P. 102-113.
43. FXYP1 phosphorylation in vitro and in adult rat cardiac myocytes: threonine 69 is a novel substrate for protein kinase C / W. Fuller, J. Howie, L.M. McLatchie [et al.] // *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2009. Vol. 296. № 6. P. 1346-1355. URL: <https://journals.physiology.org/doi/full/10.1152/ajpcell.00523.2008> (Дата обращения: 20.04.2021).
44. General and specific lipid–protein interactions in Na, K-ATPase / F. Cornelius, M. Habeck, R. Kanai [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 2015. Vol. 1848. № 9. P. 1729-1743.
45. Heterogeneity of signal transduction by Na-K-ATPase α -isoforms: role of Src interaction / H. Yu, X. Cui, J. Zhang [et al.] // *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2018. T. 314. №. 2. P. C202-C210.
46. Higley M. J., Picciotto M. R. Neuromodulation by acetylcholine: examples from schizophrenia and depression // *Current opinion in neurobiology*. – 2014. T. 29. P. 88-95.
47. In vivo effects of neostigmine and Physostigmine on neutrophil functions and evaluation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase as

inflammatory markers during experimental sepsis in rats / D. I Bitzinger, M. Gruber, S. Tümmler [et al.] // Mediators of inflammation. 2019. Т. 2019, P 1-12.

48. Kirley, T.L. Determination of three disulfide bonds and one free sulfhydryl in the beta subunit of (Na, K)-ATPase // Journal of Biological Chemistry. 1989. Vol. 264. № 13. P. 7185-7192.

49. Lingwood D., Simons K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle // Science. 2010. Т. 327. №. 5961. P. 46-50. URL: <https://science.sciencemag.org/content/327/5961/46.abstract> (Дата обращения: 17.04.2021).

50. Mallick B. N., Adya H. V. A., Faisal M. Norepinephrine-Stimulated Increase in Na⁺, K⁺-ATPase Activity in the Rat Brain Is Mediated Through α 1A-Adrenoceptor Possibly by Dephosphorylation of the Enzyme // Journal of neurochemistry. 2000. Т.74.№.4. P. 1574-1578.

51. Mallick B. N., Singh S., Singh A. Mechanism of noradrenaline-induced stimulation of Na–K ATPase activity in the rat brain: implications on REM sleep deprivation-induced increase in brain excitability // Molecular and cellular biochemistry. 2010. Т. 336. №. 1. P. 3-16.

52. Na, K-ATPase activity regulates AMPA receptor turnover through proteasome-mediated proteolysis / D. Zhang, Q. Hou, M. Wang [et al.] // Journal of Neuroscience. 2009. Vol. 29. № 14. P. 4498-4511.

53. Na,K-ATPase α 4 isoform is essential for sperm fertility / T. Jimenez, J.P. McDermott, G. Sanchez [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2011. Vol. 108. № 2. P. 644-649.

54. Nature as a source of drugs for ophthalmology / G. K. L. D. O. Pinheiro, I. D. Araújo, A. C. M. Rêgo [et al.] // Arquivos brasileiros de oftalmologia. 2018. Т. 81. P. 443-454.

55. N-terminal sequence targets and tethers Na⁺ pump α 2 subunits to specialized plasma membrane microdomains / H. Song, M.Y Lee, S.P Kinsey [et al.] // Journal of Biological Chemistry. 2006. Vol. № 18. P. 12929-12940.

56. Ouabain targets the Na⁺/K⁺-ATPase α 3 isoform to inhibit cancer cell proliferation and induce apoptosis. / Y. Xiao, C. Meng, J. Lin [et al.] // *Oncology letters*. 2017. Vol. 14. № 6. P. 6678-6684. URL: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2017.7070?text=fulltext> (Дата обращения: 21.05.2021).
57. Phosphorylation of the Na⁺, K⁺-ATPase and the H⁺, K⁺-ATPase / H. Poulsen, P. Morth, J. Egebjerg [et al.] // *FEBS letters*. 2010. Vol. 584. № 12. P. 2589-2595.
58. Picciotto M. R., Higley M. J., Mineur Y. S. Acetylcholine as a neuromodulator: cholinergic signaling shapes nervous system function and behavior // *Neuron*. 2012. T. 76. №. 1. P. 116-129. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627312008021> (Дата обращения: 10.04.2021).
59. Pivovarov A. S., Calahorra F., Walker R. J. Na⁺/K⁺-pump and neurotransmitter membrane receptors // *Invertebrate Neuroscience*. 2019. T. 19. №. 1. P. 1-16. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10158-018-0221-7> (Дата обращения: 21.05.2021).
60. Proudfoot A. The early toxicology of physostigmine // *Toxicological reviews*. 2006. T. 25. №. 2. P. 99-138.
61. Reevaluation and update on efficacy and safety of neostigmine for reversal of neuromuscular blockade / J. Luo, S. Chen, S. Min [et al.] // *Therapeutics and clinical risk management*. 2018. T. 14. P. 2397.
62. Regulation of intracellular cholesterol distribution by Na/K-ATPase / Y. Chen, T. Cai, H. Wang [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. 2009. Vol. 284. № 22. P. 14881-14890.
63. Regulation of Na-K-ATPase gene expression by aldosterone in vascular smooth muscle cells / A. Oguchi, U. Ikeda, T. Kanbe [et al.] // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1993. Vol. 265. № 4. P. 1167-1172.
64. REM sleep deprivation-induced noradrenaline stimulates neuronal and inhibits glial Na-K ATPase in rat brain: in vivo and in vitro studies / G. Baskey, A.

Singh, R. Sharma [et al.] // *Neurochemistry international*. 2009. Vol. 54. № 1. P. 65-71.

65. Retamales-Ortega R., Vio C. P., Inestrosa N. C. P2C-type ATPases and their regulation // *Molecular neurobiology*. 2016. T. 53. №. 2. P. 1343-1354.

66. Role of protein kinase C in phospholemman mediated regulation of $\alpha 2\beta 1$ isozyme of Na^+/K^+ -ATPase in caveolae of pulmonary artery smooth muscle cells / K. Dey, S Roy, B Ghosh [et al.] // *Biochimie*. 2012. Vol. 94, № 4. P. 991-1000.

67. Schmalzing G., Gloor S. Na^+/K^+ -pump beta subunits: Structure and functions // *Cellular Physiology and Biochemistry*. 1994. T. 4. №. 3-4. P. 96-114.

68. Skou, J.C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves // *Biochimica et biophysica acta*. 1957. Vol. 23. P. 394-401.

69. Sowa, G. Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights // *Frontiers in physiology*. 2012. Vol. 2. P. 1-13.

70. Srikanthan K., Shapiro J. I., Sodhi K. The role of Na/K -ATPase signaling in oxidative stress related to obesity and cardiovascular disease // *Molecules*. 2016. T. 21. №. 9. P. 1-13. URL: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/9/1172> (Дата обращения: 29.04.2021).

71. Stimulatory role of calcium in rapid eye movement sleep deprivation–induced noradrenaline-mediated increase in Na - K -ATPase activity in rat brain / G. Das, A. Gopalakrishnan, M. Faisal [et al.] // *Neuroscience*. 2008. T. 155. №. 1. P. 76-89.

72. Subunit isoform selectivity in assembly of Na , K -ATPase α - β heterodimers / E. Tokhtaeva, R.J. Clifford, J.H. Kaplan [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. 2012. Vol. 287. № 31. P. 26115-26125. URL: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)73622-7/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)73622-7/abstract) (Дата обращения: 25.05.2021).

73. The nicotinic acetylcholine receptor and the Na , K -ATPase $\alpha 2$ isoform interact to regulate membrane electrogenesis in skeletal muscle / J. A. Heiny, V. V.

Kravtsova, F. Mandel [et al.] // Journal of Biological Chemistry. 2010. Vol. 285. №. 37. P. 28614-28626. URL: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)52713-0/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)52713-0/abstract) (Дата обращения: 16.05.2021).

74. The cellular Na⁺ pump as a site of action for carbon monoxide and glutamate: a mechanism for long-term modulation of cellular activity / J.A. Nathanson, C. Scavone, C. Scanlon [et al.] // Neuron. 1995. Vol. 14. № 4. P. 781-794.

75. The effect of endothelin-1 on Src-family tyrosine kinases and Na, K-ATPase activity in porcine lens epithelium / A. Mandal, M. Shahidullah, C. Beimgraben [et al.] // Journal of cellular physiology. 2011. Vol. 226. № 10. P. 2555-2561.

76. The gamma subunit of the Na, K-ATPase induces cation channel activity / N. T. Minor, Q. Sha, C. G. Nichols [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1998. – Т. 95. – №. 11. – С. 6521-6525.

77. Toxic cardenolides: chemical ecology and coevolution of specialized plant–herbivore interactions / A.A. Agrawal, G. Petschenka, R.A. Bingham [et al.] // New Phytologist. 2012. Vol. 194. № 1. P. 28-45.

78. Tsakiris S., Kontopoulos A. N. Time changes in Na⁺, K⁺-ATPase, Mg⁺⁺-ATPase, and acetylcholinesterase activities in the rat cerebrum and cerebellum caused by stress // Pharmacology Biochemistry and Behavior. 1993. Т. 44. №. 2. P. 339-342.

79. α -Adrenergic effects on Na⁺-K⁺ pump current in guinea-pig ventricular myocytes / Y. Wang, J. Gao, R.T. Mathias [et al.] // The Journal of physiology. 1998. Vol. 509. № 1. P. 117-128.