

DOI: 10.12731/wsd-2017-4-2-150-166

УДК 612.015.12: 612.111

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ИССЛЕДОВАНИЯ АКТИВНОСТИ Mg^{2+} -ЗАВИСИМОЙ Na^+/K^+ -АКТИВИРУЕМОЙ АТФАЗЫ В ТЕНЯХ ЭРИТРОЦИТОВ

Петрова П.А.

В настоящем обзоре рассматриваются методические причины широкого диапазона значений активности Mg^{2+} -зависимой Na^+/K^+ -активируемой АТФазы теней эритроцитов, которые описываются у различных авторов. Установлено, что получаемые исследователями различия в показаниях активности фермента обусловлены методическими особенностями, связанными со способом получения Na^+/K^+ -АТФазы и измерением ее активности, такими как особенности выделения и хранения теней эритроцитов (режим центрифугирования, концентрация и состав лизирующего раствора, время и температура гемолиза и замораживания), а также особенностями методов количественного определения белка и неорганического фосфора. На основании проведенного анализа данных литературы мы полагаем, что для наиболее точного определения активности Na^+/K^+ -АТФазы рекомендуется использовать лизирующий буферный раствор с применением хелатора и методы Фиске-Суббароу и Лоури для определения неорганического фосфора и количественного содержания белка соответственно.

Ключевые слова: сравнительный анализ; тени эритроцитов.

THE COMPARATIVE ANALYSIS OF THE ACTIVITY ASSAY METHODS FOR Mg^{2+} -DEPENDENT Na^+/K^+ -ACTIVATED ATPASE IN ERYTHROCYTE MEMBRANES

Petrova P.A.

This review considers the methodological reasons for the wide range of results for the red blood cells Mg^{2+} -dependent Na^+/K^+ -ATPase activity described

by different authors. We assert that the differences in the Na^+/K^+ -ATPase activity obtained by the researchers are due to the methodological peculiarities associated with methods of obtaining and measurement of the enzyme activity, such as red blood cells separation and storage (centrifugation, concentration and composition of the lysing solution, time and temperature of hemolysis and freezing), as well as the peculiarities of methods for the quantitative determination of protein and inorganic phosphorus. On the basis of the literature data analysis we recommend that for the most accurate determination of the Na^+/K^+ -ATPase activity it is better to use the chelator in the lysing buffer solution and Fiske-Subbarow and Lowry methods for the determination of inorganic phosphorus and quantitative protein content, respectively.

Keywords: comparative analysis; erythrocyte membranes.

Mg^{2+} -зависимая Na^+/K^+ -активируемая АТФаза является интегральным олигомерным белком мембраны клеток тканей животных и поддерживает ассиметричное распределение ионов Na^+ и K^+ внутри и вне клетки [1]. Na^+/K^+ -АТФаза контролирует такие процессы в клетках, как поддержание объема клетки, уровня pH и Ca^{2+} , мембранного потенциала. Модулируя уровень Ca^{2+} и мембранный потенциал в нервных и мышечных клетках, данная ферментативная система регулирует выброс и поглощение нейромедиаторов, эффективность сокращения мышц, проведение нервного импульса [2, с. 21].

Активность Na^+/K^+ -АТФазы у человека измеряется преимущественно в эритроцитах (гемолизаты или мембраны эритроцитов) и в мышцах [3, 4, 5, 6, 7]. У животных активность фермента определяется в гомогенатах ткани почек, головного мозга, мышц, сердца, в гемолизатах и мембранах эритроцитов [8, 9, 10, 11, 12, 13]. Выбор эритроцитов в качестве объекта исследования обусловлен тем, что структура их мембраны отражает общие принципы молекулярной организации плазматических мембран различных тканей [14]. Для человека, мембраны (тени) эритроцитов – это более универсальный объект исследования активности фермента, чем мышечная ткань, поскольку при этом не требуется взятия биопсии. О необходимости стандартизации методов, применяемых для определения активности Na^+/K^+ -АТФазы в эритроцитах, свидетельствуют следующие авторы [9, 15, 16]. Установлено, что в мембранных препаратах эритроцитов активность Na^+/K^+ -АТФазы, по данным различных исследований, колеблется в широких пределах, например, для эритроцитов человека активность фермента варьирует от 0,05 до 0,35 мкмоль/ч на мг белка [9, 15, 16].

В данном обзоре подробно рассмотрены этапы исследования, необходимые для определения активности Na^+/K^+ -АТФазы в мембранных препаратах эритроцитов, описаны различные методы определения ее активности, рассматриваются причины вариаций в показаниях активности по данным других исследователей.

Цель. Сравнить методы определения активности Mg^{2+} -зависимой Na^+/K^+ -активируемой АТФазы тений эритроцитов, а также выявить факторы и условия, влияющие на определение активности данного фермента.

Задачи настоящей работы:

1. Охарактеризовать способ получения мембран эритроцитов.
2. Сравнить методы определения количественного содержания белка в мембранах эритроцитов.
3. Рассмотреть и охарактеризовать методы определения активности Mg^{2+} -зависимой Na^+/K^+ -активируемой АТФазы в мембранах эритроцитов.

Определение активности Na^+/K^+ -АТФазы мембранных препаратов эритроцитов включает четыре этапа:

1 этап – выделение тений эритроцитов и их хранение. Активность Na^+/K^+ -АТФазы измеряется, в основном, в суспензии тений эритроцитов, а не в гемолизатах крови. Что связано с более высокой степенью очистки белка при получении тений, необходимой для точного измерения активности фермента [7, 9, 17].

Основным методом получения тений эритроцитов является метод Доджа и др. (1963), кроме которого существуют другие методы получения тений, также основанные на гипоосмотическом гемолизе эритроцитов [18, 19, 20].

По данным литературы, в результате использовании метода Доджа и др. наблюдается наиболее высокая степень очистки мембран эритроцитов, без лишнего содержания гемоглобина в препарате, что может быть связано с выбором лизирующего буферного раствора, времени и режима центрифугирования, а также с добавлением детергента или хелатора в разных концентрациях [17]. Например, Лимбирд и соавт. (1980) используют трисНСI-буфер, в отличие от метода Доджа и др., уменьшают время (до 5 мин) и режим центрифугирования (19000 g), вместо 40 мин при 20000 g соответственно [18, 20].

Исследователи вносят свои модификации в метод Доджа в соответствии с различными условиями эксперимента [9]. В модификации Казенова и соавт. (1984) один объем отмытых эритроцитов смешивают с 20 объемами охлажденной до 4°C гемолизирующей среды (10 мМ трис-НСI

буферный раствор, содержащий 1–1,5 мМ этилендиаминтетрауксусную кислоту (ЭДТА) в качестве хелатора) [9, 21, 22]. В дальнейшем, пробы выдерживают 5 мин при 4⁰С во избежание полного разрыва мембран и замыкания их в везикулярные структуры, которые в силу низкой проницаемости для АТФ и уабаина (ингибитора Na⁺/K⁺-АТФазы) препятствуют их свободному подходу к соответствующим центрам фермента [9]. В качестве гемолизирующей среды некоторыми исследователями используется вода [10, 20].

После лизиса эритроцитов надосадочную жидкость удаляют, а осадок теней эритроцитов промывают буферным раствором до исчезновения розового оттенка [9, 17].

Таким образом, на основании данных литературы можно предположить, что для повышения чистоты мембран эритроцитов предпочтительнее выбирать более длительный режим центрифугирования, использовать хелатор в составе гемолизирующей среды, а также тщательно соблюдать процедуру гемолиза.

Ключевая роль в сохранении целостности мембран клеток принадлежит времени и температуре хранения. По данным литературы тени эритроцитов можно хранить при температуре -30⁰С в течение 2 месяцев при использовании 40% раствора глицерина для сохранения состава фосфолипидов на уровне близком к исходному при скорости замораживания 10⁰/мин, предотвращая агрегацию мембранных белков, а также при 4⁰С, но не более 7–10 дней [10, 23]. Также показано, что хранение мембран эритроцитов в зоне умеренно низких температур (от -30⁰С до -70⁰С) в течение 3 месяцев приводит к формированию в плазматических мембранах трансмембранных дефектов разной величины, которые могут оказывать влияние на активность исследуемого фермента [23].

Учитывая, что хранение теней эритроцитов в течение длительного периода времени требует использования криопротектора (раствор глицерина), а хранение без них может способствовать формированию областей повреждения в тенях эритроцитов, более целесообразно определять активность фермента непосредственно после получения теней [9].

2 этап – измерение количества белка в пробе мембранного препарата эритроцитов. К наиболее распространенным методам исследования концентрации белка относятся методы Бредфорд, Седмака и Лоури [24, 25, 26]. Метод Лоури сочетает биуретовую реакцию и реакцию с реактивом Фолина, главным недостатком которого является то, что многие соединения, наиболее часто используемые в буферных растворах для приготовления

ния белкового препарата (детергенты, углеводы, глицерин, трицин, ЭДТА, трис) препятствуют анализу и влияют на развитие окраски [27].

В основе методов Бредфорд и Седмака лежит принцип связывания сульфогрупп красителя Кумасси G-250 с аминогруппами остатков аргинина и гидрофобных аминокислот, при этом значительное количество красителя адсорбируется на стенках кювет, что также влияет на точность результатов измерений [28, с. 155]. Возможно, по этой причине данные методы не рекомендуют применять при расчете активности АТФаз.

3 этап – инкубация мембран эритроцитов.

Образец суспензии теней эритроцитов (аналогично инкубируют плазматические мембраны других клеток) вносят в среду, содержащую 30 мМ (50 мМ) трис-НСI буфер, ионы в различной концентрации (например, NaCl – 100 мМ, KCl – 10 мМ, MgCl₂ – 2-6 мМ), а также АТФ 2–3 мМ и ЭДТА 0,1-1 мМ (рН=7,0 (7,4) при 37°C) [9, 29, 30, 31]. По данным Казенова и соавт. наиболее высокую активность Na⁺/K⁺-АТФаза показывает при концентрации ЭДТА в инкубационной среде – 1 мМ [9].

Активность Na⁺/K⁺-АТФазы может существенно зависеть от рН среды. Можно предположить, что предпочтительнее использовать инкубационную среду с рН=7,4, так как оптимум активности Na⁺/K⁺-АТФазы находится в области рН=7,5 [32].

Инкубацию фермента проводят при температуре 37°C (44°C) в течение 15 мин – 2 часов, реакцию останавливают добавлением раствора 20%-ной трихлоруксусной кислоты, осаждение белков осуществляют путем центрифугирования при 3500 об/мин в течение 10 мин, супернатант суспензии теней используют для определения ферментативной активности [9, 29, 33, 34, 35].

4 этап – определение активности Na⁺/K⁺-АТФазы. Определение АТФазной активности измеряют по простоте неорганического фосфора, с использованием преимущественно спектрофотометрических методов детекции. Суть данных методов заключается в образовании фосфорномолибденовой кислоты с ее последующим восстановлением аскорбиновой кислотой, хлоридом олова, эйконогеном и т.д. в молибденовую синь, количество которой пропорционально исходному содержанию фосфора [36, 37, 38, 39, 40]. В некоторых случаях для определения активности АТФазы мембраны клеток предварительно стандартизируют по фиксированным аликвотам белка в каждой пробе (50 мкг/мл – 2,07 мг/мл), приводя, таким образом, расчетную формулу активности фермента каждого испытуемого к общему знаменателю [5, 41].

Активность Na^+/K^+ -АТФазы определяют по разнице показателей неорганического фосфора в пробах с убаином (от 0,2 мМ до 10^{-4} мМ) и без него [9, 29, 42]. Убаин – сердечный гликозид растительного происхождения, ингибитор Na^+/K^+ -АТФазы. Сердечные гликозиды, подавляя активность Na^+/K^+ -АТФазы и Na^+ -насоса, образуют с ферментом прочный комплекс, действие сердечных гликозидов проявляется только тогда, когда они находятся с наружной стороны мембраны [43]. По этой причине так важен этап получения теней эритроцитов и следование четким указаниям по проведению гемолиза, во избежание замыкания теней в везикулярные структуры, когда действие ингибитора становится невозможным. Активность Na^+/K^+ -АТФазы рассчитывают по разнице между общей АТФазной активностью и активностью Mg^{2+} -АТФазы в присутствии ингибитора Na^+/K^+ -АТФазы и выражают в мкмоль/ч или нмоль/ч неорганического фосфора на мг белка [9].

К недостаткам используемых спектрофотометрических методов определения неорганического фосфора можно отнести: нестабильность окраски молибденовой сини, низкую дифференциальную точность определения фосфатов, гидролиз лабильных фосфорных соединений, катализируемый молибдатом в водной кислотной среде, особенно интенсивно протекающий при нагревании проб с восстановителем [44, 45].

Среди методов определения неорганического фосфора можно выделить:

1. Определение неорганического фосфора с применением малахитового зеленого, основанное на образовании окрашенного комплекса между малахитовым зеленым, молибдатом аммония и ортофосфатом [36, 46]. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству неорганического фосфора [47, 48, 49, 50]. Достоинством метода является то, что белок не мешает проведению реакции, поэтому депротеинизацию не проводят, однако для обеспечения коллоидной устойчивости образовавшегося комплекса в раствор добавляется твин 20 или тритон X100 [36, 46]. Минимальное количество определяемого фосфора – 0,05 мкг/мл [51].

2. Определение неорганического фосфора с использованием эйконогена (1-амино-2-нафтол-4-сульфоновая кислота) в качестве восстановителя (метод Фиске-Суббароу) [37]. Установлено, что наименьшее количество определяемого фосфора соответствует – 0,3 мкг/мл [38].

3. Определение неорганического фосфора с использованием аскорбиновой кислоты в качестве восстановителя (метод Чена), являющийся модификацией метода Фиске-Суббароу [39, 40, 52, 53]. Чувствительность

метода выше метода Фиске-Суббароу примерно в 8 раз и составляет около 0,038 мкг/мл [39]. Недостатком метода является нестабильность аскорбиновой кислоты, способной восстанавливать молибденовую кислоту и в отсутствие фосфора [54].

4. Определение неорганического фосфора с использованием хлорида олова в качестве восстановителя [32, 40, 55]. Используя в качестве восстановителя хлорид олова можно определить 0,07 мкг/мл неорганического фосфора, что в 4 раза чувствительнее метода Фиске-Суббароу [38].

Кроме того, установлено, что аскорбиновая кислота является более мягким восстановителем, чем хлорид олова, что предотвращает восстановление молибдена из избытка молибдата аммония, тогда как достоинство хлорида олова как восстановителя – быстрая кинетика восстановления [56].

Таким образом, возможно, самым удобным и приемлемым способом определения неорганического фосфора является метод Фиске-Суббароу, т.к. он менее чувствителен к температуре окружающей среды и pH и больше подходит для биологических образцов [54].

На основании данных литературы можно сделать заключение о том, что для определения активности Na^+/K^+ -АТФазы теней эритроцитов целесообразнее использовать лизирующий буферный раствор с применением хелатора, метод Лоури и метод Фиске-Суббароу для определения содержания белка и неорганического фосфора соответственно, а также в некоторых случаях стандартизировать пробы по количеству белка, тщательно соблюдая температурный режим.

Список литературы

1. Болдырев А.А. Роль Na/K -насоса в возбудимых тканях // Журнал Сибирского федерального университета. Биология. 2008. Т.3. №1. С. 206–225.
2. Мосягин В.В. Влияние возраста и физиологического состояния на активность ферментных систем клеток, тканей и органов животных: Дис. ... д-ра биол. наук. Москва, 2011, 261 с.
3. Muscle Na/K -ATPase activity and isoform adaptations to intense interval exercise and training in well-trained athletes / Aughey R.J., Murphy K.T., Clark S.A., Garnham A.P., Snow R.J., Cameron-Smith D., Hawley J.A., McKenna M.J. // J. Appl. Physiol., 2007, vol. 103, no. 1, pp. 39–47.
4. Chronic intermittent hypoxia and incremental cycling exercise independently depress muscle in vitro maximal Na/K -ATPase activity in well-trained athletes / Aughey R.J., Gore C.J., Hahn A.G., Garnham A.P., Clark S.A., Petersen A.C., Roberts A.D., McKenna M.J. // J. Appl. Physiol., 2005, vol. 98, no. 1, pp. 186–192.

5. Decreased Erythrocyte Na/K-ATPase Activity and Increased Plasma TBARS in Prehypertensive Patients / Malfatti C.R., Burgos L.T., Rieger A., Rudger C.L., Turmina J.A., Pereira R.A., Pavlak J.L., Silva L.A., Osiecki R. // *Scientific World Journal*, 2012.
6. Hypothesis: low Na/K-ATPase activity in the red cell membrane, a potential marker of the predisposition to diabetic neuropathy / Raccach D., Gallice P., Pouget J., Vague P. // *Diabete Metab.*, 1992, vol.3, pp. 236–241.
7. Якушева И.А., Орлова Л.И. Метод определения активности аденозинтрифосфатаз в гемолизатах эритроцитов крови человека // *Лабораторное дело*. №8. 1970. С. 497–501.
8. Boldyrev A., Bulygina E., Carpenter D., Schoner W. Glutamate receptors communicate with Na/K-ATPase in rat cerebellum granule cells: demonstration of differences in the action of several metabotropic and ionotropic glutamate agonists on intracellular reactive oxygen species and the sodium pump / *J. Molec. Neurochem.* // 2003, vol. 21, no. 3, pp. 213–222.
9. Казенов 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.
10. Лишко В.К., Малышева М.К., Гревизирская Т.И. Изучение взаимодействия Na/K-АТФазы мембран и теней эритроцитов с оубаином // *Биохимия*. 1974. Т.39. № 1. С. 60–66.
11. Establishment of a Rabbit Model of Chronic Obstructive Sleep Apnea and Application in Cardiovascular Consequences / Xu L.F., Zhou X.F., Hu K., Tang S., Luo Y.C., Lu W. // *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2017, vol. 130, no. 4, pp. 452–459.
12. Tong Z., Yu F., Liu Z., Liang H. Influence of ShuJinHuoXue tablets on ischemia reperfusion injury of animals' skeletal muscle / *Molecules* // 2012, vol. 17, no. 7, pp. 8494–8505.
13. Mineralocorticoids modulate the expression of the beta-3 subunit of the Na/K-ATPase in the renal collecting duct / Rojas M., Diaz P., León P., González A.A., González M., Barrientos V., Pestov N.B., Alzamora R., Michea L. // *Channels (Austin)*, 2017.
14. Боровская М.К., Кузнецова Э.Э., Горохова В.Г., Корякина Л.Б., Курильская Т.Е. Пивоваров Ю.И. Структурно-функциональная характеристика мембраны эритроцита и ее изменения при патологии при патологии разного генеза // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. 2010. № 3. Вып. 73. С. 334–354.
15. Standardized method for the determination of human erythrocyte membrane adenosine triphosphatases / Reinila M., MacDonald E., Salem N.Jr., Linnoila M., Trams E.G. // *Anal. Biochem.*, 1982, vol.124, Issue 1, pp. 19–26.

16. Charalambous B.M., Mir M.A. An improved procedure for the preparation and measurement of Na/K-ATPase in human erythrocytes / *Biochim. Biophys. Acta* // 1982, vol.691, no. 1, pp. 71–82.
17. Воейков В.Л, Виленская Н.Д., Лукашев М.Е., Гуревич В.В. Выделение мембран ретикулоцитов крыс, содержащих регулируемые гуаниловыми нуклеотидами аденилатциклазу и β -адренергические рецепторы // *Биоорганическая химия*. 1982. Т.8. № 4. С. 524–532.
18. Dodge J., Mitchell C., Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes // *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, vol.100, № 1, pp. 119–130.
19. Bilezikian J.P., Spiegel A.M., Brown E.M., Aurbach G.D. Identification and persistence of 6-adrenergic receptors during maturation of the rat reticulocyte / *Mol. Pharmacol.* // 1977, vol. 13, no. 5, pp. 775–785.
20. Loss of Beta-Adrenergic Receptor-Guanine Nucleotide Regulatory Protein Interactions Accompanies Decline in Catecholamine Responsiveness of Adenylate Cyclase in Maturing Rat Erythrocytes / *Limbird L.E., Gill M., Stadel J.M. Hickey A.R., Lefkowitz R.J.* // *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, no. 5, pp. 1854–1861.
21. Медведева И.А. Динамика и механизм изменения активности Na/K-АТФазы эритроцитов крыс в условиях стресса: Автореферат дис. ... к-та биол. наук. Ростов-на-Дону, 1993, 24 с.
22. Осмотическая резистентность эритроцитов крыс и концентрация тиоловых групп белков их мембраны зависят от длительности умеренной гипотермии / Аль-Рабии М.А.М., Чалабов Ш.И., Астаева М.Д., Кличханов Н.К. // *Современные проблемы науки и образования*. 2015. Выпуск № 3. 539 с.
23. Кукушкин А.И. Исследование структурно-функциональных характеристик мембран эритроцитов при замораживании до умеренно низких температур (-30/-70 градусов С): Автореферат дисс. ... кандидата биологических наук. Харьков. 1992. 19 с.
24. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding // *Anal. Biochem.*, 1976, vol.72, № 1-2, pp. 248–254.
25. Sedmak J.J., Grossberg S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250 // *Anal. Biochem.*, 1977, vol. 97, pp. 544–552.
26. Lowry O.H., Roberts N.R., Leiner K.Y., Wu M.L., Farr A.L., Albers R.W. The quantitative histochemistry of brain. Iii. Ammon's Horn. // *J. Biol. Chem.*, 1954, vol. 207, № 1, pp. 39–49.

27. Olson B., Markwell J. Assays for determination of protein concentration // *Curr. Protoc. Protein Sci.*, 2007.
28. Сравнительный анализ спектрофотометрических методик определения массовой доли белка в образцах пектиновых полисахаридов / Пономарева С.А. Головченко В.В. Патова О.А, Ванчикова Е.В. Оводов Ю. // *Биоорганическая химия*. 2015. Т.41. №2. С. 154–161.
29. Кыров Д.Н. Исследование модулирующих эффектов гемолизата эритроцитов на активность Na/K-АТФазы: Автореферат дис. ... к-та биол. наук. Тюмень, 2006. 21 с.
30. Писарева Л.Н. Парфенова Е.В. Влияние исходного состояния мембранного препарата активности Na/K-АТФазы на взаимодействие с гистонами. В сб. *Биофизика мембран*. 1973. С. 514–517.
31. Ташкин В.Ю. Конкурентный транспорт ионов в цитоплазматическом канале доступа Na/K-АТФазы: Автореферат дис. ... кандидата биол. наук. Москва, 2014. 26 с.
32. Казенов А.М. Маслова М.Н. Особенности активации детергентами Na/K-аденозинтрифосфатазы головного мозга позвоночных // *Журнал эволюционной физиологии и биохимии*. 1980. Т.14. №5. С. 430–435.
33. Alterations in erythrocyte membrane fluidity and Na/K-ATPase activity in chronic alcoholics / Maturu P., Vaddi D.R., Pannuru P., Nallanchakravarthula V. // *Mol. Cell. Biochem.*, 2010, pp. 35–42.
34. Василенко Т.Ф. Влияние поверхностно-активных веществ на аденозинтрифосфатазную активность и 180-обменные свойства Na/K-АТФазы: Дис. ... к-та биол. наук. Ленинград, 1980, 146 с.
35. Hanahan D.J., Ekholm J.E. The expression of optimum ATPase activities in human erythrocytes. A comparison of different lytic procedures / *Arch. Biochem. Biophys.* // 1978, vol. 187, no. 1, pp. 170–179.
36. Байков А.А., Evtushenko A.A., Avaeva S.M. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay // *Anal. Biochem.*, 1988, vol. 171, pp. 266–270.
37. Fiske C.H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus // *J. Biol. Chem.*, 1925, vol. 66, pp. 373–400.
38. Владимиров Г.Е., Мишенева В.С. Определение фосфорных соединений в очень малых количествах нервной ткани // *Труды института физиологии им. И.П. Павлова*. 1956. Т.5. С. 416–424.
39. Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. Microdetermination of phosphorus // *Anal. Chem.*, 1956, vol. 28, pp. 1756–1758.
40. Болотов М.П. Каретников П.В. Фотоколориметрическое определение минерального фосфора // *Лабораторное дело*. 1965. №1. С. 30–33.

41. Bartolommei G, Moncelli MR, Tadini-Buoninsegni F. A method to measure hydrolytic activity of adenosinetriphosphatases (ATPases) // *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 3.
42. Федорова Е.Ю., Максимов В.И. Влияние ингибитора и ионов электролитов на активность АТФаз молока коров черно-пестрой породы // *Известия Оренбургского государственного аграрного университета*. 2013. № 44. С. 231–232.
43. Николаев А.Я. Биологическая химия. Москва: Медицинское информационное агентство, 2004. 566 с.
44. Виноградов А.П. Аналитическая химия фосфора. Москва: Наука, 1974. 219 с.
45. Петрунькина А.М. Практическая биохимия. Ленинград: Биомедгиз. 3 издание переработанное, 1961, 298 с.
46. Kodama T., Fukui K., Kometani K. The initial phosphate burst in ATP hydrolysis by myosin and subfragment-1 as studied by a modified malachite green method for determination of inorganic phosphate // *J. Biochem.*, 1986, vol. 99, no.5, pp. 1465–1472.
47. Muszbek L., Szabó T., Fésüs L. A high sensitive method for the measurement of ATPase activity // *Anal. Biochem.*, 1977, vol. 77, no. 1, pp. 286–288.
48. Queiroz-Claret C., Meunier J.C. Staining technique for phosphatases in polyacrylamide gels // *Anal. Biochem.*, 1993, vol. 209, no. 2, pp. 228–231.
49. Geladopoulos T.P., Sotiroudis T.G., Evangelopoulos A.E. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity // *Anal. Biochem.*, 1991, vol.192, no.1, pp. 112–116.
50. Simultaneous assay of Ca-ATPase and Na/K-ATPase activities of osteoblast rat by malachite greencolorimetic method / Cen X., Huang Y., Wang R., Chen Z., Wu Z. // *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 1998, vol. 29, no. 4, pp. 427–430.
51. Itaya K, Ui M. A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate / *Clin. Chim. Acta* // 1966, vol.14, no. 3, pp. 361–366.
52. Sompong W., Cheng H., Adisakwattana S. Protective effects of ferulic acid on high glucose-induced protein glycation, lipid peroxidation, and membrane ion pump activity in human erythrocytes // *PLoS One*, 2015, vol. 10, no.6.
53. Protein measurement with the folin phenol reagent / Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. // *J. Biol. Chem.*, 1951, vol.193, pp. 265–270.
54. Тимин О.А., Климентьева Т.К., Серебров В.Ю., Жаворонок Т.В., Кузьменко Д.И., Удинцев С.Н. Биохимические методы исследования в клинико-диагностических лабораториях: практическое пособие. Томск: STT, 2002. 244 с. URL: <http://biokhimija.ru/mineraly/fosfor> (дата обращения: 1.07.2017).
55. Kuttner T., H.R. Cohen. Micro colorimetric studies // *J. Biol. Chem.*, 1927, vol. 75, pp. 517–531.

56. Басова Е.М., Иванов В.М. Спектрофотометрическое определение ортофосфат-ионов в пластовых водах для проведения индикаторных исследований // Вестник Московского Университета. Серия 2. ХИМИЯ. 2012. Т. 53. № 3. С. 165–180.

References

1. Boldyrev A.A. Rol' Na/K-nasosa v vozбудimykh tkanyakh [Function of Tissues Na/K-pump in Excitable]. *Zhurnal Sibirskogo federal'nogo universiteta. Biologiya* [Journal of Siberian Federal University. Biology], 2008, vol. 3, no. 1, pp. 206–225.
2. Mosyagin V.V. *Vliyaniye vozrasta i fiziologicheskogo sostoyaniya na aktivnost' fermentnykh sistem kletok, tkaney i organov zhivotnykh* [Influence of age and physiological state on the activity of cells enzyme systems, tissues and organs of animals]. Doctor's thesis. Moscow, 2011, 261 p.
2. Aughey R.J., Murphy K.T., Clark S.A., Garnham A.P., Snow R.J., Cameron-Smith D., Hawley J.A., McKenna M.J. Muscle Na-K-ATPase activity and isoform adaptations to intense interval exercise and training in well-trained athletes. *J. Appl. Physiol.*, 2007, vol. 103, no. 1, pp. 39–47.
4. Aughey R.J., Gore C.J., Hahn A.G., Garnham A.P., Clark S.A., Petersen A.C., Roberts A.D., McKenna M.J. Chronic intermittent hypoxia and incremental cycling exercise independently depress muscle in vitro maximal Na/K-ATPase activity in well-trained athletes. *J. Appl. Physiol.*, 2005, vol. 98, no. 1, pp. 186–192.
5. Malfatti C.R., Burgos L.T., Rieger A, Rudger C.L, Turmina J.A., Pereira R.A., Pavlak J.L., Silva L.A., Osiecki R. Decreased Erythrocyte Na/K-ATPase activity and increased plasma TBARS in prehypertensive patients. *Scientific World Journal*, 2012, 5 p.
6. Raccach D., Gallice P., Pouget J., Vague P. Hypothesis: low Na/K-ATPase activity in the red cell membrane, a potential marker of the predisposition to diabetic neuropathy. *Diabete Metab.*, 1992, vol. 3, pp. 236–241.
7. Yakusheva I.A., Orlova L.I. Metod opredeleniya aktivnosti adenozintrifosfataz v gemolizatakh eritrotsitov krovi cheloveka [A method for determining the activity of adenosinetriphosphatase in hemolysates of human blood erythrocytes]. *Laboratornoe delo* [Laboratory work], 1970, no. 8., pp. 497–501.
8. Boldyrev A., Bulygina E., Carpenter D., Schoner W. Glutamate receptors communicate with Na/K-ATPase in rat cerebellum granule cells: demonstration of differences in the action of several metabotropic and ionotropic glutamate agonists on intracellular reactive oxygen species and the sodium pump. *J. Molec. Neurochem.*, 2003, vol. 21, no. 3, pp. 213–222.

9. Kazenov A.M., Maslova M.N., Shalabodov A.D. Issledovanie aktivnosti Na/K-ATFazy v jeritrocitah mlekopitajushhiih [Study of the Na/K-ATPase activity of mammalian erythrocytes]. *Biohimija* [Biochemistry], 1984, vol. 49, issue 7, pp. 1089–1095.
10. Lishko V.K., Malysheva M.K., Grevizirskaya T.I. Izuchenie vzaimodejstvija Na/K-ATFazy membran i tenej jeritrocitov s ouabainom [Investigation of interaction of Na/K-ATPase of the membranes and ghosts of erythrocytes with ouabain]. *Biohimija* [Biochemistry], 1974, vol. 39, no. 1, pp. 60–66.
11. Xu L.F., Zhou X.F., Hu K., Tang S., Luo Y.C., Lu W. Establishment of a rabbit model of chronic obstructive sleep apnea and application in cardiovascular consequences. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 2017, vol. 130, no. 4, pp. 452–459.
12. Tong Z., Yu F., Liu Z., Liang H. Influence of ShuJinHuoXue tablets on ischemia reperfusion injury of animals' skeletal muscle. *Molecules*, 2012, vol. 17, no. 7, pp. 8494–8505.
13. Rojas M., Díaz P., León P., González A.A., González M., Barrientos V., Pestov N.B., Alzamora R., Michea L. Mineralocorticoids modulate the expression of the beta-3 subunit of the Na/K-ATPase in the renal collecting duct. *Channels (Austin)*, 2017.
14. Borovskaya M.K., Kuznetsova E.E., Gorokhova V.G., Koryakina L.B., Kuril'skaya T.E., Pivovarov Yu.I. Strukturno-funksional'naya kharakteristika membrany eritrotsita i ee izmeneniya pri patologii raznogo geneza [Structural and functional characteristics of membrane's erythrocyte and its change of pathologies of various genesis]. *Byulleten' VSNTs SO RAMN* [Acta biomedical scientifica], 2010, no.3, issue 73, pp. 334–354.
15. Reinila M., MacDonald E., Salem N.Jr., Linnoila M., Trams E.G. Standardized method for the determination of human erythrocyte membrane adenosine triphosphatases. *Anal. Biochem.*, 1982, vol. 124, issue 1, pp. 19–26.
16. Charalambous B.M., Mir M.A. An improved procedure for the preparation and measurement of Na/K-ATPase in human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, vol. 691, no. 1, pp. 71–82.
17. Voeykov V.L., Vilenskaya N.D., Lukashev M.E., Gurevich V.V. Vydelenie membran retikulotsitov krysa, sodержashchikh reguliruemye guanilovymi nukleotidami adenilattsiklazu i β -adrenergicheskie retseptory [Isolation of rat reticulocyte membranes containing guanil nucleotide sensitive adenilate cyclase and β -adrenergic receptors]. *Bioorganicheskaya khimiya* [The Russian Journal of Bioorganic Chemistry]. 1982, vol. 8, no. 4, pp. 524–532.
18. Dodge J., Mitchell C., Hanahan D. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1963, vol.100, no. 1, pp. 119–130.

19. Bilezikian J.P., Spiegel A.M., Brown E.M., Aurbach G.D. Identification and persistence of 6-adrenergic receptors during maturation of the rat reticulocyte. *Mol. Pharmacol.*, 1977, vol. 13, no. 5, pp. 775–785.
20. Limbird L.E., Gill M., Stadel J.M. Hickey A.R., Lefkowitz R.J. Loss of beta-adrenergic receptor-guanine nucleotide regulatory protein interactions accompanies decline in catecholamine responsiveness of adenylate cyclase in maturing rat erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 1980, vol. 255, no. 5, pp. 1854–1861.
21. Medvedeva I.A. Dinamika i mekhanizm izmeneniya aktivnosti Na/K-ATFazy eritrotsitov krysa v usloviyakh stressa [Dynamics and mechanism of changes in the activity of Na/K-ATPase in erythrocytes of rats under stress]. *Extended abstract of Candidate's thesis*. Rostov-na-Donu, 1993, 24 p.
22. Al-Rabeei M.A.M., Chalabov S.I., Astaeva M.D., Klichhanov N.K. Osmoticheskaya rezistentnost' jericitocitov krysa i koncentracija tiolovykh grupp belkov ih membrany zavisjat ot dlitel'nosti umerennoj gipotermii [Osmotic fragility of erythrocytes and plasma membrane thiol concentration is depends on the duration of mild hypothermia in rats]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija* [Modern problems of science and education], 2015, no. 3, 539 p.
23. Kukushkin A.I. Issledovanie strukturno-funktsional'nykh kharakteristik membran eritrotsitov pri zamorazhivanii do umerenno nizkikh temperatur (-30 / -70 gradusov C) [Study of the structural-functional characteristics of the erythrocyte membranes after freezing to moderately low temperatures (from -30 to -70 degrees C)]. *Extended abstract of Candidate's thesis*. Kharkov, 1992, 19 p.
24. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, vol.72, no. 1-2, pp. 248–254.
25. Sedmak J.J., Grossberg S.E. A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie Brilliant Blue G-250. *Anal. Biochem.*, 1977, vol. 79, pp. 544–552.
26. Lowry O., Rosebrough N., Farr A., Randall R. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.*, 1951, vol.193, no. 1, pp. 265–270.
27. Olson B., Markwell J. Assays for determination of protein concentration. *Curr. Protoc. Pharmacol.*, 2007, Appendix 3:3A.
28. Ponomareva C.A. Golovchenko V.V. Patova O.A., Vanchikova E.V. Ovodov Yu. Sravnitel'nyy analiz spektrofotometricheskikh metodik opredeleniya massovoy doli belka v obraztsakh pektinovykh polisakharidov [Comparative analysis of the spectrophotometric methods of the protein amount determination in the pectic polysaccharide samples]. *Bioorganicheskaya khimiya* [Russian Journal of Bioorganic Chemistry], 2015, vol. 41, no. 2, pp. 154–161.

29. Kyrov D.N. Issledovanie moduliruyushchikh effektov gemolizata eritrotsitov na aktivnost' Na/K-ATFazy [The study of the modulating effects of the hemolysate erythrocytes on activity Na/K-ATPase]. *Extended abstract of Candidate's thesis*. Tyumen, 2006, 20 p.
30. Pisareva L.N. Parfenova E.V. Vliyanie iskhodnogo sostoyaniya membrannogo preparata aktivnosti Na/K-ATFazy na vzaimodeystvie s gistonami.. [The influence of the initial state of the membrane preparation activity Na/K-ATPase to the interaction with histones]. *Biofizika membrane* [Biophysics of membranes], 1973, pp. 514–517.
31. Tashkin V.Yu. Konkurentnyy transport ionov v tsitoplazmaticheskom kanale dostupa Na/K-ATFazy [Competitive ion transport in the cytoplasmic access channel of the Na/K-ATPase]. *Extended abstract of Candidate's thesis*. Moscow, 2014. 26 p.
32. Kazenov A.M. Maslova M.N. Osobennosti aktivatsii detergentami Na/K-adenozintrifosfatazy golovnogo mozga pozvonochnykh [Peculiarities of activation of Na/K-ATPase from the brain of vertebrates by detergents]. *Biohimija* [Biochemistry], 1980, vol. 14, no. 5, pp. 430–435.
33. Maturu P., Vaddi D.R., Pannuru P., Nallanchakravarthula V. Alterations in erythrocyte membrane fluidity and Na/K-ATPase activity in chronic alcoholics. *Mol. Cell. Biochem.*, 2010, vol. 39, no. 1–2, pp. 35–42.
34. Vasilenko T.F. Vliyanie poverkhnostno-aktivnykh veshchestv na adenozintrifosfataznuyu aktivnost' i 180-obmennye svoystva Na/K-ATFazy [Surface-active substances influence on adenosinetriphosphatase activity and 180-exchange properties of the Na/K-ATPase]. Candidate's thesis. Leningrad, 1980, 146 p.
35. Hanahan D.J., Ekholm J.E. The expression of optimum ATPase activities in human erythrocytes. A comparison of different lytic procedures. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978, vol. 187, no. 1, pp. 170–179.
36. Baykov A.A., Evtushenko A.A., Avaeva S.M. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immunoassay. *Anal. Biochem.*, 1988, vol. 171, pp. 266–270.
37. Fiske C.H., Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 1925, vol. 66, pp. 373–400.
38. Vladimirov G.E., Misheneva V.S. Opreделение fosfornykh soedineniy v ochen' malykh kolichestvakh nervnoy tkani [Determination of phosphorus compounds in very small amounts of nervous tissue]. *Trudy instituta fiziologii imeni I.P. Pavlova* [Proceedings of the Institute of physiology named I.P. Pavlov], 1956, vol. 5, pp. 416–424.

39. Chen P.S., Toribara T.Y., Warner H. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.*, 1956, vol. 28, pp. 1756–1758.
40. Bolotov M.P. Karetnikov P.V. Fotokolorimetriceskoe opredelenie mineral'nogo fosfora [Photocolorimetric determination of the mineral phosphorus]. *Laboratornoe delo* [Laboratory work], 1965, no. 1, pp. 30–33.
41. Bartolommei G., Moncelli M.R., Tadini-Buoninsegni F. A method to measure hydrolytic activity of adenosinetriphosphatases (ATPases). *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 3.
42. Fedorova E.Yu., Maksimov V.I. Vliyanie inhibitora i ionov elektrolitov na aktivnost' ATFaz moloka korov cherno-pestroy porody [Influence of electrolyte ions and inhibitor on the activity of black-spotted cow milk ATP]. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [News of the Orenburg State Agrarian University], 2013, no. 6, issue 44, pp. 231–232.
43. Nikolaev A.Ya. Biologicheskaya khimiya [Biological chemistry]. Moscow, Meditsinskoe informatsionnoe agentstvo, 2004, 566 p.
44. Vinogradov A.P. Analiticheskaya khimiya elementov – Fosfor [Analytical chemistry of elements – Phosphorus]. Moscow, Nauka, 1974, 219 p.
45. Petrun'kina A.M. Prakticheskaya biokhimiya [Practical biochemistry]. Leningrad, Biomedgiz, 1961, 298 p.
46. Kodama T., Fukui K., Kometani K. The initial phosphate burst in ATP hydrolysis by myosin and subfragment-1 as studied by a modified malachite green method for determination of inorganic phosphate. *J. Biochem.*, 1986, vol. 99, no. 5, pp. 1465–1472.
47. Muszbek L., Szabó T., Fésüs L. A high sensitive method for the measurement of ATPase activity. *Anal. Biochem.*, 1977, vol. 77, no. 1, pp. 286–288.
48. Queiroz-Claret C., Meunier J.C. Staining technique for phosphatases in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 1993, vol. 209, no. 2, pp. 228–231.
49. Geladopoulos T.P., Sotiroudis T.G., Evangelopoulos A.E. A malachite green colorimetric assay for protein phosphatase activity. *Anal. Biochem.*, 1991, vol. 192, no. 1, pp. 112–116.
50. Cen X., Huang Y., Wang R., Chen Z., Wu Z. Simultaneous assay of Ca-ATPase and Na/K-ATPase activities of osteoblast rat by malachite greencolorimetic method. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 1998, vol. 29, no. 4, pp. 427–430.
51. Itaya K, Ui M. A new micromethod for the colorimetric determination of inorganic phosphate. *Clin. Chim. Acta*, 1966, vol. 14, no. 3, pp. 361–366.
52. Sompong W., Cheng H., Adisakwattana S. Protective effects of ferulic acid on high glucose-induced protein glycation, lipid peroxidation, and membrane ion pump activity in human erythrocytes. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 6.

53. Lowry O.H., Roberts N.R., Leiner K.Y., Wu M.L., Farr A.L., Albers R.W. The Quantitative histochemistry of brain. Iii. Ammon's horn. *J. Biol. Chem.*, 1954, vol. 207, no.1, pp. 39–49.
54. Timin O.A., Kliment'eva T.K., Serebrov V.Yu., Zhavoronok T.V., Kuz'menko D.I., Udintsev S.N. Biokhimicheskie metody issledovaniya v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyakh: prakticheskoe posobie [Biochemical methods of research in clinical diagnostic laboratories: a practical guide]. Tomsk, STT, 2002, 244 p. <http://biokhimija.ru/mineraly/fosfor> (accessed July 1, 2017).
55. Kuttner T., Cohen H.R. Micro colorimetric studies. *J. Biol. Chem.*, 1927, vol. 75, pp. 517–531.
56. Basova E.M., Ivanov V.M. Spektrofotometricheskoe opredelenie ortofosfat-ionov v plastovykh vodakh dlya provedeniya indikatornykh issledovaniy [Spectrophotometric determination of orthophosphate ions in stratal waters for indicator of research]. *Vestnik. Moskovskogo universiteta. Seriya 2. Khimiya*. [Department of Analytical Chemistry], vol. 53, no. 3, pp. 165–180.

ДААННЫЕ ОБ АВТОРЕ

Петрова Полина Анатольевна, аспирант, лаборант-исследователь
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук
ул. Первомайская, 50, г. Сыктывкар, Республика Коми, 167982, Российская Федерация
vilena_silence@mail.ru

DATA ABOUT THE AUTHOR

Petrova Polina Anatolevna, Postgraduate Student, Laboratory Assistant Researcher
Institute of Physiology, Komi Science Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences
50, Pervomaiskaya Str., Syktyvkar, Republic of Komi, 167982, Russian Federation
vilena_silence@mail.ru