

ი. ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტი

ლი ა შ ი ო შ ვ ი ლ ი

ნორადრენალინით გამოწვეული Na,K-ATPაზური სისტემის
რეგულაციის მექანიზმი

ბიოლოგიურ მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო
ხარისხის მოსაპოვებლად წარდგენილი
დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა

03. 00. 04 – ბიოქიმია

თბილისი 2006 წ.

შემოკლებების სია

1. ATP - ადენოზინტრიფოსფატი
2. ADP - ადენოზინდიფოსფატი
3. GTP - ადენოზინტრიფოსფატი
4. cAMP - ციკლური ადენოზინმონოფოსფატი
5. pNpp - პარანიტროფენილფოსფატი
6. NT - ნეიროტრანსმიტერი
7. NA - ნორადრენალინი
8. ACl - აცეტილქოლინი
9. 5-HT - სეროტონინი
10. DA - დოფამინი
11. EGTA - ეთილენგლიკოლტეტრააცეტატი
12. EDTA - ეთილენდიამინტეტრააცეტატი

შ ე ს ა ვ ა ლ ი

ცოცხალი მატერიის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ნიშან-თვისებას წარმოადგენს ინფორმაციის მიღება და გადამუშავება. ინფორმაციის გადაცემის მექანიზმის შესწავლისათვის აუცილებელია სინაფსში მიმდინარე ბიოქიმიური და ფიზიოლოგიური პროცესების დეტალური ცოდნა, რადგან სინაფსში მიმდინარე პროცესები არის ცენტრალური ნერვული სისტემის ინტეგრალური მოქმედების საფუძველი. ამ პროცესებში მნიშვნელოვან როლს ასრულებს Na,K-ATPაზა (Na^+ და K^+ აქტივირებულია და Mg^{++} სტიმულირებული ადენოზინტრიფოსფატაზა EC 3.6.1.3). Na,K-ATPაზა ძალზე მნიშვნელოვანი ფერმენტული სისტემაა, რომლის მთავარი დანიშნულებაა ATP-ის ენერჯის ხარჯზე Na^+ და K^+ ასიმეტრიული განაწილების შექმნა და შენარჩუნება, რაც თავის მხრივ ტრანსმემბრანული ელექტრული პოტენციალის გენერაციის საფუძველს წარმოადგენს. Na,K-ATPაზა წარმოადგენს სინაფსური გადაცემის რეგულატორს. რეგულაციის ამ სისტემაში განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ნეიროტრანსმიტერების (NT) და სინაფტოსომების ციტოზოლში აღმოჩენილი სინაფტოსომური გამააქტივებელი ფაქტორის (SF_a) მონაწილეობის გარკვევა და მათი როლის დადგენა, ვინაიდან ნეიროტრანსმიტერების ფუნქციიდან გამომდინარე, ისინი უშუალოდ მონაწილეობენ სინაფსური გადაცემის პროცესში, ხოლო ცილოვანი ფაქტორი (SF_a) მონაწილეობს როგორც უშუალოდ Na,K-ATPაზას, ასევე ნეიროტრანსმიტერებით Na,K-ATPაზას რეგულაციის პროცესში.

ამ საკითხის ირგვლივ მრავალი მნიშვნელოვანი გამოკვლევა არსებობს მაგრამ ბოლომდე მაინც არ არის გაშიფრული Na,K-ATPაზაზე NT და SF_a მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი და არ არის განსაზღვრული Na,K-ATPაზას და მისი რეგულაციის როლი ტვინის ინტეგრალურ მოქმედებაში.

გარდა ამისა, ის ფაქტი, რომ ნეიროტრანსმიტერების მოქმედების ეფექტი განსხვავებულია თავის ტვინის სხვადასხვა სუბუჯრედულ ფრაქციებში, კერძოდ ის, რომ ეფექტი არ ვლინდება ტვინის მიკროსომულ ფრაქციაში, შეიძლება ჩაითვალოს მინიშნებად იმაზე, რომ შესაძლებელია თავის ტვინის სინაფსურ მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზა განსხვავდება თავის ტვინის მიკროსომულ ფრაქციაში ლოკალიზებულ Na,K-ATPაზასგან მოქმედების მოლეკულური მექანიზმით.

წინამდებარე ნაშრომში წარმოდგენილია იმ კვლევის შედეგები, რომლებიც მნიშვნელოვან ინფორმაციას გვაძლევენ ნეიროტრანსმიტერებით და სინაფტოსომური ფაქტორით (SF_a) Na,K-ATPაზას რეგულაციის მოლეკულურ მექანიზმზე და მის ფუნქციონალურ მნიშვნელობაზე. აგრეთვე წარმოდგენილია ის შედეგები, რომელთა საფუძველზე გაშიფრულია თავის ტვინის მიკროსომული ფრაქციის Na,K-ATPაზას მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი.

I. ლიტერატურის მიმოხილვა

1. Na,K-ATP-აზური სისტემის ზოგადი დახასიათება

1. 1. Na,K-ATP-აზური სისტემის გავრცელება და ლოკალიზაცია

ნატრიუმის და კალიუმის იონების ტრანსპორტს პლაზმური მემბრანის გასწვრივ, მათი კონცენტრაციული გრადიენტის საწინააღმდეგო მიმართულებით, უზრუნველყოფს რთული ბიოლოგიური მანქანა, რომელიც ხასიათდება ATP-აზური აქტიობით. ამ ტრანსპორტული ATP-აზას ძირითადმა თვისებებმა განაპირობა მისი სახელწოდება - Na^+ - და K^+ -აქტივირებული და Mg^{++} -სტიმულირებული ადენოზინტრიფოსტაზა (EC 3.6.1.3). აღნიშნული მექანიზმის ფიზიოლოგიური ასპექტებიდან გამომდინარე, მას შემოკლებით Na/K საქაჩავს უწოდებენ, ხოლო ბიოქიმიური ასპექტებიდან გამომდინარე - NaK-ATP-აზას.

Na,K-ATP-აზა თითქმის ყველა სასიცოცხლო პროცესში ღებულობს მონაწილეობას, მაგრამ მისი ძირითადი ფუნქცია ATP-ის ენერჯის ხარჯზე Na^+ და K^+ გრადიენტის შექმნა და შენარჩუნება. Na,K-ATP-აზის როლი ნერვულ უჯრედში მიმდინარე პროცესებში განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი გახდა მას შემდეგ, რაც აღმოჩნდა, რომ ის ელექტროგენურია და უშუალოდ მონაწილეობს პოტენციალის გენერაციის პროცესში, სადაც მისი წვლილი დაახლოებით 30%-ს შეადგენს. აღნიშნულიდან გამომდინარე ნათელია, რომ ელექტროგენური კომპონენტის ცვლილება გამოიწვევს Na,K-ATP-აზური სისტემის წილის შეცვლას მემბრანული პოტენციალის გენერაციის პროცესში. Na,K-ATP-აზის ელექტროგენური კომპონენტი

რეგულირებადია. უჯრედში არსებობს ამ რეგულაციის სხვადასხვა საშუალება, რომელთა მოქმედების მოლეკულური მექანიზმის შესწავლას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება.

Na,K-ATPაზა ფართოდ გავრცელებული ფერმენტია. აღმოჩენილია ცხოველთა ყველა ორგანოში, უმაღლეს მცენარეებში, მთელ რიგ ზღვის წყალმცენარეებში. მისი აქტიობა ფართო საზღვრებში მერყეობს და დამოკიდებულია იმ ობიექტზე, საიდანაც ის არის მიღებული. მაღალი აქტიობით ხასიათდება აგზნებადი და სეკრეტორული ორგანოებიდან მიღებული პრეპარატები, როგორცაა კუნთოვანი და ნერვული ქსოვილი, თირკმლის ტვინოვანი შრე, ზოგიერთი თევზის ელექტრონული ორგანო, ზღვის ფრინველების სამარილე ჯირკვლები და სხვ. (Shurmans, Bonting 1981). დაბალი აქტიობით ხასიათდება ერითროციტების Na,K-ATPაზა.

Na,K-ATPაზა პირველად გამოყოფილ იქნა კიბორჩხალას არამიელინიზებული აქსონის მემბრანებიდან (Skou 1957). Na,K-ATPაზას აღმოჩენამდე ცნობილი იყო, რომ არსებობს ფიზიოლოგიური მექანიზმი – ე. წ. პლაზმატური მემბრანის ნატრიუმის საქაჩავი, რომელიც უზრუნველყოფს ATP-ის ჰიდროლიზის ხარჯზე ერთვალენტური იონების აქტიურ ტრანსპორტს ელექტროქიმიური გრადიენტის საწინააღმდეგოდ (Dean 1941). სკოუმ ივარაუდა, რომ ეს ორი სისტემა – Na,K-ATPაზა და საქაჩავი არის იდენტური, რადგანაც ორივე მათგანი აქტივდება Na^+ და K^+ იონებით, ინჰიბირდება საქაჩავის სპეციფიური ინჰიბიტორით – ოუბაინით და საჭიროებს ATP-ის ენერჯიას. ჰიპოთეზა იმის შესახებ, რომ სკოუს მიერ 1957 წელს აღმოჩენილი Na,K-ATPაზა იგივეა, რაც Na,K-საქაჩავი (Skou 1965), გამართლდა. ამის

საბოლოო დამამტკიცებელია ის ფაქტი, რომ მოხერხდა ფერმენტის შედარებით გასუფთავება და ჩაშენება ლიპიდურ ვეზიკულებში, რის შედეგადაც ფერმენტმა ATP-ის დამატებისას შეასრულა გრადიენტის საწინააღმდეგო ტრანსპორტი იმავე სტექიომეტრიით, როგორც ეს ფიზიოლოგიურად ხდება (Glynn, Karlsh 1975).

Na,K-ATPაზა ლოკალიზირებულია უჯრედის პლაზმურ მემბრანაში და წარმოადგენს მის მარკერს (Shurmans, Bonting 1981)., ძუძუმწოვრების სხვადასხვა ქსოვილიდან გამოყოფილი ფერმენტი უნდა ჩაითვალოს იდენტურად, ვინაიდან იმუნოლოგიურმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ თირკმლიდან მიღებული Na,K-ATPაზის ანტისხეულები რეაგირებენ ცხოველის სხვა ქსოვილიდან მიღებული ფერმენტთან, ერთროციტების ჩათვლით (Longensen, 1982). აღნიშნულ იდენტურობას ბიოქიმიური მნიშვნელობა აქვს. ეს საშუალებას იძლევა, რომ სხვადასხვა ქსოვილიდან გამოყოფილი ფერმენტის შესწავლისას მიღებული ინფორმაცია Na,K-ATPაზის სტრუქტურისა და ფუნქციის შესახებ გამოვიყენოთ იმ ქსოვილების საქაჩავისათვის, რომელთაგანაც მათი მიღება და გასუფთავება არ ხერხდება. თუმცა, უნდა აღინიშნოს, რომ ეს იდენტურობა არაა აბსოლუტური. ასე, მაგალითად, ტვინის Na,K-ATPაზა მგრძნობიარეა ნეიროტრანსმიტერებისადმი, მაშინ როდესაც თირკმლის, ღვიძლის და ერთროციტების Na,K-ATPაზა აღნიშნულ მგრძნობელობას არ ამჟღავნებს (Кометиани, 1972). ცნობილია აგრეთვე სახეობრივი განსხვავება ლიგანდებისადმი მგრძნობელობაში. ასე, მაგალითად, სხვა ცხოველებისაგან (ხარი, ძაღლი, ცხვარი) განსხვავებით, ვირთაგვას გულიდან და თირკმელიდან გამოყოფილი Na,K-ATPაზა ნაკლებად მგრძნობიარეა ოუაბაინისადმი (Боядырев, 1982).

1. 2 Na,K-ATP-აზას მოლეკულური სტრუქტურა

Na,K-ATP-აზას მოლეკულური წონა, იმისდა მიხედვით, თუ რა ობიექტიდან არის პრეპარატი მიღებული და რა მეთოდითაა გასუფთავებული, მერყეობს 190-დან 560 კილოდალტონამდე (kD) და შედგება ეკვიმოლარული რაოდენობით α და β სუბერთეულისაგან.

α სუბერთეული ლიპოპროტეინული ბუნებისაა და მისი მოლეკულური მასაა 85-135 kD (საშუალოდ მიღებულია, როგორც 100 kD). β სუბერთეული გლიკოპროტეინული ბუნებისაა, რომლის მოლეკულური წონაა 35-55 kD (საშუალოდ 45 kD) (Kyte 1972; Jorgensen 1974; Lane et al., 1973, 1978). α სუბერთეული იდენტიფიცირებულია, როგორც Na,K-ATP-აზას კატალიზური კომპონენტი. მას უკავშირდება, აგრეთვე ოუაბაინი და აქტიური ტრანსპორტის სხვა ინჰიბიტორები. α სუბერთეული 1012 ამინომჟავური ნაშთისაგან შედგება (Skou, Esman, 1992) და რამდენიმეჯერ განსჯოლავს მემბრანას ისე, რომ აქტიური ცენტრი ფორმირდება ციტოპლაზმურ მხარეს, ხოლო ოუაბაინის დაკავშირების ცენტრი – მემბრანის გარეთა მხარეს (Cantley et. al., 1982).

კატალიზური α სუბერთეული წარმოდგენილია α_1, α_2 და α_3 იზოფორმებით, რომლებიც ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან სხვადასხვა ინჰიბიტორებისა და იონების მიმართ მგრძობელობით. α_1 ნანახია ყველა უჯრედში, α_2 - ჩონჩხის კუნთებში, სადაც ჩართულია კუნთის შეკუმშვის დროს Ca^{++} -ის დონის რეგულაციაში (Lingrel et. al., 2002). α_3 α_1 და α_2 -თან ერთად გვხვდება ნერვულ ქსოვილში (Skou, Esmann, 1992). ხშირად, α_2 და α_3 იზოფორმას აღნიშნავენ, როგორც α^+ , რადგანაც

ისინი ბიოქიმიურად ძალიან მსგავსნი არიან (Капля и др.,). არსებობს მონაცემები α_4 იზოფორმის არსებობის შესახებაც (Lingrel et. al., 2002).

β სუბერთეულს არ გააჩნია კატალიზური აქტიობა, თუმცა ამ სუბერთეულის ანტისხეული ინჰიბირებს Na,K-ATPაზას (Jean et. al., 1975). ვარაუდობენ, რომ β სუბერთეული უნდა ასრულებდეს რეგულატორულ ფუნქციას (Karlsh, Kemper, 1984). იგი შეიცავს 302 ამინომჟავურ ნაშთს და ერთხელ განსჭოლავს მემბრანას. β სუბერთეულის N ბოლო ციტოპლაზმურ მხარეზეა, ხოლო ჯაჭვის უმეტესი ნაწილი, მრავალრიცხოვანი ნახშირწყლოვანი ნაშთებითურთ – გარეთა მხარეს (Ziberre et al., 1987).

თანამედროვე მონაცემებით, β სუბერთეული წარმოდგენილია 3 იზოფორმით: β_1 β_2 β_3 . ამ იზოფორმების, ისევე, როგორც თვით β სუბერთეულის ფიზიოლოგიური მნიშვნელობა, დღეისათვის ცნობილი არ არის. ვარაუდობენ, რომ β_2 და β_3 იზოფორმები მნიშვნელოვან როლს უნდა თამაშობდნენ ნეირონალური და გლიური უჯრედების ურთიერთქმედებაში. ვარაუდობენ აგრეთვე β_4 იზოფორმის არსებობასაც (Skou, Esmann, 1992).

Na,K-ATPაზას ზოგიერთ გასუფთავებულ პრეპარატში აღმოჩენილი იქნა პროტეოლიპიდი, რომლის მოლეკულური წონაა 12-14 kD და მას უწოდეს γ სუბერთეული (Hansen et. al., 1979; Reeves et. al., 1980). γ სუბერთეული, რომელიც წარმოდგენილია γ_a და γ_b იზოფორმების სახით, სავარაუდოდ, მონაწილეობს იონთა ტრანსპორტის რეგულაციაში (Blostein et. al., 2002; Farman, Clureud, 2002).

მინიმალური მასა, რომელიც განსაზღვრულია სოლუბილიზებული ფერმენტის სედიმენტაციის სიჩქარით, არის 170 kD, რაც შეესაბამება 1α ,

1β და, შესაძლოა 1γ სუბერთეულს (Jorgensen, 1982; Robinson, 1983). როგორც უკვე აღვნიშნეთ, უმრავლეს პრეპარატებში ნანახია მხოლოდ α და β სუბერთეულები ეკვიმოლარული თანაფარდობით. ამიტომ, როდესაც საუბრობენ პროტომერზე, მხედველობაში აქვთ $\alpha\beta$ კომპლექსი მოლეკულური მასით 120-150 kD. ამავე დროს, გასათვალისწინებელია ის ფაქტი, რომ Na,K-ATPასას გასუფთავებული პრეპარატების მასა, რომლებიც გელ-ფილტრაციით ან ულტრაცენტრიფუგირებით არის მიღებული, 250-300 kD-ია, რაც მიუთითებს ფერმენტის ასოციაციაზე. ასე, მაგალითად, ცხენის თირკმელში აღმოჩენილია დი- და ტრიმერული ფორმები, ძალის თირკმელში – პროტომერი $\alpha\beta$ და დიმერი $\alpha_2\beta_2$ (Болдырев, Мельгунов, 1985). დასაშვებია $\alpha_4\beta_4$ კომპოზიციაც (Robinson 1983), რაც ფერმენტის ოლიგომერულ ბუნებაზე მიუთითებს. ყველაზე უფრო სარწმუნოა დიმერის $\alpha_2\beta_2$ არსებობა (Кометиани, 1987).

1. 3 Na,K-ATPასური სისტემის მოდიფიკატორები

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, Na,K-ATPასით განხორციელებული ATP-ის ჰიდროლიზის პროცესი დამოკიდებულია Mg^{++} იონებზე და სტიმულირდება Na^+ და K^+ იონებით. Na,K-ATPასას, როგორც ფერმენტული სისტემის, მუშაობიდან გამომდინარე, ჩანს, რომ Na^+ და K^+ ერთდროულად შეიძლება გამოდიოდნენ როგორც მთლიანი სისტემის აქტივატორების როლში – $[Na^+]_{in}$ და $[K^+]_{out}$, ასევე ინჰიბიტორების როლში $[Na^+]_{out}$ და $[K^+]_{in}$, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ იგი, მოქმედების თვალსაზრისით, არის არა სკალარული, არამედ ვექტორული, რაც ფერმენტებისათვის საკმაოდ იშვიათია.

ბუნებრივია, რომ ფერმენტს უნდა ჰქონდეს ტრანსპორტული უბნები, რომელთაც უნდა ახასიათებდეს მაღალი თვისობა და შერჩევითობა ტრანსპორტირებული იონის მიმართ მემბრანის ერთ მხარეს, ხოლო მემბრანის მეორე მხარეს – მაღალი დისოციაციის კოეფიციენტი.

უბნები Na^+ იონებისათვის: Na^+ უბნები არის როგორც პლაზმური მემბრანის შიდა, ასევე გარეთა ზედაპირზე. შიდა მხარე – გარეთ ერთროციტების ვეზიკულებზე ნაჩვენებია (Blostein, Polvani; 1987), რომ უჯრედშიდა Na^+ იონი (ვეზიკულების გარეთ Na^+ ემატებოდა სარეაქციო არეს) მთლიანად ააქტივებს ფერმენტის ფოსფორილირებას.

ვარაუდობენ, რომ ფერმენტს გააჩნია სამი იდენტური და არაურთიერთმოქმედი Na^+ -უბანი. ფერმენტული აქტიობისათვის ყოველი მათგანი უნდა იყოს გაჯერებული. Na^+ იონებისათვის $K_{0,5}$ (კონცენტრაცია, რომელიც განაპირობებს ნახევრად მაქსიმალურ აქტიობას) შეადგენს 30mM. Na^+ იონები შეიძლება შეიცვალოს მხოლოდ Li^+ იონებით.

უბნები K^+ იონებისათვის: Na,K-ATP-აზურ პრეპარატზე ვარაუდობენ K^+ -ის ორი – α და β უბნის არსებობას (Jorgensen 1982). K^+ ფოსფატაზური რეაქციისათვის აქტივირებადი K^+ -უბნების $K_{0,5}$ არის უფრო დიდი, ვიდრე Na,K-ATP-აზურ რეაქციაში. საშუალო თვისობის K^+ -უბნები (ნანახი ფოსფატაზურ რეაქციაში) იწოდებიან " α " უბნებად. მაღალი თვისობის უბნები (ნანახი ATP-აზურ რეაქციაში) – β უბნებად (Robinson 1979). ფერმენტის α და β უბნებზე K^+ იონის მიმართ თვისობას ამცირებს ATP. K^+ იონები შეიძლება შეიცვალოს სხვა იონებით, როგორცაა: Rb^+ , Cs^+ ან NH_4^+ ($K_{0,5}=0,7-6\text{mM}$); Li ($K_{0,5}=11\text{mM}$).

უბნები ATP და MgATP-სათვის: ცნობილია, რომ Na,K-ATPაზას ჭეშმარიტ სუბსტრატს MgATP წარმოადგენს. პლესნერმა, თანაავტორებთან ერთად, აჩვენა, რომ ჰიდროლიზდება არა მარტო ხსნარში არსებული MgATP, არამედ ის კომპლექსიც, რომელიც ფერმენტზე წარმოიქმნება. ამ დროს აუცილებელია ფერმენტს ჯერ თავისუფალი ATP მიუერთდეს, მერე Mg^{++} , რადგანაც თუ ჯერ Mg^{++} მიუერთდა, წარმოიქმნება ჩიხური კომპლექსი (Plesner et. al. 1981).

Na,K-ATPაზური სისტემის შესახებ ადრინდელ ნაშრომებში (Robinson 1974) ნაჩვენები იყო, რომ MgATP-სთვის K_m იცვლება ზღვრებში 0,1-0,6mM. ნანახია, რომ K_m მიკრომოლურ ზღვრებშიც იცვლებოდა (Glynn, Karlsh 1975), რაც აიხსნა არასუფთა ფერმენტულ პრეპარატებში მეორე ATPაზას არსებობით. Na,K-ATPაზური რეაქციის ლაინუივერ-ბერგის გრაფიკზე ნაჩვენებია ორი K_m სიდიდეებით: $3\mu M$ -სთან ახლოს და 0,2mM. ორი K_m -ის არსებობა მათ ახსნეს ATP-ის ჰიდროლიზის დამატებითი გზის არსებობით, რაც მიუთითებს მაღალი და დაბალი თვისობის სუბსტრატული უბნების არსებობაზე (Glynn, Karlsh 1976; Robinson 1976).

Na,K-ATPაზას ერთ-ერთ მოდიფიკატორს წარმოადგენს ATP. მას შეუძლია ფერმენტის აქტიურ ცენტრთან წარმოქმნას კომპლექსი ყოველგვარი სხვა ლაგანდის გარეშე. ATP არ ხასიათდება აბსოლიტური სპეციფიურობით. ის შეიძლება შეიცვალოს სხვა ნუკლეოტიდებით, რომელთა (CTP-ის გარდა) ჰიდროლიზი არაა შეუღლებული ტრანსპორტთან (Shoner et. al. 1968; Skou, Esmann 1992).

ATP-ს შეუძლია "არეგულიროს" ფერმენტის თვისობა იონების მიმართ, უფრო ზუსტად, გაზარდოს ფერმენტის თვისობა Na^+ იონების

მიმართ და შეამციროს K^+ იონების მიმართ (Skou, Jensen et.al. 1984). ATP-ის ეს თვისება განაპირობებს იონური ცენტრებიდან იონების მოხლეჩვას მათი გადატანის შემდეგ.

უბნები Mg^{++} იონებისათვის: Mg^{++} იონები ერთის მხრივ, მონაწილეობენ სუბსტრატის – MgATP-ის წარმოქმნაში, მეორეს მხრივ, იგი წარმოადგენს ფერმენტული აქტიობის მნიშვნელოვან მარეგულირებელ ფაქტორს და გავლენას ახდენს $E_1P \rightarrow E_2P$ და $E_1 \rightarrow E_2$ კონფორმაციულ გადასვლებზე (Post et. al. 1960; Albers et. al. 1963; Robinson 1979; 1983; Skou, Esmann 1992). Mg^{++} იონები MgATP-ის ანალოგიურად, ინჰიბირებენ ADP/ATP გაცვლას, ზრდიან Na^+ -სთვის $K_{0.5}$. ეს ეფექტი არ იმიტირდება MgATP-ით (Robinson, Flashner 1979). ყველა ზემოთჩამოთვლილი არ შეიძლება აიხსნას სუბსტრატული უბნების Mg^{++} იონებით დაკავებით. უფრო სარწმუნოა, რომ Mg^{++} -სათვის არსებობს სპეციალური დაკავშირების უბანი, სადაც Mg^{++} შეიძლება გამოავლინოს თავისი, როგორც ძლიერი მოდიფიკატორის თვისებები.

1.4 Na,K-ATPაზური სისტემის ინჰიბიტორები

არსებობენ სხვადასხვაგვარი ნაერთები, რომლებიც მოქმედებენ Na,K-ATPაზაზე. მათგან განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ნივთიერებები, რომლებიც სპეციფიურად ინჰიბირებენ ფერმენტს. მათ რიგს მიეკუთვნება გულის გლიკოზიდების ჯგუფი, რომელთა შორის ყველაზე მნიშვნელოვანია Na,K-ATPაზას მაღალაქტიური, წყალში ადვილად ხსნადი ინჰიბიტორი – ოუბაინი (სტროფანტინი G).

ფერმენტთან ოუბაინის დაკავშირება ხასიათდება აბსოლუტური სპეციფიურობითა და შეუქცევადობით. ოუბაინი მოქმედებს მემბრანის გარეთა მხრიდან და ხელს უშლის როგორც ATP-ის დაკავშირებას ფერმენტთან და ფოსფორილირებას, ისე დეფოსფორილირებას (Болдырев 1982, 1985; Shurmans, Bonting, 1981), თუმცა, უფრო დიდი თვისობით უკავშირდება ფერმენტის ფოსფორილირებულ ფორმას. ერთი მოლეკულა ოუბაინის დაკავშირებას ერთ მოლეკულა Na,K-ATPაზასთან მივყავართ ფერმენტის აქტიურობის სრულ ინჰიბირებამდე (Robinson, 1979).

მეორე ეფექტური არასპეციფიური ინჰიბიტორია ვანადატი, რომელიც მნიშვნელოვან მიკროელემენტს წარმოადგენს. ადამიანისა და ცხოველთა ორგანიზმში იგი ძირითადად მცირედ აქტიური ვანადილიონის სახით არსებობს. ცხოველური უჯრედების მთელ რიგ მეტაბოლურ კომპონენტებს აქვთ უნარი ის დაჟანგონ და გადაიყვანონ აქტიურ ფორმაში (VO_4^{3+}), რომელიც მაღალი თვისობით ურთიერთქმედებს Na,K-ATPაზასთან და ინჰიბირებს მას, ნორადრენალინსა და NADH-ს კი აქვთ უნარი ვანადატი გადაიყვანონ ვანადილიონში და დააქვეითონ მისი აქტიობა. არსებობს მოსაზრება, რომ ვანადიუმთან დაკავშირებული ჟანგვა-აღდგენითი პროცესები წარმოადგენენ Na,K-ATPაზას რეგულაციის ერთ-ერთ სახეს (Каквидзе и др., 1982).

ვანადატი Na,K-ATPაზაზე მოქმედებს უჯრედის შიგნით, ფერმენტის აქტიურ ცენტრზე. ATP-ის დაკავშირების დაბალი თვისობის ცენტრების ვანადატით გაჯერება ინჰიბირებს ფოსფატაზურ რეაქციას, ხოლო მაღალი თვისობის ცენტრის გაჯერება – მთლიან Na,K-ATPაზას.

ვარაუდობენ, რომ ვანადატი ინჰიბირებს ფერმენტის ფოსფორილირების შემდეგ K^+ იონის გამოთავისუფლებას.

Na,K-ATP-ას ძლიერი ბუნებრივი ინჰიბიტორია Ca^{++} იონები. ისინი ინჰიბირებენ, აგრეთვე, სუმაარული ATP-ას ოუბაინარამგრძობიარე ნაწილსაც (Mg-ATP-ას), რაც, როგორც ჩანს აიხსნება Mg^{++} და Ca^{++} იონებს შორის კონკურენციითა და Ca-ATP კომპლექსის წარმოქმნით.

სხვადასხვანაირი მოქმედებით ხასიათდება ოლიგომიცინის ზემოქმედება Na,K-ATP-აზე. იგი ინჰიბირებს Na,K-ATP-აზურ და Na-ATP-აზურ რეაქციებს, აქვს მცირე ეფექტი K^+ -ფოსფატაზურ რეაქციაზე, ააქტივებს ADP/ATP გაცვლას. ოლიგომიცინის ანალოგიურად მოქმედებს დიმეთილსულფოქსიდი, მაგრამ მათი ერთდროული დამატებისას ოლიგომიცინის მაინჰიბირებელი ეფექტი სუსტდება.

Na,K-ATP-ას ინჰიბიტორებს წარმოადგენენ აგრეთვე ის ნაერთები, რომლებიც მოქმედებენ Na,K-ATP-ას ცალკეულ რეაქციებზე. მათ რიცხვს მიეკუთვნება სულფჰიდრული რეაგენტები, რომელთა შორისაა N-ეთილმალეიმიდი (NEM), ქლორპრომაზინი, ეთაკრინის მჟავა, პარაქლორმერკურბენზოატი, რომელთა მოქმედებით ფერმენტის SH ჯგუფების აღდგენა ხდება. სულფჰიდრული რეაგენტების მსგავსად, კერძო რეაქციებზე მოქმედებენ სხვა ნაერთებიც, მაგალითად, პირიდოქსალფოსფატი, რომელიც უკავშირდება ლიზინის ჯგუფებს (Robinson, 1983); ტრინიტრობენზოლსულფონატი, რომელიც ფერმენტის ამინოჯგუფებზე მოქმედებს. Na,K-ATP-ას ერთ-ერთ ინჰიბიტორს წარმოადგენს, აგრეთვე, ტიმეროსალი, რომელიც ხელს უშლის

კონფორმაციულ გადასვლებს, მაგრამ არ ცვლის ფერმენტის თვისობას იონების მიმართ და არც დაკავშირებული იონების რიცხვს.

Na,K-ATPაზას მოდიფიკატორების ერთ-ერთ ჯგუფს მიეკუთვნება ზოგიერთი ისეთი ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერება, როგორცაა ნეიროტრანსმიტერები, ჰორმონები და სხვა. ისინი მოქმედებენ Na,K-ATPაზაზე და ცვლიან მის აქტიობას.

1.5 Na,K-ATPაზური სისტემის მუშაობის რეჟიმები და ინტერმედიატები

Na,K-ATPაზური რეაქცია მიდის სტექიომეტრიით $3\text{Na}^+/2\text{K}^+/1\text{ATP}$, ე. ი. ერთი მოლეკულა ATP-ის ჰიდროლიზის ხარჯზე ხდება 3 Na^+ იონის გამოსვლა და 2 K^+ იონის შთანთქმა. თუმცა, გარკვეულ პირობებში, საქაჩავს შეუძლია ფუნქციონირება რამდენადმე შეცვლილი სახითაც. ეს საკითხი დეტალურად იქნა შესწავლილი გლინის მიერ (Glynn, Karlsh, 1975, 1982). მანვე მოახდინა საქაჩავის შესაძლო ფუნქციონირების კლასიფიკაცია:

1. შეუღლებული Na^+/K^+ ცვლა:

ფიზიოლოგიურ პირობებში ხდება შეუღლებული Na^+/K^+ ცვლა. ამ რეაქციის მიმდინარეობისათვის საჭიროა Na^+ , K^+ და Mg^{++} იონები. K^+ იონები Na,K-ATPაზას ააქტივებენ მემბრანის გარეთა მხრიდან, ხოლო Na^+ , Mg^{++} და ATP – შიგნიდან. ADP-სა და Pi-ს გამოთავისუფლება ხდება შიგნით. ცნობილია, რომ ფერმენტის ფოსფორილირებისათვის აუცილებელია Na^+ და Mg^{++} იონები (Post, Kuml, 1973). K^+ -ის შემდგომი დამატება განაპირობებს დეფოსფორილირებას (Post et, al. 1965; Whittam, Chapperfield, 1975; Levitt, 1980).

2. Na^+/Na^+ ცვლა:

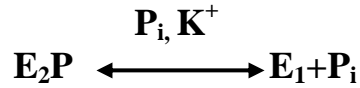
უჯრედგარე არეში K^+ იონების არარსებობისას და მემბრანის ორივე მხარეს Na^+ იონების არსებობისას სისტემა ახორციელებს Na^+ იონების ეკვიმოლარულ ცვლას მემბრანაში. ასეთი ცვლისათვის აუცილებელია შიდაუჯრედულ არეში ATP-ის არსებობა, თუმცა ამ დროს ATP ცოტაა, ანდა არ ჰიდროლიზდება. აგრეთვე, აუცილებელია ADP-ის არსებობა. Na^+/Na^+ ცვლას თან ახლავს ATP/ADP ცვლა.

3. Na^+ დამოკიდებული ATP/ADP გაცვლა:

Na^+ , Mg^{++} რადიაქტიური ADP და არალაბილური ATP-ით წარმოიქმნება რადიაქტიური ATP (Glynn, 1985). ეს რეაქცია შექცევადია და შეიძლება შევადართო Na^+/Na^+ გაცვლას, მაგრამ Na^+/Na^+ გაცვლა ინჰიბირდება ოლიგომიცინით, მაშინ, როცდესაც ATP/ADP გაცვლა - არა. საქაჩავის მოქმედება შეიცავს ამ დამატებით საფეხურს.

4. შიდაუჯრედული Na^+ -ის არარსებობისას, მაგრამ ორივე მხრიდან K^+ იონების არსებობისას, Na,K-საქაჩავი მემბრანაზე ახორციელებს K^+ იონების არაელექტრონეგურ ცვლას, რომლითაც არ იქმნება კალიუმის გრადიენტი. ამ პროცესისათვის აუცილებელია შიდაუჯრედული Pi ან ATP-ის არსებობა, რომელიც შეიძლება შეიცვალოს არაჰიდროლიზებადი ანალოგით - β - γ -NH- ATP-ით (Simons, 1975). ამ პროცესში ADP არ მონაწილეობს. ეს იმაზე მიუთითებს, რომ Na^+/Na^+ და K^+/K^+ ცვლის განხორციელებისას ფერმენტი სხვადასხვა მდგომარეობაშია. პირველ შემთხვევაში აუცილებელია ATP-ის აქტიური ცენტრის ფოსფორილირება, ამიტომაც სუბსტრატის არაჰიდროლიზებადი ანალოგი არ ააქტივებს Na^+/Na^+ ცვლას. მეორე შემთხვევაში კი, როგორც ჩანს, საკმარისია ATP-ის ან მისი ანალოგის დაკავშირება სუბსტრატის

დაკავშირების უბანზე, რაც ასტიმულირებს რეაქციას. ფოსფოფერმენტი კი იქმნება P_i -ს მონაწილეობით. K^+/K^+ ცვლას თან ახლავს რეაქცია:



ფოსფორილირება მიმდინარეობს იმავე, ასპარაგინის მჟავას β -კარბოქსილზე, რომელზეც ხდება ATP-ით ფოსფორილირება. (Post et. al., 1975).

K^+/K^+ ცვლის სისტემის მგრძობელობა ინჰიბიტორებისა და უჯრედული K^+ იონების მიმართ იგივეა, როგორც Na,K-საქაჩავისა. მემბრანის თითოეულ მხარეს Na^+ და K^+ იონების ფიზიოლოგიური კონცენტრაციისას K^+/K^+ გაცვლაზე მოდის საქაჩავის მთლიანი K^+ -დინების 15-30% (Beauge et. al., 1979).

5. Na^+ -ის არაშეუღლებული გადატანა:

უჯრედის გარეთ Na^+ და K^+ იონების არარსებობისას საქაჩავს არ შეუძლია შეუღლებული Na^+/K^+ გაცვლა, მაგრამ აქვს უნარი აწარმოოს უჯრედშიდა Na^+ -ის იონების შეუწყვილებელი გამოსვლა (Cavieres, 1987). არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ ერთი მოლეკულა ATP-ის ჰიდროლიზს თან ახლავს 2-3 Na^+ იონის გადატანა. (Carrahan, Glynn, 1967). Na^+ -ის არაშეუღლებული გადატანა არ ხორციელდება კონცენტრაციული გრადიენტის საწინააღმდეგოდ. უჯრედის გარეთ Na^+ იონების დამატებისას Na^+ დინების სიჩქარე ნულამდე ეცემა. Na^+ დინების სიჩქარის ხელახალი მატება ხდება უჯრედგარეთა Na^+ იონების კონცენტრაციის გაზრდით, რაც აიხსნება საქაჩავის მიერ Na^+/Na^+ გაცვლით.

6. რევერსია

როდესაც შექმნილია Na^+ და K^+ იონების საწინააღმდეგო გრადიენტი და ADP-სა და P_i -ის შეფარდება ATP-თან მაღალია, საქაჩავს შეუძლია იმუშაოს საწინააღმდეგო მიმართულებით, ისეთივე სტექიომეტრიით. ამ დროს Na^+ და K^+ იონები გადაიტანებიან კონცენტრაციული გრადიენტით, რასაც თან ახლავს ATP-ის სინთეზი. ერთი მოლეკულა ATP-ის სინთეზი დაკავშირებულია $2\text{K}^+/3\text{Na}^+$ გადატანასთან.

7. K^+ -დამოკიდებული ფოსფატაზა:

K^+ და Mg^{++} იონების არსებობისას ფერმენტმა შეიძლება განახორციელოს სხვადასხვა ფოსფოეთერების ჰიდროლიზი Na^+ -ის ტრანსპორტის გარეშე. ეს ფოსფოეთერებია: პარანიტრიფენილფოსფატი, უმბელილფოსფატი, აცეტილფოსფატი და სხვა. ამ სუბსტრატებს შორის განსაკუთრებით ხშირად იხმარება პარანიტრიფენილფოსფატი (pNPP), რის გამოც ეს რეაქცია აღინიშნება როგორც Na,K -ATPაზური სისტემის პარანიტრიფენილფოსფატაზური აქტიობა. ეს რეაქცია წარმოაჩენს მთლიანი Na,K -ATPაზური რეაქციის ბოლო, ჰიდროლიზურ საფეხურს, სადაც უჯრედგარე აცეტილფოსფატი ფერმენტის შუალედურ მდგომარეობაში ცვლის ასპარაგინფოსფატს. K^+ -დამოკიდებული ფოსფატაზური რეაქცია ხორციელდება Na,K -ATPაზას K^+ აქტივირებული დეფოსფორილირებადი ნაწილით (Skou, Esmann, 1992). შემდგომი გამოკვლევების საფუძველზე შესაძლებელი გახდა pNPPაზას მინიმალური მოდელის შექმნა (Кометиани, Векуа, 1984, 1885).

Na,K -ATPაზის მუშაობის პრონციპებიდან გამომდინარე ჩანს, რომ შესაბამისი ლიგანდების არსებობისას ფერმენტი შეიძლება არსებობდეს რამდენიმე ფორმით, ე. ი. წარმოიქმნება ინტერმედიატები.

ფერმენტის ფორმას, რომელიც ხასიათდება Na^+ იონების მიმართ მაღალი თვისობით, უწოდებენ Na-ფორმას და აღინიშნება, როგორც E_1 , ხოლო ფორმას, რომლის წარმოქმნაც საჭიროებს K^+ იონების არსებობას, უწოდებენ K-ფორმას ანუ E_2 . ძირითადად არსებობს ორი ფორმა: არაფოსფორილირებული (E_1 , E_2) და ფოსფორილირებული ($E_1\text{P}$ მგრძნობიარე ADP-დეფოსფორილირებისადმი და $E_2\text{P}$ მგრძნობიარე K^+ -ის თანაობისას ფოსფორილირების მიმართ). არაფოსფორილირებულ ფორმებს უფრო მაღალი თვისობა აქვთ Na^+ იონების მიმართ, ვიდრე K^+ -სადმი, ფოსფორილირებულ ფორმებს კი - პირიქით.

ფერმენტის Na^+ და K^+ ფორმები განიცდიან ურთიერთგარდაქმნას.

სკოუმ და ესმანმა ნახეს, რომ $E_1\text{Na}$ -ის $E_2\text{K}$ -ად გარდაქმნა იწვევს პროტონის "შთანთქმას". პროტონის დისოციაცია შესაძლებელს ხდის K^+ -ფორმის Na^+ -ფორმად გარდაქმნას. როდესაც $\text{pH}=9,5$, ფერმენტი იმყოფება E_1 ფორმაში, ხოლო როცა $\text{pH}=5,5$ – E_2 ფორმაში. pH -ის ფიზიოლოგიური მნიშვნელობისას $E_1\text{Na} \rightarrow E_2\text{K}$ გადასვლა დაკავშირებულია როგორც K^+ -თან, ისე H^+ -ის მიერთებასთან. $E_1\text{Na}$ -ის გადასვლა $E_2\text{K}$ -ში სწრაფია (300^{-1}Sc), უკუგადასვლა ათასჯერ უფრო ნელი. ექსპერიმენტულად ნაჩვენებია, რომ Na,K-ATPაზის Na^+ და K^+ ფორმა განსხვავდება ATP-ის მიმართ თვისობით (Skou, Esmann, 1981; Karlsh et.al., 1982; Glynn, Karlsh, 1982; Jorgensen, 1983).

E_2 -ის თვისობა ATP-ის მიმართ უფრო მცირეა, ვიდრე E_1 -ის. E_2 მდგომარეობაში ATP-ის კავშირი ნუკლეოტიდურ ცენტრთან სუსტია. Na^+ -ის იონების დამატება განაპირობებს სუბსტრატის დაკავშირებას და ამ პირობებში ხდება გადასვლა $E_2 \rightarrow E_1$ (Klodos, Ottolenghi, 1984).

უნდა აღინიშნოს, რომ $(Na)E_1P \leftrightarrow (Na)E_2P$ და $(K)E_2O \leftrightarrow (K)E_1S$ გადასვლები მიმდინარეობს ფერმენტის კონფორმაციული ცვლილებებით.

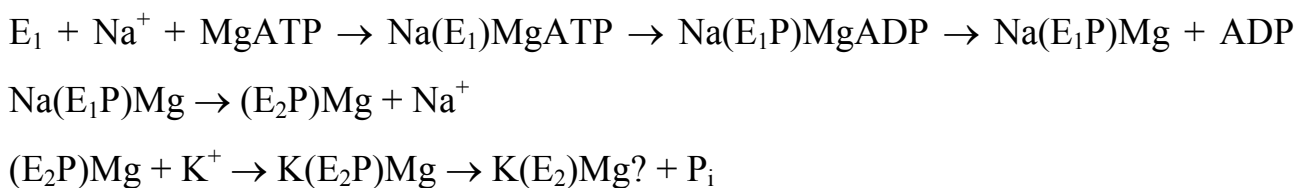
თავისუფალი ATP-ის, თავისუფალი Mg^{++} -ისა და სუბსტრატის Na,K-ATPაზურ აქტიობაზე დამოკიდებულების შესწავლამ აჩვენა, რომ არსებობენ სხვა ინტერმედიატებიც (Plesner et al., 1981; Кометиани, 1987).

1.6. Na,K-ATPაზური სისტემის კინეტიკური სქემები

Na,K-ATPაზური მოდიფიკატორების მოქმედების, ინტერმედიატების ბუნების, ფერმენტის სხვადასხვა რეჟიმში მუშაობისა და სხვა საკითხებზე არსებული მრავალრიცხოვანი მონაცემები თავის ასახვას პოულობენ რეაქციის კინეტიკურ სქემაში. ამ მონაცემების ავტორები ცდილობენ შექმნან Na,K-ATPაზური რეაქციის მიმდინარეობის სრული სქემა, დაადგინონ მისი აქტიობის რეგულაციის საშუალებები, როგორც მთლიანობაში, ასევე ცალკეულ სტადიების მიმართ. ეს კი, თავის მხრივ, საშუალებას იძლევა შეფასდეს უჯრედის ფუნქციონირების პროცესში Na,K-ATPაზას ბიოლოგიური როლი.

ფერმენტის მრავალი თვისების ასახსნელად ხშირად გამოყენებულ ერთ-ერთ პირველ სქემას წარმოადგენს პოსტ-ალბერსის თანმიმდევრული მოდელი (Post et. al., 1960; Albers et. al., 1968), რომლის მიხედვითაც რეაქცია მიმდინარეობს საფეხურებრივად და სხვადასხვა ეტაპზე ჩართავს Na^+ და K^+ იონებს

(სქემა 1)





სქემა გვთავაზობს Na^+ და K^+ იონების მიერთებასა და მოცილებას სხვადასხვა ეტაპზე და ეთანხმება მრავალ მონაცემს ფოსფორილირებისა და დეფოსფორილირების პირობების შესახებ. სქემა გულისხმობს ორი ფოსფორილირებული ინტერმედიატის (E_1P და E_2P) არსებობას, რომლებიც იმყოფებიან სხვადასხვა კონფორმაციულ მდგომარეობაში. E_1P მგრძნობიარეა ADP-ის მიმართ, ხოლო E_2P – K^+ იონების მიმართ. მათ შორის წონასწორობა კონტროლირდება Mg^{++} -ით, ხოლო გადასვლა ინჰიბირდება N-ეთილმალეიმიდით.

ამ სქემის მიხედვით ყველა სტადია შექცევადია, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ საქაჩავი შესაძლებელია გამოყენებული იქნას, როგორც ATP-ის ენერჯის იონურ გრადიენტში გარდამქმნელი, ისე – იონური გრადიენტის ქიმიურ ენერჯიაში გარდამქმნელი. Na,K -ATP-ის საშუალებით ასეთი გზით მიღებულია ერთროციტებში ATP, ADP-ისა და Pi-საგან (Glynn, Karlsh, 1975; Karlsh, 1987).

Na,K -ATP-ის ფუნქციონირებას შედარებით სრულად აღწერს ის მოდელები, რომლებიც ფერმენტს განიხილავენ, როგორც ოლიგომერულ სისტემას. ამ მხრივ მნიშვნელოვანია სტეინის მიერ შემოთავაზებული მოსაზრებები (Stein et. al., 1973), რომელიც შემდგომ რეპკემ განავითარა (Repke, Ditrach, 1979).

რეპკეს ჰიპოთეზის თანახმად, Na,K -ATP-ის რეაქცია ხორციელდება ერთი პროტომერით. K^+ -ს ფერმენტი გადაჰყავს ოლიგომერულ ფორმაში. ამ პირობებში, დაბალი თვისობის ცენტრზე ATP-ის მიერთება ინდუცირებს მეზობელი მაღალი თვისობის

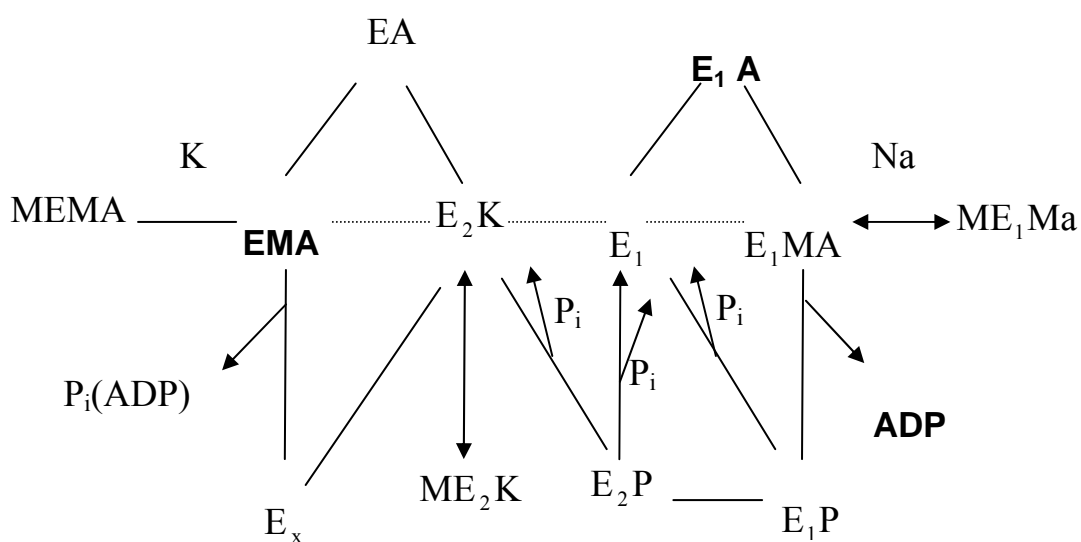
ცენტრიდან ADP-ის გამოთავისუფლებას. ეს კი განაპირობებს დიმერის მუშაობის სინქრონიზაციას ისე, რომ ერთი პროტომერის ენდერგონული სტადია ემთხვევა მეორე პროტომერის ეკზერგონულ სტადიას (Repke, Ditrich, 1979). სქემა ვარაუდობს, რომ ფერმენტის პროტომერები მთლიანად იდენტურები არ არიან და შესაძლებელია ნუკლეოტიდდამაკავშირებელი ცენტრები ერთმანეთისაგან კონფიგურაციით განსხვავდებოდნენ.

პროტომერების შეუღლებული მოქმედება საფუძვლად უდევს ლევიტის მოლეკულურ მოდელს (Levitt, 1980). ეს მოდელი არის ცდა, შეათანხმოს სხვადასხვა შეხედულებანი Na^+ და K^+ ტრანსპორტისათვის ATP-ის ენერჯის გამოყენების მექანიზმებზე. იგი თითქმის აერთიანებს პოსტ-ალბერსის, ვიტამისა და რეპკეს ძირითად დებულებებს და ამავე დროს, თავისუფალია წინამორბედი მოდელების ნაკლოვანებებისაგან. ამ მოდელის ძირითადი განსხვავება პოსტ-ალბერსის სქემიდან არის ის, რომ მასში განიხილება Na^+ და K^+ იონთა ერთდროული და არა თანმიმდევრული გადატანა. კარლიშისა და მისი თანამშრომლების მიერ შემოთავაზებული სქემა უფრო სრულყოფილია, ვიდრე წინამორბედი სქემები (Karlsh, 1980; Karlsh, Kempner, 1984). იგი განსაზღვრავს ყველა ინტერმედიატისათვის (გარდა Mg^{++} იონის შესაძლო დისოციაციისა) სპეციფიკურ საფეხურს. იგი, ფაქტიურად, პოსტ-ალბერსის გაფართოებული სქემაა ფოსფოფერმენტის ორი ფორმითა (E_1P და E_2P) და ოკლუდირებული K^+ -ფორმით. სქემა შედგება ათი ცალკეული საფეხურისაგან (ხუთი E_1 და ხუთი E_2 ; ხუთი ფოსფორილირებული და ხუთი დეფოსფორილირებული). კარლიშის სქემამ აჩვენა თითოეულ სუბერთეულზე მაღალი და დაბალი

თვისობის უზნების არსებობა, თუმცა ვერ ხსნის, თუ როგორ ფუნქციონირებენ აქტიური ცენტრები - ერთმანეთისაგან დამოუკიდებლად, თუ შეთანხმებით; ამ სქემის ძირითადი უპასუხო კითხვაა: შესაძლებელია თუ არა ორივე სუბსტრატის ერთ და იგივე მდგომარეობაში (E_1/E_1 ან E_2/E_2) ყოფნა.

Na,K-ATP-ის სისტემის მოლეკულური მექანიზმის ასახსნელად შედარებით სრულყოფილი კინეტიკური სქემა მოწოდებულია პლესნერის მიერ (Plesner, 1981):

სქემა 2.

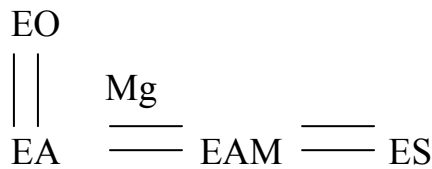


ამ სქემის მიხედვით, ფერმენტის მოლეკულას გააჩნია მხოლოდ ერთი სუბსტრატული უბანი, რომლის თვისობა სუბსტრატის მიმართ განისაზღვრება ცილის კონფორმაციული მდგომარეობით. ამ შემთხვევაში განიხილება Na,K-ATP-ის მონომერული ფორმა, რომელიც პასუხისმგებელია Na,K-ATP-ის ყველა გამოვლინებაზე, მათ შორის ტრანსპორტულ ფუნქციაზეც.

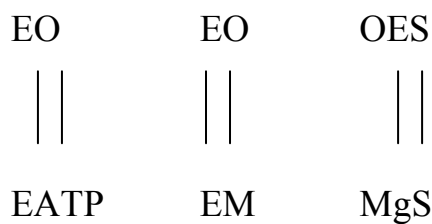
მინიმალური მოდელი აღწერს ორ სხვადასხვა ჰიდროლიზურ ციკლს: Na-ციკლს (Na-ATPაზა) და Na,K-ციკლს (Na,K-ATPაზა), რომელთაც სუბსტრატის მიმართ განსხვავებული თვისობა აქვთ; სუბსტრატის დაბალი კონცენტრაციისას აქტიობა წარმოადგენილია Na-ATPაზით, ხოლო სუბსტრატის მაღალი კონცენტრაციისას – Na,K-ATPაზით. Na-ციკლი მოიცავს: $E_1-(E_1A)-E_1MA-E_1P-E_2P-E_1$, ხოლო Na,K-ციკლი: $E_2K-(EA)-EMA-E_x-E_2K$.

პლესნერის დამსახურება შემდეგშია:

- 1) მან მკაცრად დაამტკიცა, რომ სუბსტრატი არის Mg-ATP-ის კომპლექსი და არა ATP;
- 2) სუბსტრატის აწყობა შესაძლებელია მოხდეს ფერმენტულ სისტემაზე, მაგრამ ამისათვის აუცილებელია ჯერ ATP-ის და შემდეგ Mg^{++} -ის დაკავშირება;



- 3) აღმოაჩინა ჩიხები:



- 4) დაამტკიცა 0-ATPაზას არსებობა.

ყველაზე სრულყოფილ კინეტიკურ სქემას წარმოადგენს ქომეთიანის მიერ მოწოდებული კინეტიკური სქემა, რომელიც ემყარება

როგორც სადღეისოდ არსებულ ლიტერატურულ მონაცემებს, ისე იმ ექსპერიმენტებს, რომელიც მიღებულია მის მიერვე დამუშავებული კინეტიკური მრუდების გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდით. სქემა აკმაყოფილებს ლიტერატურაში არსებულ თეორიულ მოსაზრებებს, ხსნის ამ საკითხზე არსებულ ყველა ექსპერიმენტულ ფაქტს და მოიცავს Na,K-ATP-ის ყველა შესაძლო რეჟიმს (Кометиანი, 1987).

ამ სქემის მიხედვით, Na,K-ATP-ის აქვს ოლიგომერული სტრუქტურა ერთ α სუბერთეულზე ერთი ნუკლეოტიდური უბნით. მინიმალური მოდელის პრინციპიდან (იგი გულისხმობს ფერმენტის ფორმებისა და მათ შორის რეაქციების საფეხურების მინიმალური რაოდენობის შერჩევას, რომლებიც გარკვეული წესით არიან დაკავშირებულნი და ლიგანდის ნებისმიერ კონცენტრაციაზე უზრუნველყოფენ თეორიული და ექსპერიმენტული მრუდების გეომეტრიული ფორმების თანხვედრას) გამომდინარე, Na,K-ATP-ის წარმოადგენს დიმერს ორი $\alpha\beta$ სუბერთეულით. ერთი სუბერთეულის მდგომარეობა შეუღლებულია დიმერის მეორე სუბერთეულის გადასვლებთან. პრინციპული კინეტიკური სქემის მიხედვით, Na,K-ATP-ის შეუძლია იმუშაოს როგორც თანმიმდევრული, ისე ერთდროული ტრანსპორტის რეჟიმში. თანმიმდევრულ რეჟიმში მონაწილეობს მხოლოდ მაღალი თვისობის კატალიზური უბანი, ხოლო ერთდროულში – დაბალი თვისობის უბანიც. სუბსტრატულ უბანს შეიძლება დაუკავშირდეს ATP_f ან Mg^{++}_f .

ამ სქემაში, ადრე არსებული ყველა სქემისაგან განსხვავებით, იგულისხმება ის კონფორმაციული ცვლილებებიც, რომელიც

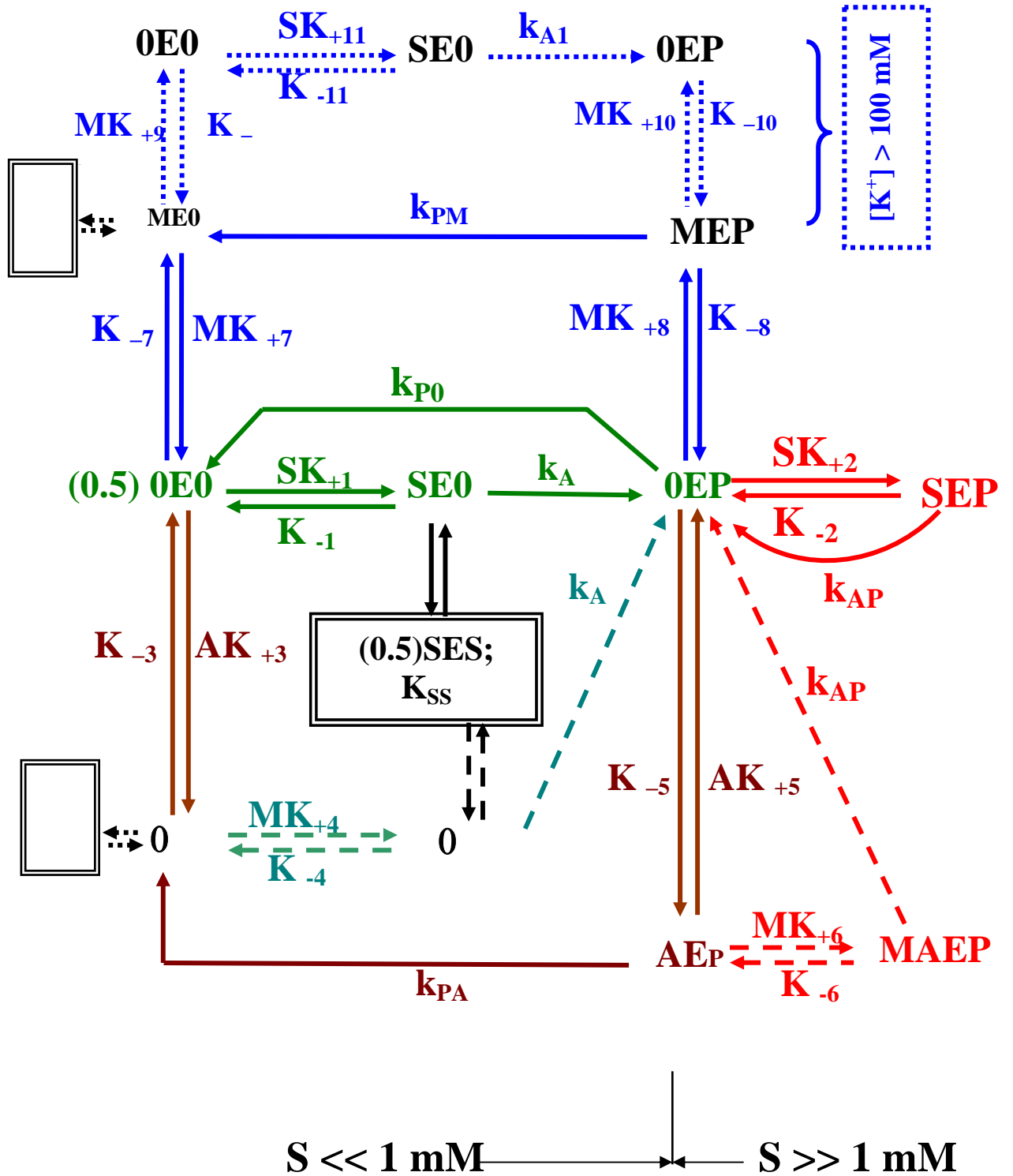
გამოწვეულია ამ ლიგანდების მოქმედებით. სქემა უშვებს Na,K-ATP-ის მიერ ATP-ის ჰიდროლიზს Na^+ და K^+ იონების არარსებობისას.

სუბსტრატის დაბალი კონცენტრაციებისათვის ($s < 1\text{mM}$) $v=f(s)$ დამოკიდებულება დეტალურად არის შესწავლილი პლესნერის მიერ (Plesner, 1981). ამ ფარგალში ქომეთიანის მონაცემები ემთხვევა პლესნერის მონაცემებს და, შესაბამისად, მის მოდელს. თუმცა, მაღალ კონცენტრაციებში ფიქსირებული $[M]$ -ის დროს $v=f(s)$ დამოკიდებულებას აქვს არასწორხაზოვანი დამოკიდებულება და არ ეთანხმება პლესნერის "მინიმალურ მოდელს", რომლის თანახმადაც, ფიქსირებული $[M]$ -ის დროს შებრუნებულ სიდიდეებში სწორხაზოვნება სუბსტრატის მაღალ კონცენტრაციებშიც უნდა შენარჩუნდეს.

ამრიგად, ექსპერიმენტულმა გამოკვლევებმა აჩვენა პლესნერის მოდელის გაფართოებისა და ზოგიერთი ფორმის დამატების აუცილებლობა, რათა ახსნილიყო ექსპერიმენტული მონაცემებით მიღებული შესაბამისი თეორიული $v=f(s)$ დამოკიდებულება. $v=f(S, A, M)$ დამოკიდებულების თეორიული ანალიზითა და მისი ექსპერიმენტთან შედარებით შეიქმნა სქემა, რომელიც მიღებულია როგორც პრინციპიალური სქემა (Кометиани, 1987). (სქემა 3).

ამ სქემაზე OEO აღნიშნავს ფერმენტის ფორმას, როდესაც არცერთი ნუკლეოტიდამაკავშირებელი უბანი არ არის დაკავებული (E-ში იგულისხმება ფერმენტის ფუნქციონალური რგოლი). სქემის მთავარი დამახასიათებელია მასში კატალიზის უნარის მქონე ფოსფორილირებული ინტერმედიატების - MEP, SEP და AEP არსებობა, რომელთაც შეუძლიათ დეფოსფორილირება. ამით ხაზი ესმება თავისუფალი Mg^{++} და თავისუფალი ATP-ის როლს, რომლებსაც აქვთ

უნარი გადაიყვანონ სისტემა სუბსტრატის – Mg-ATP-ის ჰიდროლიზის ძირითადი გზიდან დამატებით ვარიანტებზე. ეს გადაყვანა დამოკიდებულია ლიგანდების – [A] და [M] შეფარდებაზე.



$$M \equiv [Mg^{++}], A \equiv [ATP_f], S \equiv [MgATP]$$

სქემა 3. Na,K-ATP-ის სისტემის მინიმალური მოდელი

სუბსტრატის მაღალი კონცენტრაციისას შესაძლებელია ფერმენტის განშტოება SEP, რომელზეც ერთდროულად შეერთებულია როგორც სუბსტრატი, ისე ფოსფატი. ნაჩვენებია, რომ იმ მდგომარეობაში, როცა ფერმენტთან სუბსტრატი მიერთებული, თუ მას მიუერთდა თავისუფალი ATP ან თავისუფალი Mg^{++} , მაშინ ფერმენტი გადადის ჩიხურ მდგომარეობაში.

სქემის მარცხენა ნაწილი შეესაბამება სუბსტრატის დაბალ კონცენტრაციებს ($s < 1mM$), ხოლო მარჯვენა – მაღალს ($s > 1mM$). საინტერესოა ასევე ჰიდროლიზის ძირითადი გზების გამოყოფა:

- 1) როდესაც $[M] \gg [A]$ (ზედა გზა, $k_A k_{pm}$); OPM რეჟიმი
- 2) $[M] \approx [A]$ (შუა გზა, $k_A k_{ps}$); OPS რეჟიმი
- 3) $[A] \gg [M]$ (ქვედა გზა, $k_A k_{pA}$); OPA რეჟიმი

ამ სქემის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი უპირატესობა მდგომარეობს იმაში, რომ შეიცავს ფერმენტის ისეთ დამატებით ფორმებს, რომელნიც მგრძნობიარე არიან Mg^{++} და ATP-ის მიმართ, რაც $v = f(S, A, M)$ ფუნქციის არასწორხაზოვნების ახსნის საშუალებას იძლევა ცვლადების ფიქსირებისა და ვარირების სხვადასხვა პირობებში. ნაჩვენებია, რომ ეს ფორმები განსხვავდებიან Na^+ და K^+ იონების დაკავშირების უბნების რიცხვით და შესაბამისად, არსებობს რეაქციათა სხვადასხვა ციკლები სხვადასხვა ენდოგენურობის კოეფიციენტით. $[Mg^{++}]$ სიჭარბისას ფერმენტულ სისტემას შეუძლია იმუშაოს იონთა გადატანის რეჟიმით: $4Na^+ : 1K^+$ და $4Na^+ : 0K^+$ უჯრედგარე არეში K^+ -ის სიჭარბისას ($[K^+] > 100mM$),

ან ასევე $3\text{Na}^+:1\text{K}^+$ და $3\text{Na}^+:0\text{K}^+$ უჯრედგარე არეში K^+ -ის ნაკლებობისას ($[\text{K}^+] < 100\text{mM}$).

ამრიგად საბოლოოდ უნდა ითქვას, რომ ჩვენს მიერ შემოთავაზებული Na,K-ATPase სისტემის მუშაობის ამსახველი კინეტიკური სქემა (სქემა 3) ითვალისწინებს ჩვენს მიერ მიღებულ ექსპერიმენტულ შედეგებს და ამავდროულად ხსნის ლიტერატურაში არსებულ მონაცემებს. მის საფუძველზე შეიძლება ითქვას, რომ წარმოდგენილი სქემა ყველაზე უფრო მიახლოებულია Na,K-ATPase ს ჰემმარიტ მოლეკულურ მექანიზმთან.

2. Na,K-ATPase და ნეიროტრანსმიტერულ სისტემებს

შორის კავშირი

ნეიროქიმიური გადაცემა, რომელიც რთული, თანმიმდევრულად განხორციელებადი პროცესების ერთობლიობას წარმოადგენს, გულისხმობს ნეიროტრანსმიტერების ბიოსინთეზს, ვეზიკულაციას, ტრანსპორტს, სეკრეციას, მის დაკავშირებას რეცეპტორთან, ინაქტივიზაციას, უკუმთანთქმას და სხვა მრავალმხრივ გარდაქმნას, რომლებიც მიმდინარეობს არე და პოსტინაფსურ მემბრანებში. ნეიროტრანსმიტერებით მიღებული გარეგანი სიგნალი გარდაიქმნება შიდაუჯრედულ სიგნალად, რის შედეგადაც მემბრანული პოტენციალი ისე იცვლება, რომ პოსტინაფსურ ნეირონზე ვითარდება მოქმედების პოტენციალი, დეპოლარიზაცია ან ჰიპერპოლარიზაცია - შესაბამისად აგზნება და შეკავება. ეს უკანასკნელი შეიძლება განხორციელდეს ნეიროტრანსმიტერების პირდაპირი მოქმედებით იმ რეცეპტორებთან, რომელიც იონური არხების შემადგენელ კომპონენტებს წარმოადგენენ,

ან მემბრანული ცილების რიგით, რომლებიც მოქმედებენ თანმიმდევრობით. თითოეულის მოქმედება მომდევნო ცილაში იწვევს სტრუქტურულ ცვლილებებს. გარკვეულ ეტაპზე ინფორმაციის შემდგომი გადაცემა ხდება მეორადი მესენჯერებით, რომლებიც წარმოადგენილია იონებით ან მცირე ზომის მოლეკულებით.

სიგნალის გადაცემის ნებისმიერი მექანიზმი დაკავშირებულია ნერვული უჯრედის პლაზმატურ მემბრანასა და სინაფსში მიმდინარე პროცესებთან. ამიტომ ჯერ კიდევ სამოციან წლებში ქომეთიანის მიერ დაისვა საკითხი: ხომ არ არსებობს კავშირი ნეიროტრანსმიტერულ სისტემებსა და Na,K-ATP-აზურ სისტემას შორის, რადგან ეს უკანასკნელი ასევე სინაფსურ ფერმენტს წარმოადგენს და, გარდა იმისა, რომ ხელს უწყობს Na^+ და K^+ ასიმეტრიული განაწილების შექმნას და შენარჩუნებას, რაც თავის მხრივ ელექტრული პოტენციალის გენერაციის საფუძველს წარმოადგენს, თავისი ელექტროგენურობით უშუალოდ მონაწილეობს მის წარმოქმნაში.

სადღეისოდ არსებული მრავალრიცხოვანი მონაცემები აშკარად მიუთითებენ, რომ ნეიროტრანსმიტერულ და Na,K-ATP-აზურ სისტემებს შორის არსებობს ურთიერთკავშირი და მას ფუნქციონალური მნიშვნელობა აქვს. მაგრამ ქრონოლოგიურად თუ განვიხილავთ კვლევის შედეგებს, ყურადღებას იპყრობს ჯერ კიდევ კიდევ ადრე მიღებული მონაცემები, რომელიც აღნიშნული საკითხის შესწავლის საწყის ეტაპს წარმოადგენს.

ქომეთიანისა და კალანდარიშვილის მიერ ვირთაგვას თავის ტვინიდან მიღებული მიკროსომულ პრეპარატებში ნაჩვენები იქნა, რომ აცეტილქოლინესთერაზულ (ACIE) და Na,K-ATP-აზურ სისტემებს შორის

არსებობს გარკვეული ურთიერთკავშირი. კერძოდ, ერთი სისტემის ინჰიბიტორი თუ აქტივატორი გავლენას ახდენს მეორე სისტემაზე. იზოსტიგმინი, აცეტილქოლინესტერაზის ინჰიბატორი, უმნიშვნელო გავლენას ახდენს Na,K-ATP-აზაზე, ხოლო Na,K-ATP-აზის სპეციფიკური ინჰიბიტორი, ოუბაინი, აკავებს აცეტილქოლინესტერაზულ აქტიობას. მეორეს მხრივ, Na,K-ATP-აზის სუბსტრატი, ATP და მისი გარდაქმნის პროდუქტი ADP, აკავებს აცეტილქოლინესტერაზულ აქტიობას. აცეტილქოლინი, აცეტილქოლინესტერაზის სუბსტრატი, აქვეითებს Na,K-ATP-აზურ აქტიობას და არ მოქმედებს Mg-ATP-აზაზე. მაქსიმალური შეკავება მიიღწევა Na^+ და K^+ იონების კონცენტრაციის ისეთი შეფარდებისას, რომელიც ოპტიმალურია Na,K-ATP-აზის მუშაობისთვის. იონთა კოპცენტრაციის შეფარდების შეცვლისას შესაბამისად მცირდება ინჰიბიცია და უკიდურესად შემცირებისას დადის ნულამდე. იონთა შემადგენლობას ასევე გავლენა აქვს ATP, ADP და ოუბაინის აცეტილქოლინესტერაზაზე მოქმედების ეფექტზე. (Каландаришвили, Кометиани, 1969; Кометиани, 1970; Каландаришвили, Аревшятов, 1972).

შემდგომში ეს ეფექტი შესწავლილი იყო ვირთაგვას თავის ტვინის სინაპტოსომურ ფრაქციაზე (Логуа, Кометиани, 1970; Кометиани, 1972). მიღებული შედეგებით დადასტურდა აცეტილქოლინესტერაზულ და Na,K-ATP-აზურ სისტემებს შორის ურთიერთკავშირის არსებობა, და გამოთქმული იქნა მოსაზრება რომ აცეტილქოლინის Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების შესაძლებელი მექანიზმის შესახებ. კერძოდ, გამოითქვა ვარაუდი რომ, აცეტილქოლინის მაინჰიბირებელი ეფექტი Na,K-ATP-აზაზე არაა დაკავშირებული არც აცეტილქოლინესტერაზის

კატალიზური ცენტრის და არც ქოლინრეცეპტორის ფუნქციონირებასთან, აცეტილქოლინი ქოლინრეცეპტორულ და აცეტილქოლინესთერაზულ ცენტრთან დაკავშირების პარალელურად უკავშირდება მემბრანის კომპონენტს, რომელსაც X-ცენტრი უწოდეს. X-ცენტრი საერთოა ორივე სისტემისათვის და განაპირობებს კავშირს აღნიშნულ ორ, აცეტილქოლინესთერაზულ და Na,K-ATP-აზურ სისტემას შორის. მათვე გამოთქვეს მოსაზრება, რომ X-ცენტრი, თავისი სტრუქტურით, მკვეთრად უნდა განსხვავდებოდეს რეცეპტორული ცენტრისაგან და მცირედ ესთერაზულისაგან, რაც გამომდინარეობს იქიდან, რომ ატროპინი, ქოლინრეცეპტორის ინჰიბიტორი, სულ არ ცვლის აცეტილქოლინის Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების ეფექტს. აცეტილქოლინესთერაზის ინჰიბიტორი, ფიზოსტიგმინი კი უმნიშვნელოდ მოქმედებს მასზე. ავტორებმა დაუშვეს, რომ X-ცენტრი შესაძლებელია წარმოადგენდეს მემბრანულ ცილას, რომლის საშუალებით ტრანსპორტული ATP-აზა და აცეტილქოლინესთერაზა დაკავშირებულია ერთმანეთთან. მათ კონფორმაციულ მდგომარეობაზე დამოკიდებულია როგორც აცეტილქოლინესთერაზული, ასევე Na,K-ATP-აზური აქტიობა. სინაპტოსომალური ფრაქციის NaI-ით დამუშავებისას, წყდება კავშირი აცეტილქოლინესთერაზას და Na,K-ATP-აზურ სისტემებს შორის; აცეტილქოლინი აღარ მოქმედებს Na,K-ATP-აზაზე, რადგან კომპლექსი იშლება, X-ცენტრი გადადის ფრაქციაში რომელიც აცეტილქოლინესთერაზას შეიცავს.

X-ცენტრი განთავსებულია მემბრანის გარეთა მხარეს. აცეტილქოლინის დაკავშირება X-ცენტრთან რეგულირდება Na^+ და K^+ იონების კონცენტრაციის შეფარდებით. Na^+ და K^+ იონების

გარკვეული შეფარდება განაპირობებს აცეტილქოლინის X-ცენტრთან დაკავშირებას და აქტიური ტრანსპორტის ინჰიბიციას. მოქმედების პოტენციალის შედეგად Na^+ და K^+ იონების კონცენტრაციის შეფარდება მკვეთრად მცირდება, რაც იწვევს აცეტილქოლინის გამოთავისუფლებას X-ცენტრიდან და აცეტილქოლინესთერაზა შლის მას. სისტემა უბრუნდება პირვანდელ მდგომარეობას.

შემდგომში ეს საკითხი კიდევ უფრო დეტალურად იქნა შესწავლილი ქომეთიანისა და თანაავტორების მიერ. ნანახი იქნა აცეტილქოლინის სხვადასხვა კონცენტრაციების მოქმედება სხვადასხვა სუბუჯრედულ და სუბსინაფსურ ფრაქციებში. ასევე შემოწმებული იქნა ეფექტის დამოკიდებულება EGTA-სა და დეტერგენტების მიმართ, სადაც გამოჩვენდა მთელი რგი კანონზომიერებანი, რომელიც აცეტილქოლინის $\text{Na},\text{K}-\text{ATP}$ -აზაზე მოქმედებისთვისაა დამახასიათებელი და დაისვა საკითხი სხვა ნეიროტრანსმიტერული სისტემებისა და $\text{Na},\text{K}-\text{ATP}$ -აზის ურთიერთკავშირის შესწავლისა (Кометиანი и др., 1975).

აღმოჩნდა, რომ ზოგიერთი ნეიროტრანსმიტერი, როგორცაა გლუტამატი, ასპარტატი, GABA, გლიცინი, პროლინი, არ მოქმედებენ ვირთაგვას თავის ტვინიდან მიღებულ სინაფსური მემბრანების $\text{Na},\text{K}-\text{ATP}$ -აზაზე (Jariashvili, 2001); ხოლო სხვა ნეიროტრანსმიტერები, როგორცაა ნორადრენალინი (NA), დოფამინი (DA), სეროტონინი (5-HT), ჰისტამინი, მოქმედებენ $\text{Na},\text{K}-\text{ATP}$ -აზაზე და ამჟღავნებენ ისეთივე კანონზომიერებებს, როგორც ACI -თვისაა დამახასიათებელი (Джариашвили, Кометиანი, 1975). კერძოდ, აღმოჩნდა რომ არსებობს ნეიროტრანსმიტერის ეფექტი, მას უნივერსალური ხასიათი აქვს.

Na,K-ATP-აზური აქტიობის ცვლილება ნეიროტრანსმიტერების მოქმედების მიმართ ყველა შემთხვევაში დამოკიდებულია ნეიროტრანსმიტერის კონცენტრაციაზე და როგორც წესი, ორფაზოვანი ხასიათისაა. ნეიროტრანსმიტერის დაბალი კონცენტრაციისას ადგილი აქვს აქტივაციას, ზოგიერთ შემთხვევაში ინჰიბიციას, ხოლო კონცენტრაციის გაზრდისას ინჰიბიციას. სარეაქციო არეში EGTA-ს დამატება ხსნის დაბალი კონცენტრაციებით გამოწვეულ ეფექტს, ხოლო მაღალი კონცენტრაციით გამოწვეულ ეფექტზე არ მოქმედებს ან ძალიან სუსტად მოქმედებს და რამდენადმე ამცირებს მას (Кометиани и др., 1975; Джариашვილი, Кометиани, 1975).

გამოითქვა მოსაზრება, რომ ნეიროტრანსმიტერების დაბალი და მაღალი კონცენტრაციებით გამოწვეული ეფექტის განსხვავებული მგრძობელობა EGTA-ს მიმართ შესაძლებელია გამოწვეული იყოს ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების სხვადასხვა მოლეკულური მექანიზმის არსებობით. ამ მოსაზრებას ამყარებს ის ფაქტი, რომ დაბალი კონცენტრაციების ეფექტი სპეციფიკურია და მხოლოდ სინაფსური მემბრანებისთვისაა დამახასიათებელი, მაშინ, როდესაც მაღალი კონცენტრაციების ეფექტი ვლინდება როგორც სინაფსურ, ისე მიკროსომულ ფრაქციაში, რაც თავისთავად მიუთითებს იმაზე, რომ დაბალი კონცენტრაციების ეფექტი, სინაფსურ გადაცემასთან კავშირში უნდა წარმოვიდგინოთ (Кометиани и др., 1975).

იგივე საკითხი შესწავლილ იქნა სხვადასხვა ლაბორატორიებში, სხვადასხვა ობიექტებზე, სხვადასხვა ფრაქციებში. ნეიროტრანსმიტერების ეფექტი ნერვული ქსოვილის Na,K-ATP-აზაზე ნანახი იქნა სხვადასხვა ავტორების მიერ. ნორადრენალინის

მასტიმულირებელი გავლენა თავის ტვინის სინაპტოსომალურ Na,K-ATPაზაზე ნაჩვენები იქნა ჯილბერტის მიერ (Gilbert et al., 1975), ხოლო სხვა ავტორების მონაცემებით, თავის ტვინის სინაფსურ მემბრანებში (Vizi, 1972), ასევე არასიმპათიკურ ნერვებზე (Poton, 1971) მიიღებოდა შეკავება. გლებოვისა და დმიტრიევას მიერ, ვირთაგვის თავის ტვინის ქერქში, ნორადრენალინის (0,75-2,0 mM) დამატებით, მჟღავნდებოდა ინჰიბიცია, ხოლო უფრო დაბალ კონცენტრაციაზე ეფექტი არ შეინიშნებოდა. ამავე ავტორების მონაცემებით, აცეტილქოლინი ინჰიბირებდა Na,K-ATPაზას და არ მოქმედებდა MgATPაზაზე (Глебнев, Дмитриева, 1974). აჩვენები იქნა ნორადრენალინის და სეროტონინის გავლენა ტვინის ქსოვილის დიგიტონიან ექსტრაქტში (Тяхепилдъ и др., 1971), ხოლო თავის ტვინის ქერქის ჰომოგენატში, ნათხემში და ზოლიან სხეულში სეროტონინისა და დოფამინის ეფექტი (Logan, O'Donovan, 1975; Desai, 1976; Tsukada, 1982); სხვა ავტორების მიერ კატექოლამინებისა და სეროტონინის ეფექტი (Logan, O'Donovan, 1975), ასევე დოფამინის მაინჰიბირებელი გავლენა ნაჩვენები იქნა სინაპტოსომურ Na,K-ATP-აზაზე, ხოლო ნორადრენალინის, აცეტილქოლინის, დოფამინის და GABA-ს ეფექტი შესწავლილი იყო როგორც სინაპტოსომურ, ასევე მიკროსომულ პრეპარატებზე (Voth, York, 1976; Ho, Desai, 1978.)

მიღებული შედეგებიდან გამოიკვეთა ნეიროტრანსმიტერების მკაცრად განსაზღვრული შერჩევითობა მემბრანის ტიპის მიხედვით, კერძოდ: ნეიროტრანსმიტერების მოქმედების ხასიათი დამოკიდებულია იმ მემბრანის ტიპზე, რომელშიც ლოკალიზებულია Na,K-ATP-აზა: ღვიძლის, თირკმლის მიკროსომული ფრაქციების, ასევე

ერიტროციტების ჩრდილების, ბაყაყის საჯდომი ნერვის და ნეიროგლიის Na,K-ATP-აზა არაა მგძნობიარე ნეიროტრანსმიტერების მიმართ. ასევე, გველთევზას ელექტრული ორგანოსა და ზღვის ფრინველების სამარილე ჯირკვლების Na,K-ATP-აზა, რომელიც განსაკუთრებით მაღალი აქტიობით ხასიათდება, არაა მგძნობიარე ნეიროტრანსმიტერების მიმართ, მაშინ, როდესაც ვირთაგვას თავის ტვინის Na,K-ATP-აზა მაღალ მგრძნობელობას იჩენს მათ მიმართ (Кометиани, Каландаришвили, 1969; Болдырев, 1971; Ткачук и др., 1972; Каландарившиვი, Аревшятов, 1972; Кометиани и др., 1975; Джаришвили, Кометиани, 1975).

ნეიროტრანსმიტერების მოქმედების ეფექტი განსხვავებულია ტვინის სხვადასხვა სუბუჯრედულ ფრაქციებში. ბუნებრივია, ეფექტი არ არის იმ ფრაქციებში, სადაც არაა Na,K-ATP-აზა – მიტოქონდრიულ, ვეზიკულურ და მიელინურ ფრაქციებში. ნაკლებადაა მიკროსომულში და განსაკუთრებით ძლიერად მჟღავნდება სინაპტოსომურ ფრაქციაში. ამასთან, თვით სინაფსური ფრაქციის სხვადასხვა სუბსინაფსურ ფრაქციებში ეფექტი სხვადასხვა სიღრმით ვლინდება. კერძოდ, სინაფსური ფრაქციის დამუშავებისას დეტერგენტ ტრიტონ X-100-ით, შემაერთებელი კომპლექსით მდიდარი ფრაქცია მიიღება. ამ შემთხვევაში Na,K-ATP-აზური აქტიობა მცირდება, ხოლო ნეიროტრანსმიტერებით გამოწვეული შეკავება იზრდება. აღმოჩნდა, რომ დაბალი კონცენტრაციების ეფექტი, რომელიც სინაფსური ფრაქციისთვის არის დამახასიათებელი, მაქსიმალურად მჟღავნდება იმ ფრაქციებში, რომელიც მდიდარია შემაერთებელი კომპლექსით (Джарившиლი, Кометиани, 1975).

ნეიროტრანსმიტერების ეფექტის განსხვავება ფერმენტის ლოკალიზაციის მიხედვით, მისი ქსოვილური სპეციფიკურობა, ანუ ის ფაქტი, რომ Na,K-ATP-აზა განსაკუთრებულად სინაფსურ მემბრანებში ამჟღავნებს ნეიროტრანსმიტერებისადმი მგრძობელობას, მიუთითებს იმაზე, რომ ნეიროტრანსმიტერების ეფექტი სპეციფიკურია და დამახასიათებელია ქიმიურად აგზნებადი მემბრანებისათვის. თუმცა, ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების სპეციფიკურობის, მისი სინაფსურ გადაცემაში მონაწილეობაზე სრული მტკიცებებისათვის საჭიროა ეფექტის დეტალური შესწავლა, რასაც ხელს უშლის ის ფაქტი, რომ ფრაქციები, რომელიც გამოყენებული იყო ამ ეფექტის შესწავლისთვის, ჰეტეროგენულია, წარმოდგენილია ტვინის განსხვავებული უბნების სინაფსების მემბრანული ფრაგმენტებით და ხასიათდება სხვადასხვა სინაფსების შემცველობით, რომელიც სპეციფიკურია ცალკეული ნეიროტრანსმიტერისათვის. ამიტომ, შესაძლებელია მიღებული ეფექტი არის ნეიროტრანსმიტერის Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების სიღრმით და ხასიათით განსხვავებული ეფექტების ჯამი.

ამ წინააღმდეგობის მოხსნის საშუალებად, კვლევის შემდგომ ეტაპზე, ქომეთიანმა და თანაავტორებმა, ჩათვალეს, ნეიროტრანსმიტერების ეფექტის შესწავლა Na,K-ATP-აზაზე ვირთაგვას თავის ტვინის სხვადასხვა უბნებში. მათ ივარაუდეს რომ ტვინის სხვადასხვა უბნების Na,K-ATP-აზა სხვადასხვა მგრძობელობას უნდა იჩენდეს ნეიროტრანსმიტერების მიმართ, რადგანაც ფუნქციონალურად განსხვავებული სინაფსები ამ უბნებში განაწილებულია არათანაბრად. ეს ვარაუდი ექსპერიმენტში გამართლდა (Kometiani et al., 1984) –

ნეიროტრანსმიტერების მოქმედების ჯამური სურათი თითოეულ უბანში განსხვავებულად გამოიყვანება.

სამი ნეიროტრანსმიტერის - აცეტილქოლინის, ნორადრენალინის, სეროტონინის, მოქმედების შესწავლით ტვინის ოთხ უბანში: ქერქში, ნათხემში, ხიდში და ტვინის ღეროვან ნაწილში, ნაჩვენებია იქნა, რომ თითოეული მითითებული ნეიროტრანსმიტერი ტვინის აღნიშნული სინაფსური მემბრანების Na,K-ATP-აზაზე განსხვავებულად მოქმედებს.

ეფექტი განსხვავებულია როგორც მოქმედების ხასიათით, ასევე სიღრმით. კერძოდ, ნორადრენალინი ინჰიბირებს Na,K-ATP-აზას ტვინის ოთხივე უბანში, თუმცა ინჰიბიციის ხარისხს ნორადრენალინის კონცენტრაციისგან დამოკიდებულებით თითოეულ შემთხვევაში აქვს მისთვის დამახასიათებელი, სხვა უბნისაგან განსხვავებული სახე (Kometiani et al., 1984).

რაც შეეხება აცეტილქოლინსა და სეროტონინს, მათი ეფექტი ტვინის სხვადასხვა უბნების სინაფსური მემბრანების Na,K-ATP-აზაზე განსხვავებულია არა მარტო სიღრმით, არამედ ხასიათითაც. მაგალითად, სეროტონინი, რომელიც ააქტივებს Na,K-ATP-აზას შუამდებარე და შუა ტვინის უბანში, ხიდში იწვევს მის ინჰიბიციას. აცეტილქოლინი, რომელიც შუა და შუამდებარე ტვინის Na,K-ATP-აზაზე ორფაზოვან ეფექტს იწვევს, სრულიად არ მოქმედებს ხიდის Na,K-ATP-აზაზე, ხოლო ქერქში გამააქტივებელ ეფექტს ამჟღავნებს.

მიღებული შედეგების საფუძველზე, ავტორებმა გამოთქვეს ვარაუდი, რომ არსებობს კორელაცია, თუ მოცემულ უბანში წამყვანია რომელიმე ნეიროტრანსმიტერი, Na,K-ATP-აზა ამ ნეიროტრანსმიტერის მიმართ ამჟღავნებს მეტ მგრძობელობას, სხვის მიმართ კი ნაკლებს.

მსგავსი შედეგები იქნა მიღებული სხვა ავტორების მიერ, სადაც განსხვავებულად გამოქვეყნდა ტვინის სხვადასხვა უბნებში Na,K-ATP-აზაზე ნორადრენალინისა და სეროტონინის ეფექტი (Hernandez, 1987, 1992; Hernandez, Condes-Lara, 1992).

ტვინის ექვს უბანში სეროტონინის Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების შესწავლისას, ოთხ უბანში შეინიშნებოდა სეროტონინის კონცენტრაციაზე დამოკიდებული Na,K-ATP-აზური აქტიობის ცვლილება განსხვავებული ხარისხით, ხოლო ორ უბანში - ქერქში და ნათხემში, ეფექტი ყველაზე ძლიერად იყო გამოხატული. ავტორების აზრით, სეროტონინი მოდულირებს ტვინის Na,K-ATP-აზურ აქტიობას სპეციფიკური რეცეპტორების საშუალებით, რომლებიც შესაბამის უბნებშია ლოკალიზებული.

ნეიროტრანსმიტერების ეფექტი Na,K-ATP-აზაზე მეტ სპეციფიურობას იჩენს ფრაქციის, სინაფსური სტრუქტურების ჰომოგენურობის გაზრდით. ამის გამოვლინებას წარმოადგენს ცდების შემდეგი სერიებით მიღებული შედეგები. კერძოდ, დოფამინერგული დაბოლოებებით მდიდარი უბნებიდან მიღებული Na,K-ATP-აზის პრეპარატზე დოფამინის ეფექტის შედარება ნათხემის და ტვინის დანარჩენი უბნებიდან მიღებულ პრეპარატზე მიღებულ ეფექტთან, აჩვენა, რომ დოფამინისადმი განსაკუთრებით მაღალი გრძნობელობით ხასიათდება ის Na,K-ATP-აზა, რომელიც მიღებულია დოფამინერგული დაბოლოებებიდან. მცირე კონცენტრაციების ეფექტი, რომელსაც ფუნქციონალური მნიშვნელობა, აქვს შეიმჩნეოდა მხოლოდ დოფამინერგულ დაბოლოებებიდან მიღებულ ფრაქციაში და არ

მჟღავნებოდა დანარჩენი უბნებიდან მიღებულ პრეპარატში (Джапаридзе и др., 1981).

ასევე, ქოლინერგულ და ადრენერგულ სინაპტოსომებში აცეტილქოლინისა და ნორადრენალინის მოქმედების შესწავლის შედეგად მიღებული მონაცემებით აღმოჩნდა, რომ ნორადრენალინი სპეციფიკურად მოქმედებს ადრენერგულ სინაპტოსომებში, მაშინ, როდესაც ქოლინერგულ სინაპტოსომებში მისი მოქმედება პრაქტიკულად არ მჟღავნდება. აცეტილქოლინი პირიქით, სარწმუნოდ ცვლიდა ქოლინერგული სინაპტოსომების Na,K-ATP-აზას, თუმცა არ მოქმედებდა ადრენერგულ სინაპტოსომებზე (Джапаридзе и др., 1982).

ადრენერგულ და ქოლინერგულ სინაპტოსომებში, რომელთა შორის არის სხვაობა, როგორც მორფოლოგიური, ასევე ფუნქციონალური თვალსაზრისით, ასევე დოფამინერგული ნერვული დაბოლოებებით მდიდარ ფრაქციაში, ნეიროტრანსმიტერების სინაფსური სპეციფიურობის გამოვლენა მიუთითებს ეფექტის ფუნქციონალურ მნიშვნელობაზე. ამაზევე მიუთითებს ეფექტის ფერმენტული სპეციფიკურობა, კერძოდ, ფერმენტები, რომლებიც ლოკალიზებული არიან სინაფსურ მემბრანებში, როგორცაა MgATP-აზა, აცეტილქოლინესტერაზა, Ca-Mg-ATP-აზა და Ca-ATP-აზა, რომელიც ასევე ტრანსპორტულ ფერმენტს წარმოადგენს, არ ამჟღავნებენ მგრძობელობას ნეიროტრანსმიტერების მიმართ (Джаришвили и др., 1993).

ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების ეფექტის ფუნქციონალური მნიშვნელობის გამოვლენის თვალსაზრისით, ერთ-ერთი საინტერესო შედეგი იყო მიღებული ცდებით, რომელიც

ტარდებოდა განვითარების პროცესში, კერძოდ, როდესაც ხდება ახალი სინაფსების ჩამოყალიბება. კერძოდ, ექსპერიმენტული მონაცემები მიღებული იყო ორი ძირითადი ასაკობრივი ჯგუფიდან: 14-დღიანი და 11–12 თვიანი ვირთაგვებიდან მიღებულ პრეპარატებზე.

აღნიშნულ პრეპარატებზე $AC1$, NA , $5-HT$ და DA მოქმედების შესწავლისა და შედარების შედეგად, ნათლად გამოიკვეთა, რომ განვითარების პროცესში შეიმჩნეოდა თვისობრივი ცვლილება ნეიროტრანსმიტერების უნარისა, არეგულიროს სინაპტოსომური წარმოშობის მემბრანული $Na,K-ATP$ -აზა. თუ ნეიროტრანსმიტერების $Na,K-ATP$ -აზაზე მოქმედებას გავყოფთ $EGTA$ - დამოუკიდებელ და $EGTA$ - დამოკიდებულ ნაწილებად, მიღებული შედეგების მიხედვით $EGTA$ -დამოკიდებული მოქმედება ონტოგენეზის პროცესში ცვლილებას არ განიცდის, $EGTA$ -დამოკიდებული მოქმედება კი, როგორც აქტივაცია, ისე ინჰიბიცია, ონტოგენეზის პროცესში სარწმუნოდ მცირდება (Цакадзе, Джариашвили, Кометиანი, 1987).

ნეიროტრანსმიტერების $Na,K-ATP$ -აზაზე მოქმედების დამოკიდებულება ონტოგენეზის პროცესში ასევე გვიჩვენებს, რომ ეფექტს აქვს ფუნქციონალური მნიშვნელობა და მიღებული ცვლილებები დაკავშირებულია იმ ბიოქიმიურ და ფიზიოლოგიურ პროცესებთან, რომლებსაც ადგილი აქვს ვირთაგვას თავის ტვინის განვითარების პროცესში.

ნეიროტრანსმიტერების $Na,K-ATP$ -აზაზე მოქმედების შესწავლის კვლევის პროცესში ავტორების მიერ შეიმჩნეოდა ზოგიერთი კანონზომიერება, კერძოდ:

1. ნებისმიერი ნეიროტრანსმიტერის მოქმედების კონცენტრაციული დამოკიდებულების მრუდის ფორმა (აქტივაცია, ინჰიბიცია, ორფაზოვანი დამოკიდებულება) არაერთნაირი იყო, იცვლებოდა კინეტიკური სურათი. სხვადასხვა დროს მიღებულ პრეპარატებში იცვლებოდა აქტივაციური ეფექტის სიღრმე და ინჰიბიციის ხარისხი, შესაბამისად აქტივაციისა და ინჰიბიციის კონცენტრაციის ფარგლები.
2. პრეპარატის ქელატორებით დამუშავებისას ან გარეცხვით ქრებოდა აქტივაციური ეფექტი, ინჰიბიცია კი შენარჩუნებული იყო.
3. პრეპარატის ძლიერი დამუშავებისას დეტერგენტით (მაგ. NaI-ით) ქრებოდა ინჰიბიციური ეფექტიც, თუმცა Na,K-ATP-აზური აქტიობა მკვეთრად იზრდებოდა.
4. ფერმენტის პრეინკუბაციისას ნეიროტრანსმიტერთან ერთად, რომლის დროსაც სავარაუდოდ ხდება რაიმე კომპონენტის დისოციაცია ან რაიმე სხვა ურთიერთქმედება მემბრანასთან, ცვლიდა ნეიროტრანსმიტერის Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების ეფექტს.

აქედან გამომდინარე, გამოითქვა ვარაუდი, რომ ინჰიბიციური ეფექტი დაკავშირებული უნდა იყოს მემბრანასთან მჭიდროდ დაკავშირებულ ცილებთან, ხოლო აქტივაციური ეფექტი - იმ კომპონენტებთან, რომლებიც სუსტად არიან დაკავშირებული მემბრანასთან და სხვადასხვა პირობებში შედარებით ადვილად ხდება მათი დისოციაცია. შესაძლებელია, ქელატორებით დამუშავებისას ხდება Ca-ის იონების იმობილიზაცია, ხდება მემბრანასთან სუსტად

დაკავშირებული კომპონენტების კავშირის შესუსტება და აქტივაცია იკარგება. ავტორების აზრით, შესაძლებელია ამ ეფექტში მონაწილეობს ისეთი ადვილად დისოცირებადი კომპონენტები, რომელიც ფერმენტის დეტერგენტით დამუშავების გარდა, შესაძლებელია პრეინკუბაციის ან პრეპარატის მიღების დროსაც დისოცირდეს კომპლექსიდან.

ეს უნდა იყოს რეგულატორული ფაქტორი, რომელიც ნეიროტრანსმიტერით ფერმენტის აქტივაციაზეა პასუხისმგებელი და ჩართული უნდა იყოს Na,K-ATP-აზის რეგულაციის მექანიზმში (Кометиани, Цакадзе, Джариашვილი, 1988).

ეს მოსაზრება ნაწილობრივ ხსნის ონტოგენეზში შემჩნეულ ნეიროტრანსმიტერის მოქმედების რაოდენობრივი მხარის ცვლილებებს Na,K-ATP-აზაზე. ავტორებმა დაუშვეს, რომ შესაძლებელია პრეპარატში, რომელიც სხვადასხვა ასაკის ვირთაგვას თავის ტვინიდან მზადდებოდა, კომპლექსი მარეგულირებელი ცილით, არათანაბრად იყოს წარმოდგენილი.

3. სინაპტოსომური ფაქტორების ეფექტი ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATP-აზაზე მოქმედებაზე

ზემოთ მოყვანილი მონაცემების საფუძველზე, ავტორების მიერ გამოთქმული ვარაუდი იმის შესახებ, რომ ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATP-აზაზე მოქმედებაში უნდა მონაწილეობდეს ერთი ან რამდენიმე ხსნადი ან პერიფერიული დისოცირებადი რეგულატორული კომპონენტი, გამართლდა.

უხეში მიტოქონდრიული ფრაქციის ოსმოსური შოკის შედეგად მიღებულ სუპერნატანტში მართლაც აღმოჩნდა ცილები,

სინაპტოსომალური ფაქტორები, რომელთა დამატება სარეაქციო არეში ცვლის Na,K-ATP-აზურ აქტიობას და არეგულირებს ნეიროტრანსმიტერის ეფექტს Na,K-ATP-აზაზე. კერძოდ, მიღებული სინაპტოსომური ფაქტორი (SF), ინჰიბირებს Na,K-ATP-აზურ აქტიობას (დაახლოებით 20-30%-ით), ხოლო ნეიროტრანსმიტერთან ერთად სარეაქციო არეში შეტანისას იხსნება როგორც მისი უშუალო მოქმედებით, ასევე ნეიროტრანსმიტერთი გამოწვეული ინჰიბიცია და ფერმენტი აქტივდება. SF-ის ტემპერატურული დამუშავებით 82°C 5 წთ დენატურირებული ცილების მოცილების შემდეგ, მიღებულ ფრაქციას SF_T-ს შენარჩუნებული აქვს SF-ის თვისებები. ისინი ნაკლებად განსხვავდებიან როგორც Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების თვალსაზრისით, ასევე ნეიროტრანსმიტერებთან ერთად Na,K-ATP-აზის გააქტივების უნარით, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ SF არ წარმოადგენს ფერმენტულ ცილას და ინერტულ ცილებს მიეკუთვნება.

SF და SF_T-ს დიალიზის შედეგად (სადიალიზო პარკით, რომელიც ატარებს მოლეკულებს Mr<10KD 20-48 სთ-ს განმავლობაში, 8-10°C) მიღებულ შესაბამის ფრაქციებს (SFD და SF_TD) Na,K-ATP-აზის მაინჰიბირებელი თვისება დაეკარგა, ხოლო ნეიროტრანსმიტერებთან ერთად Na,K-ATP-აზის გააქტივების უნარი შენარჩუნებული ჰქონდა.

აქედან გამომდინარე, ავტორებმა ივარაუდეს, რომ დიალიზის შედეგად SF-ს სცილდება მაინჰიბირებელი, დაბალმოლეკულური კომპონენტი, ხოლო აქტივაციის უნარის მქონე მაღალმოლეკულური კომპონენტი დიალიზატში რჩება, რაც მიგვანიშნებს სინაპტოსომური ფაქტორის ჰეტეროგენურობაზე. კერძოდ, SF უნდა შეიცავდეს სულ მცირე ორ მარეგულირებელ ფაქტორს - მაინჰიბირებელს და

გამააქტივებელს, რომლებიც მონაწილეობენ Na,K-ATP-აზის მოქმედების რეგულაციაში (Кометиани и др., 1988).

შემდგომში, სეფადექს G-50-ზე სინაპტოსომური ფაქტორის გელფილტრაციით, მართლაც გამოიყო ორი პიკი ამათგან პირველი ნეიროტრანსმიტერთან ერთად გამააქტივებელი კომპონენტის შემცველი ფრაქცია, SF_a იყო, ხოლო მეორე Na,K-ATP-აზის მაინჰიბირებელი – SF_i. ხოლო SF-ის მაღალეფექტური ქრომატოგრაფიით გელფილტრაციული ფრაქციონირებისას ძირითადად გამოიკვეთა ოთხი ფრაქცია, რომელიც 1-5 KD-დან 100-200 KD-მდე იყო, რაც მიუთითებს ფაქტორის მრავალკომპონენტურობაზე.

აღნიშნული ოთხი ფრაქციიდან Mg-ATP-აზაზე არცერთი ფრაქცია არ ახდენდა გავლენას, ხოლო Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების თვალსაზრისით, გამოიკვეთა მაღალმოლეკულური ცილოვანი ფრაქცია, მოლეკულური მასით 75-80 KD. ეს ფრაქცია მთლიანად ხსნიდა NA-ით გამოწვეულ ინჰიბიციას, ხოლო მისი საპირისპირო, ანუ Na,K-ATP-აზის ინჰიბიტორული მოქმედება გამომჟღავნდა დაბალმოლეკულურ (4-10 KD) ფრაქციებში. დანარჩენი ფრაქციების მოქმედებით Na,K-ATP-აზაზე ეფექტი არ იყო.

მრავალკომპონენტურობის აღმოჩნდა თვითონ ნეიროტრანსმიტერის მაინჰიბირებელი ეფექტის მოხსნის უნარის მქონე მაღალმოლეკულური აქტიური ფრაქცია. მისი შემდგომი ფრაქციონირებით, იონცვლადი ქრომატოგრაფიით, მიღებული იქნა ექვსი ფრაქცია, თუმცა მათი მოქმედებით მკვეთრად გამოიხატა ნეიროტრანსმიტერით (NA-ით) გამოწვეული ინჰიბიციის გაღრმავება, ხოლო Na,K-ATP-აზის აქტივაციისა და ნეიროტრანსმიტერის ინჰიბიციის მოხსნის უნარი არ

გააჩნდა არცერთ ფრაქციას. აქედან გამომდინარე, ავტორებმა ივარაუდეს, რომ გამააქტივებელი უნარის მქონე კომპონენტი (SF_a), თავის მხრივ წარმოადგენს მულტიკომპონენტურ სისტემას, რომელიც დაყოფისას კარგავს გამააქტივებელ თვისებას (Jariashvili, Kharebava, 2000).

აღნიშნულ მონაცემებს შეესაბამება სხვა ავტორების მონაცემები, რომელთა მიხედვით სინაპტოსომური ფაქტორის ტემპერატურული დამუშავებით ($95^{\circ}C$, 5 წთ), Na,K-ATP-აზის მაინჰიბირებელი უნარი შენარჩუნებული იყო, ხოლო დიალიზის შემდეგ (24-სთ) ეს უნარი მოიხსნა (Rodríguez, Antonelli, 1988).

სხვა ავტორების მიერ, ასევე სინაფსური ციტოზოლის შემდგომი ფრაქციონირებით სეფადექს G-50-ზე მიღებულია ორი პიკი: პირველი, მაღალმოლეკულური, ნეიროტრანსმიტერთან ერთად Na,K-ATP-აზას აქტივაციის უნარის მქონე, 70 KD და მეორე – ინჰიბიტორული 10 KD მასით (Rodríguez, 1992; Rodríguez, Pena, 1995).

სინაპტოსომური ფაქტორის მოქმედება Na,K-ATP-აზაზე ხასიათდება სპეციფიკურობით. კერძოდ;

1. სინაპტოსომურ SF_a -ს ახასიათებს ნეიროტრანსმიტერული სპეციფიკურობა: ის აქტივდება ნორადრენალინით და დოფამინით (ძლიერად) და სეროტონინით (შედარებით სუსტად), არ აქტივდება აცეტილქოლინით და იმ ნეიროტრანსმიტერებით რომლებიც Na,K-ATP-აზაზე არ მოქმედებენ (Jariashvili, 2001).

2. სინაპტოსომური ფაქტორის მოქმედებას ახასიათებს ფერმენტული სპეციფიკურობა ოუბაინმგრძნობიარე Na,K-ATP-აზის მიმართ. კერძოდ, ნეიროტრანსმიტერით აქტივირებული ფაქტორი არც ცალკე და არც ნეიროტრანსმიტერთან ერთად არ მოქმედებს ოუბაინარამგრძნობიარე

Mg-ATP-აზე, აცეტილქოლინესტერაზაზე, Ca-ATP-აზაზე (Джариаშვილი, Цакаძე, Кометиანი, 199/), ასევე 5–ნუკლეოტიდაზაზე (Rodríguez, 1992).

ამგვარად, ტერმინში – ნეიროტრანსმიტერებით სტიმულირებული ფაქტორი, იგულისხმება Na,K-ATP-აზის მიმართ სტიმულაცია, ხოლო მასტიმულირებელი ნეიროტრანსმიტერებია: NA, DA, 5-HT .

3. სინაპტოსომური ფაქტორის მოქმედება ხასიათდება ქსოვილური სპეციფიკურობით. ის არ მოქმედებს თირკმლის ქსოვილიდან მიღებულ მიკროსომულ Na,K-ATP-აზაზე. მეორეს მხრივ, თირკმლის ქსოვილიდან უხეში მიტოქონდრიული ფრაქციის ოსმოსური შოკის შედეგად მიღებულ ციტოზოლურ ხსნარში არ არის ნეიროტრანსმიტერებთან ერთად Na,K-ATP-აზის აქტივაციის უნარის მქონე ფაქტორი, მაინჰიბირებელი კი არის.

4. სინაპტოსომური ფაქტორის გამააქტივებელი მოქმედება, ნეიროტრანსმიტერებთან ერთად, სპეციფიკურად მჟღავნდება სუბუჯრედულ ფრაქციებშიც. იგი არ აღმოჩნდა უჯრედის წვენიში, რომელიც მიკროსომული ფრაქციის ზედა ხსნარს წარმოადგენს, თუმცა მაინჰიბირებელი ფაქტორი აქაც არის (Цакаძე, Кометиანი, 1990).

ნეიროტრანსმიტერებისა და სინაპტოსომალური ფაქტორის მოქმედებით Na,K-ATP-აზური აქტიობის რეგულაციის ფუნქციონალური მნიშვნელობის დასადგენად მნიშვნელოვანია იმ მექანიზმის ახსნა, რომელიც საფუძვლად უდევს ამ რეგულაციას.

აქედან გამომდინარე კვლევა წარიმართა სხვადასხვა მიმართულებით. კერძოდ, ნეიროტრანსმიტერებისა და სინაპტოსომური ფაქტორის Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების ერთ-ერთ შესაძლებელ გზად მიჩნეული იქნა მოქმედება არსებულ “კლასიკურ” რეცეპტორებზე

ზემოქმედების გზით. გამოითქვა მოსაზრება, რომ შესაძლებელია ციტოზოლურ ფაქტორს უნარი აქვს მემბრანა გადაიყვანოს ამა თუ იმ ნეიროტრანსმიტერებისათვის რეცეპტორმგრძნობიარე ფორმაში, თუმცა ამ მიმართულებით ჩატარებულმა ცდებმა საწინააღმდეგო შედეგი აჩვენა: კერძოდ, α -ადენობლოკატორი-დიჰიდროერგოკრიპტონი, β -ადენობლოკატორი-ალპრეოლოლი. შერეული α - და β -ადენობლოკატორი, ფენტოლამინი, არ მოქმედებენ არც ნორადრენალინით გამოწვეულ ინჰიბიციაზე და არც სინაპტოსომური ფაქტორის დამატებით გამოწვეულ სტიმულაციაზე (ანალოგიური შედეგი იქნა მიღებული დოფამინური და სეროტონინული სტიმულაციის შემთხვევაში, რომელიც სინაპტოსომური ფაქტორის სარეაქციო არეში შეტანით გამოიწვეოდა. ამ შემთხვევაში აღებული იყო D-5-HT-ის რეცეპტორის ანტაგონისტი – დიჰიდროერგოკრიპტონი და დოფამინის რეცეპტორის ანტაგონისტი – ჰალოპერიდოლი (Джариаშვილი и др., 1989)

აღნიშნული მონაცემებიდან გამომდინარე, ავტორებმა გამოთქვეს ვარაუდი, რომ სინაპტოსომური ფაქტორის Na,K-ATP-აზაზე მოქმედება არ არის განპირობებული მისი ზემოთ მოყვანილ რეცეპტორებზე ზემოქმედებით, მაგრამ არ გამორიცხეს, რომ “კლასიკურ” რეცეპტორებთან ერთად მემბრანაში არსებობდეს სხვა ტიპის რეცეპტორებიც, მაგალითად, ისეთი, როგორც რეცეპტორის შესახებაც გამოთქმული იქნა ჰიპოთეზა ადრე და წოდებული იყო, როგორც X-უბანი (Кометиანი, Логуа, 1970).

გრინგარდის თეორიის მიხედვით (Greengard, 1976), ნეიროტრანსმიტერების მოქმედება Na,K-ATP-აზაზე განპირობებულია

მეორადი მესენჯერული სისტემების საშუალებით. აქედან გამომდინარე უფრო სარწმუნო გზად ნეიროტრანსმიტერების, ფაქტორის და Na,K-ATP-აზის ურთიერკავშირს შორის არის მეორადი მესენჯერული სისტემების გზა, რომლის პროცესში ჩართულია cAMP- და cGMP-დამოკიდებული პროცესები, ასევე Ca-ის იონები, დიაცილგლიცეროლი და ინოზიტოლტრიფოსფატი. მის შესამოწმებლად ნანახი იქნა მეორადი მესენჯერული სისტემების კომპონენტების, მათი აქტივატორებისა და ინჰიბიტორების გავლენა ნეიროტრანსმიტერებისა და სინაპტოსომური ფაქტორის Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების ეფექტზე (Цакадзе, Джариашвили, Кометиანი, 1990). კერძოდ:

1. კალმადულინდამოკიდებული პროცესების ინჰიბიტორის, ტრიფტოპერაზინის (10^{-5} – 10^{-4} M) Na,K-ATP-აზაზე გავლენის შესწავლით ნანახი იქნა, რომ ტრიფტოპერაზინი ინჰიბირებს Na,K-ATP-აზას, მაგრამ არ ცვლის Na,K-ATP-აზის მგრძნობელობას ნეიროტრანსმიტერუიის მიმართ არც ცალკე და არც სინაპტოსომურ ფაქტორთან ერთად.
2. ფოსფოდიესთერაზის ინჰიბიტორი თეოფილინი (10^{-5} – 10^{-4} M) არ ცვლის Na,K-ATP-აზურ აქტიობას, როგორც cAMP არსებობისას (10^{-6} – 10^{-3} M), ასევე არარსებობისას. ასევე არ იცვლება ეფექტი სინაპტოსომური ფაქტორისა და ნეიროტრანსმიტერების დამატებით.
3. C-კინაზური რეაქციების ერჩევითი აქტივატორი, ფაბროლის ეთერი (10^{-9} - 10^{-8} M), რომელიც იმიტირებს დიაცილგლიცეროლის ეფექტს, ინჰიბირებს Na,K-ATP-აზას, მაგრამ, Na,K-ATP-აზაზე ნეიროტრანსმიტერებისა და სინაპტოსომური ფაქტორის ეფექტს არ ცვლის.

4. GTP (10^{-6} - 10^{-4} M) არავითარ გავლენას არ ახდენს არც Na,K-ATP-აზაზე და არც ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATP-აზაზე მოქმედებაზე.
5. G ცილების აქტივატორის, 5-გუანილილიმიდოფოსფატის ($0,8$ - 100 μ M) მოქმედებით არ იცვლება ნეიროტრანსმიტერებისა და სინაპტოსომური ფაქტორის ეფექტი Na,K-ATP-აზაზე.
6. განსაკუთრებით დეტალურად იქნა შესწავლილი Ca-ის იონების როლი, რადგან Ca-დამოკიდებულ მესენჯერული სისტემის მოქმედებაში უდიდესი როლი ენიჭება Ca^{++} -ის იონებს. ამ საკითხთანაა დაკავშირებული EGTA –ს მოქმედება Na,K-ATP-აზაზე, რადგან, ერთის მხრივ ცნობილია, რომ EGTA ააქტივებს Na,K-ATP-აზას და ხსნის ნეიროტრანსმიტერებით, კერძოდ NA-ით გამოწვეულ ინჰიბიციას; მეორეს მხრივ, EGTA-ს ეფექტს იმიტირებს სინაპტოსომური ფაქტორი, რომელიც ასევე ხსნის NA-ით გამოწვეულ Na,K-ATP-აზის ინჰიბიციას და ააქტივებს მას. ავტორებმა დაუშვეს ვარაუდი, რომ ეს პროცესები დაკავშირებულია Ca^{++} -ის იონების იმობილიზაციასთან, რადგან Ca^{++} -ს იონები ინჰიბირებს Na,K-ATP-აზას, ხოლო EGTA, როგორც Ca^{++} -ის იონების ქელატორი, ათავისუფლებს ფერმენტს მაინჰიბირებელი მოქმედებისაგან (Кометиани и др., 1975; Джариашвили, Кометиани, 1975).

აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ ნეიროტრანსმიტერებით და სინაპტოსომური ფაქტორით გამოწვეულ Na,K-ATP-აზის რეგულაციის მექანიზმში Ca^{++} -ს იონების როლის შესწავლისას გამოყენებული იყო მაღალი სისუფთავის ქელატორებით დამუშავებული პრეპარატი, რათა მაქსიმალურად გამორიცხულიყო მასში თავისუფალი Ca^{++} -ს იონების არსებობა. ასეთ პრეპარატზე მიღებულ ცდებში Ca^{++} -ის იონების სხვადასხვა კონცენტრაციების მოქმედებისას გამომჟღავნდა Ca^{++} -ის

სხვადასხვაგვარი მოქმედების სპექტრი. კერძოდ, დაბალ კონცენტრაციებში (0,1–0,3 mM) Na,K-ATP-აზის გამააქტივებელი მოქმედება, რაც ემთხვევა სხვა ავტორების მონაცემებს (Болдырев, 1985), ხოლო 0,3 mM-ზე აქტიობა უბრუნდება საწყის დონეს და უფრო მაღალ კონცენტრაციებზე იწყება ინჰიბიცია.

აბაშიძისა და თანაავტორების მიერ დეტალურად იქნა ნანახი Ca^{++} -ის იონების სხვადასხვა კონცენტრაციის მოქმედებით გამოწვეული Na,K-ATP-აზის ინჰიბიციაზე სინაპტოსომური SF_a ფაქტორისა და NA-ის (0,1 mM) მოქმედება სარეაქციო არეში EGTA-ს არსებობისას. აღმოჩნდა, რომ მრუდს, რომელიც მიღებული იყო Ca^{++} -ის იონების სხვადასხვა კონცენტრაციების მოქმედებით Na,K-ATP-აზაზე და მრუდებს, რომელიც მიღებული იყო აღნიშნულ პირობებთან ერთად ნორადრენალინისა და SF_a -ს სხვადასხვა კონცენტრაციის არსებობისას, ერთიდაიგივე ინჰიბიციის კონსტანტა აქვს. ასეთივე პირობებში აქტივაციის გამომწვევი Ca^{++} -ის კონცენტრაციის გავლენის შესწავლისას, ასევე ერთი და იგივე აქტივაციის კოეფიციენტები მიიღებოდა, რაც იმის დამადასტურებელია, რომ Ca^{++} -ის იონებს არა აქვთ გავლენა Na,K-ATP-აზის აქტივაციაში, რომელიც გამოიწვევა NA- SF_a -ით (Abashidze, Jariashvili, Kometiani, 2001). ამავე ავტორების მიერ, Ca^{++} -ის როლი გამოირიცხა ასევე NA-ით გამოწვეულ ინჰიბიციურ მექანიზმში. მათ მიერ შესწავლილი იყო Ca^{++} -ის აქტივაციური (0,06 mM), ინჰიბიციური და თითქმის უმოქმედო კონცენტრაციების მოქმედება NA-ის სხვადასხვა კონცენტრაციებისას.

აღნიშნული მონაცემების საფუძველზე, რომელიც შესაბამისობაშია ადრე მიღებულ მონაცემებთან (Кометиани др., 1977), გამოტანილი იქნა

დასკვნა, რომ Ca^{++} , როგორც მეორადი მესენჯერი, Ca-დამოკიდებული პროცესების აქტივატორი, NA და SF_a დამოკიდებულ აქტივაციაში, ასევე NA-ით გამოწვეულ ინჰიბიციაში არ მონაწილეობს, ანუ ეფექტი არ არის. Ca-დამოკიდებული პროცესი, ასეთივე მიდგომით ჩატარებული ცდებით აღმოჩნდა, რომ Ca^{++} არ მონაწილეობს არც DA-დამოკიდებულ ინჰიბიციურ მექანიზმში და არც DA/ SF_a აქტივაციურ მექანიზმში, როგორც მეორადი მესენჯერი (Abashidze, Jariashvili, Kometiani, 2002).

ზემოთ აღნიშნული იყო, რომ ჯერ კიდევ ადრე, სინაპტოსომური ფაქტორის აღმოჩენამდე, ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების ფუნქციონალური მნიშვნელობის დადგენის თვალსაზრისით, სხვადასხვა ნეიროტრანსმიტერების მოქმედება შესწავლილი იქნა განვითარების პროცესში და გამოირკვა, რომ ეს ეფექტი განსხვავებულად მჟღავნდებოდა ონტოგენეზში (Цакадзе, Джариашвили, Кометиани, 1987).

სინაპტოსომური ფაქტორის აღმოჩენის შემდეგ ეს საკითხი დეტალურად იქნა შესწავლილი NA-ის მიმართ, სინაპტოსომური ფაქტორის ცალკეული კომპონენტების SF_a და SF_r -ის მოქმედებასთან ერთად, ასევე 14!დლიან და ერთწლიან ვირთაგვებიდან მიღებულ პრეპარატებზე. მიღებული შედეგებიდან გაკეთდა მნიშვნელოვანი დასკვნები, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ სინაპტოსომური ფაქტორების მოქმედება დამოკიდებულია ონტოგენეზის პროცესზე, კერძოდ:

1. ნორადრენალინის სხვადასხვა კონცენტრაციის მოქმედებით გამოწვეული Na,K-ATP-აზის ინჰიბიციის ხასიათი ორივე შემთხვევაში (ორკვირიან და ერთწლიან ვირთაგვებიდან მიღებული პრეპარატებში)

ერთნაირია განსხვავება შეინიშნება ინჰიბიციის სიღრმეში და უფრო ღრმა არის ერთწლიან ვირთაგვებში.

2. მკვეთრად განსხვავებულია ინჰიბიციური სინაპტოსომური ფაქტორის მოქმედება. ერთწლიანებში ინჰიბიცია ძლიერადაა გამოხატული, მაშინ როდესაც ორკვირიანებში არ არის.

3. ინჰიბიციის უნარი არ გამოამჟღავნა ორკვირიანი ვირთაგვებიდან მიღებულმა ინჰიბიტორულმა ფაქტორმა.

4. ინჰიბიტორული ფაქტორი (SF_i) არ ახდენს გავლენას ნორადრენალინით გამოწვეულ ინჰიბიციაზე ორივე შემთხვევაში Na,K-ATP-აზის ინჰიბიცია NA -ით და სინაპტოსომური ფაქტორით, ერთმანეთისგან დამოუკიდებელია.

5. განსხვავებით SF_i -სგან SF_a -ს მოქმედება როგორც ორკვირიან, ასევე ერთწლიან პრეპარატებშინ დამოკიდებულია სარეაქციო არეში ნორადრენალინის არსებობაზე, რითაც ვლინდება SF_a -ს აქტივაციური ხასიათი. თავის მხრივ, ნორადრენალინით გამოწვეული ინჰიბიცია SF_a -ს დამატებით აქტივაციით იცვლება. ეფექტი დამოკიდებულია ნორადრენალინისა და SF_a -ს კონცენტრაციაზე და შესაბამისად შეიძლება ჰქონდეს როგორც ინჰიბიციური, ასევე აქტივაციური ხასიათი.

6. მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდის გამოყენებით (Bardsley et al., 1975; Кометиани, 1982; Кометиани и др., 1988) დადგინდა, რომ ერთწლიანი და ორკვირიანი ვირთაგვები მკვეთრად განსხვავდებიან რეგულაციის მექანიზმით: ერთწლიან ვირთაგვებში უფრო გამოხატულია ნორადრენალინის ინჰიბიციური მექანიზმი მაშინ, როდესაც ორკვირიანებში აქტივაციური მექანიზმია გამოხატული ძლიერად.

მიღებული მონაცემების საფუძველზე ავტორებმა დაასკვნეს, რომ ვირთაგვას თავის ტვინის სინაფსურ მემბრანებში წარმოდგენილია ნორადრენალინით და სინაპტოსომური ფაქტორებით განხორციელებული Na,K-ATP-აზის რეგულაციის რამდენიმე მექანიზმი. ესენია:

1. NA–დამოკიდებული Na,K-ATP-აზის ინჰიბიციური მექანიზმი. ამ მექანიზმის შემადგენელი კომპონენტები მჭიდროდ არიან დაკავშირებული მემბრანასთან.
2. NA–დამოკიდებული Na,K-ATP-აზის აქტივაციური მექანიზმი, რომლის ერთ-ერთი შემადგენელი კომპონენტია პერიფერიული ხსნადი ცილა, SF_a . ამ მექანიზმის შემადგენელი კომპონენტები სუსტად არიან დაკავშირებული მემბრანასთან, წარმოადგენენ პერიფერიულ ცილებს და ადვილად გადადიან ციტოზოლში (ან ციტოზოლურ ცილებს წარმოადგენენ).
3. NA–დამოკიდებული Na,K-ATP-აზის ინჰიბიციური მექანიზმი, რომელიც განპირობებულია სინაპტოსომურ ციტოზოლში აღმოჩენილი SF_i კომპონენტის მოქმედებით.
4. NA–დამოკიდებული Na,K-ATP-აზის არასპეციფიკური აქტივაციური მექანიზმი, რომელიც SF_a კომპონენტის Na,K-ATP-აზაზე მოქმედებით ხორციელდება და გავლენას ახდენს Mg-ATP-აზაზეც.

აღნიშნული მექანიზმების ერთობლიობა ქმნის Na,K-ATP-აზის ერთ, მთლიან მარეგულირებელ სისტემას, რომელიც ონტოგენეზში განიცდის რაოდენობრივ და ხარისხობრივ ცვლილებას, რაც მიუთითებს ამ რეგულაციის ფუნქციონალურ მნიშვნელობაზე (Koemtiani, Jariashvili, 2001).

ეფექტის ფუნქციონალურ მნიშვნელობაზე მიუთითებს ის მონაცემებიც, რომელთა მიხედვით ნეიროტრანსმიტერების ეფექტი განსხვავებულია ორ სხვადასხვა გარემოში მყოფ ვირთაგვებიდან მიღებულ პრეპარატებში. კერძოდ, შესწავლილი იქნა სოციალურ იზოლაციაში და ნორმალურ სოციალურ გარემოში გაზრდილი ვირთაგვების თავის ტვინიდან მიღებულ პრეპარატებზე კატეკოლამინური ნეიროტრანსმიტერების - NA-ის და DA-ის, ასევე სინაპტოსომური ფაქტორის ეფექტი. აღმოჩნდა რომ;

1. NA-ით გამოწვეული ინჰიბიცია უფრო ღრმა არის ნორმალურ სოციალურ პირობებში გაზრდილი ვირთაგვების თავის ტვინიდან მიღებულ Na,K-ATP-აზაზე, ვიდრე სოციალურ იზოლაციაში გაზრდილი ვირთაგვების თავის ტვინიდან მიღებულ პრეპარატებში.
2. DA-ით გამოწვეული ინჰიბიცია უფრო ღრმა არის იზოლაციაში მყოფი ვირთაგვებიდან მიღებული სინაფსური მემბრანების Na,K-ATP-აზაზე, ვიდრე ნორმალურ სოციალურ გარემოში მყოფ ვირთაგვებიდან მიღებულ პრეპარატზე.
3. შესადარებელ ორივე პრეპარატში, ორივე ნეიროტრანსმიტერით გამოწვეული ინჰიბიცია იხსნება SF_a -ს მოქმედებით და ფერმენტი აქტივდება, თუმცა აქტივაცია განსხვავებულია, კერძოდ:
4. SF_a -ს დამატებით, ნორმალურ სოციალურ გარემოში მყოფი ვირთაგვების თავის ტვინში სამჯერ აქტივდება ფერმენტი NA-ის ინჰიბიციასთან შედარებით, ხოლო სოციალური იზოლაციის შემთხვევაში ორჯერ. ამგვარად, NA-დამოკიდებული აქტივაციის მექანიზმი უფრო კარგად არის წარმოდგენილი ნორმალურ გარემოში მყოფ ვირთაგვებში, ვიდრე სოციალურ იზოლაციაში მყოფში.

5. SF_6 -ს მოქმედებით მიღებული DA-დამოკიდებული აქტივაცია სოციალურ იზოლაციაში მყოფი ვირთაგვების პრეპარატში, DA-ის ინჰიბიციასთან შედარებით ოთხჯერ იზრდება, ხოლო ნორმალურ გარემოში მყოფ ვირთაგვებში - თნახევარჯერ, რაც მიუთითებს, რომ DA-დამოკიდებული აქტივაციური მექანიზმი უკეთაა წარმოდგენილი სოციალურ იზოლაციაში მყოფ ვირთაგვებში, ნორმალურ სოციალურ პირობებში გაზრდილ ვირთაგვებთან შედარებით (Abashidze, Jariashvili, Kometiani, 2002).

ზემოთ მოყვანილი ექსპერიმენტული შედეგები უდავოდ მიუთითებენ Na, K -ATP-აზის ნეიროტრანსმიტერებით და სინაპტოსომური ფაქტორით რეგულაციის ფიზიოლოგიურ მნიშვნელობაზე და ამ რეგულაციის საყურადღებო როლზე სინაფსურ გადაცემებში. როგორც ექსპერიმენტული, ასევე თეორიული გამოკვლევების საფუძველზე, ავტორებმა გამოიტანეს დასკვნა, რომ Na, K -ATP-აზის რეგულაცია ნეიროტრანსმიტერებით არ უნდა ხდებოდეს დღემდე ცნობილი სინაფსური გადაცემის მექანიზმებით: ნეიროტრანსმიტერების უშუალო ზემოქმედებით იონურ არხებზე, ანუ Na/K -გრადიენტდამოკიდებული პროცესებით, როგორცაა იონების პასიური ტრანსპორტი და შესაბამისად ტრანსმემბრანული პოტენციალთა სხვაობა. ის არ უნდა ხდებოდეს არც მეორადი მესენჯერული სისტემების ჩართვით. სავარაუდოა, რომ არსებობს ამ მექანიზმის განხორციელების მესამე გზა, რომელიც Na, K -ATP-აზის საშუალებით ხორციელდება და თავის მხრივ რეგულირდება სინაპტოსომური ფაქტორებით. რეგულაციის ეს მექანიზმი ხორციელდება ნეიროტრანსმიტერების და სინაპტოსომური ფაქტორების

Na,K-ATP-აზაზე, კერძოდ, მის ელექტროგენურ კომპონენტზე უშუალო ზემოქმედებით, რომლის ვარირებითაც ხდება ტრანსმემბრანული პოტენციალთა სხვაობის ცვლილება.

კინეტიკური ცდების ანალიზით ნათელი გახდა, რომ ნეიროტრანსმიტერის რეცეპტორსა და Na,K-ATP-აზას შორის არსებობს ერთი ან მეტი კომპონენტის შემცველი გადაცემათა ჯაჭვი, რომელიც განაპირობებს ამ რეგულაციას და ინჰიბიციური მექანიზმი გადაყავს აქტივაციურ მექანიზმში.

სინაფსური გადაცემის რეგულაცია Na,K-ATP-აზური აქტიობის ელექტროგენური კომპონენტის საშუალებით, ანუ როგორც მას უწოდეს, სინაფსური გადაცემის Na,K-ATP-აზური მექანიზმი, წარმოადგენს შედარებით სწრაფი რეგულაციის საშუალებას და ნეირონთაშორის კომუნიკაციის ერთ-ერთ გზას, რომელიც სპეციფიკურია თავის ტვინისათვის. ამის დამამტკიცებელია ეფექტის მკაცრი სპეციფიკურობა, მისი ლოკალიზაცია სინაფსში, კორელაცია ეფექტის სიძლიერესა და შემაერთებელი კომპლექსით მდიდარ ფრაქციებს სორის, SF_a-ს არსებობა მხოლოდ სინაფსურ ციტოზოლში, ეფექტის ქსოვილური, მემბრანული, ფერმენტული სპეციფიკურობა, ეფექტის ცვლილება განვითარების პროცესში და სხვადასხვა გარემოში მყოფ ცხოველებში.

აღსანიშნავია ის ფაქტი, რომ ინჰიბიტორული SF_i გავლენას არ ახდენს ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATP-აზაზე მოქმედების ეფექტზე, მაგრამ სხვა ავტორების მონაცემებით, ისიც ჩართულია Na,K-ATP-აზის რეგულაციის სისტემაში და მონაწილეობს ნეიროტრანსმიტერების სეკრეციაში, კერძოდ, მისი მოქმედებით, ისევე როგორც ოუაბაინის

მოქმედებით, იზრდება ნორადრენალინის გამოთავისუფლება ჰიპოთალამუსის ნეირონების პრესინაფსური დაბოლოებებიდან (Watta et al., 1999). სხვა მონაცემებით, ოუბაინის მოქმედებით, ცხოველებში ძნელდება დამახსოვრება, კერძოდ, ქვეითდება მოკლევადიანი მეხსიერება (Watta, Mark, 1971; Gibbs, 1976) და ქრება პოსტტეტანური პოტენციაცია (Ройтбак и др., 1984).

ყველა ზემოთ მოყვანილი შედეგი დიდი ალბათობით მიუთითებს იმაზე, რომ Na,K-ATP-აზის რეგულაციის ეს გზა დაკავშირებული უნდა იყოს დასწავლის პროცესთან, კერძოდ ხანმოკლე მეხსიერებასთან, რომლის მოქმედება განპირობებულია ნეირონული აქტიობით და დაკავშირებულია ტვინის ინტეგრალურ მოქმედებასთან. ხოლო საკითხი, სინაფსური გადაცემის რომელ საფეხურზე, Na,K-ATP-აზის მუშაობის რომელ ეტაპზე, რომელ რეჟიმში და რა კონკრეტული მექანიზმით ხორციელდება ეს რეგულაცია, შემდგომი დეტალური კვლევის გაგრძელებას საჭიროებს.

II. კვლევის მეთოდები

კვლევის ობიექტად ძირითადად გამოიყენებოდა თეთრი ვირთაგვას თავის ტვინიდან მიღებული სხვადასხვა სუბუჯრედული ფრაქცია, რომლებიც მიიღება დიფერენციალური ცენტრიფუგირების მეთოდით საქაროზას სიმკვრივის სხვადასხვა გრადიენტში. სუბუჯრედული ფრაქციების მიღებისას გამოყენებული იყო დე რობერტისისა (De Robertis, 1969) და ვიტაკერის (Whittaker, 1969) რეკომენდაციები.

ჰომოგენიზაცია კეთდებოდა ხელის ჰომოგენიზატორით, რისთვისაც გამოიყენებოდა პოტერ-ელვეგეიმის ტიპის მინის ჰომოგენიზატორი ტეფლონის დგუმით. ღრიჭო შეადგენდა 0,025 mm-ს. ჰომოგენიზაცია ხდებოდა ორი სახით: ძლიერი, რომელიც ტარდებოდა მექანიკური ჰომოგენიზატორით 600-800 ბრ/წთ, და სუსტი, როდესაც დგუმის ტრიალი ხდება ხელის საშუალებით. ეს უკანასკნელი გამოიყენება დაუნგრეველი სინაპტოსომალური ფრაქციის მისაღებად.

ცენტრიფუგირების რეჟიმის შერჩევა ხდება შემდეგი პარამეტრების გათვალისწინებით: საშუალო რადიუსად მიღებულია R_0 სიდიდე, რომელიც გამოითვლება შემდეგი ფორმულით:

$$R_0=0,5(R_2-R_1)$$

სადაც R_2 არის სითხის მაქსიმალური დაშორება ბრუნვის ღერძიდან როგორც კუთხური, ისე – "სვინგაუტ"-როტორისათვის, R_1 კი მინიმალური დაშორება.

ყოველი ფრაქციის მიღება ხდება ერთ გარკვეულ რეჟიმში, რაც გულისხმობს შემდეგი პირობის შესრულებას:

$$\frac{v^2}{\ln \frac{R_2}{R_1}} = const; \quad \frac{Gt}{R_0 \ln \frac{R_2}{R_1}} = const$$

სადაც v ბრუნვათა რიცხვია, რომლის ერთეულიცაა ბრ/წთ. G - კუთხური აჩქარებაა, რომელიც გამოიხატება ვარდნის აჩქარების ერთეულებში და გამოითვლება ფორმულით: $G = \omega/g$, სადაც, ω - კუთხური სიჩქარეა, g -თავისუფალი ვარდნის აჩქარება – 981სმ/წთ²; G -ს ბრუნვებში გადასაყვანად, ანდა პირიქით, ბრუნვების G -ში გადასაყვანად ვიყენებთ ფორმულას:

$$G = \frac{R_0 v^2}{90000}; \quad v = 300 \sqrt{\frac{G}{R_0}}$$

ცენტრიფუგირების დროდ აღებულია ბრუნვის დაწყებიდან ცენტრიფუგის გამოთიშვამდე დრო.

ერთი და იგივე ბრუნვისათვის, ერთხელ დადგენილი წესით, ყოველთვის გამოიყენებოდა ერთი და იგივე როტორი და შესაბამისი ცენტრიფუგა, კერძოდ:

5 000გ-მდე – K-23 ცენტრიფუგა,

5 000 - 2 000გ-მდე – UP65 ცენტრიფუგა 6X80ml როტორით,

20 000გ-ზე ზევით – UP65 ცენტრიფუგა 8X30ml როტორით,

ამიტომაც, სქემებსა და ტექსტში აღარ არის მითითებული დასახელება და როტორის სახე.

II. 1. სინაფსური მემბრანების ფრაქციის მიღება

20-25 თეთრი ვირთაგვას ახლადამოღებულ თავის ტვინს სწრაფად ვაციებდით 4°C-მდე და ვაკეთებდით ნაზ ჰომოგენიზაციას ხელის

ჰომოგენიზატორით საქაროზას 0,32 m ხსნარში, ისე, რომ მზადდებოდა 10%-იანი ჰომოგენატი. საჰომოგენიზაციო ხსნარი კრისტალური ტრისით წინასწარ მიიყვანებოდა pH-ის საჭირო მნიშვნელობამდე (7,0-7,2).

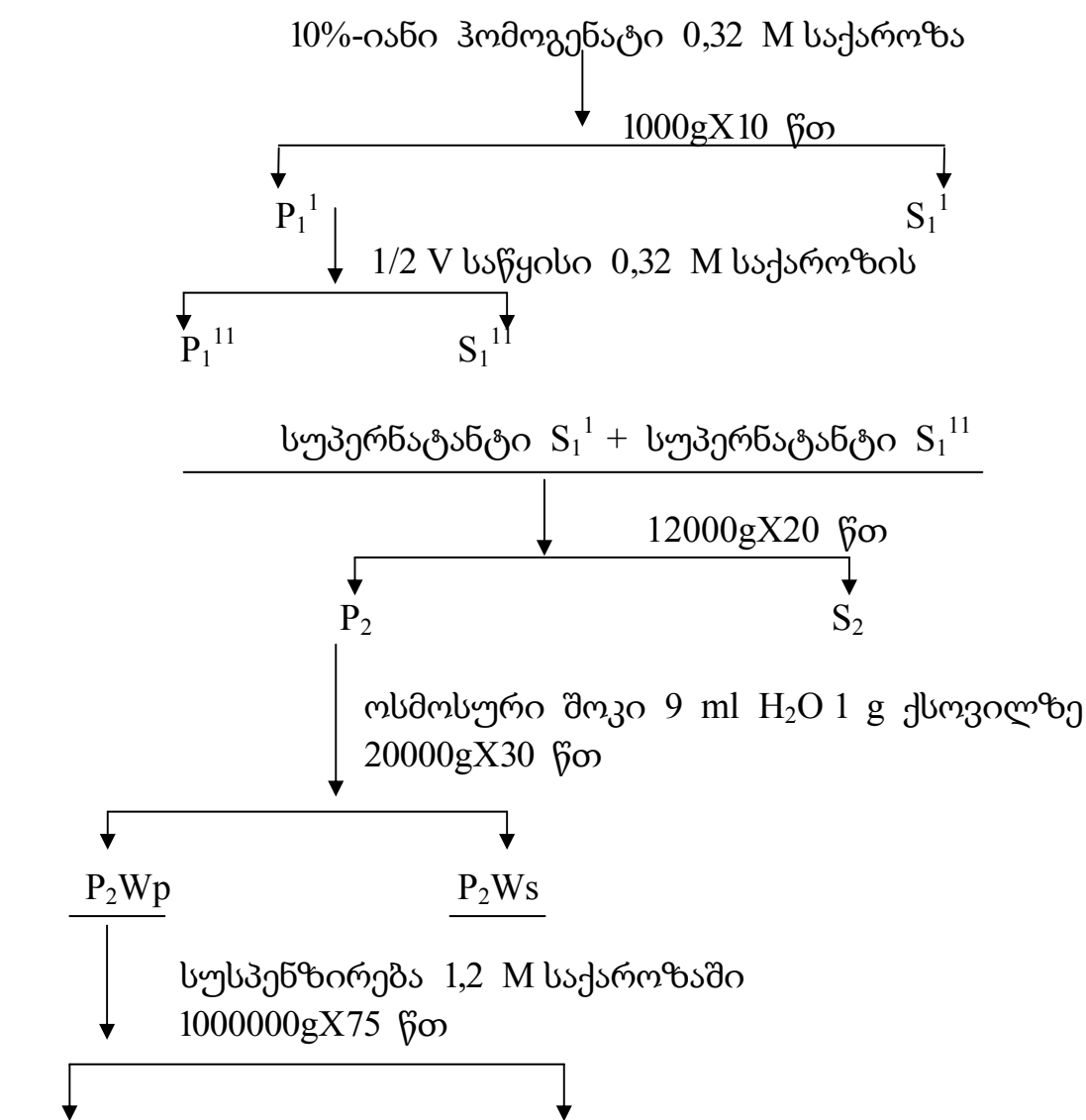
მიღებული ჰომოგენატი ცენტრიფუგირდებოდა 1000gX10 წთ. სუპერნატანტი დროებით ინახებოდა მაცივარში, ხოლო ნალექი ირეცხებოდა საწყისი მოცულობის ნახევარ ($1/2V_0$) 0,32 m საქაროზას ხსნარში და ხელახლა ცენტრიფუგირდებოდა იგივე პირობებში. პირველად და მეორედ მიღებულ სუპერნატანტებს ვაერთიანებდით ადრე მიღებულთან, ხოლო ნალექს (P_1), რომელიც შედგებოდა დაუგლეჯავი უჯრედებისა და ბირთვებისაგან და წარმოადგენს ე. წ. უხემ ბირთვულ ფრაქციას, ვღვრიდით.

გაერთიანებული ზედა ხსნარი (S_1) ცენტრიფუგირდებოდა 12 000gX20 წთ. მიღებულ სუპერნატანტში (S_2) არის მიკროსომები, ნალექი (P_2)კი შეიცავს მიტოქონდრიებს, მიელინსა და სინაპტოსომებს თავისი შიგთავსით. ოსმოსური შოკის (1 გრ. საწყის ქსოვილზე 9 ml ცივი ბიდისტილატის დამატება) მოქმედებით მიღებულ სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 20 000gX30 წთ. მიღებულ ნალექს (P_3) ამ რეჟიმით გამოეყოფოდა სუპერნატანტი, რომელიც შედგება მემბრანის უწვრილესი ნაგლეჯებისაგან – მიკროსომებისაგან, ვეზიკულებისაგან და უჯრედის განზავებული ციტოზოლისაგან. ნალექი P_2W_p შეიცავს მიტოქონდრიებს, სინაფსური წარმოშობის მემბრანებს, მათ შორის, შემაერთებელ კომპლექსს, და მიელინს. აღნიშნული ნალექი სუსპენზირდებოდა 1,2 m საქაროზას ხსნარში და ცენტრიფუგირდებოდა 100000gX75 წთ. ამ დროს ხდებოდა მიტოქონდრიების მოცილება სინაფსური მემბრანებისაგან. მიღებული ნალექი (P_4) შეიცავდა სუფთა

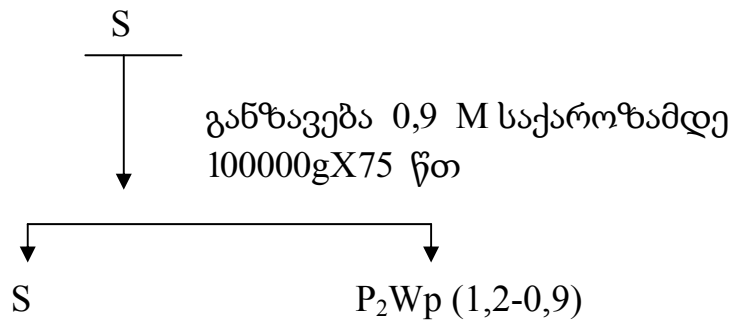
მიტოქონდრიებს. სუპერნატანტს ვაზავებდით 0,9 m საქაროზამდე და ხელახლა ვაცენტრიფუგირებდით 100 000gX75 წთ.

1,2-0,9 m საქაროზას ფენებს შორის ილექებოდა სინაფსური მემბრანების შემაერთებული კომპლექსი მემბრანებითურთ. მიღებული ნალექი P_2W_p (1,2-0,9) ინახებოდა 20-30 mM ტრის-HCl ბუფერში, რომლის pH-იც იყო 7,6-7,8, ანდა ბიდისტილატში და რამდენიმე თვის განმავლობაში ინახებოდა მაცივარში -20°C -ზე (სქემა 4).

სქემა 4 - სინაფსური ფრაქციის მიღება



$P_2W_p(1,2)$



სინაფსური მემბრანების ყველა სუბფრაქცია მიიღებოდა ასეთივე გზით (უხეში მიტოქონდრიული ფრაქციის – P_2 -ის ოსმოსური შოკის შემდეგ). ტექსტში ისინი აღნიშნულია P_2W_p , ფრჩხილებში კი მითითებულია საქაროზას კონცენტრაცია, რომლის ფენებს შორისაც ილექებოდა აღნიშნული ფრაქციის ნაწილაკები.

II. 2. მიკროსომული ფრაქციის მიღება

მიკროსომულ ფრაქციას ვღებულობდით ვირთაგვის თავის ტვინიდან სკოუს მეთოდით, მცირედი მოდიფიცირებით (Skow, 1962).

ახლად ამოღებული ტვინიდან, მისი სწრაფი ჰომოგენიზაციით, 0,32 M საქაროზაში მზადდებოდა 10%-იანი ჰომოგენატი და ცენტრიფუგირდებოდა 1000 გxწთ. ნალექის რესუსპენზირება ხდებოდა საწყისი მოცულობის ნახევარ 0,32 M საქაროზაში და ცენტრიფუგირებას ვახდენდით იგივე პირობებში. მიღებული ნალექი შეიცავდა დაუგლეჯავ უჯრედებს, ერთროციტებს, მიტოქონდრიებს, მიელინს. გაერთიანებული სუპერნატანტები (S_1) ცენტრიფუგირდებოდა 100 000 გ x 80 წთ. ნალექი (P_3), რომელიც მიკროსომებს წარმოადგენს, რესუსპენზირდებოდა ტრის-HCl-ის ბუფერში ან ბიდისტილატში pH7,7-ზე და ინახებოდა 20C⁰-ზე (იხ. სქემა 5).

II. 3. სინაპტოსომური ფრაქციის მიღება

სინაპსური ფაქტორის, SF-ის, მისაღებად, უხეშ მიტოქონდრიულ ფრაქციას (P_2 , სქემა 4) უკეთდებოდა ოსმოსური შოკი და ცენტრიფუგირდება 20 000gx30 წთ. მიღებული სუპერნატანტი P_2W_s , შეიცავს სინაპტოსომურ ფაქტორს. ზედმეტი, გაყოლილი მემბრანული მემბრანული წარმონაქმნების მოცილების მიზნით, P_2W_s ცენტრიფუგირდება 100 000gx30 წთ. მიღებული ზედა ხსნარი გამოიყენება როგორც გასუფთავებული სინაპტოსომური ფაქტორის მისაღები საწყისი ხსნარი (სქემა 6).

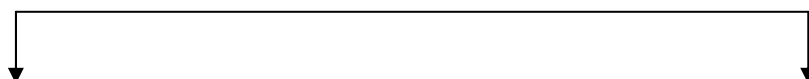
საინფსური ფაქტორის შემადგენელი აქტივატორული (SF_a) და ინჰიბიტორული (SF_i) კომპონენტების განცალკევების მიზნით ვახდენდით გელიოფილტრაციას. გელიოფილტრაცია ხდებოდა ფირმა „LKB“-ს ტიპის დანადგარზე, 2x40 სვეტზე. გელის მომზადება და ელუირება ხდებოდა ბიდისტილატით pH 7,0-ზე. ცილის განსაზღვრა ხდებოდა 280 nM სიგრძის ტალღით 10-12°C⁰ ტემპერატურაზე.

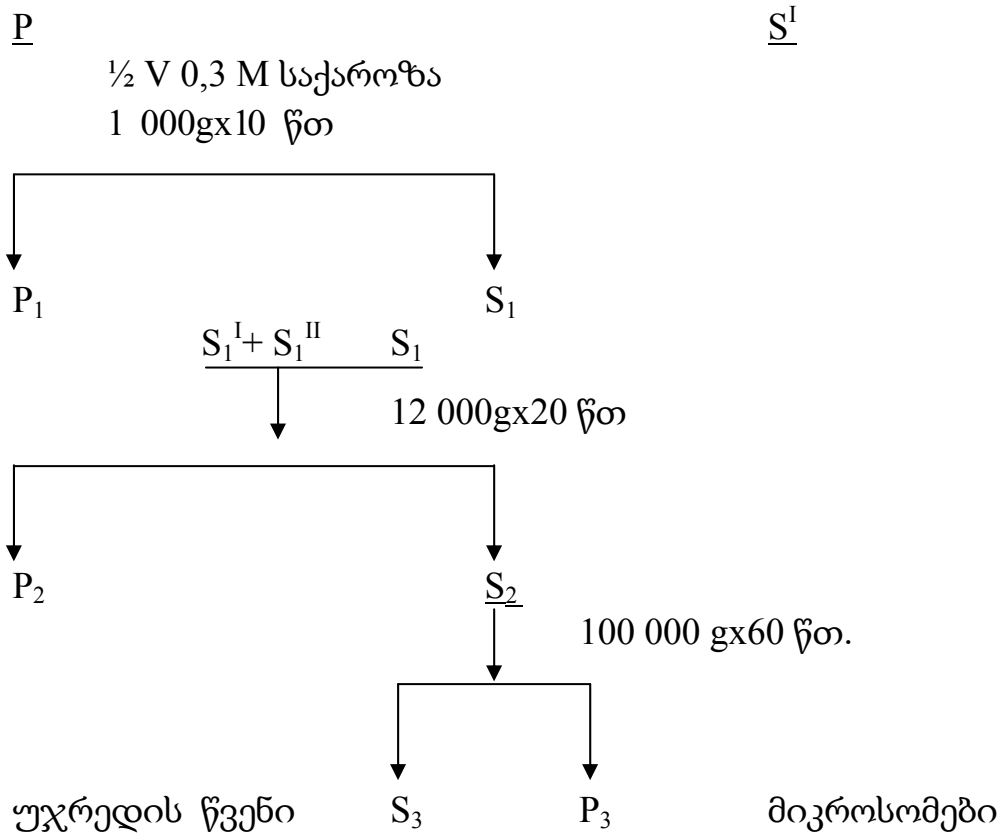
ფრაქციონირება ხდებოდა უხეშად, სეფადექს C-50-ზე (Pharmacia, შვედეთი). ელუირების შედეგად მიიღებოდა ორი პიკი: პირველი, დიდი, რომლის ელუატი შეიცავდა აქტივატორულ კომპონენტს SF_a -ს; მეორე, შედარებით პატარა კი ინჰიბიტორულ SF_i -ს.

მიღებული ელუატების კონცენტრირებას ვახდენდით სეფადექს C-25-ით (Pharmacia, შვედეთი).

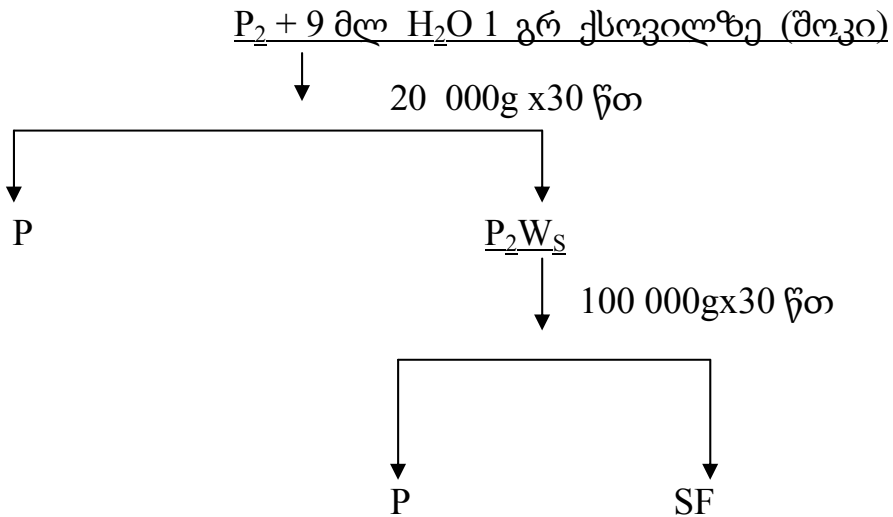
სქემა 5. მიკროსომული ფრაქციის მიღება

10%-იანი ჰომოგენატი
1 000gx10 წთ





სქემა 6. სინაფსური ფაქტორის მიღება



II. 4. Na,K-ATPაზური აქტიობის განსაზღვრა

ცილის კონცენტრაციას ვსაზღვრავდით ლოურის მეთოდით (Lowry, 1951). ცილის კონცენტრაციის სტანდარტული მრუდი აგებული იყო ხარის ალბუმინით.

არაორგანული ფოსფორის განსაზღვრისათვის ვიყენებდით ჩვენს ლაბორატორიაში მოდიფიცირებულ ფისკე-სუბაროუს მეთოდს (Fiske, Subbarow, 1925). ამ მეთოდის პრინციპი მდგომარეობს არაორგანული ფოსფორიდან და ამონიუმის მოლიბდატიდან ფოსფომოლიბდატის კომპლექსის წარმოქმნაში, რომელსაც აქვს უნარი მჟავე არეში აღდგეს ფოსფომოლიბდატის ლურჯამდე. ცისფერი ფერის ინტენსივობა ნიმუშში არაორგანული ფოსფორის რაოდენობის პირდაპირპროპორციულია. მეთოდში აღმდგენელად გამოყენებული იყო კალა SnCl_2 . გაზომვა ხდებოდა სპექტროფოტომეტრ "CФ-46"-ზე კონტროლის მიმართ, რომელშიც შედიოდა ყველა რეაგენტი, გარდა ფოსფორისა. გაზომვისას ექსტინციების ფარგალი იყო 0,070-0,300, ტალღის სიგრძე იყო $\lambda=735\text{nm}$. ფოსფორის სტანდარტის სახით ვიყენებდით Na_2HPO_4 -ს, რომელიც გახსნილი იყო ტრის-HCl ბუფერში, (pH=7,7) ან წყალში.

Na,K-ATPაზური აქტიობა განისაზღვრებოდა, როგორც ჯამური ATPაზას ოუბაინმგრძნობიარე ნაწილი. ჯამური ATPაზასათვის საინკუბაციო არე სტანდარტული იყო და შეიცავდა NaCl-ს 120-145 mM კონცენტრაციის ფარგლებში, KCl-ს 5-20 mM, MgCl_2 -ს 2-3 mM და ATP-ს 2-3 mM, 50 mM ტრის-HCl ბუფერს (pH=7,7), რაც შეესაბამება Na,K-ATPაზას მუშაობის ოპტიმალურ პირობებს. არეში ფერმენტული პრეპარატის რაოდენობა არ აღემატებოდა 100-150 mg-ს.

ოუბაინმგრძნობიარე ნაწილი განისაზღვრებოდა ზემოთ აღნიშნულ არეში 0,2 mM ოუბაინის დამატებით, ზოგჯერ კი ცალკე შედგენილი საინკუბაციო არით, რომელიც შედგებოდა 0,2 mM ოუბაინისა და MgCl_2 -სგან, რაც Na^+ უბნის სრული დაკეტვის

გარანტიას იძლევა. ჯამურ და ოუბაინმგრძობიარე აქტიობას შორის სხვაობა შეადგენს Na,K-ATP-აზურ აქტიობას და არის დაახლოებით შემდეგი: 1) OPM რეჟიმისათვის $Mg_f^{++}/ATP_f \geq 4$. 2) OPA-ATP_f/Mg⁺⁺ ≥ 4 . 50-70 $\mu\text{mol Pi/mg}$ ცილაზე საათში.

სუბსტრატის, Mg⁺⁺-ს და ATP_f-ს კონცენტრაციის განსაზღვრა ხორციელდებოდა Mg-ATP-ის კომპლექსის დისოციაციის კონსტანტის მნიშვნელობის გათვალისწინებით ($K_d=0,085$) (Plesner, 1981).

ყველა რეაგენტს ემატება ყინული 0-4°C-ზე, რის შემდეგაც სინჯარები ინჯღრეოდა და თავსდებოდა თერმოსტატში საინკუბაციოდ 37°C-ზე. ინკუბაცია გრძელდებოდა 15 წთ. რეაქცია ჩერდებოდა ტემპერატურის სწრაფი ცვლილებით, სინჯარების ერთდროული გადატანით თერმოსტატიდან ყინულოვან აბაზანაში 0-4°C-ზე, სადაც ყოვნდებოდა 5-6 წთ. ამის შემდეგ ვსაზღვრავდით არაორგანულ ფოსფორს.

ATP-აზურ აქტიობაზე ვმსჯელობდით ფერმენტის მიერ ATP-ის დაშლით გამოყოფილი არაორგანული ფოსფორის რაოდენობის მიხედვით. აქტიობა გამოხატული იყო მიკრომოლებში (μM) გამოყოფილი ფოსფორის რაოდენობით mg ცილაზე საათში ($\mu\text{M.P/mg}$ ცილა/სთ).

რეაქციის პროდუქტის მატებასა და ცილის კონცენტრაციას შორის დაცული იყო სწორხაზოვანი დამოკიდებულება. დაშლილი ATP-ის რაოდენობა არ აღემატებოდა 10-12%-ს.

II. 5. მონაცემების სტატისტიკური დამუშავება

მონაცემების სტატისტიკური დამუშავებისას ვიყენებით სტიუდენტ-ფიშერის t-განაწილებას, რადგანაც ჩვენს ცდებში პარალელურ გაზომვათა რიცხვი (რომელთა გასაშუალებაც ხდება) – n ყოველთვის ოცდაათზე ნაკლებია (Гейл, 1959).

ცხრილებითა და მრუდებით მოყვანილი სტატისტიკურად დამუშავებული მონაცემები წარმოდგენილი იყო $x \pm \sigma_x(n)$ სახით, სადაც x არის ინდივიდუალური გაზომვების საშუალო არითმეტიკული, ხოლო σ_x – საშუალო კვადრატული ცდომილება, რომელიც შემდეგი ფორმულით გამოითვლება:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} ; \quad \sigma_x = \sqrt{\frac{(\bar{X} - X_i)^2}{n(n-1)}}$$

სადაც n – პარალელურ გაზომვათა რიცხვია.

ზოგიერთი მონაცემის დამუშავებისას, განსაკუთრებით მაშინ, როდესაც გამოყენებული გვექონდა რეგრესიული ანალიზი, საშუალო არითმეტიკულის საშუალო კვადრატული ცდომილების ნაცვლად ვიყენებით სტანდარტულ გადახრას – S, რომელიც გამოითვლება ფორმულით:

$$s = \sqrt{\frac{(\bar{X} - X_i)^2}{n-1}}$$

თუ რაიმე შედეგი არ მოხვდებოდა ზღვარში $|\bar{x} - x_i| \geq 3\sigma_x$, ის ითვლებოდა აცდენად და მონაცემების გასაშუალოებისას მხედველობაში არ მიიღებოდა.

უფრო დიდი სიზუსტისთვის, ხშირად, ცდები ტარდებოდა სერიებად. ამიტომაც გაზომვები გვიხდებოდა ერთ ან სხვადასხვა პრეპარატზე, სარეაქციო არის ერთნაირი შედგენილობისას, მაგრამ სხვადასხვა დროს, ანდა სხვადასხვა დროს მიღებულ პრეპარატზე. ასეთი გზით მიღებული მონაცემების გაერთიანების მიზნით ვახდენთ ფერმენტული აქტიობების ნორმირებას, რითაც ვადგენდით სხვადასხვა დროს მიღებულ მონაცემებს შორის განსხვავებას. ეს ხდება ნორმირების კოეფიციენტის გამოთვლით. თუ ცდების პირველ სერიაში აქტიობები იყო: $V_{11}, V_{12}, \dots, V_{1n}$; შემდეგ სერიებში კი: $V_{21}, V_{22}, \dots, V_{2n}$; $V_{31}, V_{32}, \dots, V_{3n}$ და ა.შ. ნორმირების კოეფიციენტის გამოთვლა ხდებოდა შემდეგნაირად:

$$\frac{V_{11}}{V_{21}}, \frac{V_{12}}{V_{22}}, \dots, \frac{V_{1n}}{V_{2n}}, \text{ ანდა } \frac{V_{11}}{V_{31}}, \frac{V_{12}}{V_{32}}, \dots, \frac{V_{1n}}{V_{3n}}, \text{ და ა.შ.}$$

რის შედეგადაც თითოეული სერიისათვის ვიღებდით კოეფიციენტებს $K_{21}, K_{22}, \dots, K_{2n}$, ანდა $K_{31}, K_{32}, \dots, K_{3n}$ და ა.შ. შემდეგში ხდებოდა მათი გასაშუალოება, რის შედეგადაც მიიღებოდა ნორმირების კოეფიციენტი \bar{K}_2 , ანდა \bar{K}_3 და ა.შ.

შემდეგ, სერიის ყველა მონაცემი, ცდომილების ჩათვლით, მრავლდებოდა ამ კოეფიციენტზე. ნორმირება კეთდებოდა ყველა სერიისთვის (გამოვდიოდით იმ მოსაზრებიდან, რომ სხვადასხვა სერიის აქტიობებს შორის არის ხაზოვანი დამოკიდებულება). ხშირად ეს კოეფიციენტი ერთის ტოლი იყო, მაგრამ შემოწმება ხდებოდა ყოველთვის ყველა სერიისათვის.

ნორმირებულ შედეგებს, რომელიც წარმოდგენილი იყო $x_1 \pm \sigma_1$, $x_2 \pm \sigma_2, \dots, x_n \pm \sigma_n$ -ის სახით, ვასაშუალებდით აწონვის მეთოდით (Агекян, 1968), რისთვისაც ვითვლიდით საშუალო წონას (W), აწონილ საშუალოს

და აწონილი საშუალო არითმეტიკულის საშუალო კვადრატულ ცდომილებას.

$$W = \sum_{i=1}^n \frac{1}{\sigma_i^2} ; \quad \bar{X} = \frac{1}{W} \sum_{i=1}^n \frac{X_i}{\sigma_i^2} ; \quad \sigma_i = \sqrt{\frac{1}{W(n-1)} \sum_{i=1}^n \frac{(\bar{X} - X_i)^2}{\sigma_i^2}}$$

სადაც n – სერიების რიცხვია.

ხშირად, საქმე გვექონდა არა პირდაპირ ექსპერიმენტულ მონაცემებთან, არამედ ამ ექსპერიმენტული შედეგების გამოთვლით მიღებულ პარამეტრებთან. მაგალითად, Na,K-ATP-აზური აქტიობის გამოსათვლელად, როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ჯერ ვზომავდით ჯამურ ATPაზასა და Mg-ATPაზას, ხოლო Na,K-ATPაზას ვითვლიდით, როგორც მათ სხვაობას. ამ შემთხვევისათვის ვიყენებდით ირიბი გამოთვლებისათვის არსებულ სტატისტიკურ კანონებს, რომელიც ზოგადად აისახება ასე: თუ გვაქვს ექსპერიმენტულად განსაზღვრული $x_i \pm \sigma_x(n_x)$ და $y_i \pm \sigma_y(n_y)$ პარამეტრი, მაშინ $Z = f(x,y)$ -ს, რომელიც მიიღება მათი ირიბი გაზომვით, შეესაბამება ფორმულა $\bar{Z} = f(\bar{x}; \bar{y})$ და შესაბამისად:

$$\frac{\sigma_z^2}{n_z - 1} = [f'_x]^2 \frac{\sigma_x^2}{n_x - 1} + [f'_y]^2 \frac{\sigma_y^2}{n_y - 1}.$$

ჩვენ ვიყენებდით ამ ფორმულის კერძო შემთხვევას:

1. თუ $A = \text{const}$; $Z = Ax$, შესაბამისად, $\bar{Z} = A\bar{x}$; $\sigma_z = A\sigma_x$; $n_z = n_x$
2. Na,K-ATPაზას გამოთვლისათვის, სადაც $Z = x - y$, მივიღებთ $\bar{Z} = \bar{x} - \bar{y}$ და $\sigma_z^2 = \sigma_x^2 + \sigma_y^2$.

ეს გამოთვლები გამოიყენება მაშინ, როცა გაზომვების რიცხვი ტოლია $n_x = n_z = n_y$, რაც ჩვენს შემთხვევაში არ ირღვეოდა.

II. 6. ორ სიდიდეს შორის განსხვავების სარწმუნოების შეფასება

მონაცემების შედარებისას, პირველ რიგში, გამოწმენდით შესადარებელი სიდიდეების, მაგალითად, $x_1 \pm \sigma_x(n_x)$ -ისა და $y_1 \pm \sigma_y(n_y)$ -ის ცდომილებებს და ვადგენდით, იყო თუ არა ისინი ერთი და იმავე რანგის.

ამისათვის ვიყენებდით ფიშერის F კრიტერიუმს, კერძოდ, ვანგარიშობდით F ექსპერიმენტალურს (F_{exp}) შემდეგი ფორმულით:

$$F_{\text{exp}} = \frac{n_x \sigma_x^2}{n_y \sigma_y^2}$$

მრიცხველში იწერება უფრო დიდი ციფრი.

თითოეულისათვის ვითვლიდით თავისუფლების ხარისხს: $\nu_x = n_x - 1$; $\nu_y = n_y - 1$ და შესაბამის ტაბულაში ვპოულობთ F ტაბულის (F_{tab}) მნიშვნელობას. თუ $F_{\text{exp}} \geq F_{\text{tab}}$, მაშინ ითვლება, რომ $\sigma_x^2 \neq \sigma_y^2$ ე. ი. სხვადასხვა რანგისაა, ხოლო თუ $F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$, მაშინ $\sigma_x^2 = \sigma_y^2$, ე. ი. ერთი რანგისაა. თითოეული შემთხვევისათვის შესაბამისი ფორმულით ვითვლიდით t-კრიტერიუმს: თუ $F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$, მაშინ:

$$t = \frac{|X - Y|}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y}\right) \left(\frac{S_x + S_y}{n_x + n_y}\right)}}$$

სადაც, $S_x = \sum (x - x_i)^2$; $S_y = \sum (y - y_i)^2$. მიღებული შედეგების თავისუფლების ხარისხი იქნება: $\nu = n_x + n_y - 2$;

ხოლო თუ $F_{\text{exp}} \geq F_{\text{tab}}$, მაშინ:

$$t = \frac{|X - Y|}{\sqrt{\sigma_x^2 + \sigma_y^2}} ;$$

ხოლო თავისუფლების ხარისხი გამოითვლება ფორმულით:

$$v = \frac{1}{\frac{u^2}{n_X - 1} + \frac{(1-u)^2}{n_Y - 1}}$$

შესაბამის ტაბულაში თავისუფლების ხარისხისა და t-მნიშვნელობის საფუძველზე ვპოულობთ შესატყვის სარწმუნოების (P) მნიშვნელობას. თუ შედარებისას $P > 0,1$ (უფრო ხშირად, $P > 0,05$) ვთვლიდით, რომ ორ სიდიდეს შორის განსხვავება არ არის, ხოლო თუ $P < 0,05$ ორ სიდიდეს განსხვავებულად მივიჩნევდით.

II. 7. რეგრესიული ანალიზი

სრულ რეგრესიულ ანალიზს ვაწარმოებდით სპეციალური კომპიუტერული პროგრამის საშუალებით. გამოითვლებოდა როგორც პარამეტრები, ასევე მათი ცდომილებები და ხდებოდა სწორხაზოვნების შემოწმება-შეფასება.

რეგრესიის კოეფიციენტები განისაზღვრებოდა ფორმულით:

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)(\bar{y} - y_i)}{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

ექსპერიმენტული მრუდების აგება ხდებოდა მრუდის პოლინომური აპროქსიმაციის საშუალებით (სტანდარტული კომპიუტერული პროგრამა).

III. მრავალუბნიანი ფერმენტული სისტემების ანალიზის პრინციპები

მრავალუბნიანი ფერმენტული სისტემებისათვის, როდესაც რეაქციის მიმდინარეობის პირობები (ტემპერატურა, იონური ძალა, pH და სხვა). უცვლელია, ფერმენტის ფუნქციონალური ერთეულის სტრუქტურული მუდმივობისას (იგულისხმება ასოციაცია-დისოციაცია და პოლიმერიზაციის პროცესები), საწყისი ფერმენტული სიჩქარე იქნება ერთცვლადიანი $V=f(x)$ ფუნქცია, რომელიც გამოისახება შემდეგი ანალიტიკური ფორმულით:

$$V = \frac{x^n \sum_{i=0}^p \alpha_i x^i}{\sum_{i=0}^s \beta_i x^i} \quad S=n+m+p \quad (1)$$

სადაც, $\alpha_i > 0$ და $\beta_i > 0$ არის ინდივიდუალური სიჩქარის კოეფიციენტებისა და მუდმივი ლიგანდების კონცენტრაციების ნამრავლის ჯამი, x - ცვლადი ლიგანდის კონცენტრაცია; n , m და p წარმოადგენენ ხარისხობრივ პარამეტრებს და მთელი დადებითი რიცხვებია. სწრაფი წონასწორობის შემთხვევაში n წარმოადგენს აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვს, m - სრული ინჰიბიტორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვს (Chkadua, Kometiani, 1997). სწრაფი წონასწორობისას $p=h$ (h არის ნაწილობრივი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი) და $S=k$ (k არის უბნების სუმარული რიცხვი).

სტაციონალურ წონასწორობაში შემოდის ახალი პარამეტრი q , რომელსაც ეწოდება «სირთულის პარამეტრი» და მისი რიცხობრივი

მნიშვნელობა დამოკიდებულია ფერმენტული სისტემის მოლეკულოური მექანიზმის სირთულეზე. სტაციონალურ წონასწორობაში $p=h+q$; $S=k+q$. სწრაფი წონასწორობის პირობებში $q=0$.

ამრიგად, მრავალუბნიანი ფერმენტული სისტემებისათვის სიჩქარის განტოლებას რთული სახე აქვს და ასეთი სისტემების მოლეკულოური მექანიზმის გაშიფვრისათვის მხოლოდ კინეტიკური მრუდების გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდი, «მინიმალური მოდელის» პრინციპთან ერთად იძლევა ფერმენტული სისტემის პრინციპიალური კინეტიკური სქემის დადგენის საშუალებას. მრუდების გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდი გულისხმობს ფუნქციის პირველი და მეორე წარმოებულების ნულთან ტოლობის განსაზღვრას, რაც შესაბამისად, მოტრიალებისა და გადაღუნვის წერტილების განსაზღვრის საშუალებას იძლევა ; აგრეთვე, ფუნქციის პირველი და მეორე წარმოებულების ნიშნის განსაზღვრას, რაც იძლევა ინფორმაციას მრუდის ზრდადობა-კლებადობისა და ამოზნექილობა-ჩაზნექილობის შესახებ.

გარდა ამისა, მნიშვნელოვანია იმ წერტილების დადგენა, რომლებზედაც გაივლის კოორდინატთა სათავეში გამავალი მხები. მინიმალური მოდელის პრინციპი გულისხმობს ფერმენტის ფორმების და მათ შორის რეაქციის საფეხურების მინიმალური რაოდენობის შერჩევას, რომლებიც გარკვეული წესით არიან დაკავშირებულნი და ლიგანდის ნებისმიერ კონცენტრაციაზე უზრუნველყოფენ თეორიული და ექსპერიმენტული მრუდების გეომეტრიული ფორმების თანხვედრას.

n , m და p პარამეტრების დადგენის შემდგომ “მინიმალური მოდელის პრინციპიდან” გამომდინარე, იქმნება თეორიული სქემა, რომლის საფუძველზეც უნდა გამოვიყვანოთ ანალიტიკური ფორმულა.

მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდი თეორიული მრუდის გეომეტრიული ფორმის დადგენის საშუალებას იძლევა, რომელიც შემდგომ დარდება ექსპერიმენტულ მრუდთან. სწორედ ექსპერიმენტული მრუდეების და შესაბამისი მოდელის თეორიული მრუდეების გეომეტრიული ფორმების შედარება და მსგავსება წარმოადგენს ერთადერთ კრიტერიუმს, რომლითაც ფასდება მოდელის მიახლოება ფერმენტის ჭეშმარიტ მოლეკულურ მექანიზმთან.

III.1. n პარამეტრების განსაზღვრა

მრავალუბნიანი ფერმენტული სისტემების შემთხვევაში $V=f(x)$ მრუდს საკმაოდ რთული გეომეტრიული ფორმა აქვს, სადაც ექსტრემალურად მცირე კონცენტრაციების უბანში $[(V=f(x))$ ფუნქციის პირველ მოტრიალების წერტილამდე)], მრუდის ფორმას ძირითადად განსაზღვრავს n პარამეტრი; ლიგანდის ექსტრემალურად დიდი კონცენტრაციების უბანში $[(V=f(x))$ ფუნქციის ბოლო მოტრიალების წერტილიდან $+\infty$ -მდე)] – ძირითადად m პარამეტრი, ხოლო ლიგანდის შუა კონცენტრაციების უბანში მრუდის გეომეტრიული ფორმის ძირითადი განმსაზღვრელი p პარამეტრია. n , m და p პარამეტრების განსაზღვრისას უნდა ვიმუშაოთ შესაბამის უბანში.

n პარამეტრის რიცხოვრივი მნიშვნელობის განსაზღვრისათვის შემუშავებული იქნა სპეციალური მეთოდი და შესაბამისი

$$U(r;t) = \left[\frac{t^n \sum_{i=0}^s \beta_i t^{-i}}{\sum_{i=0}^p \alpha_i t^{-i}} \right]^{1/r}$$

კომპიუტერული პროგრამა (Kometiani, 1982). ამ მეთოდის პრინციპს საფუძვლად უდევს $U(r; t)$ ფუნქციის

(2)

შემდეგი თვისება: $U(r; t)$ ფუნქციისთვის არსებობს ღია ინტერვალი $[(t_0; +\infty)$ (t_0 არის $y = \sqrt{u} = f(r; t)$ ფუნქციის ბოლო მოტრიალების წერტილი)], სადაც ფუნქციას აქვს ჩაზნექილი ფორმა, როდესაც $r < n$, ამოზნექილი ფორმა – როცა $r > n$, ხოლო როდესაც $r = n$, $U(r; t)$ ფუნქციას გააჩნია ასიმპტოტა.

$(t_0; +\infty)$ ინტერვალზე r -ისგან დამოკიდებული მრუდის ფორმის აღნიშნული ცვლილებები იძლევა n -პარამეტრის ვიზუალური, გრაფიკული განსზღვრის საშუალებას. თუ ექსპერიმენტული წერტილები მოთავსდება კორექტულ სამუშაო ინტერვალში, როდესაც $r = n$, აღნიშნულ წერტილებზე გავლებული რეგრესიის ხაზისთვის აწონილი საშუალო კვადრატული ცდომილება (MU), გასაშუალებული აპროქსიმაციის კოეფიციენტი (MV) და F ტესტი ღებულობენ მინიმალურ, ხოლო კორელაციის კოეფიციენტი (CC) – მაქსიმალურ მნიშვნელობას. ასიმპტოტის ფორმულას აქვს შემდეგი სახე:

$$U_r = a_r + b_r t = r \sqrt{\frac{\beta_0}{\alpha_0}} \left[\frac{1}{r} \left(\frac{\beta_1}{\beta_0} - \frac{\alpha_1}{\alpha_0} + t \right) \right] \quad (3)$$

საიდანაც,
$$a_r = \frac{D_{01}}{r \alpha_0 \beta_0} \cdot r \sqrt{\frac{\beta_0}{\alpha_0}} \quad (D_{01} = \alpha_0 \beta_1 - \beta_0 \alpha_1)$$

$$b_r = r \sqrt{\frac{\beta_0}{\alpha_0}} \quad t_0 = -\frac{a}{b} = -\frac{D_{01}}{r \alpha_0 \beta_0}$$

ზემოთ აღნიშნულიდან გამომდინარე, ნათელია, რომ განსაკუთრებული ყურადღება უნდა მიექცეს სამუშაო ინტერვალის სწორად შერჩევას. სამუშაო ინტერვალზე «სახიფათო წერტილების» (მოტორიალებისა და გადაღუნვის წერტილები) არსებობა შეიძლება გახდეს n -ის არასწორი განსაზღვრის მიზეზი. სამუშაო ინტერვალის ზედა ზღვარი დამოკიდებულია ფერმენტული რეაქციის მოლეკულური მექანიზმის ბუნებაზე, რადგანაც მისგან გამომდინარე, მრუდს შეიძლება ჰქონდეს მოტორიალებისა და გადაღუნვის წერტილები, ამიტომაც, მათი ამოგდების თვალსაზრისით, ვიხილავთ ინტერვალს $V=f(x)$ ფუნქციის პირველ მოტორიალების წერტილამდე. სამუშაო ინტერვალზე $\ln u=f(t)$ მრუდს უნდა ჰქონდეს ამოზნექილი ფორმა (ე. ი.

ხოლო $\ln u=f(\ln t)$ ფუნქციას არ უნდა ჰქონდეს გადაღუნვის წერტილები. სამუშაო ინტერვალის ქვედა ზღვარი კი მოთავსებულია ექსტრემალურად მცირე სიდიდეების უბანში და შეიძლება ცდომილების რიგის იყოს. ამიტომ, გამოთვლებიდან ამოსაგდება წერტილები, რომელთა ფარდობითი ცდომილება აღემატება $0,2$ -ს ($\varepsilon(v_i) > 0,2$).

შემდეგი ეტაპი გულისხმობს $y=f(r; t)$ მრუდის ფორმის ანალიზს რეგრესიის მეთოდით. r -ის ვარირება ხდება ერთიდან ათამდე (ან ოცამდე) ბიჯით $\Delta r=1$. $U(r; t) = r\sqrt{1/V}$ $\sigma(r; t) = \frac{1}{r}(V)^{\frac{1}{r}+1} \cdot \sigma_{(v)}$

r -ის ყოველი მნიშვნელობისთვის ითვლება მისი ცდომილება; ყოველი r -ისათვის ხდება რეგრესიის ხაზის განსაზღვრა $U_r=a_r+b_r t$; ანალიზდება $\Delta=U_r-U(r; t)$ გამოსახულების ნიშნების განაწილება და ფიქსირდება r_1 -ისა და r_2 -ის მნიშვნელობები, რომლის დროსაც იწყება და მთავრდება ნიშნების არევა. ითვლება აწონილი საშუალო

კვადრატული ცდომილება (MU), გასაშუალებული აპროქსიმაციის კოეფიციენტი (MV), სწორხაზოვნების საზომი (F_{exp}) და კორელაციის კოეფიციენტი (CC):

$$MU = \left[\sum_{i=1}^k \left(\frac{U_r - U(r, t)}{\sigma(r, t)} \right)^2 \right]^{1/2} \quad F_{exp} = \frac{k \sum_{i=1}^k (U_r - U(r, t))^2}{(k-2) \sum_{i=1}^k (\sigma(r, t))^2} \quad (4)$$

$$MV = \sum_{i=1}^k \frac{V_r - v_r}{\sigma(r, t)} \quad CC = \frac{\sum_{i=1}^k (\bar{U}_r - u_i)(\bar{t} - t_i)}{\left[\sum_{i=1}^k ((\bar{U}_r - u_i))^2 \sum_{i=1}^k ((\bar{t} - t_i))^2 \right]^{1/2}} \text{სადაც,}$$

k - წერტილების რიცხვია (პარალელური გაზომვების რიცხვი მუდმივია).

შემდეგ ეტაპზე ითვლება R , R_1 და R_2 :

- 1) R ფასდება r -ის იმ მნიშვნელობით, როდესაც MV , F_{exp} და MU აქვს მინიმალური მნიშვნელობა, ხოლო CC დებულობს მაქსიმალურ მნიშვნელობას.
- 2) R_1 სიდიდე ფასდება r -ის მნიშვნელობით, რომლის დროსაც იწყება $\text{sing } \Delta i$ განაწილების არევა.
- 3) R_2 სიდიდე ფასდება r -ის მნიშვნელობით, რომლის დროსაც მთავრდება $\text{sing } \Delta i$ განაწილების არევა.

შემდეგი ეტაპი გულისხმობს r -ის ვარიაციის გამეორებას r_1-r_2 ინტერვალში შემცირებული ბიჯით – $\Delta r=0,1$. საბოლოოდ, R , R_1 და R_2 -ის საშუალებით შესაძლებელია გამოვთვალოთ პირველი და მეორე მიახლოებაში R -ის დაშორება n -ის ჭეშმარიტი მნიშვნელობიდან $|R-n|$

$$\left| \bar{R} - n \right|_1 = \frac{(R_2 - R_1) \cdot t_1 t_2}{t_1 + t_2} \quad \text{პირველ მიახლოებაში}$$

$$\left| \bar{R} - n \right|_2 = \frac{(\bar{R} - R_2) \cdot t_2^2 + (\bar{R} - R_1) \cdot t_1^2}{t_2 - t_1} \quad \text{მეორე მიახლოებაში}$$

სადაც, t_1 და t_2 სამუშაო ინტერვალის საწყის და საბოლოო წერტილებს წარმოადგენენ.

III. 2. m პარამეტრის განსაზღვრა

სიჩქარის ზოგადი განტოლების მრიცხველი და მნიშვნელი გავამრავლოთ t^s -ზე ($t=1/x$). მივიღებთ:

$$V = \frac{t^m \sum_{i=0}^p \alpha_{p-i} t^i}{\sum_{i=0}^s \beta_{s-i} t^i} . \quad (5)$$

ამ გამოსახულების ანალიტიკური ფორმა აბსოლუტურად იდენტურია $V=f(x)$ განტოლებისა, მხოლოდ n პარამეტრი შენაცვლებულია m პარამეტრით. ცხადია, რომ სრული ინჰიბიტორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვის (m) განსაზღვრის თეორია და მეთოდი იდენტური იქნება n -ის განსაზღვრისათვის გამოყენებული თეორიისა და მეთოდისა, საჭიროა მხოლოდ $U(r,t)$ ფუნქციაში არგუმენტის შეცვლა x -ით ($x=1/t$).

სიჩქარის ძირითადი განტოლებიდან ნათელია, რომ თუ ცვლადი ლიგანდი აუცილებელ აქტივატორს წარმოადგენს, მაშინ არგუმენტის ნულთან ტოლობისას ფუნქციაც ნულის ტოლი ხდება. მაგრამ, ამ შემთხვევაში, თუ ცვლადი ლიგანდი არ წარმოადგენს აუცილებელ აქტივატორს, არგუმენტის ნულთან ტოლობისას ფუნქცია ღებულობს

ნულისაგან განსხვავებულ მნიშვნელობას $v_0 = \frac{\alpha_0}{\beta_0}$. აღნიშნულ

შემთხვევაში $V=f(x)$ ფუნქციის მაგივრად საჭიროა ანალიზი გაუკეთდეს

$\Delta v = v - v_0$ ფუნქციას

$$\Delta V = \frac{\sum_{i=1}^p D_{i0} x^i - \alpha_0 \sum_{i=p+1}^s \beta_i x^i}{\beta_0 \sum_{i=0}^s \beta_s x^i} \quad (6)$$

აღსანიშნავია, რომ ის მიდგომები, რომელთაც ვიყენებდით $V=f(x)$ ფუნქციის შემთხვევაში, ΔV ფუნქციის შემთხვევაშიც იძლევა ფერმენტული სისტემის მოლეკულური მექანიზმის გაშიფვრის საშუალებას.

IV. ექსპერიმენტული მონაცემები

IV. 1. NA-ს გავლენა Na,K-ATPაზური სისტემის ელექტროგენურობაზე

თავის ტვინის ინტეგრალურ მოქმედებაში აქტიურ როლს ასრულებს Na,K-ATPაზური სისტემა, რომლის როლი ნერვულ უჯრედში მიმდინარე პროცესებში განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი გახდა მას შემდეგ, რაც აღმოჩნდა, რომ ის ელექტროგენურია და უშუალოდ მონაწილეობს პოტენციალის გენერაციაში.

Na,K-ATPაზური აქტიობა და მისი ელექტროგენურობა რეგულირებადია და უჯრედში არსებობს ამ რეგულაციის

განსაზღვრული სისტემები, რომელთა მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი ჯერ კიდევ ბოლომდე არ არის შესწავლილი. ამ რეგულაციის პროცესში განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ნეიროტრანსმიტერების და სინაფტოსომურ ციტოზოლში აღმოჩენილი ფაქტორის (SF_a) როლის დადგენა, რადგანაც, არსებული მონაცემების საფუძველზე, ისინი მონაწილეობენ რეგულაციის აღნიშნულ პროცესში, მაგრამ უცნობია Na,K -ATP-ის ელექტროგენურ კომპონენტზე მათი ზემოქმედების მექანიზმი.

ამიტომაც მნიშვნელოვანია იმი ს გარკვევა, თუ რა ცვლილებებს იწვევს ნეიროტრანსმიტერების და SF_a -ს მოქმედება Na^+ -ის და K^+ -ის ტრანსპორტის სტოქეომეტრიის თვალსაზრისით, რადგან ელექტროგენურობა არის ურთიერთ საწინააღმდეგო მხარეს Na^+ -ის და K^+ -ის არათანაბარი გადატანის შედეგი. ამიტომ უნდა შეგვესწავლა, მუდმივია თუ არა სტოქეომეტრია.

Na,K -ATP-ისაზე, როგორც ეს ლიტერატურული ნაწილიდან ჩანს, მოქმედებს ძირითადად ოთხი ნეიროტრანსმიტერი: დოფამინი (DA), ნორადრენალინი (NA), სეროტონინი (5-HT) და აცეილქოლინი (ACh).

აღნიშნული ნეიროტრანსმიტერებიდან Na,K -ATP-ისაზე მოქმედების ყველაზე ძლიერი ეფექტი აქვს DA-ს, ხოლო ყველაზე სუსტი - ACh-ს. ამიტომაც კვლევისათვის ავირჩიეთ საშუალო ეფექტის მქონე ნეიროტრანსმიტერი - NA.

პრეპარატად, როგორ უკვე აღვნიშნეთ, გამოიყენებოდა თეთრი ვირთაგვას თავის ტვინის სინაფსური მემბრანებისა და მიკროსომული მემბრანების სუბუჯრედული ფრაქციები.

Na,K-ATPაზას ელექტროგენურ კომპონენტზე ნორადრენალინის მოქმედების მოლეკულური მექანიზმის დადგენისათვის თავდაპირველად შევისწავლეთ OPS რეჟიმში ($[MgATP] > [ATP_f] = [Mg_f^{++}]$) მომუშავე ფერმენტის აქტიობის დამოკიდებულება K^+ -ის კონცენტრაციიდან, საინკუბაციო არეში NA-ის არასებობისას, რადგანაც ცნობილია, რომ OPS რეჟიმში, როცა $[NA]=0$, K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 2.

სურათ 1-ზე ნაჩვენებია Na,K-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება K^+ -ის კონცენტრაციიდან $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში, სადაც $y(r;t)=\sqrt[r]{u}=f(t)$, $u=1/v$, v – Na,K-ATPაზური აქტიობაა, $t=1/[K^+]$, სარეაქციო არე ისე იყო შერჩეული, რომ ფერმენტს ემუშავა OPS რეჟიმში: $[MgATP]=1,628$ mM, $[Mg_f^{++}]=0,372$ mM, $[ATP_f]=0,372$ mM, $[NaCl]=147$ mM, $[NA]=0$. აღებული ქვეონდა K^+ -ის ვარიაბელური კონცენტრაცია 0,1 mM-დან 1,2 mM-მდე.

აღნიშნული მონაცემების საფუძველზე, მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდმა აჩვენა, რომ $\sqrt[r]{u}=f(t)$ ფუნქციის სარწმუნო ლინეარიზაცია მიიღწევა იმ შემთხვევაში, როცა $r=2$, რაც მიუთითებს, რომ K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 2, რაც ემთხვევა არსებულ ლიტერატურულ მონაცემებს (ექსპერიმენტულად გამოთვლილი აუცილებელი აქტივატორების რიცხვი (R_0), პირველ მიახლოებაში ჭეშმარიტი მნიშვნელობიდან გადახრა (R_0-n) და რეგრესიის კოეფიციენტები (a , b) მოტანილია 1 ცხრილში.

სურათ 2-ზე წარმოდგენილია OPS რეჟიმში NA-ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციისას Na,K-ATPაზური აქტიობის K^+ -ის კონცენტრაციიდან დამოკიდებულება $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში, სადაც სადაც $y(r;t)=\sqrt{u} = f(t)$, $u=1/v$, $t=1/[K^+]$.

სურათი 2-დან ჩანს, რომ NA-ს ფიქსირებული კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად იზრდება რეგრესიის ხაზების დახრა, იზრდება ორდინატთა ღერძზე მოჭრილი მონაკვეთიც (რეგრესიის კოეფიციენტების მნიშვნელობა წარმოდგენილია ცხრილ 1-ში).

აღსანიშნავია, რომ წრფეები იკვეთებიან აბსცისათა ღერძზე ერთ წერტილში, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ ამ პირობებში NA წარმოადგენს არასპეციფიკურ ინჰიბიტორს (Kometiani, 2005).

სურათიდან ჩანს, რომ სამივე შემთხვევაში $\sqrt{u} = f(t)$ ფუნქციის სარწმუნო ლინეარიზაცია მიიღწევა იმ შემთხვევაში, როდესაც $r=1$ და K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის, განკუთვნილი უბნების რაცხვი არის 1, ე. ი. NA-ის ზემოქმედებით იცვლება K^+ -ის აქტივატორული უბნების რიცხვი და ნაცვლად 2-სა ხდება 1.

ამის შემდეგ, შევისწავლეთ OPM რეჟიმში Na,K-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება K^+ -ს კონცენტრაციიდან სარეაქციო არეში NA-ის გარეშე და NA-ს დამატებისას, რათა გვენახა, იცვლებოდა თუ არა K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი.

სურათ 3-ზე წარმოდგენილია OPM რეჟიმში მყოფი Na,K-ATPაზას ფერმენტული აქტიობის K^+ -ს კონცენტრაციიდან დამოკიდებულება $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში, სადაც $y(r;t)=\sqrt{u} = f(t)$, $u=1/v$, $t=1/[K^+]$.

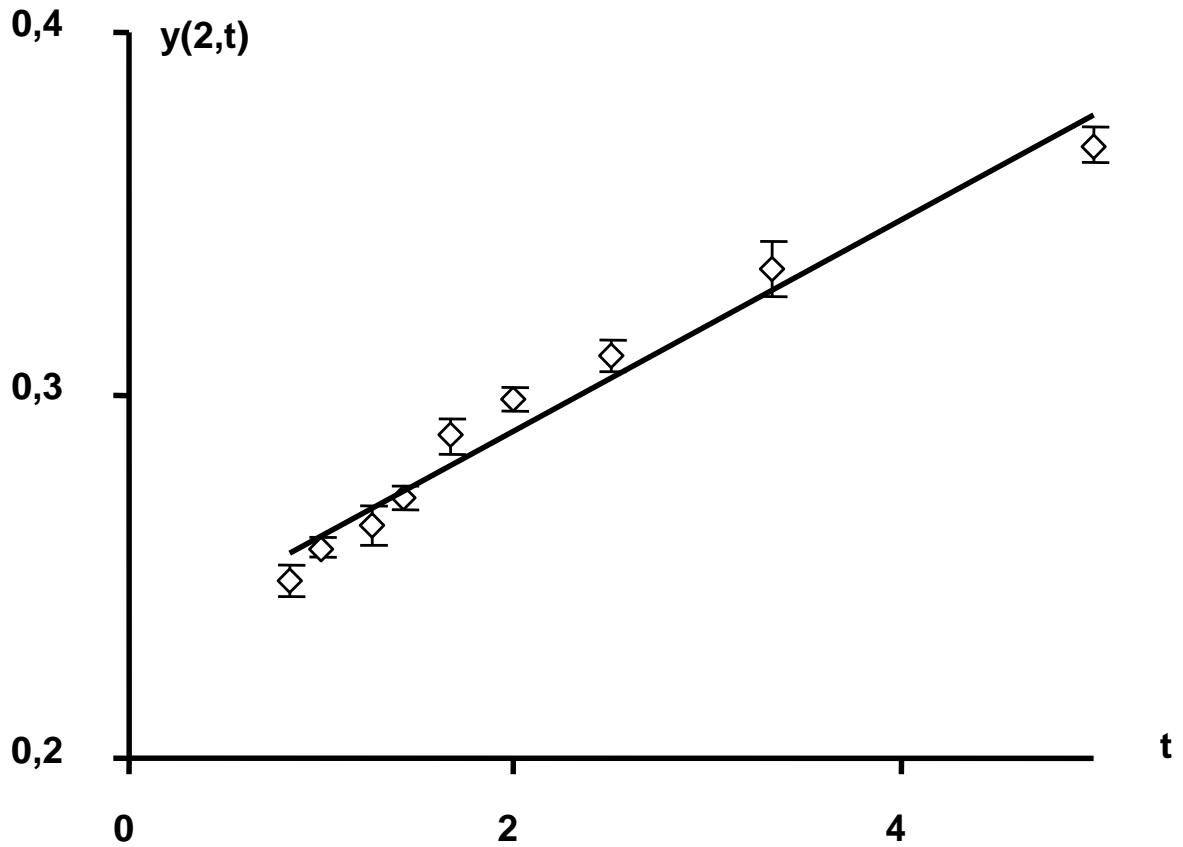
სარეაქციო არის შემადგენლობაა:

$[MgATP]=1,628mM$, $[Mg^{++}]=[ATP]=0,372 mM$, $[NaCl]=147 mM$, $[NA]=0.1 mM$ (ხაზი 1), $[NA]=0.05 mM$ (ხაზი 2), $[NA]=0.025 mM$ (ხაზი 3).

სარეაქციო არე შედგება $[MgATP]=1,8mM$, $[Mg^{++}]=3 mM$, $[ATP]=0,05 mM$, $[NaCl]=147 mM$, $[NA]=0.1 mM$ (ხაზი 1), $[NA]=0$ (ხაზი 2).

სურათიდან ჩანს, რომ ორივე შემთხვევაში $\sqrt{u}=f(t)$ ფუნქციის სარწმუნო ლინეარიზაცია მიიღწევა მაშინ, როდესაც $r=1$, ე. ი. OPM რეჟიმში როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი NA-ს მოქმედებით არ იცვლება და რჩება 1-ის ტოლი.

სურათიდან ჩანს, რომ სარეაქციო არეში NA-ის დამატებისას იზრდება რეგრესიის ხაზების დახრა და ორდინატა ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთი (რეგრესიის კოეფიციენტების მნიშვნელობა მოცემულია ცხრილ 1-ში). წრფეები აბსცისათა ღერძზე იკვეთებიან ერთ წერტილში, ე. ი. OPM რეჟიმში NA მოქმედებს როგორც არასპეციფიკური ინჰიბიტორი (Kometiani, 2005).



სურ. 1. Na,K-ATP-ის აქტივობის დამოკიდებულება K^+ -ის კონცენტრაციისგან OPS რეჟიმში.

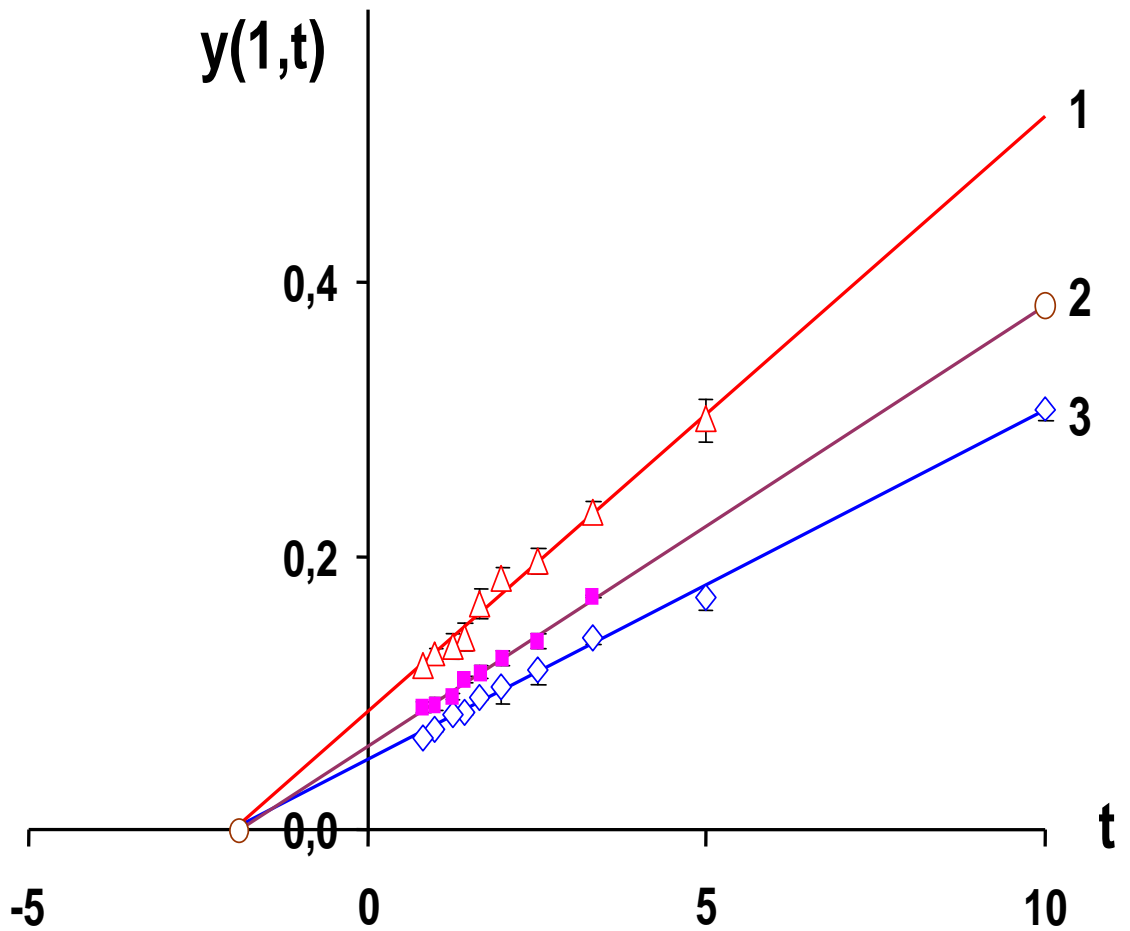
$y(2,t) = f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში სარეაქციო არის შემადგენლობა:

$$[MgATP]=1,628mM,$$

$$[Mg^{++}]=[ATP]=0,372 mM,$$

$$[NaCl]=147 mM,$$

$$[NA]=0.$$



სურ. 2. Na,K-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება K^+ -ის კონცენტრაციისგან OPS რეჟიმში.

$y(1;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში.

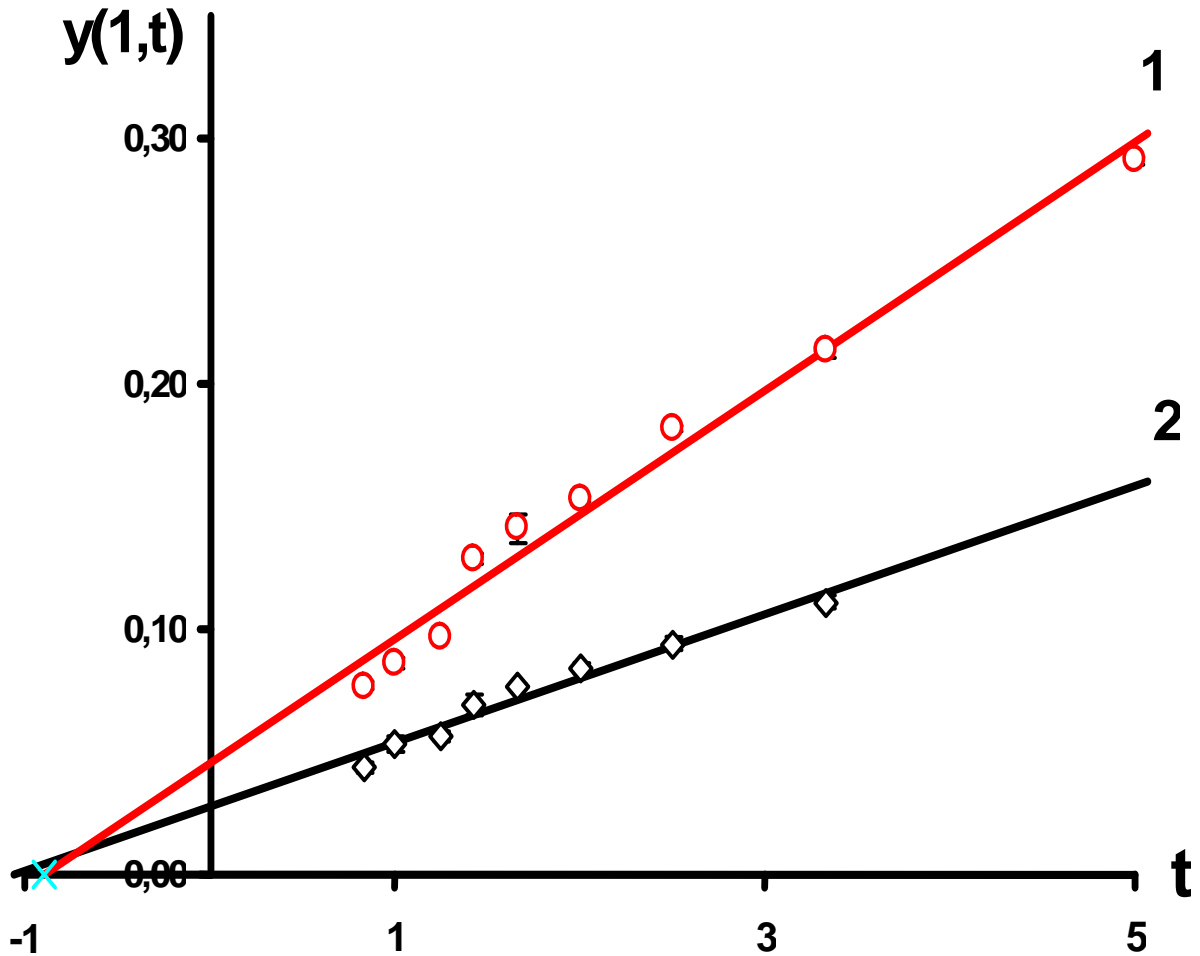
სარეაქციო არის შემადგენლობა:

$[MgATP]=1,628mM$, $[Mg^{++}]=[ATP]=0,372 mM$, $[NaCl]=147 mM$.

$[NA]=0.1 mM$ (ხაზი 1)

$[NA]=0.05 mM$ (ხაზი 2)

$[NA]=0.025 mM$ (ხაზი 3)



სურ. 3. Na,K-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება K^+ -ის კონცენტრაციისგან OPM რეჟიმში.

$y(1;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში.

სარეაქციო არის შემადგენლობა:

$[MgATP]=1,8mM$, $[Mg^{++}]=3 mM$, $[ATP]=0,05 mM$, $[NaCl]=147 mM$.

$[NA]=0.1 mM$ (ხაზი 1)

$[NA]=0$ (ხაზი 2)

OPS და OPM რეჟიმებში Na,K-ATPას K^+ -ით აქტივაციის მექანიზმზე NA-ის მოქმედების შესწავლის შემდეგ შევისწავლეთ აღნიშნულ რეჟიმებში Na^+ -ით აქტივაციის მექანიზმზე NA-ის გავლენა.

სურათ 4-ზე წარმოდგენილია OPS რეჟიმში Na,K-ATPას აქტიობის დამოკიდებულება Na^+ -ის კონცენტრაციიდან $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში (სადაც $y(r;t)=\sqrt{u} = f(t)$, $u=1/v$, $t=1/[Na^+]$, $r=3$), NA-ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის პირობებში.

სარეაქციო არე შედგებოდა:

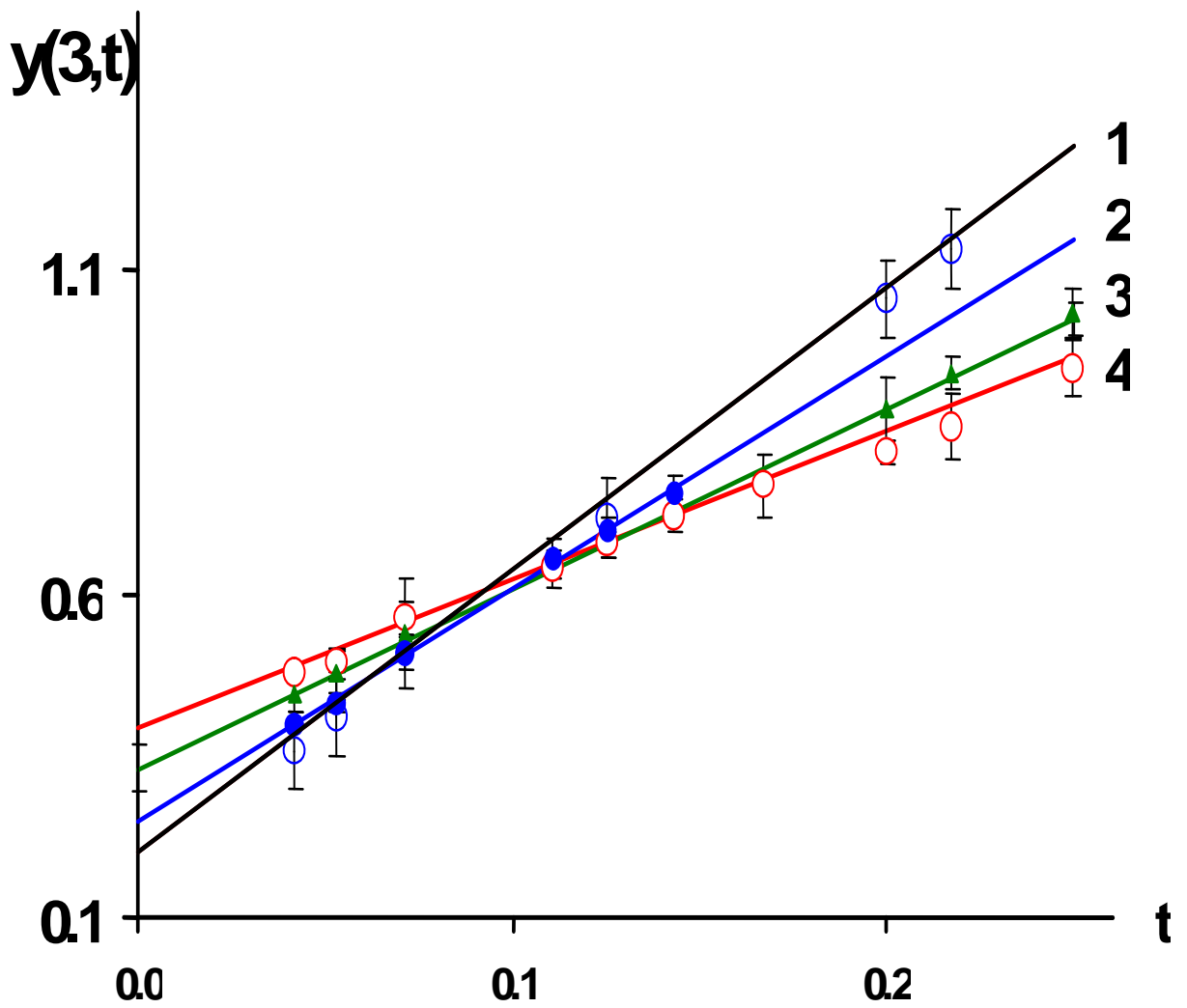
$MgATP]=1.8mM$, $[Mg^{++}]=[ATP]=0.4 mM$, $[KCl]=125 mM$, $[NA]=0$ (ხაზი 1), $[NA]=0.025 mM$ (ხაზი 2), $[NA]=0.05 mM$ (ხაზი 3), $[NA]=0.1 mM$ (ხაზი 4). ყველა შემთხვევაში $\sqrt{u} = f(t)$ ფუნქციის ლინეარიზაცია მიიღწევა, როდესაც $r=3$, ე. ი. Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი როგორც NA-ის გარეშე, ისე NA-ის დამატებისას არ იცვლება და არის 3.

აღსანიშნავია, რომ კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად რეგრესიის ხაზების დახრა მცირდება, ხოლო ორდინატთა ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთი იზრდება (რეგრესიის კოეფიციენტების მნიშვნელობები მოცემულია ცხრილ 1-ში). წრფეების გადაკვეთა ხდება კოორდინატთა სისტემის I მეოთხედში, რაც მიუთითებს, რომ Na^+ -ის დაბალი კონცენტრაციისას ადგილი აქვს NA-ით გამოწვეულ აქტივაციას, ხოლო Na^+ -ის მაღალი კონცენტრაციისას - NA-ით გამოწვეულ ინჰიბიციას და ამ პირობებში NA წარმოადგენს ორმაგი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორს (Kometiani, 2005).

სურათ 5-ზე წარმოდგენილია $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში (სადაც $y(r;t)=\sqrt{u}=f(t)$ $u=1/v$, $t=1/[Na^+]$), Na,K-ATP-ის აქტიობის დამოკიდებულება Na^+ -ის კონცენტრაციიდან OPS რეჟიმში, როცა $[NA]=0 - 1$ ხაზი, და OPM რეჟიმში NA-ის გარეშე და NA-ს დამატებისას: $[NA]=0 - 3$ ხაზი, $[NA]=0,1 \text{ mM} - 2$ ხაზი. OPS რეჟიმში აღებული იყო იგივე პირობები, რაც სურათ 4-ზე, ხოლო OPM რეჟიმში – რაც სურათ 3-ზე.

აღსანიშნავია, რომ სარეაქციო არეში NA-ის არარსებობისას OPS რეჟიმში $\sqrt{u}=f(t)$ ფუნქციის სარწმუნო ლინეარიზაცია მიიღწევა მაშინ, როცა $r=3$, ხოლო OPM რეჟიმში – როცა $r=4$. ე. ი. OPS რეჟიმში NA-ის არარსებობისას Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი რიცხვი OPS რეჟიმში არის 3, ხოლო OPM რეჟიმში 4.

საინტერესოა, რომ NA-ის დამატებისას, OPM რეჟიმში $\sqrt{u}=f(t)$ ფუნქციის სარწმუნო ლატერალიზაცია მიიღწევა, როცა $r=3$, ე. ი. OPM რეჟიმში NA-ის დამატებით იცვლება Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის, განკუთვნილი უბნების რიცხვი და ნაცვლად 4-სა ხდება 3. წრფეების გადაკვეთა ხდება კოორდინატთა სისტემის I მეოთხედში (რეგრესიის კოეფიციენტების მნიშვნელობები მოცემულია ცხრილში 1).



სურ. 4. Na,K-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება Na^+ -ის კონცენტრაციისგან შებრუნებულ სიდიდეებში OPS რეჟიმში .

$y(3;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში.

სარეაქციო არის შემადგენლობა:

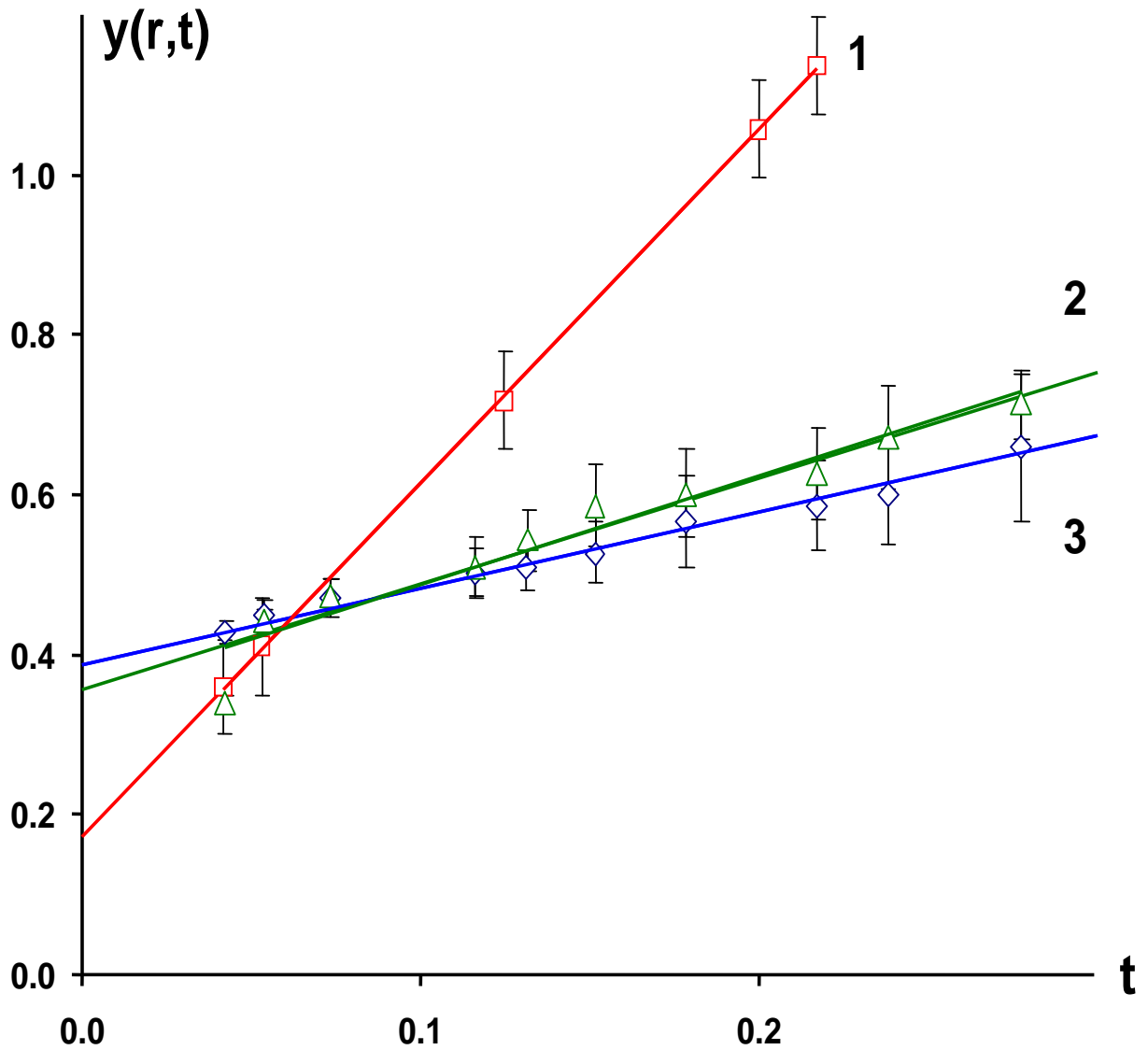
$[\text{MgATP}]=1.8\text{mM}$, $[\text{Mg}^{++}]=[\text{ATP}]=0.4\text{mM}$, $[\text{KCl}]=125\text{mM}$.

$[\text{NA}]=0$ (ხაზი 1)

$[\text{NA}]=0.025\text{mM}$ (ხაზი 2)

$[\text{NA}]=0.05\text{mM}$ (ხაზი 3)

$[\text{NA}]=0.1\text{mM}$ (ხაზი 4)



სურ. 5. Na,K-ATP-ის აქტივობის დამოკიდებულება Na^+ -ის კონცენტრაციისგან. OPS რეჟიმში, $[\text{NA}]=0$, ($r=3$) (ხაზი 1).
OPM რეჟიმში, $[\text{NA}]=0.1 \text{ mM}$, ($r=3$) (ხაზი 2).
OPM რეჟიმში $[\text{NA}]=0$, ($r=4$). (ხაზი 3).
(OPS რეჟიმში ისეთივე პირობებია როგორც სურ.4-ზე; ხოლო OPM რეჟიმში, ისეთივე, როგორც სურ.3-ზე).

1, 2, 3, 4, 5-სურათებზე გამოსახული ფუნქციების პარამეტრები.

$y(r,t) = \sqrt[3]{1/V} = f(t)$	t	r	R₀	R₀-n	y(r,t) = a + bt		
					a	b	-a/b
Fig. 1 OPS; [NA]=0	1/[K ⁺]	2	2.004±0.021	- 0.086	0.231 ± 0.074	0.0302 ± 0.030	-
Fig. 2 [NA]=0.025 mM [NA]=0.05 mM [NA]=0.1 mM	1/[K ⁺]	1	1.01± 0.004 1.00± 0.008 1.00± 0.002	- 0.001 - 0.001 - 0.001	0.051 ± 0.002 0.061 ± 0.003 0.086± 0.004	0.0256 ± 0.001 0.0323 ± 0.001 0.0436 ± 0.002	2.008 ± 0.111 1.892 ± 0.110 1.979 ± 0.203
Fig. 3 [NA]=0. [NA]=0.1 mM	1/[K ⁺]	1	1.003±0.012 1.009±0.001	-0.16 - 0.103	0.027 ± 0.004 0.045 ± 0.007	0.0262±0.0022 0.0507±0.0089	1.061 ± 0.180 0.896 ± 0.145
Fig. 4 [NA]=0 [NA]=0.025 mM [NA]=0.05 mM [NA]=0.1 mM	1/[Na ⁺]	3	3.002±0.003 3.018±0.014 3.004±0.008 3.003±0.012	-0.16 -0.76 -0.46 -0.36	0.200 ± 0.005 0.247 ± 0.024 0.329 ± 0.004 0.393 ± 0.004	4.338 ± 0.032 3.614 ± 1.467 2.790 ± 0.083 2.209 ± 0.046	-
Fig. 5 OPS; [NA]=0 OPM; [NA]=0 OPM; [NA]=0.1 mM	1/[Na ⁺]	3 4 3	3.04± 0.003 4.04 ± 0.012 3.00 ± 0.012	-0.05 -0.36 -0.36	0.389 ± 0.083 0.349 ± 0.007 0.172 ± 0.009	0.953 ± 0.269 1.360 ± 0.068 4.428 ± 0.221	-

IV. 2. Na,K-ATPაზური სისტემის ნორადრენალინითა და სინაფტოსომური (SF_a) ფაქტორით რეგულაციის მექანიზმი

სინაფსურ მემბრანებში, როგორც აღვნიშნეთ, აღმოჩენილია Na,K-ATPაზას ნეიროტრანსმიტერებით რეგულაციის ახალი სისტემა. ნეიროტრანსმიტერების მოქმედება, თავის მხრივ, რეგულირდება სინაფტოსომურ ციტოზოლში აღმოჩენილი ფაქტორით (SF_a), რომლის დამატების შედეგად იხსნება Na,K-ATPაზაზე ნეიროტრანსმიტერების მოქმედებით გამოწვეული ინჰიბიცია და ფერმენტი მკვეთრად აქტივდება (Kometiani, Jariashvili, 2001).

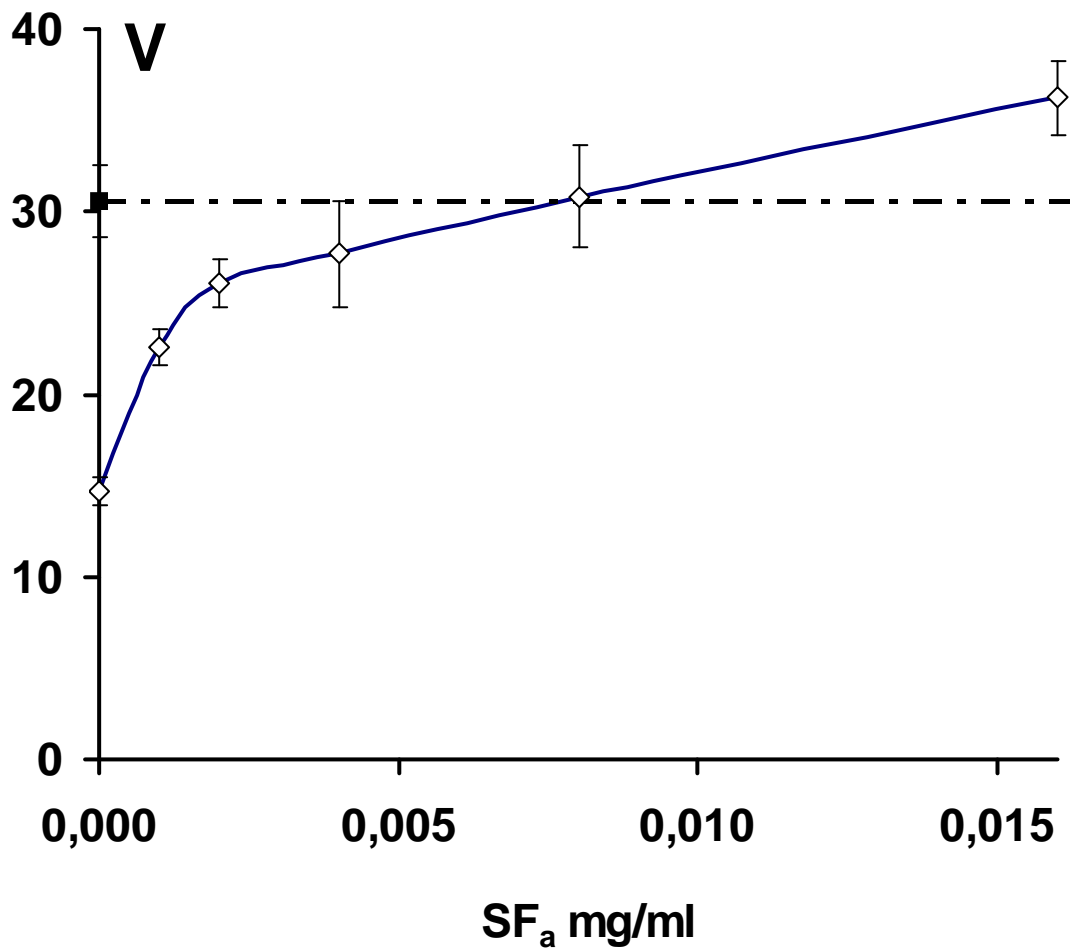
Na,K-ATPაზას რეგულაციას ნეიროტრანსმიტერებითა და SF_a-თი აქვს ფუნქციონალური მნიშვნელობა, რადგან ის სპეციფიურია სინაფსური გადაცემისათვის. დღეისათვის ბოლომდე არააშესწავლილი NT-სა და SF_a-ის Na,K-ATPაზაზე მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი, რომლის გარკვევაც დამატებით ინფორმაციას მოგვცემს ამ რეგულაციის ფუნქციონალური მნიშვნელობის შესახებ.

ამ მიზნით შეწავლილ იქნა Na,K-ATPაზას მუშაობის OPS და OPM რეჟიმებში NT-ისა და SF_a-ს გავლენა Na⁺-ისა და K⁺-ის ტრანსპორტის სტოქიომეტრიაზე.

სურათზე 6 ნაჩვენებია სარეაქციო არეში NA-ის არსებობისას Na,K-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება SF_a კონცენტრადიიან OPS რეჟიმში. სარეაქციო არის შემადგენლობა: [MgATP]=2.08 mM, [Mg⁺⁺]=[ATP_f]= 0.42 mM, [NaCl]=145 mM, [KCl]=5 mM, [NA]=0.1 mM.

წყვეტილი ხაზით აღნიშნულია Na,K-ATPაზური აქტიობა OPS რეჟიმში NT-ისა და SF_a-ს გარეშე.

სურათიდან ჩანს, რომ OPS რეჟიმში 0,1 mM NA-ის დამატების შედეგად Na,K-ATPაზური აქტიობა მცირდება დაახლოებით 62,9%-ით.



სურ. 6. NaK-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება SF_a კონცენტრაციიდან OPS რეჟიმში.

სარეაქციო არე:

[MgATP]=2.08 mM,

$[Mg^{++}] = [ATP_f] = 0.42 \text{ mM}$,
 $[NaCl] = 145 \text{ mM}$, $[KCl] = 5 \text{ mM}$,
 $[NA] = 0.1 \text{ mM}$.

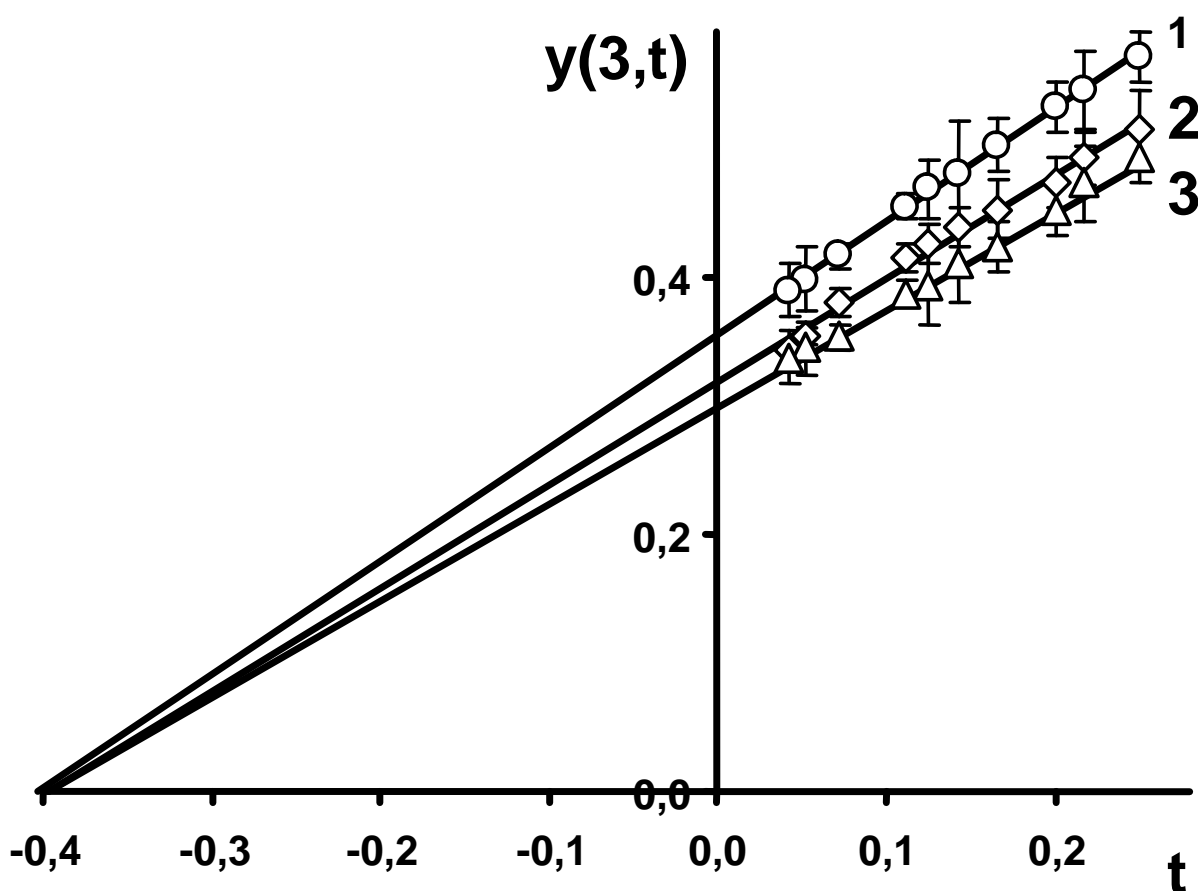
სარეაქციო არეში SF_a -ს დამატებისას NA -ის ინჰიბიტორული ეფექტი თანდათანობით იხსნება და ფერმენტის საწყისი აქტიობა აღდგება სარეაქციო არეში $0,008 \text{ მგ/მლ } SF_a$ -ს დამატებისას, ხოლო $0,016 \text{ მგ/მლ } SF_a$ -ს დამატება ფერმენტის საწყის აქტიობას ზრდის $18,5\%$ -ით.

აქედან გამომდინარე, შერჩეულ იქნა SF_a -ს შემდეგი კონცენტრაციები: 1) $0,001 \text{ მგ/მლ}$, როდესაც დაწყებულია NA -ის ინჰიბიტორული ეფექტის მოხსნა, მაგრამ ჯერ კიდევ არ არის აღდგენილი საწყისი Na, K -ATP-ის აქტიობა და 2) $0,016 \text{ მგ/მლ}$, როდესაც მთლიანად მოხსნილია NA -ის ინჰიბიტორული ეფექტი და ფერმენტის საწყისი აქტიობა გაზრდილია (სურ. 6).

ამის შემდეგ, შესწავლილ იქნა OPS რეჟიმში Na^+ -ის და K^+ -ის ტრანსპორტის სტოქიომეტრია NA -ისა და SF_a -ს ერთდროული ზემოქმედებისას, რისთვისაც განვსაზღვრეთ აღნიშნულ პირობებში Na^+ -ისა და K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი.

სურათ 7-ზე წარმოგენილია OPS რეჟიმში Na, K -ATP-ის აქტიობის დამოკიდებულება Na^+ -ს კონცენტრაციიდან $y(r;t) = f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში, სადაც $y(r;t) = \sqrt{u} = f(t)$, $u = 1/v$, $t = 1/[Na^+]$, სარეაქციო არეში SF_a -ს სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციისა და NA -ს ერთდროული არსებობისას.

სარეაქციო არე შეიცავს: $[MgATP]=2,08mM$, $[Mg^{++}]=[ATP_f]=0.42 mM$, $[KCl]=125 mM$, $[NA]=0.1 mM$, $[SF_a]=0$. - (ხაზი 1); $[SF_a]=0.001$ მგ/მლ - (ხაზი 2); $[SF_a]=0.016$ მგ/მლ - (ხაზი 3).



სურ. 7. Na,K-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება Na^+ -ის კონცენტრაციისგან OPS რეჟიმში NA-ისა და SF_a -ს ერთდროული არსებობისას $y(3;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში.

სარეაქციო არის შემადგენლობა:

$[MgATP]=2,08mM$, $[Mg^{++}]=[ATP_f]=0.42 mM$, $[KCl]=125 mM$, $[NA]=0.1mM$

$[SF_a]=0$. $y(3,t) = 0.8784t + 0.3542$ $-a/b= 0.4033 \pm 0.0030$ (ხაზი 1)

$[SF_a]=0.001 mM$. $y(3,t) = 0.8000t + 0.3180$ $-a/b= 0.3975 \pm 0.0022$ (ხაზი 2)

$[SF_a]=0.016 mM$. $y(3,t) = 0.7509t + 0.2983$ $-a/b= 0.3972 \pm 0.0056$. (ხაზი 3)

მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდიდან გამომდინარე $\sqrt{u}=f(t)$ ფუნქციის სარწმუნო ლინეარიზაცია მიიღწევა მაშინ, როდესაც $r=3$, რაც მიუთითებს, რომ აღნიშნულ პირობებში Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის, განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 3. სურთიდან ჩანს, რომ SF_a -ს ფიქსირებული კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად რეგრესიის ხაზების დახრა მცირდება; მცირდება აგრეთვე ორდინატთა ღერძზე მოჭრილი მონაკვეთები და წრფეები აბსცისათა ღერძზე იკვეთებან ერთ წერტილში, რაც მიუთითებს, რომ SF_a არ ცვლის ფერმენტის თვისობას Na^+ -ის მიმართ (სურათი 7).

ცხრილში 2 მოცემულია სარეაქციო არეში $0,1 mM$ NA -ის არსებობისას OPS რეჟიმში Na^+ -სა და K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვის დამოკიდებულება SF_a -ს კონცენტრაციიდან.

ცხრილიდან ჩანს, რომ OPS რეჟიმში NA -სთან ერთად SF_a -ს სხვადასხვა კონცენტრაციის დამატებისას ყველა შემთხვევაში, Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების

რიცხვი არის 3, ხოლო K^+ -ს, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 2.

ამის შემდეგ შვეისაწავლეთ OPM რეჟიმში Na^+ -ს და SF_6 -ს ერთდროული ზემოქმედებისას Na^+ -სა და K^+ -ის ტრანსპორტის სტოქიომეტრია და განვსაზღვრეთ აღნიშნულ პირობებში Na^+ -სა და K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის, განკუთვნილი უბნების რიცხვი.

ცხრილი 2.

აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რაოდენობის დამოკიდებულება SF_6 -დან OPS რეჟიმში

ცდის პირობები	[SF], mg/ml	აუცილებელ აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რაოდენობა $n(Na^+)$ და $n(K^+)$
[NaCl]=144 mM=const $\sqrt[3]{1/V} = f(1/[K^+])$	0.001	$R=2.0038 \pm 0.163$; $(R-n)=-0.2704$; $\Rightarrow n(K^+)=2$
	0.016	$R=2.0014 \pm 0.073$; $(R-n)=-0.1714$; $\Rightarrow n(K^+)=2$
[KCl]=125 mM=const $\sqrt[3]{1/V} = f(1/[Na^+])$	0	$R=3.0001 \pm 0.094$; $(R-n)=-0.2438$; $\Rightarrow n(Na^+)=3$
	0.001	$R=3.0371 \pm 0.182$; $(R-n)=p0.0974$; $\Rightarrow n(Na^+)=3$
	0.016	$R=3.0015 \pm 0.083$; $(R-n)=p0.0631$; $\Rightarrow n(Na^+)=3$

სურათზე 8 ნაჩვენებია OPM რეჟიმში Na,K-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება Na^+ -ს კონცენტრაციიდან $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში, სადაც $y(r;t)=\sqrt{u}=f(t)$, $u=1/v$, $t=1/[\text{Na}^+]$, სარეაქციო არეში NA–ისა და SF_a -ს ერთდროული არსებობისას.

სარეაქციო არე შემდეგი შედგენილობისაა:

$[\text{MgATP}]=1$ mM, $[\text{Mg}^{++}]=3$ mM, $[\text{ATP}_f]=0.028$ mM, $[\text{KCl}]=125$ mM, $[\text{NA}]=0.1$ mM, $[\text{SF}_a]=0.016$ მგ/მლ.

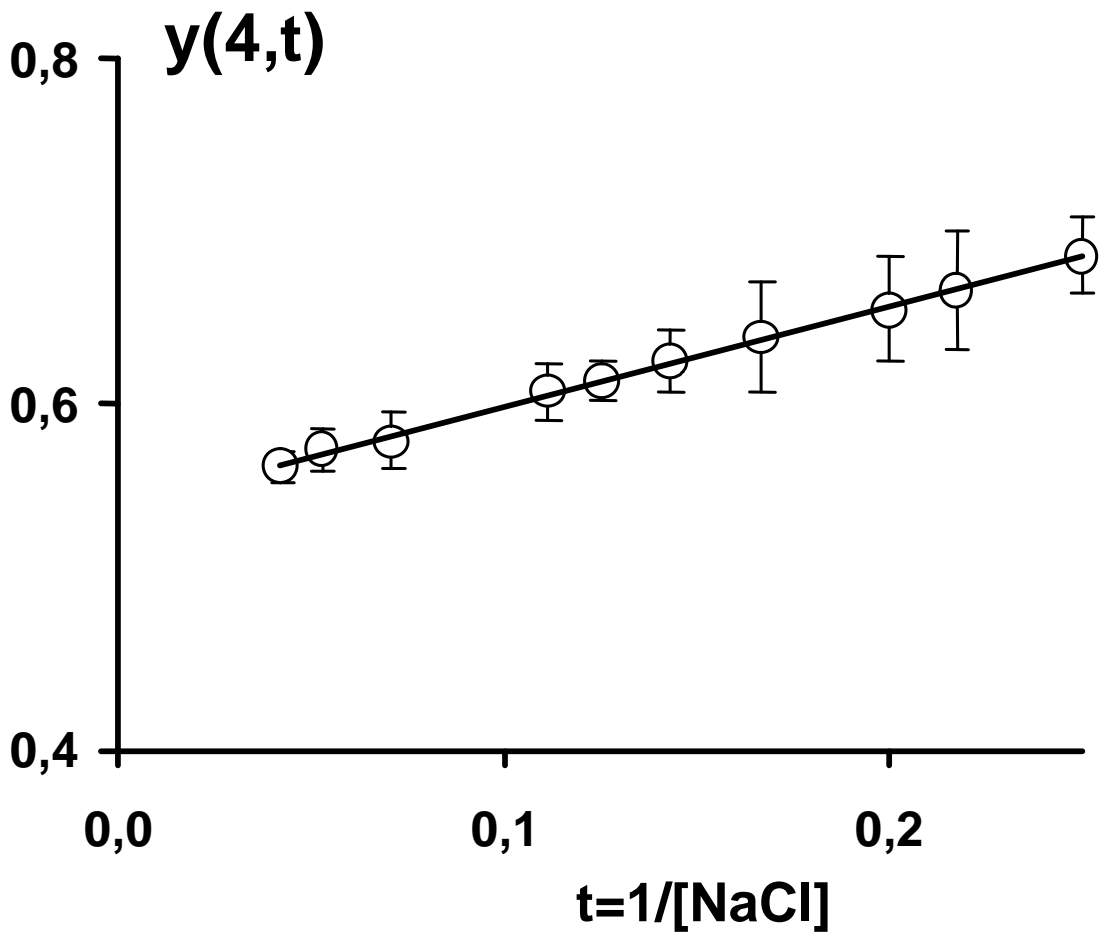
სურათიდან ჩანს, რომ $\sqrt{u}=f(t)$ ფუნქციის ლინეარიზაცია მიიღწევა მაშინ, როცა $r=4$ და OPM რეჟიმში Na^+ -ს, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 4.

სურათზე 9 წარმოდგენილია სარეაქციო არეში NA–ს და SF_a -ს ერთდროული არსებობისას OPM რეჟიმში Na,K-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება K^+ -ს კონცენტრაციიდან $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში, სადაც $y(r;t)=\sqrt{u}=f(t)$, $u=1/v$, $t=1/[\text{K}^+]$.

სარეაქციო არე შეიცავს:

$[MgATP]=1$ mM, $[Mg^{++}]=3$ mM, $[ATP_f]=0.028$ mM, $[NaCl]=144$ mM, $[NA]=0.1$ mM, $[SF_a]=0.016$ მგ/მლ.

სურათიდან ჩანს, რომ $\sqrt{u}=f(t)$ ფუნქციას ასიმპტოტა აქვს მაშინ, როცა $r=1$ და OPM რეჟიმში K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 1.



სურ. 8. Na,K-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება Na^+ -ის კონცენტრაციისგან OPM რეჟიმში NA-ისა და SF_a -ს ერთდროული არსებობისას, $y(4;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში.

სარეაქციო არის შემადგენლობა:

$[MgATP]=1$ mM,

$[Mg^{++}] = 3 \text{ mM}$, $[ATP_f] = 0.028 \text{ mM}$,

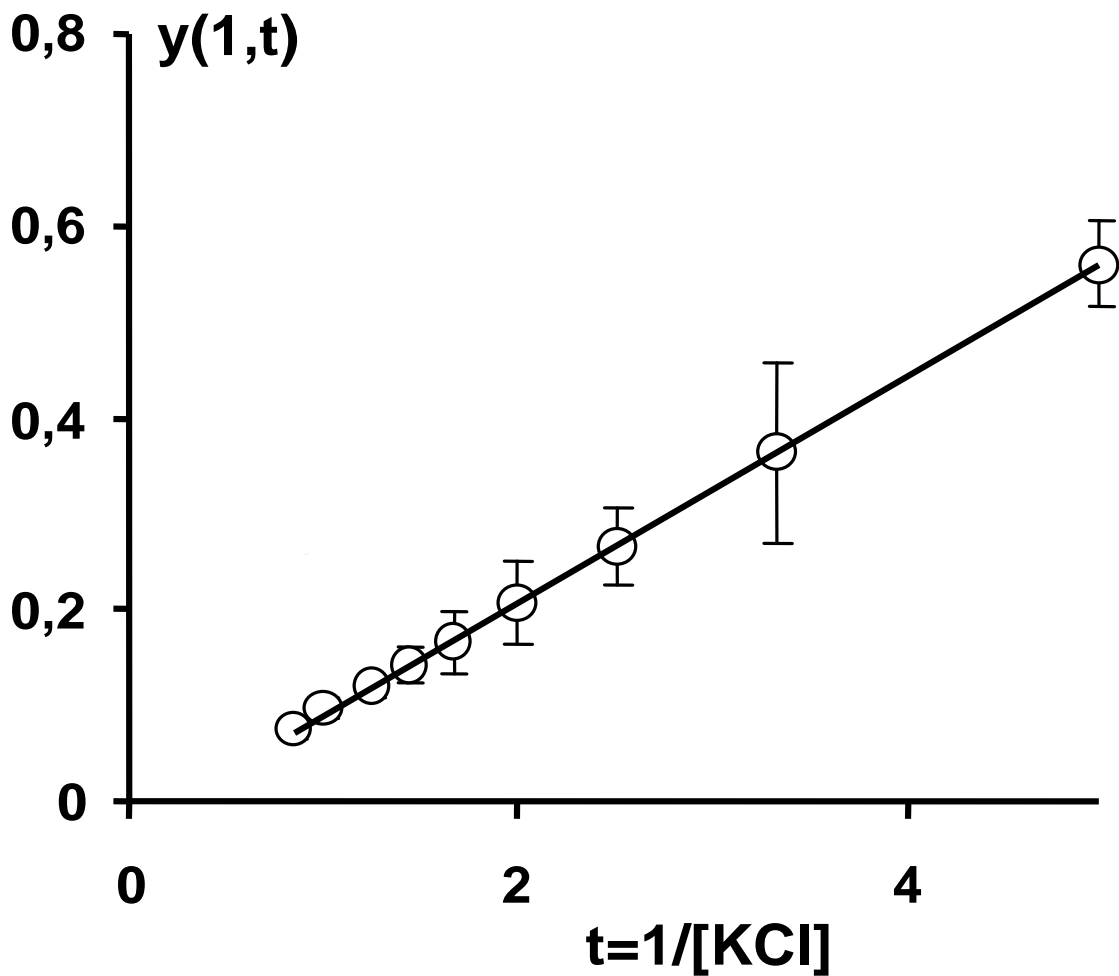
$[KCl] = 125 \text{ mM}$,

$[NA] = 0.1 \text{ mM}$,

$[SF_a] = 0.016 \text{ mg/ml}$.

$R = 4.022 \pm 0.034$;

$(R-n) = -0.133$; $\Rightarrow n(Na^+) = 4$.



სურ. 9. Na,K-ATP-ის აქტივობის დამოკიდებულება K^+ -ის კონცენტრაციისგან OPM რეჟიმში NA-ისა და SF_a -ს ერთდროული არსებობისას $y(1;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში.

სარეაქციო არის შემადგენლობა:

$[MgATP] = 1 \text{ mM}$,

$$[\text{Mg}^{++}] = 3 \text{ mM},$$

$$[\text{ATP}_f] = 0.028 \text{ mM},$$

$$[\text{NaCl}] = 144 \text{ mM}, [\text{NA}] = 0.1 \text{ mM},$$

$$[\text{SF}_a] = 0.016 \text{ mg/ml}.$$

$$R = 1.002 \pm 0.005;$$

$$(R-n) = -0.013;$$

$$\Rightarrow n(\text{K}^+) = 1.$$

IV. 3. მიკროსომული Na,K-ATPაზის მოლეკულური მექანიზმი

ცნობილია, თირკმლის მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზას მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი განსხვავდება სინაფსური მემბრანების Na,K-ATPაზას მოქმედების მოლეკულური მექანიზმებისაგან, მუშაობის OPM და OPS რეჟიმების არარსებობით (Куталиа и др., 19..). ამიტომაც დავინტერესდით თავის ტვინის მიკროსომული ფრაქციის Na,K-ATPაზის მოქმედების მოლეკულური მექანიზმით, რისთვისაც შევისწავლეთ თავის ტვინის მიკროსომული Na,K-ATPაზას აქტიობის დამოკიდებულება ისეთი მოდიფიკატორებისაგან, როგორცაა MgATP, Mg^{++}_f და ATP_f . შესწავლილ იქნა აგრეთვე მიკროსომული Na,K-ATPაზას Na^+ -ითა და K^+ -ით აქტივაციის მექანიზმი. სურათ 10-ზე წარმოდგენილია Na,K-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება სუბსტრატის კონცენტრაციიდან შებრუნებულ სიდიდეებში.

სარეაქციო არე შეიცავს:

$$[\text{Mg}^{++}] = [\text{ATP}_{\text{free}}] = \sqrt{K_T S},$$

$$[\text{NaCl}] = 145 \text{ mM}, [\text{KCl}] = 5 \text{ mM}.$$

სურათიდან ჩანს, რომ $1/v = f(1/s)$ მრუდს რთული გეომეტრიული ფორმა აქვს. კერძოდ, არგუმენტის მცირე მნიშვნელობისას ფუნქცია

კლებადია, ხოლო შემდეგ გადადის ზრდად ფუნქციაში, რომელიც არგუმენტის მაღალი მნიშვნელობისას უახლოვდება ასიმპტოტას და გააჩნია მკვეთრად გამოხატული ერთი მოტრიალებისა და ერთი გადალუნვის წერტილი. სურათზე

11-ზე ნაჩვენებია NaK-ATPაზური აქტიობის შებრუნებული სიდიდის ($1/V$) დამოკიდებულება თავისუფალი $[Mg^{++}]$ კონცენტრაციიდან MgATP-ს სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციისას.

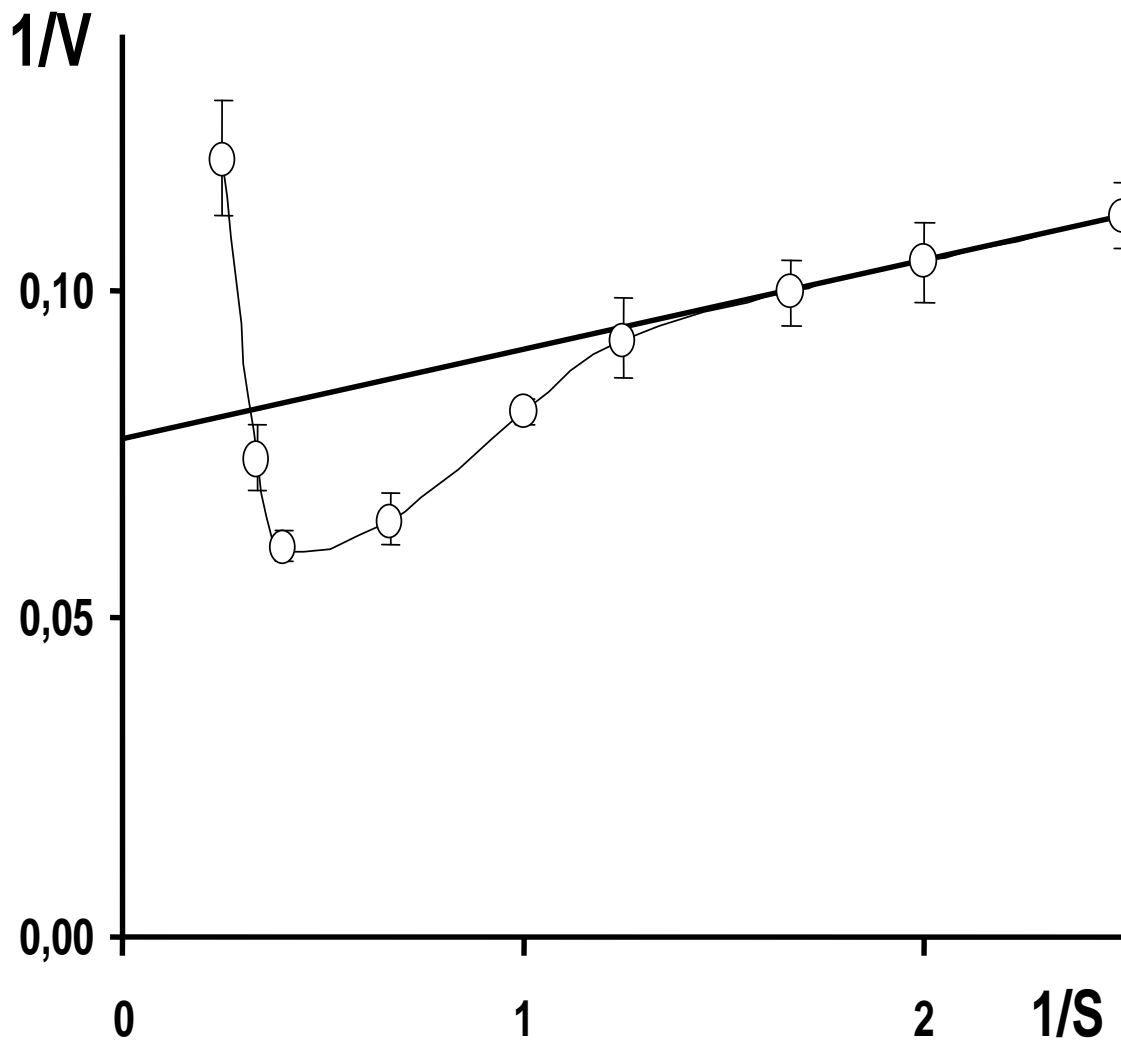
სარეაქციო არის შემცველობაა: $[NaCl]=145$ mM, $[KCl]=5$ mM, $[MgATP]=0.5$ mM (1 ხაზი); $[MgATP]=0.8$ mM (2 ხაზი); $[MgATP]=1.0$ mM (3 ხაზი); $[MgATP]=1.5$ mM (4 ხაზი).

სურათიდან ჩანს, რომ MgATP-ს ყველა ფიქსირებული კონცენტრაციისას $1/v=f(Mg^{++}_f)$ ფუნქციას აქვს რთული გეომეტრიული ფორმა. კერძოდ, Mg^{++}_f -ს შედარებით მცირე კონცენტრაციებისას ფერმენტული აქტიობა თითქმის არ იცვლება, ხოლო Mg^{++}_f -ს მაღალი კონცენტრაციებისას აქტიობა მცირდება, ფუნქცია უახლოვდება ასიმპტოტას და გააჩნია ერთი მოტრიალების წერტილი. უნდა აღინიშნოს, რომ MgATP-ის ფიქსირებული კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად ასიმპტოტების დახრა მცირდება; მცირდება აგრეთვე ორდინატა ღერძთან გადაკვეთის წერტილი, ხოლო აბსცისაზე მოჭრილი მონაკვეთები იზრდება და რეგრესიის ხაზების გადაკვეთა ხდება კოორდინატა სისტემის II მეოთხედში.

სურათ 12-ზე ნაჩვენებია, რომ MgATP-ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციისას NaK-ATPაზური აქტიობის (შებრუნებულ სიდიდეში) დამოკიდებულება ATP-ის კონცენტრაციიდან.

სარეაქციო არე შეიცავს: $[NaCl]=145$ mM, $[KCl]=5$ mM, $[MgATP]=0.8$ mM (1 ხაზი); $[MgATP]=1$ mM (2 ხაზი); $[MgATP]=1.5$ mM (3 ხაზი). სურათიდან ჩანს, ATP_f -ის აღნიშნული კონცენტრაციებისას $1/v=f(ATP_f)$ ფუნქცია სწორხაზოვანია ან უახლოვდება ასიმპტოტას.

აღსანიშნავია, რომ $MgATP$ -ის ფიქსირებული კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად მცირდება წრფეების დახრა და მათ მიერ ორდინატა ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთები, ხოლო აბსცისათა ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთები იზრდება და რეგრესიის ხაზების გადაკვეთა ხდება კოორდინატა სისტემის II მეოთხედში.

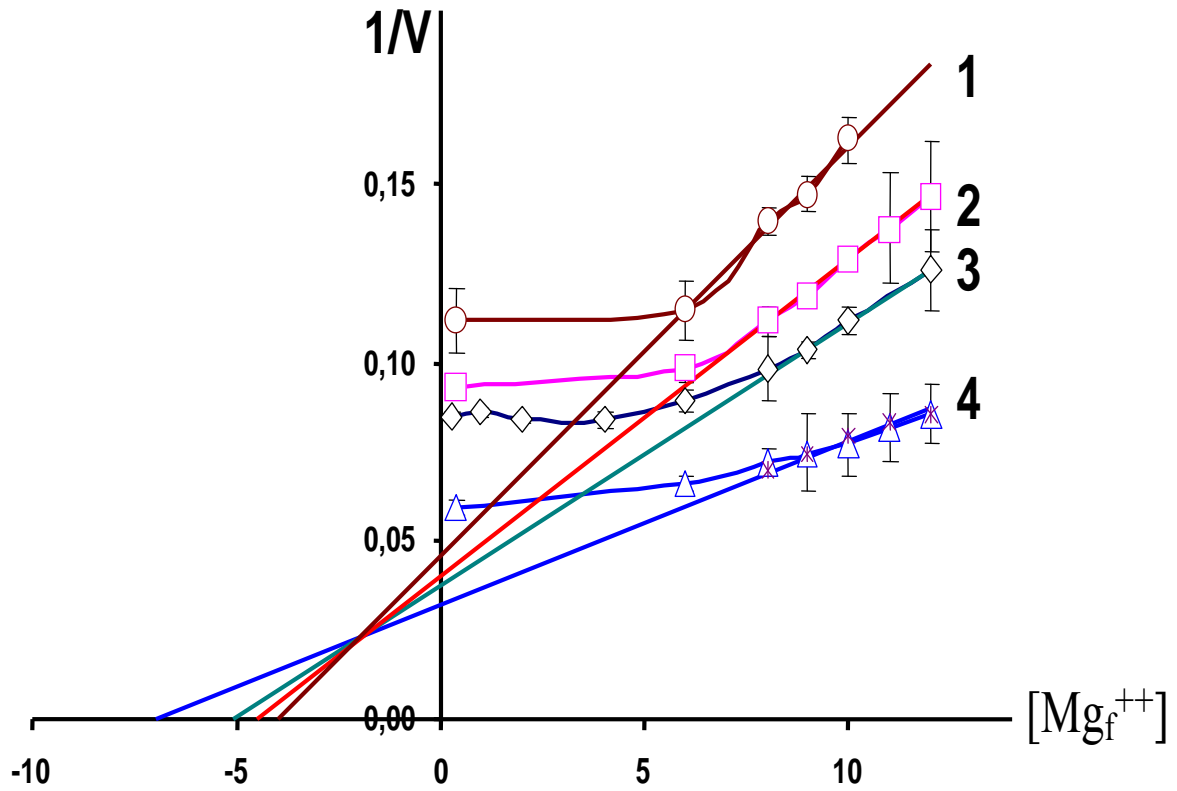


სურ. 10. NaK-ATPაზური აქტიობის (V) დამოკიდებულება სუბსტრატის (S=[MgATP] mM) კონცენტრაციიდან შებრუნებულ სიდიდეებში.

$$[Mg^{++}] = [ATP_{free}] = \sqrt{K_T S};$$

$$[NaCl] = 145 \text{ mM},$$

$$[KCl] = 5 \text{ mM}.$$



სურ. 11. NaK-ATPაზური აქტიობის შეზღუდვითი სიდიდის ($1/V$) დამოკიდებულება თავისუფალი $[Mg^{++}]$ კონცენტრაციიდან.

$S=[MgATP]=const:$

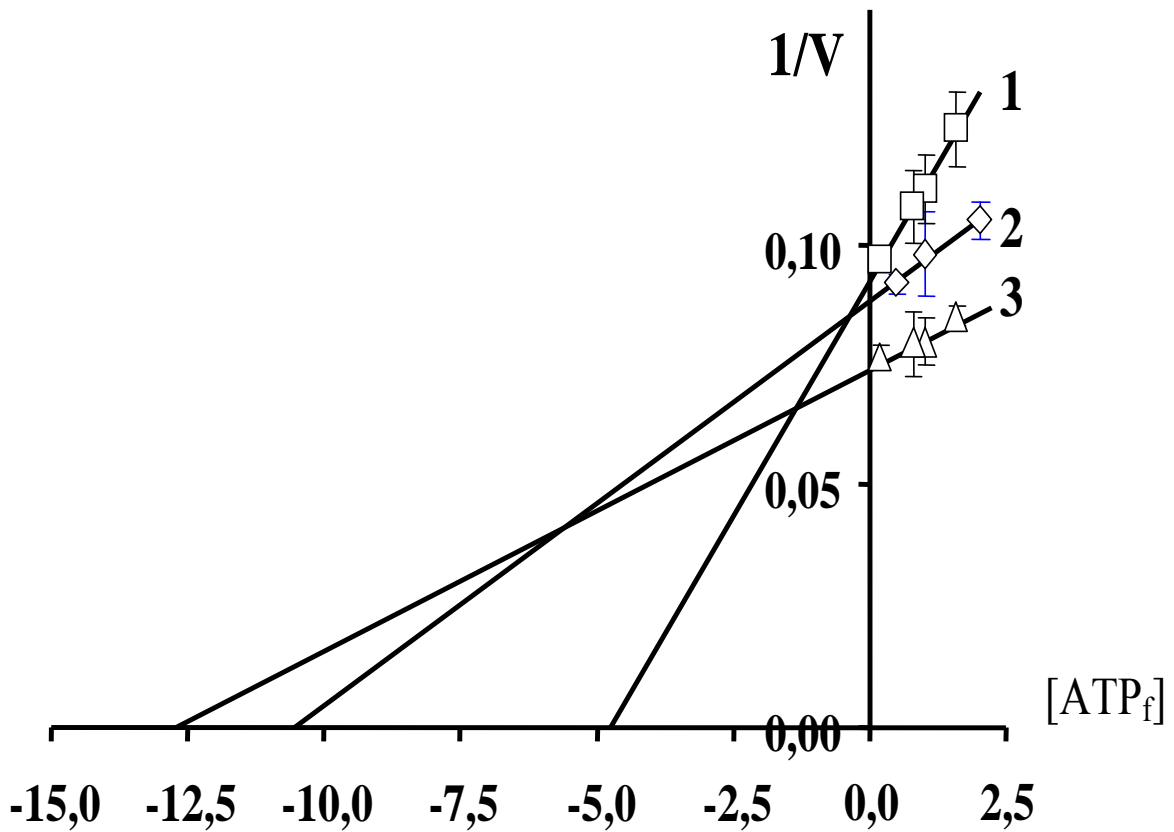
$S=0.5 \text{ mM}$ (1);

$S=0.8 \text{ mM}$ (2);

$S=1.0 \text{ mM}$ (3);

$S=1.5 \text{ mM}$ (4).

$[NaCl]=145 \text{ mM}$, $[KCl]=5 \text{ mM}$. $[Mg^{++}] = K_r S / [ATP_i]$.



სურ. 12. NaK-ATPაზური აქტიობის შეზღუდვითი სიდიდის ($1/V$) დამოკიდებულება თავისუფალი $[ATP_{free}]$ კონცენტრაციიდან.

$S=[MgATP]=const:$

$S=0.8$ mM (1);

$S=1.0$ mM (2);

$S=1.5$ mM (3).

$[NaCl]=145$ mM,

$[KCl]=5$ mM. $[ATP_i]=K_i S/[Mg^{++}]$

როგორც უკვე აღინიშნა, თირკმლის NaK-ATPაზა სინაფსური მემბრანების NaK-ATPაზასგან განსხვავდება OPM და OPA რეჟიმების არარსებობით. ამიტომ შვეისწავლეთ თავის ტვინის მიკროსომული მემბრანების NaK-ATPაზას Na^+ -ითა და K^+ -ით აქტივაციის მექანიზმები OPM და OPA რეჟიმებში.

ცხრილში 3 მოცემულია OPM და OPA რეჟიმებში NaK-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება Na^+ -ისა და K^+ -ის კონცენტრაციებისაგან.

სარეაქციო არის შემადგენლობაა:

OPM რეჟიმში - $[\text{Mg}^{++}] = 4 \text{ mM}$; $[\text{ATP}] = 0,02 \text{ mM}$, $[\text{MgATP}] = 1 \text{ mM}$;

OPS რეჟიმში - $[\text{Mg}^{++}] = 0,1 \text{ mM}$; $[\text{ATP}] = 0,85 \text{ mM}$, $[\text{MgATP}] = 1 \text{ mM}$;

Na,K-ATP-აზური აქტიობის Na^+ -ის კონცენტრაციიდან დამოკიდებულების შესწავლისას აღებული იყო K^+ -ის ორი ფიქსირებული კონცენტრაცია – 50 და 125 mM, ხოლო K^+ -ის კონცენტრაციიდან დამოკიდებულების შესწავლისას $[\text{NaCl}] = 145 \text{ mM}$ იყო.

ცხრილიდან ნათლად ჩანს, რომ როგორც OPM, ისე OPA რეჟიმებში ფერმენტული აქტიობა 0-ის ტოლია.

ამის შემდეგ დავინტერესდით, თუ როგორ იყო მიკროსომული Na,K-ATPაზისათვის Na^+ -ისა და K^+ -ის ტრანსპორტის სტოქიომეტრია OPS რეჟიმში.

ცხრილში 4 წარმოდგენილია OPS რეჟიმში MgATP-ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციისას Na^+ -ისა და K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი. Na^+ -ის შემთხვევაში აღებული იყო K^+ -ის ორი ფიქსირებული კონცენტრაცია $[\text{KCl}] = 50 \text{ mM}$ და $[\text{KCl}] = 125 \text{ mM}$, ხოლო K^+ -ის შემთხვევაში Na^+ -ის ფიქსირებული კონცენტრაცია იყო $[\text{NaCl}] = 145 \text{ mM}$.

ცხრილიდან ჩანს, რომ K^+ -ის ორივე ფიქსირებული კონცენტრაციისას Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის, განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 3, ხოლო K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის, განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 2.

ცხრილი. 3.

Na,K-ATP-აზური აქტიობის დამოკიდებულება Na^+ -ის ($[K^+] = \text{const}$) და K^+ -ის ($[Na^+] = \text{const}$) კონცენტრაციებიდან OPM და OPA რეჟიმებში.

ფერმენტის მუშაობის რეჟიმი	[MgATP]	[Mg ⁺⁺]	[ATP _f]	[Na ⁺]	[K ⁺]	Na,K-ATPაზური აქტიობა
OPM	1mM	4mM	0,02mM	145mM	≤ 1,2mM	0
				≤ 20mM	50mM	0
					125mM	0
		0,85mM	0,1mM	145mM	≤ 1,2mM	0
				≤ 20mM	50mM	0
					125mM	0
OPA	1mM	0,1mM	0,85mM	145mM	≤ 1,2mM	0
				≤ 20mM	50mM	0
					125mM	0

ცხრილი 4.

აუცილებელ აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რაოდენობის განსაზღვრა

($A=[ATP_f]$; $M=[Mg^{++}]$; $S=[MgATP]$. V_0 – აქტიობა $[KCl]=0$ დროს)

სარეაქციო არე	ფიქსირებული ლიგანდი	ხარიხობრივი გარდაქმნა	n
A = M S= 0.8 mM S= 1 mM S= 2 mM	[KCl]=0 [KCl]=50 mM [KCl]= 125 mM	$\sqrt{1/V} = f(1/[Na])$ [Na ⁺] < 25 mM	3.002 ≤ R ≤ 3.007 ს(R) ≤ 0.008; (R-n) ≤ 0.272 n(Na) = 3
	[NaCl]=145 mM	$\sqrt{1/(V-V_0)} = f(1/[K])$ [K ⁺] < 1.2 mM	2.004 ≤ R ≤ 2.008 ს(R) ≤ 0.007; (R-n) ≤ 0.342 n(K) = 2

V. ექსპერიმენტული მასალის განხილვა

თავის ტვინის ინტეგრალურ მოქმედებას თუ მუშაობის ნებისმიერ სახეს, როგორც წესი, საფუძვლად უდევს ტრანსმემბრანული ელექტრული პოტენციალის სხვაობა და მისი ცვლილება, თავის მხრივ, ტრანსმემბრანული პოტენციალის ($\Delta\Psi_{io}$) გენერაციას და მის ცვლილებას განაპირობებს ორი ელემენტარული ბიოლოგიური მანქანა: ნახევრადგანვლადი არხები (ძირითადად Na⁺-ის და K⁺-ის არხები) და Na-სა და K-ს საქაჩავი (Na,K-ATPაზა). ეს სქემატურად ნაჩვენებია სქემაზე 7.

Na,K-ATPაზას აქტიობა დაკავშირებულია ერთვალენტანი კათიონების აქტიური ტრანსპორტის მექანიზმთან. ფერმენტი ქმნის Na⁺-სა და K⁺-ის გრადიენტს, რომლებიც ნახევრადგანვლად არხებში გადინებისას იწვევენ დიფუზური პოტენციალის წამოქმნას, რაც, თავის მხრივ, ნიშნავს ტრანსმემბრანული პოტენციალის შექმნას. იონთა ასიმეტრიული განაწილების შექმნის გარდა, Na,K-ATPაზა, თავისი

ელექტროგენურობის გამო, უშუალოდ მონაწილეობს პოტენციალის გენერაციაში, სადაც მისი წვლილი $\approx 10-30\%$ -მდე შეადგენს.

ცხადია, Na,K-ATP-ის მიერ შექმნილი ტრანსმემბრანული პოტენციალის სიდიდე პირდაპირპროპორციულად არის დამოკიდებული Na,K-ATP-ის ფერმენტულ აქტიობაზე – რაც მეტია ფერმენტული აქტიობა, მით უფრო მეტი სიდიდის პოტენციალი წარმოიქმნება.

თავის მხრივ, ტრანსმემბრანული პოტენციალის ცვლილება გამოწვეულია Na^+ -სა და K^+ -ის არხების განვლადობის ცვლილებით. ამ განვლადობის ცვლილების ორი გზა არსებობს: ელექტრული და ქიმიური (ნეიროტრანსმიტერებით გამოწვეული). შესაბამისად, გვაქვს ელექტროაგზნებადი და ქიმიურად აგზნებადი მემბრანები, ანუ შესაბამისად გვაქვს ელექტრული და ქიმიური სინაფსი.

კლასიკური თეორიის თანახმად, ამით ამოიწურებოდა ნეიროტრანსმიტერების ფუნქცია პოტენციალის ცვლილებაში (ანუ ქიმიურ გადაცემაში. მაგრამ აღმოჩნდა, რომ გარდა ამისა, ნეიროტრანსმიტერებს შეუძლიათ გავლენა მოახდინონ Na,K-ATPase აქტიობაზე, კერძოდ, შეამცირონ ანს სპეციალური ცილის (SF_a) თანაობისას გაზარდონ Na,K-ATPase აქტიობა. Na,K-ATPase აქტიობის გაზრდა პრინციპში, უნდა იწვევდეს ჰიპერპოლარიზაციას, ხოლო შემცირება – დეპოლარიზაციას.

როგორც ლიტერატურული ნაწილიდან ჩანს, ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATPase მოქმედება დამოკიდებულია მემბრანის ტიპზე, რომელშიც ლოკალიზებულია Na,K-ATPase , ანუ ის ფაქტი, რომ Na,K-ATPase განსაკუთრებით სინაფსურ მემბრანებში ამჟღავნებს ნეიროტრანსმიტერებისადმი მგრძობელობას, მიუთითებს იმაზე, რომ NT-ის ეფექტი სპეციფიკურია და დამახასიათებელია მხოლოდ ქიმიურად აგზნებადი მემბრანებისათვის.

ნეიროტრანსმიტერების ეფექტის შესწავლამ Na,K-ATPase აჩვენა, რომ ტვინის სხვადასხვა უბნების Na,K-ATPase სხვადასხვა მგრძობელობას იჩენს ნეიროტრანსმიტერების მიმართ, რადგანაც ფუნქციონალურად განსხვავებული სინაფსები ამ უბნებში განაწილებულია არათანაბრად (Kometiani, Tsakadze, JariaShvili, 1984): მისაღებია ის ვარაუდი, რომ არსებობს კორელაცია, თუ მოცემულ უბანში წამყვანია რომელიმე ნეიროტრანსმიტერი, Na,K-ATPase ამ ნეიროტრანსმიტერის მიმართ ამჟღავნებს მეტ მგრძობელობას, სხვის

მიმართ კი ნაკლებს, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ NT-ების ეფექტს ახასიათებს სპეციფიურობა სინაფსის ტიპის მიმართ.

ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATPაზე მოქმედების ეფექტის ფუნქციონალური მნიშვნელობის გამოვლენისათვის, საინტერესოა, შეიმჩნევა თუ არა რაიმე ცვლილება განვითარების პროცესში, როდესაც ხდება ახალი სინაფსების ჩამოყალიბება. ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATPაზე მოქმედების დამოკიდებულებამ ონტოგენეზის პროცესზე გვაჩვენა, რომ ეფექტს აქვს ფუნქციონალური მნიშვნელობა და დაკავშირებულია იმ ფიზიოლოგიურ და ბიოქიმიურ პროცესებთან, რასაც ადგილი აქვს ვირთაგვის თავის ტვინის განვითარების პროცესში (Kometiani, Jariashvili, 2001).

თეორიულად, NT-ების ეფექტი Na,K-ATPაზე შეიძლება გამოწვეული იყოს მეორადი მესენჯერული სისტემების საშუალებით, რომლის შედეგად შეიძლება ხდებოდეს Na,K-ATPაზის ფოსფორილირება, ასევე არხის განვლადობის ცვლა ფოსფორილირების შედეგად. მაგრამ სპეცალურად ჩატარებული ცდების შედეგად გამოირკვა, რომ ნეიროტრანსმიტერების ეფექტი Na,K-ATPაზე გამოწვეულია არა მეორადი მესენჯერული სისტემების ჩართვის შედეგად, არამედ უშუალოდ ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATPაზე ზემოქმედების შედეგად.

ყოველივე ზემოთქმულიდან ნათელია, რომ თუ ჩვენ გვინდა ავხსნათ ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATPაზე მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი და გვინდა გავერკვეთ ამ მოქმედების ფუნქციონალურ თავისებურებებში, ჩვენ დეტალურად უნდა

შევისწავლოთ ის ცვლილებები, რომლებსაც ადგილი აქვს Na,K-ATPაზის ელექტროგენულ ნაწილში.

ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATPაზაზე ზემოქმედების მექანიზმის სრულად წარმოსადგენად საინტერესოა ვნახოთ, თუ რა ცვლილებები ხდება Na^+ -ისა და K^+ -ის ტრანსპორტის სტოქეომეტრიის თვალსაზრისით, რადგან ტრანსპორტის სტოქეომეტრიის ცვლილება გვამლევს ცვლილებას ტრანსმემბრანულ პოტენციალში.

საქმე იმაშია, რომ მოსვენების პოტენციალისას დამყარებული იონური წონასწორობის დროს Na,K-ATPაზა მუშაობს მხოლოდ და მხოლოდ ამ წონასწორობის შენარჩუნებაზე, რადგან მემბრანა იდეალურად განუვლადი არ არის და Na^+ -ის, K^+ -ის ან სხვა იონების ნაწილი შეიძლება გადადიოდეს მემბრანაში. აგზნების დროს ეს Na^+ -ისა და K^+ -ის წონასწორობა, რომელიც დამყარებული იყო მოსვენებისას, იცვლება და მემბრანის ახლოს ლოკალურ სივრცეში საკმაოდ იზრდება Na^+ -ის კონცენტრაცია და მცირდება K^+ -ის კონცენტრაცია.

რასაკვირველია, შემდგომში, წონასწორობის აღსადგენად საჭიროა Na,K-ATPაზის მუშაობის გააქტივება. მართლაც, თეორიულად, უჯრედის შიგნით Na^+ -ის კონცენტრაციის მომატება და K^+ -ის კონცენტრაციის შემცირება უნდა ივწვდეს Na,K-ATPაზის გააქტივებას. მაგრამ, პრაქტიკაში ჩვენ გვაქვს ნეიროტრანსმიტერების მოქმედებით გამოწვეული აქტივაცია და ინჰიბიცია, რაც დამატებით ფუნქციას ამლევს Na,K-ATPაზას და ეს ფუნქცია გასარკვევია.

ნეიროტრანსმიტერების მოქმედება Na,K-ATPაზაზე ხორციელდება ნეიროტრანსმიტერების უშუალო მოქმედებით Na,K-ATPაზის ელექტროგენურ კომპონენტზე. ამ მოსაზრებას გარკვეული საფუძველი

აქვს, რადგან ცნობილია, რომ სინაფსურ მემბრანებში ლოკალიზებულ Na,K-ATPase -ს, თირკმლის მემბრანებში ლოკალიზებულ Na,K-ATPase -სგან განსხვავებით, აქვს მუშაობის სხვადასხვა რეჟიმები. ძირითადად გამოყოფენ OPM, OPA და OPS რეჟიმებს.

OPA რეჟიმში Na^+ -ისა და K^+ -ის ტრანსპორტი ხორციელდება მიმდევრობითი მექანიზმით, ხოლო OPS რეჟიმში ერთდროული მექანიზმით, მაგრამ ტრანსპორტის სტოქეომეტრია ორივე რეჟიმში ერთნაირია. კერძოდ, $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$.

OPM რეჟიმი მათგან განსხვავდება. Na^+ -ისა და K^+ -ს ტრანსპორტი OPM რეჟიმში ხორციელდება თანმიმდევრული მექანიზმით და სამი Na^+ -ის გამოტანას უჯრედის გარეთ მოყვება ერთი K^+ -ის ან 0-K^+ -ის შეტანა უჯრედის შიგნით. ეს დამოკიდებულია უჯრედის გარეთ K^+ -ის კონცენტრაციაზე.

საქმე იმაშია, რომ Na,K-ATPase წარმოადგენს დიმერს და მის მუშაობაში უდიდესი როლი ენიჭება სუბერთეულების მდგომარეობას, ე. ი. რა კონფორმაციულ მდგომარეობაში იმყოფებიან სუბერთეულები – E_1 თუ E_2 მდგომარეობაში. E_1 კონფორმაციულ მდგომარეობას განსაზღვრავს S-ის (MgATP -ის) და Na^+ -ის მიერთება, ხოლო E_2 კონფორმაციულ მდგომარეობას – K^+ -ს მიერთება და ფოსფორილირება.

ფერმენტის OPS რეჟიმში მუშაობისას ერთი სუბერთეული არის E_1 კონფორმაციულ მდგომარეობაში, ხოლო მეორე – E_2 კონფორმაციულ მდგომარეობაში, რასაც განაპირობებს სუბსტრატის საკმარისად დიდი კონცენტრაცია. ამიტომაც ხდება ერთდროულად K^+ -ის გამონთავისუფლება და Na^+ -ის ჩანაცვლება ერთ სუბერთეულზე; ამავე დროს, Na^+ -ის გამონთავისუფლება და K^+ -ის ჩანაცვლება მეორე

სუბერთეულზე, და ამის გამო ხდება Na^+ -ისა და K^+ -ის ერთდროული ტრანსპორტი.

როდესაც S-ის (MgATP) კონცენტრაცია მცირეა და მაღალია ATP_f -ის კონცენტრაცია, ის უერთდება დეფოსფორილირებულ სუბერთეულს და გადაყავს ის სუსტ E_1 მდგომარეობაში, რაც განაპირობებს K^+ -ის ტრანსპორტს Na^+ -ის გარეშე. ამ შემთხვევაში ხდება 2K^+ -ის მიერთება, ისევე, როგორც ამას ადგილი ჰქონდა OPS რეჟიმში, ე. ი. $E_1\text{ATP}$ კომპლექსი უზრუნველყოფს $E_2\text{P}$ სუბერთეულზე 2K^+ -ის მიერთებას და შემდეგ მათ ტრანსპორტს.

ATP_f -გან განსხვავებით, Mg_f^{++} -აც შეუძლია მიუერთდეს დეფოსფორილებულ სუბერთეულს, მაგრამ მისი გავლენა ფოსფორილირებულ სუბერთეულზე ($E_2\text{P}$) არაა სრული. ამიტომაც ფოსფორილირებულ სუბერთეულს შეუძლია გადაიტანოს 1K^+ ან 0K^+ და არა 2K^+ , როგორც ეს ხდებოდა OPS რეჟიმში.

ამგვარად, OPM რეჟიმში Na^+ -ის და K^+ -ის ტრანსპორტის სტოქეომეტრია არის $3\text{Na}^+/1\text{K}^+$ ან $3\text{Na}^+/0\text{K}^+$, რაც იმას ნიშნავს, რომ OPS და OPA რეჟიმებისაგან განსხვავებით OPM რეჟიმში ელექტროგენურობის კოეფიციენტი მეტია და შესაბამისად OPM რეჟიმში მომუშავე $\text{Na}_2\text{K-ATP}$ აზას უფრო დიდი წვლილის შეტანა შეუძლია ტრანსმემბრანული ელექტრული პოტენციალის გენერაციაში, ე. ი. უფრო მეტი იქნება გადახრა ჰიპერპოლარიზაციისაკენ.

ამგვარად, ყოველივე ზემოთქმულიდან ნათლად ჩანს, რომ ჩვენ უნდა გამოვარკვიოთ, ხომ არ არის დაკავშირებული $\text{Na}_2\text{K-ATP}$ აზაზე ნეიროტრანსმიტერების ინჰიბიტორული მოქმედება ტრანსპორტის

სოქეომეტრიის ანუ ელექტროგენური კომპონენტის უშუალო ცვლილებასთან და არა ATP- ჰიდროლიზის სიჩქარის შემცირებასთან.

საკითხის დეტალურად შესწავლისათვის აუცილებელი იყო გაგვერკვია, თუ რა ცვლილებები ხდებოდა Na^+ -ის და K^+ -ის ტრანსპორტის სტოქეომეტრიის თვალსაზრისით. ამისათვის მთავარი იყო შეგვემოწმებინა Na^+ -ის და K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვის ცვლილება, რადგან ცნობილია, რომ OPM რეჟიმში K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის, განკუთვნილი უბნების რიცხვი $n(\text{K}^+)=0$ ან $n(\text{K}^+)=1$, ხოლო Na^+ -ისათვის $n(\text{Na}^+)=4$, როცა $(\text{K}^+]>100 \text{ mM}$) ან $n(\text{Na}^+)=3$, როცა $(\text{K}^+]<100 \text{ mM}$).

როგორც სურათი 1-დან ჩანს, OPS რეჟიმში სარეაქციო არეში NA-ის არარსებობისას, K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი $n(\text{K}^+)=2$, როგორც ეს მოსალოდნელი იყო, მაგრამ NA-ის დამატების შემდეგ K^+ -ისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი იცვლება და ხდება $n(\text{K}^+)=1$, რაც დამახასიათებელია OPM რეჟიმისათვის.

NA-ის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად იზრდება დახრა, ე. ი. ადგილი აქვს ინჰიბიციას. ამასთან, მრუდები იკვეთებიან აბსცისათა ღერძზე ერთ წერტილში, ე. ი. NA-ის მოქმედებით ადგილი აქვს Na,K-ATPase ს ინჰიბიციას, ფერმენტი მუშაობის OPS რეჟიმიდან გადადის OPM რეჟიმში, მაგრამ არ იცვლება თვისობა K^+ -ის მიმართ.

ეს დასკვნა მტკიცდება სურათი 3-ით, სადაც ნაჩვენებია, რომ მუშაობის OPM რეჟიმში მყოფ Na,K-ATPase ზე NA-ის დამატება იწვევს

ინჰიბიციას K^+ -სადმი თვისობის შეუცვლელად. აქაც რეგრესიის ხაზების გადაკვეთა ხდება აბსცისათა ღერძზე ერთ წერტილში.

K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის, განკუთვნილი უბნების რიცხვის ცვლა 2-დან 1-მდე მიუთითებს იმაზე, რომ NA-ის ზემოქმედებით Na,K -ATP-ის გადადის მუშაობის OPS რეჟიმიდან OPM რეჟიმში. მაგრამ, ამის საბოლოოდ დასამტკიცებლად საინტერესოა ვნახოთ, თუ რა ემართება Na^+ -ის უბნების რიცხვს. რადგან $[NA]=0$ პირობებში, OPM რეჟიმში მომუშავე Na,K -ATP-ის, K^+ -ის კონცენტრაციისაგან დამოკიდებულებით, შეუძლია იმუშაოს ორ განსხვავებულ სიტუაციაში, რომლებიც განსხვავდებიან Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვით, კერძოდ, $n(Na^+)=4$, როცა $[K^+]>100$ mM და $n(Na^+)=3$, როცა $[K^+]<100$ mM. ეს დაკავშირებულია იმასთან, რომ K^+ -ის მაღალი კონცენტრაციის დროს, K^+ -ის მოსაცილებლად სისტემიდან საჭიროა მეოთხე Na^+ -ის მიერთება მათი გამოდევნის გასაიოლებლად, მაშინ, როცა K^+ -ის დაბალი კონცენტრაციების დროს მეოთხე Na^+ არ არის საჭირო. მაგრამ ორივე შემთხვევაში ტრანსპორტირდება $3Na^+$.

სურათი 4-დან ჩანს, რომ OPS რეჟიმში მომუშავე Na,K -ATP-ისაზე NA-ის დამატებისას, Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არ იცვლება $n(Na^+)=3$, ისევე, როგორც ამას ადგილი აქვს სარეაქციო არეში NA-ის არარსებობის დროს. მაგრამ Na^+ -ის დაბალი კონცენტრაციების დროს ($[Na^+]<10$ mM) NA-ის კონცენტრაციის ზრდა იწვევს Na,K -ATP-ის აქტივაციას, ხოლო Na^+ -ის მაღალი კონცენტრაციების დროს ($[Na^+]>10$ mM) NA-ის კონცენტრაციის ზრდა იწვევს Na,K -ATP-ის ინჰიბიციას.

მრუდების გადაკვეთა ხდება საკოორდინაციო სიბრტყის I მეოთხედში, რაც ერთმნიშვნელოვნად მიუთითებს იმაზე, რომ NA წარმოადგენს Na^+ -თვის ორმაგი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორს (Kometiani, 2005).

მაგრამ, მეორეს მხრივ, ვიცით, რომ OPM რეჟიმში Na^+ -სათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი $n(\text{Na}^+)=4$ და თუ ფერმენტი მუშაობის OPS რეჟიმიდან გადავიდა OPM რეჟიმში, მაშინ Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი უნდა მიგვეღო 4. ამის გამოსარკვევად ჩავატარეთ სპეციალური ექსპერიმენტი, სადაც ერთდროულად ერთ გრაფიკზე გამოსახულია სამი რეგრესიული ხაზი, რომლებიც გამოსახავენ OPS რეჟიმში მყოფი Na,K-ATPase -ის სიჩქარის დამოკიდებულებას Na^+ -ის კონცენტრაციიდან შებრუნებულ სიდიდეებში, როცა $[\text{NA}]=0$, OPM რეჟიმში მყოფი Na,K-ATPase -ის სიჩქარის დამოკიდებულებას Na^+ -ის კონცენტრაციიდან შებრუნებულ სიდიდეებში, როცა $[\text{NA}]=0$ და $[\text{NA}]=0,1 \text{ mM}$ (სურ. 5).

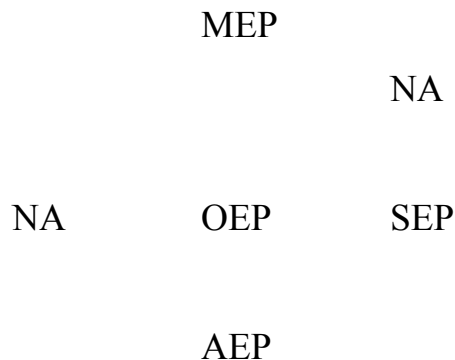
შედეგად, სამივე ეს ხაზი იკვეთება საკოორდინაციო სიბრტყის I მეოთხედში, რაც ცალსახად მიუთითებს იმაზე, რომ სურ. 4-ზე გამოსახული ხაზები შეესაბამება ფერმენტის მუშაობის OPM რეჟიმს, რადგან გადაკვეთა ორივე შემთხვევაში ხდება ერთსა და იმავე მეოთხედში.

ამრიგად, ჩვენ გვაქვს სრული და ამომწურავი ექსპერიმენტული მონაცემები, რომლებზე დაყრდნობით შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ NA-ს ზემოქმედების შედეგად Na,K-ATPase მუშაობის OPS რეჟიმიდან გადადის OPM რეჟიმში, ე. ი. NA-ის თანაობისას Na,K-ATPase ყოველთვის იმყოფება მუშაობის OPM რეჟიმში.

თუ ფერმენტი იმყოფება OPM რეჟიმში, NA-ის დამატებით ინჰიბირდება, მაგრამ რჩება მუშაობის იმავე რეჟიმში, ხოლო თუ იმყოფებოდა OPS რეჟიმში, NA-ის დამატებით ფერმენტი ინჰიბირდება და გადადის OPM რეჟიმში.

რადგანაც OPA და OPS რეჟიმებში ფიზიკური მექანიზმები ერთნაირია, ჩვენ შეგვიძლია ვიგულისხმოთ, რომ იგივე მოხდება OPA რეჟიმში მყოფ Na,K-ATPაზზე NA-ის დამატებით; აქაც ფერმენტი ინჰიბირდება და გადავა მუშაობის OPM რეჟიმში, ე. ი. ნებისმიერ რეჟიმში და ნებისმიერ სიტუაციაში NA-ის დამატებით Na,K-ATPაზ გადადის მუშაობის OPM რეჟიმში, სადაც არის ელექტროგენურობის კოეფიციენტის მკვეთრი ზრდა.

ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATPაზზე მოქმედების სრული მოლეკულური მექანიზმის გასაშიფრად საჭიროა დამატებით კინეტიკური ცდების ჩატარება. მაგრამ, ამ ეტაპზე, გამომდინარე Na,K-ATPაზის ზოგადი სქემიდან, შეგვიძლია ვაჩვენოთ, რომ NA-ის ურთიერთქმედება დაკავშირებულია Na,K-ATPაზის შემდეგ მდგომარეობასთან:



სინაფტოსომურ ციტოზოლში აღმოჩენილია ცილები, სინაფტოსომური ფაქტორები (SF_a), რომლებიც რადიკალურად ცვლიან Na,K-ATPაზზე ნეიროტრანსმიტერების მოქმედების ხასიათს.

SF_a-ს არსებობის გამო ზოგადად გვაქვს Na,K-ATPაზაზე NT-ების მოქმედების ორი მექანიზმი: 1) NT-დან დამოკიდებული ინჰიბიციის მექანიზმი და 2) NT-დან დამოკიდებული აქტივაციის მექანიზმი.

მართლაც, სარეაქციო არეში NT-ისა და SF_a-ს ერთდროული არსებობის დროს იხსნება NT-ით გამოწვეული ინჰიბიციური ეფექტი და Na,K-ATPაზა აქტივდება.

ცხადია, საჭიროა ამ აქტივაციის მექანიზმი დეტალურად გარკვევა, რისთვისაც შევისწავლეთ Na,K-ATPაზური აქტიობის ცვლილება სარეაქციო არეში NT-ისა და SF_a-ს ერთდროული არსებობისას.

სურათი 6-დან ნათლად ჩანს, რომ სარეაქციო არეში NT-ისა და SF_a-ს ერთდროული არსებობისას SF_a-ს დაბალი კონცენტრაციებიდან კი იხსნება NA-თი გამოწვეული ინჰიბიციის, ხოლო SF_a-ს 0,016 მგ/მლ-ზე მაღალი კონცენტრაციისას ადგილი აქვს ფერმენტის გააქტივებას. ამიტომაც სამუშაოდ ავირჩიეთ SF_a-ს აღნიშნული კონცენტრაცია (0,016 მგ/მლ).

ცხრილი 2-დან ჩანს, რომ ფერმენტის მუშაობის OPS რეჟიმში NA-ის არსებობისას SF_a-ს კონცენტრაციების ფართო ზღვარში K⁺-ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 2, ისევე, როგორც ამას ადგილი აქვს სარეაქციო არეში NA-ისა და SF_a-ს არარსებობისას (სურ. 1). მაშინ, როდესაც მარტო NA-ის დამატებისას SF_a-ს გარეშე, K⁺-ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 1 (სურ. 2). აქედან ჩანს, რომ NA-თან ერთად SF_a-ს დამატება არ ცვლის K⁺-ის ტრანსპორტის სტოქეომეტრიას.

ანალოგიური სიტუაციაა Na^+ -შემთხვევაშიც. ფერმენტის მუშაობის OPS რეჟიმში სარეაქციო არეში 0,1 mM NA-ის არსებობისას, SF_a -ს კონცენტრაციების ფართო ზღვარში, Na^+ -ს, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არ იცვლება და უდრის 3-ს, როგორც ამა ადგილი აქვს NA-ისა და SF_a - არარსებობისას (ცხრილი 2, სურ. 7), ე. ი. SF_a -ს დამატება NA-სთან ერთად არ ცვლის Na^+ -ისა და K^+ -ის ტრანსპორტის სტოქეომეტრიას $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$.

რადგან OPM რეჟიმისათვის დამახასიათებელია, რომ K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 1 ან 0, ამიტომ ცალსახად შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ SF_a -სა და NA-ის ერთდროული ზემოქმედების შედეგად Na,K-ATPაზური სისტემა რჩება მუშაობის OPS რეჟიმში და არ გადადის OPM რეჟიმში. როგორც ადრე აღვნიშნეთ, სუბერთეულების ურთიერთქმედებიდან გამომდინარე, ანალოგიური სურათი იქნება OPA რეჟიმშიც.

Na,K-ATPაზაზე SF_a -ს და NA-ის ერთდროული მოქმედების მექანიზმის სრულად შესწავლისათვის გამოვიკვლიეთ OPM რეჟიმში მყოფ ფერმენტზე SF_a -ს და NA-ს გავლენა. სარეაქციო არეში მათი ერთდროული დამატებისას K^+ -ს მაღალი კონცენტრაციების პირობებში ($[\text{K}^+] > 100$ mM), Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არ იცვლება და არის 4 (სურ. 8). ანალოგიურად, K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვიც არ იცვლება და არის 1 (სურ. 9).

ე. ი. SF_a -ს და NA-ის ერთდროული მოქმედების შედეგად Na,K-ATPაზა აქტივდება, ელექტროგენური კომპონენტი არ იცვლება,

ფერმენტი არ იცვლის მუშაობის რეჟიმს და მისი აქტიობა მატულობს ATP-ის ჰიდროლიზის სიჩქარის გაზრდის შედეგად.

როორც ჩვენს მიერ ჩატარებული ექსპერიმენტებიდან ჩანს, ჩვენ შევისწავლეთ სინაფსურ მემბრანებში ლოკალიზებულ Na,K-ATP-ზე ნეიროტრანსმიტერების მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი. კერძოდ, შევისწავლეთ NA-დამოკიდებული აქტივაციისა და ინჰიბიციის მექანიზმები. ყველაზე მთავარი და მნიშვნელოვანი დასკვნა, რომელიც მივიღეთ აღნიშნული კვლევის შედეგად და რომელიც ერთმნიშვნელოვნად მიუთითებს ომაზე, რომ ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATP-ზე შემოქმედებას აქვს ფუნქციონალური მნიშვნელობა, არის ის, რომ ნეიროტრანსმიტერების, კონკრეტულად კი ნორადრენალინის მოქმედებით სინაფსურ მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATP-ზე გადადის მუშაობის OPS რეჟიმიდან OPM რეჟიმში, რომლისთვისაც დამახასიათებელია მაღალი ელექტროგენურობის კოეფიციენტი.

მეორეს მხრივ, როგორც ეს ლიტერატურული მიმოხილვიდან ჩანს, ნეიროტრანსმიტერების მოქმედების ეფექტი არ ვლნდება არამიელინიზირებულ აქსონში (ვაზის ლოკოკინა), ვირთაგვის თავის ტვინის მიკროსომულ ფრაქციაში, ღვიძლის, თირკმლის მემბრანებში ლოკალიზებულ Na,K-ATP-ზე, ე. ი. ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATP-ზე მოქმედების ეფექტი ცალსახად არის დაკავშირებული ქიმიურ სინაფსურ გადაცემასთან.

ამავე დროს, მნიშვნელოვანია აღვნიშნოთ, რომ კუტალიამ თავის საკანდიდატი დისერტაციაში შეისწავლა თირკმლის მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATP-სას მოლეკულური მექანიზმი და

გამოარკვია, რომ თირკმლის მემბრანების Na,K-ATPაზას არა აქვს მუშაობის OPM და OPA რეჟიმები (Куталиа и др., 1989), რაც იმას ნიშნავს, რომ ფერმენტის MEP და AEP მდგომარეობაში მყოფ სუბერთეულებს არა აქვთ კატალიზის უნარი, ე. ი. არ ხდება მათი დეფოსფორილირება.

თირკმლის Na,K-ATPაზას შეუძლია იმუშაოს OPO რეჟიმში, სადაც Na^+ -ისა და K^+ -ის ტრანსპორტი ხორციელდება მიმდევრობითი მექანიზმით, და OPS რეჟიმში, სადაც ამ იონების ტრანსპორტი ხორციელდება ერთდროული მექანიზმით. ორივე შემთხვევაში ტრანსპორტირებული კათიონების სტოქიომეტრია ერთნაირია და არის $3\text{Na}^+/2\text{K}^+$. ამიტომაც, საჭიროდ ჩავთვალებთ შეგვესწავლა თავის ტვინის მიკროსომულ ფრაქციაში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზას მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი, რადგან, თუ ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATPაზაზე მოქმედების ეფექტი მდგომარეობს ფერმენტის OPS რეჟიმიდან OPM რეჟიმში გადაყვანაში, მაშინ მიკროსომულ Na,K-ATPაზას არამგრძნობელობა ნეიროტრანსმიტერებისადმი შეიძლება გამოწვეული იყოს OPM რეჟიმის არარსებობით.

ამის ვარაუდის საფუძველს გვაძლევს ის ფაქტიც, რომ Na,K-ATPაზა ოლიგომერული სისტემაა და მისი ძირითადი α და β სუბერთეულების რამდენიმე იზომერი არსებობს (Robinson, Flashner, 1974). თირკმლის მემბრანებში გვხვდება Na,K-ATPაზას ერთი იზომერი, მაშინ, როცა ტავის ტვინში Na,K-ATPაზას რამდენიმე იზომერი არსებობს, რომლებიც სუბეუჯრედულ ფრაქციებში არათანაბრად არიან განაწილებული (Sweadner, 1979).

სინაფსურ მემბრანებსა და თირკმლის მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზების დეტალურად შესწავლილი

მოლეკულური მექანიზმების გაანალიზების შედეგად დავადგინეთ, რომ თავის ტვინის მიკროსომული ფრაქციის Na,K-ATPაზას სრული მოლეკულური მექანიზმის გამიფრვრისათვის აუცილებელია ოთხი ტიპის ექსპერიმენტის ჩატარება:

1. მიკროსომულ ფრაქციაში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზას ოლიგომერული სტრუქტურის დადგენა;
2. S-ის ($MgATP$), (ATP_f) და (Mg_f^{++}) კონცენტრაციების ფართო დიაპაზონში Na^+ -ისა და K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის, განკუთვნილი უბნების ფრიცხვის დადგენა;
3. Mg_f^{++} -ის დაკავშირებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვისა და ტიპის დადგენა;
4. ATP_f -ის დაკავშირებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვისა და ტიპის დადგენა.

თავდაპირველად შევისწავლეთ დაბალი კონცენტრაციების დროს ($[S]=1$ mM) OPM და OPA რეჟიმების შესაბამის პირობებში Na,K-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება Na^+ -ისა და K^+ -ის კონცენტრაციებიდან (ცხრილი 3), და ამ პირობებში Na,K-ATPაზური აქტიობა არ აღინიშნა ($V=0$) მაშინ, როდესაც OPS რეჟიმში ($S \gg A=M$) ადგილი აქვს ფერმენტული აქტიობას და Na^+ -ისა და K^+ -ის ტრანსპორტის სტოქიომეტრია არის $3Na^+/2K^+$ (ცხრილი 4).

აქედან შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ მიკროსომულ Na,K-ATPაზას არა აქვს მუშაობის OPA და OPM რეჟიმები, მაგრამ, მოლეკულური მექანიზმის დასადგენად ეს არ არის საკმარისი და საჭიროა შემდგომი კვლევა.

შებრუნებულ სიდიდეებში Na,K-ATPase აქტიობის სუბსტრატის კონცენტრაციიდან დამოკიდებულების ამსახველ მრუდს აქვს რთული გეომეტრიული ფორმა (სურ. 10). კერძოდ, აღინიშნება ერთი მოტრიალებისა და ერთი გადაღუნვის წერტილი. ამასთან, S -ის მცირე კონცენტრაციებისას მრუდს გააჩნია ასიმპტოტა. ზღვრებში, როცა $t \rightarrow 0$ და $t \rightarrow \infty$ (სადაც $t=1/s$) ფუნქციის პირველ წამოებულებს აქვთ სხვადასხვა ნიშანი, ასევე სხვადასხვა ნიშანი აქვს ზღვრებში ($t \rightarrow 0$ და $t \rightarrow \infty$) ფუნქციის მეორე წარმოებულებს.

რთული გეომეტრიული ფორმის მრუდების კინეტიკური ანალიზის მეთოდის გამოყენებით (Kometiani, 2005) ცალსახად შეიძლება დავასკვნათ, რომ რადგანაც $1/v=f(1/s)$ ფუნქციას S -ის მცირე კონცენტრაციებისას გააჩნია ასიმპტოტა, აქვს ერთი მოტრიალებისა და ერთი გადაღუნვის წერტილები და ზღვრებში ($t \rightarrow 0$ და $t \rightarrow \infty$) პირველი და მეორე წარმოებულებს აქვთ განსხვავებული ნიშანი, ამიტომ ფერმენტს გააჩნია მინიმუმ ორი სუბსტრატული უბანი.

რადგანაც ცნობილია, რომ α სუბერთეულს აქვს მხოლოდ ერთი სუბსტრატული უბანი, ამიტომ ცხადია, რომ მიკროსომული Na,K-ATPase წარმოადგენს მინიმუმ დიმერს. აღსანიშნავია, რომ ზუსტად ასეთი ფორმის მრუდები მიიღება სინფსურ და თირკმლის მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPase ების შემთხვევაში.

რთული ფორმისაა, აგრეთვე $1/v=f(\text{Mg}^{++})$ დამოკიდებულებაც. ეს ნათლად ჩანს სურ. 11-ზე, სადაც წარმოდგენილია S -ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციებისას Na,K-ATPase აქტიობის (შებრუნებულ სიდიდეში) Mg_f^{++} -ის კონცენტრაციიდან დამოკიდებულების ამსახველი მრუდები. სურთიდან ჩანს, რომ ყველა

შემთხვევაში Mg_f^{++} -ის მაღალი კონცენტრაციებისას აქტიობა შესამჩნევად მცირდება და ფუნქცია უახლოვდება ასიმპტოტას. Mg_f^{++} -ის ედარებით დაბალი კონცენტრაციებისას აქტიობა შეუმჩნევლად იცვლება და მრუდები გადადიან ჰორიზონტალურ ხაზში; მრუდებს არ გააჩნიათ გადაღუნვის წერტილი, მაგრამ აქვთ ერთი მოტრიალების წერტილი. აღსანიშნავია, რომ S-ის ფიქსირებული კონცენტრაციების ზრდასთან ერთად, ასიმპტოტების დახრა (slope) მცირდება, მცირდება აგრეთვე ორდინატთა ღერძთან გადაკვეთის წერტილი (intersept), ხოლო ასიმპტოტების მიერ აბსცისათა ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთი იზრდება და ასიმპტოტების გადაკვეთა ხდება II მეოთხედში. რთული გეომეტრიული ფორმის მრუდების კინეტიკური ანალიზის მეთოდიდან გამომდინარე, ცალსახად შეიძლება დავასკვნათ, რომ მიკროსომული Na,K-ATP-ის აქვს Mg_f^{++} -ის დაკავშირების ერთი უბანი და Mg_f^{++} არის სრული ინჰიბიტორი.

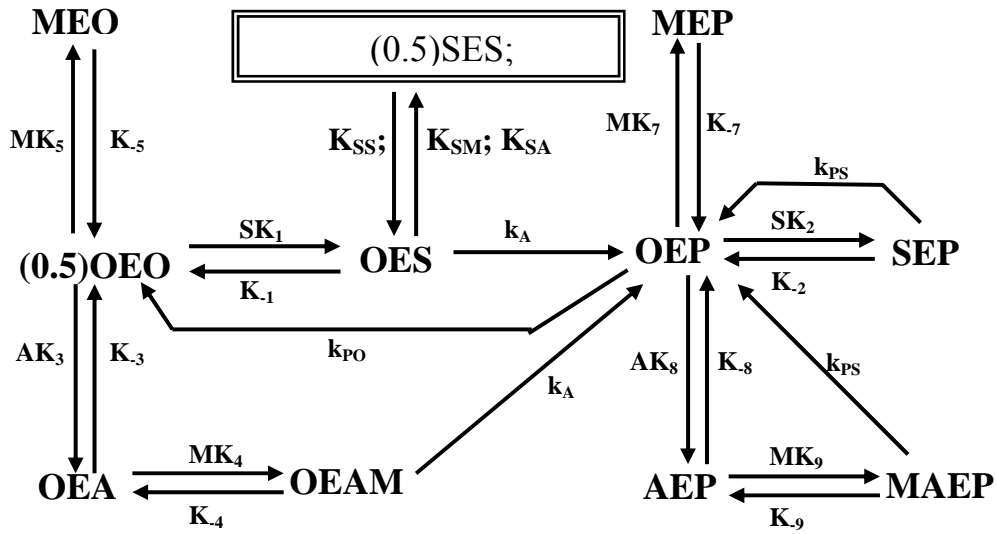
ანალოგიური სურათია $1/v=f(ATP_f)$ ფუნქციის შემთხვევაშიც (სურ. 12). კერძოდ, ATP_f -ის მაღალი კონცენტრაციებისას ფუნქციას გააჩნია ასიმპტოტა, რომელთა დახრაც S-ის ფიქსირებული კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად მცირდება აგრეთვე ორდინატთა ღერძზე გადაკვეთის წერტილი, ხოლო აბსცისაზე მოკვეთილი მონაკვეთი იზრდება და აქაც ასიმპტოტების გადაკვეთა ხდება II მეოთხედში. ისევე, როგორც Mg_f^{++} -ის შემთხვევაში, მიკროსომული Na,K-ATP-ის აქვს ATP_f -ის დაკავშირების ერთი უბანი და ATP_f წარმოადგენს სრულ ინჰიბიტორს. რადგანაც ორივე შემთხვევაში $[(1/v=f(Mg_f^{++}))$ და $1/v=f(ATP_f)]$, ასიმპტოტების გადაკვეთა ხდება II მეოთხედში; ამიტომ მიკროსომული Na,K-ATP-ისათვის Mg_f^{++} და ATP_f წარმოადგენენ

ინჰიბიტორებს კლებადი თვისობით, რაც ნიშნავს, რომ S-ის კნცენტრაციის ზრდასთან ერთად მცირდება ფერმენტის თვისობა Mg_f^{++} -ის და ATP_f -ის მიმართ.

ზემოთმოყვანილი ექსპერიმენტული მონაცემებისა და სინაფსური მემბრანების Na,K -ATPაზას არსებული კინეტიკური სქემის (სქემა 3) საფუძველზე, შეიძლება შევიმუშაოთ მიკროსომული Na,K -ATPაზას მუშაობის პრინციპული სქემა.

როგორც ექსპერიმენტული მონაცემებიდან ჩანს, მიკროსომული Na,K -ATPაზას არ გააჩნია მუშაობის OPM და OPA რეჟიმები, Mg_f^{++} და ATP_f წარმოადგენენ სრულ ინჰიბიტორებს და ფერმენტთან მათი დაკავშირებისას წარმოიქმნება ჩიხური განშტოებები. პლესნერმა და ქომეთიანმა თავის დროზე აჩვენეს, რომ იმ შემთხვევაში, როდესაც Mg_f^{++} უკავშირდება ფერმენტის სუბსტრატულ უბანს, შემდგომში მას შეიძლება დაუკავშირდეს Mg_f^{++} და ფერმენტზე მოხდეს სუბსტრატის აწყობა და კატალიზი.

ეს შემთხვევა ნაჩვენებია და დამტკიცებულია როგორც სინაფსური მემბრანების, ისე თირკმლის Na,K -ATPაზასათვის. ამიტომ, მიკროსომული Na,K -ATPაზას კინეტიკურ სქემაში ჩავრთეთ $OEO \leftrightarrow OEA \leftrightarrow OEAM \leftrightarrow OEP$ განშტოებაც. შესაბამისად, მიკროსომული Na,K -ATPაზური სისტემის მუშაობის პრინციპულ კინეტიკურ სქემას ექნება შემდეგი სახე (სქემა 8):



შემოვიღოთ აღნიშვნები: $K_T S = A \cdot M$; $K'_m = \frac{K_{-3}(k_A + K_{-4})}{k_A K_4}$; $K''_m = \frac{K_{-9}(k_{PS} + K_{-9})}{k_{PS} K_9}$;

$q = \frac{K_T K_3 K_4 K_{S1}}{K_{-3}(k_A + K_{-4})}$; $Q = \frac{K_T K_9 K_8 K_{S2}}{K_{-9}(k_{PS} + K_{-9})}$; $K_{S1} = \frac{k_A + K_{-1}}{K_1}$; $K_{S2} = \frac{k_{PS} + K_{-2}}{K_2}$;

$K_{0M} = \frac{K_{-5}}{K_5}$; $K_{0A} = \frac{K_{-3}}{K_3}$; $K_{PM} = \frac{K_{-7}}{K_7}$; $K_{PA} = \frac{K_{-8}}{K_8}$.

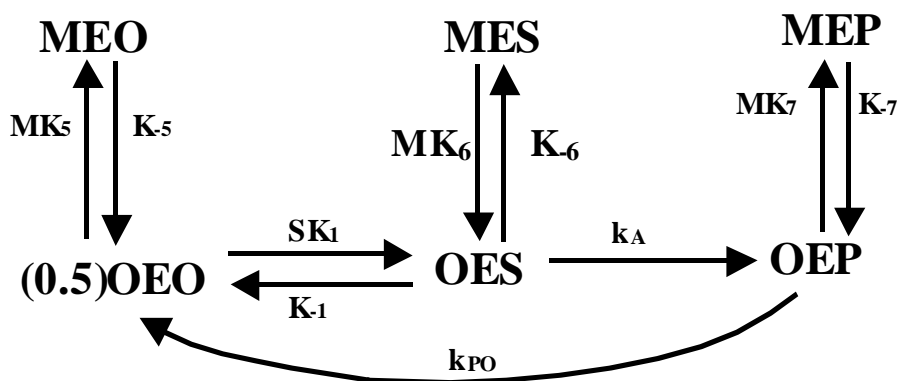
სქემა 8-ზე დაყრდნობით, კინგ-ალტმანის მეთოდის გამოყენებით, შესაძლებელია გამოვიყვანოთ მიკროსომული Na,K-ATP-ის სტაციონარული ფერმენტული სიჩქარის (აქტიობის) ანალიტიკური ფორმულა:

$$\frac{V}{e_0} = \frac{k_A \frac{S}{K_{S1}} \left(1 + q + \frac{M}{K'_m}\right) \left[k_{P0} \left(1 + \frac{M}{K''_m}\right) + k_{PS} \frac{S}{K_{S2}} \left(1 + Q + \frac{M}{K''_{mk}}\right) \right]}{k_{P0} \left(1 + \frac{M}{K'_m}\right) \left(1 + \frac{M}{K''_m}\right) \left(\frac{1}{2} + \frac{M}{K_{0M}} + \frac{A}{K_{0A}}\right) + \frac{S}{K_{S1}} \left(1 + q + \frac{M}{K'_m}\right) \left(1 + \frac{M}{K''_m}\right) \left[k_{P0} \left(1 + \frac{M}{K_{MS}} + \frac{A}{K_{AS}} + \frac{S}{K_{SS}}\right) + k_A \left(1 + \frac{M}{K_{MP}}\right) \right] + k_A \frac{S^2}{K_{S1} K_{S2}} \left(1 + q + \frac{M}{K'_m}\right) \left(1 + Q + \frac{M}{K''_m}\right)} \quad (5.1)$$

მიღებული მიკროსომული Na,K-ATP-ის მუშაობის მოლეკულური მექანიზმის სქემატური და ანალიტიკური გამოსახულება სრულად ეთანხმება ზემოთ მოყვანილ ლიტერატურულ მონაცემებს (Sweadner, 1979). უნდა აღინიშნოს, რომ სქემა 8-ში დასაზუსტებელია ფერმენტის MES, SES, MEP და AEP ფორმების არსებობა. ამ თვალსაზრისით განვიხილეთ შემთხვევა, როდესაც ATP_F -ის კონცენტრაცია იმდენად მცირეა, რომ შესაძლებელია მისი უგულებელყოფა და ამასთან აღებულია S-ის ($MgATP$ -ის) შედარებით მცირე კონცენტრაცია, მაშინ, სიჩქარის განტოლებაში $A/K_{OA} \approx 0$, $A/K_{SA} \approx 0$, $A/K_{PA} \approx 0$, $S/K_{SS} \approx 0$ და $S/K_{S2} \approx 0$. რადგანაც ფერმენტი წარმოადგენს დიმერს და Mg_f^{++} -ის დაკავშირების მხოლოდ ერთი უბანი არსებობს, ამიტომ სქემა 8 გამარტივდება და გვექნება სქემა 9.

სქემა 9-ის საფუძველზე მიღებული ანალიტიკური მრუდების გეომეტრიული ფორმა (5.3) ემთხვევა ექსპერიმენტულად მიღებული მრუდების (სურ. 10, 11, 12) გეომეტრიულ ფორმას. ანალოგიური სიტუაცია იქნება, თუ ავიღებთ S-ის შედარებით მცირე და Mg_f^{++} -ის ძალიან მცირე კონცენტრაციებს.

სქემა 9



ხოლო სიჩქარის განტოლების ანალიტიკური ფორმულა მიიღებს შემდეგ სახეს:

$$\frac{e_0}{V} = (Int) + (Sl)M = \left[\left(\frac{1}{k_A} + \frac{1}{k_{P0}} \right) + \frac{K_{S1}}{k_A S} \right] + \left[\left(\frac{1}{k_A K_{PM}} + \frac{1}{k_{P0} K_{MS}} \right) + \frac{K_{S1}}{k_A K_{0M}} \frac{1}{S} \right] M \quad (5.2)$$

(5.2) განტოლების საფუძველზე ადვილია გამოითვალოს ასიმპტოტების კოეფიციენტების დამოკიდებულება სუბსტრატის კონცენტრაციიდან $Sl=f(S)$, $Int=f(S)$, და $-Int/Sl=f(S)$, მათი წარმოებულები და ზღვრები

$$\begin{aligned} \frac{d(Sl)}{dS} &= -\frac{K_{S1}}{k_A K_{0M} S^2} < 0; & \lim_{S \rightarrow 0}(Sl) &= \infty; & \lim_{S \rightarrow \infty}(Sl) &= \left(\frac{1}{k_A K_{PM}} + \frac{1}{k_{P0} K_{MS}} \right); \\ \frac{d(Int)}{dS} &= -\frac{K_{S1}}{k_A S^2} < 0; & \lim_{S \rightarrow 0}(Int) &= \infty; & \lim_{S \rightarrow \infty}(Int) &= \left(\frac{1}{k_A K_{PM}} + \frac{1}{k_{P0} K_{MS}} \right); \\ \lim_{S \rightarrow \infty} \left(-\frac{(Int)}{(Sl)} \right) &= -\frac{1}{K_{0M}}; & \lim_{S \rightarrow \infty} \left(-\frac{(Int)}{(Sl)} \right) &= -\frac{(k_A K_{MS} + k_{P0} K_{PM})}{K_{PM} K_{MS} (k_A + k_{P0})} \\ \frac{d}{dS} \left(-\frac{(Int)}{(Sl)} \right) &= \frac{K_{S1}}{k_A} \left[\frac{1}{k_A} \left(\frac{1}{K_{0M}} - \frac{1}{K_{MS}} \right) + \frac{1}{k_{P0}} \left(\frac{1}{K_{0M}} - \frac{1}{K_{PM}} \right) \right] \end{aligned} \quad (5.3)$$

ამგვარად, სქემა 8-ის საფუძველზე მიღებული ანალიტიკური მრუდების გეომეტრიული ფორმა (5.3) ემთხვევა ექსპერიმენტულად მიღებული მრუდების (სურ. 10, 11, 12) გეომეტრიული ფორმას, რის საფუძველზეც შეიძლება ჩაითვალოს, რომ გაშიფრულია მიკროსომული Na,K-ATP-ის მინიმალური მოდელი.

სქემა 8-დან ჩანს, რომ

1. მიკროსომული Na,K-ATPაზა წარმოადგენს დიმერს;
2. ფერმენტს შეუძლია მუშაობა მიმდევრობით (OPO) და ერთდროული (OPS) ტრანსპორტის რეჟიმში;
3. ფერმენტის სუბსტრატულ უბანზე შეიძლება მოხდეს ATP_f-ის დაკავშირება, რომელსაც შემდგომ შეიძლება დაუკავშირდეს Mg⁺⁺ და ფერმენტზე მოხდეს სუბსტრატის აწყობა და კატალიზი;
4. ფერმენტს აქვს ერთი სრული ინჰიბიტორებისათვის განკუთვნილი Mg⁺⁺-ის დასაკავშირებელი უბანი;
5. Mg⁺⁺ და ATP_f-ის ფერმენტთან დაკავშირების შედეგად წარმოიქმნება ჩიხური განშტოებები.

სინაფსური მემბრანების Na,K-ATPაზასგან განსხვავებით, მიკროსომული Na,K-ATPაზას MEP და AEP ფორმებს არ ააჩნიათ კატალიზური აქტიობა, რითაც აიხსნება OPM და OPA რეჟიმების არარსებობა.

შედარებისას ნათლად ჩანს, რომ მიკროსომული Na,K-ATPაზას და თირკმლის მემბრანების Na,K-ATPაზას მოლეკულური მექანიზმები ერთნაირია და ისინი წარმოადგენენ Na,K-ATPაზებს OPM და OPA რეჟიმების გარეშე.

აღსანიშნავია, რომ S-ის დაბალი კონცენტრაციების შემთხვევაში, ე. ი. როცა არა გვაქვს OPS რეჟიმი, ჩვენს მიერ მიღებული სქემა სრულ თანხმობაშია პლესნერის მიერ მოწოდებულ სქემასთან, სადაც მას ასევე განხილული აქვს სიტუაცია S-ის დაბალი კონცენტრაციების პირობებში.

ამგვარად, მიკროსომული Na,K-ATPაზას და თირკმლის მემბრანების Na,K-ATPაზას მოლეკულური მექანიზმების საფუძველზე შეიძლება ცალსახად დავასკვნათ, რომ ნეიროტრანსმიტერების (კერძოდ,

NA-ს) Na,K-ATPაზაზე მოქმედების ფიზიკური არსი მდგომარეობს Na,K-ATPაზური სისტემის OPM რეჟიმში გადაყვანაში.

ამასთან, ცნობილია, რომ ნეიროტრანსმიტერების ეფექტი ისხნება სარეაქციო არეში 0,4 mM EGTA-ს დამატების დროს. საერთოდ, EGTA ააქტივებს Na,K-ATPაზას, რადგან მას OPM რეჟიმში მომუშავე ფერმენტი გადაჰყავს OPS რეჟიმში, ე. ი. ნეიროტრანსმიტერების მოქმედებით გამოწვეული ინჰიბიციური ეფექტის მოხსნა და სისტემის გააქტივება EGTA-თი გამოწვეულია EGTA-ს თვისებით, გადაიყვანოს Na,K-ATPაზა OPS რეჟიმში და ხელი შეუშალოს ნეიროტრანსმიტერებს მის OPM რეჟიმში გადაყვანაში.

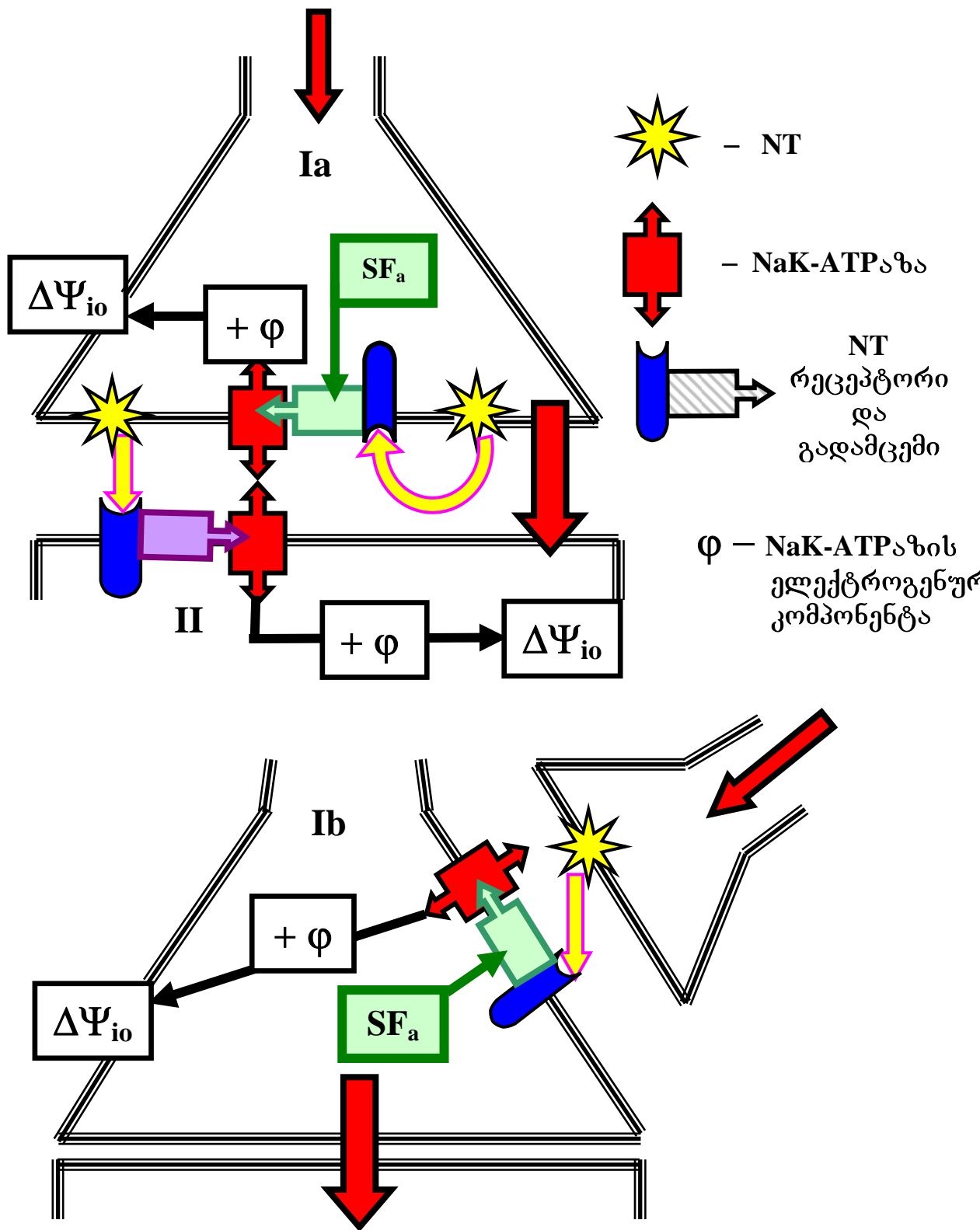
ჩვენ განვიხილეთ ნეიროტრანსმიტერების მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი, მისი ფიზიკური არსი. აქედან გამომდინარე, მთავარი დასკვნა არის ის, რომ მათი ზემოქმედების აფექტს Na,K-ATPაზე აქვს ფუნქციური მნიშვნელობა და ისინი მონაწილეობას ღებულობენ სინაფსურ გადაცემაში. არსებული მონაცემებით, ჩვენ შეიძლება დავაკონკრეტოთ სიტყვა „მონაწილეობა“ და გამოვყოთ ნეიროტრანსმიტერების (კერძოდ, NA-ის) სინაფსურ გადაცემაში მონაწილეობის სხვადასხვა ვარიანტები:

NA-დამოკიდებული ინჰიბიციის მექანიზმი და NA-დამოკიდებული აქტივაციის მექანიზმი. რადგან SF_a ჩვენ გვაქვს მხოლოდ სინაფსურ ციტოზოლში და არ გვაქვს ნეირონის ციტოზოლში (უჯრედის წვენი ფრაქცია), ამიტომ NA-დამოკიდებული აქტივაციის მექანიზმის მქონე Na,K-ATPაზა შეიძლება ლოკალიზებული იყოს მხოლოდ პრესინაფსურ რეგიონში და არ შეიძლება ლოკალიზებული იყოს პოსტსინაფსურ მემბრანაზე სქემა 10.

ასევე ცალსახად შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ნეიროტრანსმიტერმა, რომელიც ფუნქციურად აქტიურია მხოლოდ შემაერთებელი კომპლექსის ნაპრალში, შესაძლებელია იმოქმედოს Na,K-ATPაზაზე მხოლოდ მემბრანის გარედან, ე. ი. მისი რეცეპტორი განლაგებულია მემბრანის გარეთა ზედაპირზე.

NA-დამოკიდებული ინჰიბიციის მექანიზმის მქონე Na,K-ATPაზა შეიძლება ლოკალიზებული იყოს როგორც პრესინაფსურ მემბრანაზე, ასევე პოსტინაფსურ მემბრანაზე. ეს ნათლად ჩანს ორი ექსპერიმენტული ფაქტიდან: 1) Na,K-ATPაზა არის პლაზმური მემბრანის მარკერი, ამიტომ ის არის ყველგან. მაგრამ ნეიროტრანსმიტერები არ მოქმედებენ Na,K-ATPაზე, რომლებიც განლაგებულია არიან ელექტროაგზნებად მემბრანებში, ე. ი. ეფექტი ვლინდება ქიმიური სინაფსური გადაცემის შემთხვევაში; 2) ადრე ჩვენს ლაბორატორიაში ნაჩვენები იყო, რომ დეტერგენტ ტრიტონ X-100-ის დამატების შემთხვევაში ნეიროტრანსმიტერების (NA-ის) ინჰიბიციური პროცენტი მკვეთრად იზრდება. ეს აიხსნება იმ ფაქტით, რომ მცირე კონცენტრაციების შემთხვევაში ტრიტონი ანგრევს პროტოპლაზმატურ მემბრანას, მაშინ, როდესაც შემაერთებელი კომპლექსის დანგრევას იწვევს მხოლოდ და მხოლოდ დეტერგენტის ძალიან მაღალი კონცენტრაციები. ამიტომაც ინჰიბიციის ხარისხი იზრდება, რადგან ჯამური Na,K-ATPის რაოდენობა მცირდება.

სქემა 10



დასკვნები

I. ნორადრენალინის (NA) ზემოქმედების შედეგად მუშაობის OPS რეჟიმში მყოფი, სინაფსური მემბრანებში ლოკალიზებული, NaK-ATP-აზა გადადის მუშაობის OPM რეჟიმში.

a) არაფოსფორილებული სუბერთეულის თვისობა სუბსტრატის მიმართ მკვეთრად მცირდება, მაგრამ იზრდება Mg^{++} -ის იონების მიმართ.

b) იცვლება ტრანსპორტული სტოქიომეტრია: $Na^+/K^+=3/2$ მაგივრად ხდება $Na^+/K^+=3/1$ ან $Na^+/K^+=3/0$; ე. ი. იზრდება ელექტროგენურობის კოეფიციენტი.

c) K^+ -ის, როგორც აქტივატორის მიმართ NA წარმოადგენს ინჰიბიტორს უცვლელი თვისობით.

d) Na^+ -ის, როგორც აქტივატორის მიმართ NA წარმოადგენს ინჰიბიტორს ორგვარი ეფექტით.

II. NA და სინაფსური ფაქტორის (SF) ერთდროული ზემოქმედების შედეგად სინაფსური მემბრანებში ლოკალიზებული NaK-ATP-აზის მუშაობის OPS და OPM რეჟიმები არ იცვლება, მაგრამ იხსნება NA ინჰიბიტორული ეფექტი. ფერმენტული სისტემა აქტივირდება და SF წარმოადგენს აქტივატორს უცვლელი თვისობით Na^+ -ის, როგორც აქტივატორის მიმართ. ტრანსპორტული სტოქიომეტრია რჩება უცვლელი; $Na^+/K^+=3/2$, (OPS) და $Na^+/K^+=3/0$ ან 1, (OPM).

III. მიკროსომულ ფრაქციაში ლოკალიზებული და სინაფსური მემბრანების NaK-ATP-აზების მოლეკულური მექანიზმები განსხვავებულია. მიკროსომულ NaK-ATP-აზას არ გააჩნია OPM რეჟიმში მუშაობის უნარი და, შესაბამისად, NA და SF არ ზემოქმედებენ მასზე;

ე. ი. Mg-დაკავშირებული ფოსფორილებული ინტერმედიატი არ კატალიზირდება. ასევე არ კატალიზირდება ATP_{free} -დაკავშირებული ფოსფორილებული ინტერმედიატი.

გამოყენებული ლიტერატურის სია

1. Агекян Т.А. Основы теории ошибок. М. Наука, 1968.
2. Болдырев А.А. Na,K-зависимая АТРаза сарколеиини. Биохимия, 1971, 36, 826-833.
3. Болдырев А.А. Na,K-зависимая АТРаза, как олигомерная система. В сб.: Итоги науки и техники, серия Биол. химия. М., ВИНТИ, 1982, 17, 75-146.
4. Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов. М., изд. МГУ, 1985.
5. Глебов Р. Н., Дмитриева И. М. Свойства Na,K-АТРаза из коры головного мозга крыс. Биохимия, 1974, 39, 822-827.
6. Джапаридзе М. З., Джариашвили Т. Я., Цакадзе Л. Г., Кометиани З. П. Эффект дофамина на Na,K-АТРазную систему головного мозга крыс. Известия АН ГССР. серия Биол., 1981, т. 7, № 5, 425-430.
7. Джапаридзе М. З., Джариашвили Т. Я., Цакадзе Л. Г., Кометиани З. П. Эффект нейротрансмиттеров на холинергические и адренергические синапсомы. Известия АН ГССР. серия Биол., 1982, т. 8, №1, 38-41.
8. Джариашвили Т. Я., Кометиани З. П. Эффект нейротрансмиттеров на Na,K-АТРазу субклеточной фракции головного мозга. Известия АН ГССР, серия Биол., 1975, т. 1, № 5-6, 504-507.
9. Джариашвили Т. Я., Гоциридзе Е. Г., Цакадзе Л. Г., Кометиани З. П. Некоторые вопросы механизма регуляции Na,K-АТРаза нейротрансмиттерами. Известия АН ГССР, серия Биол., 1989, т. 15, № 5, 312-316.
10. Джариашвили Т. Я., Цакадзе Л. Г., Кометиани З. П. Влияние синапсомального фактора на ацетилхолинэстеразу, Ca-АТРазу и Mg-АТРазу синаптических мембран головного мозга. Известия АН

- ГССР, серия Биол., 1993, т. 19, № 2, 124-127.
11. Казанов А., Маслова М. М. Особенности активации детергентами Na,K-АТРаза головного мозга позвоночных. Ж. Эвол. Биохим. и Физиол., 1980, 16, 5, 81-87.
 12. Каландаришвили А. А., Кометиани З. П. Взаимоотношение ацетилхолинэстеразы с транспортной АТРазой в микросомах мозга крыс. Биофизика АН ГССР, 1969, 14, 213-218.
 13. Каландаришвили А. А., Аревшатов Э. Л. АХ-зависимая Na,K-АТРаза в микросомах ганглиев. Сообщ. АН ГССР, 1972, 66, 2, 433-436.
 14. Капля А.А., Кравцова Б. Б., Кравцов А. Б. Влияние фосфолипазы Ag из яда Nfja Najaohiana на активность изоферментов Na,K-АТРаза мозга крысы. Биохимия, 1996, 61, 6, 998-1005.
 15. Киквидзе З. Я., Чиквашвили Д. Б., Кометиани З. П. Роль ванадата в регуляции окислительно-восстановительных реакции в мембранах. Биохимия, 1982, 47, 1814-1817.
 16. Кометиани З. П. Ферментные системы микросом мозга крыс участвующие в транспорте ионов калия и натрияю Сб. трудов Всес. конф. по нейрохимии, Тбилиси, 1970, 413-424.
 17. Кометиани З. П. Взаиморегуляция работы АХЭ и Na,K-АТРаза в мембранах нервной ткани. Вопросы биохимии нервной и мышечной системы: Тбилиси, 1972, 23, 57-67.
 18. Кометиани З. П. Джариашвили Т. Я., Цакадзе Л. Г. Действие ацетилхолина на Na,K-АТРаза синапсом. Биохимия, 1975, 40, 1036-1046.
 19. Кометиани З. П., Цакадзе Л. Г., Джариашвили Т. Я. Метод анализа формы кривой для решения задач кинетики ферментов. Сообщения АН ГССР, 1982, 105, 2, 401-404.
 20. Кометиани З. П., Векуа М. Г. Минимальная модель п-нитрофенил-

- фосфатазы. XVI Конф. ФЕБО, Тезисы докладов, М., 1984, 448.
21. Кометиани З. П., Векуа М. Г. Известия АН ГССР, серия Биол., 1985, т. 11, № 2, 118-123.
 22. Кометиани З. П. Молекулярный механизм Na,K-АТРазной системы. Биологические науки, 1987, 10, 89-99.
 23. Кометиани З. П., Цакадзе Л. Г., Джариашвили Т. Я. Факторы действия нейротрансмитеров на Na,K-АТРазную систему синапсом. Известия АН ГССР, серия Биол., 1988, т. 14, № 5, 355-356.
 24. Куталия К. Д., Векуа М. Г., Цакадзе Л. Г., Кометиани З. П. Известия АН ГССР, 1989, т. 15, № 2, 100-104.
 25. Логуа Г. Ш., Кометиани З. П. Взаимосвязь систем ацетилхолинэстеразы и Na,K-АТРазы в синаптической фракции головного мозга крысы. Сообщения АН ГССР, 1970, 57, 3, 685-688.
 26. Ройтбак А. И., Кашакашвили Р. П., Гогодзе И. К., Кутхашвили К. В. О посттетанической потенциации дендритных потенциалов коры мозга. Физиологический Ж. АН СССР, 1984, т. TLXX, 8, 1108-1111.
 27. Ткачук В. А., Лопина О. Д. Исследование Na,K-зависимой АТРазы из скелетных мышц кролика. Тезисы Всесоюз. конф. по Биохимии мышечн. системы, М., 1972, 205.
 28. Тяхепильд А. И., Тарве У. С., Лилаелехт В. А. О свойствах роли АТРаз головного мозга. В сборн. 5-ой Всес. конф. по Нейрохимии, Тбилиси, „Мецниереба”, 1970, 437-451.
 29. Цакадзе Л. Г., Джариашвили Т. Я., Кометиани З. П. Эффект нейротрансмитеров на Na,K-АТРазную систему в онтогенезе. Известия АН ГССР, серия Биол., 1987, т. 13, 187-192.
 30. Цакадзе Л. Г., Кометиани З. П. Регуляция Na,K-АТРазной системы нейротрансмитерами. Биологические науки, 1990, 6, 16-126.

31. Цакадзе Л. Г., Джариашвили Т. Я., Кометиани З. П. Влияние норадреналина, дофамина и серотонина на регуляцию Na,K-АТФазы синапсосомальным фактором. Известия АН ГССР, серия Биол., 1990, т. 16, № 3, с. 188-192.
32. Abashidze Sh., Jariashvili T., Kometiani Z. Effect of EGTA in regulation of the Na,K-ATPase by neurotransmitters., Biomed. Biochemistry, 2001, v. 2:8, 1-7.
33. Abashidze Sh., Jariashvili T., Kometiani Z. Influence of the social isolation of the action mechanism of neurotransmitters on the Na,K-ATPase system. Bull. Georg. Acad. Sci., 2003, v. 166, N 3.
34. Albers R.U., Koval G.Y., Siegel G.Y. Studies of interaction of ouabain and other cardioactive steroids with sodium-potassium activated adenosine triphosphatase. Mol. Pharmacol., 1968, 4, 324-343.
35. Bardsley W.G., Childs R.E. Sigmoid curves non-linear double-reciprocal plots and allosterism. Biochem J., 1975, 149, 313-328
36. Beuge L., Cook R., Glunn I., Smith W. A rapid ion-exchange technique used to detect the occlusion of ions within the sodium pump. J. Physiol., 1979, 295, 40-49.
37. Blostein R., Polivani C. Proton effects on the sodium pump. 5th Conf. Na,K-ATPase, Aarhus, 1987, Abstr. and Progr., Aarhus, 1987, v. 76.
38. Blostein R., Pu. U., Scarzano R. Structure function analysis of the Na,K-ATPase, α Subunit. 10th Intern. Conf on Na,K-ATPase and related cation pumps, Elsinore, Denmark, 8-14 Aug., 2002.
39. Cantley L.G., Carilli C. T., Farley R.a., Perlman D.M. Location of binding sites on the (Na,K)-ATPase for fluoresceinisotheueryanate and ouabain. Ann. N.Y.Acad. Sci., 1982.401, p. 289-292.
40. Carrahan P.I., Glynn I.M. The stoichiometry of the sodium pump. J. Physiol., London, 1967, 192, 217-235.

41. Cavieres J. D. The molecular size required varies according to the reaction step round the sodium pump cycle. FEBS letters, 1987, 225, 145-150.
42. Chkadua G., Kometiani Z. The definition of number of essential activators by means of kinetic curve form analysis. Bull. of the Georgian Academy of Sciences, 1997, 155, 125-128.
43. Dean B.R. Theories of electrolyte equilibrium in muscle. Biol. Symp, 1941, 3, 331.
44. Desaiiah D., Ho J. K. Effect of biogenic amines and GABA on ATPase activating in mouse tissue. Eur. J. Pharmacol., 1976, 40, 255-261.
45. Esmann M., Skou I.L. Occlusion of Na^+ by the Na,K-ATPase in the presence of oligomycin. Biochem Biophys. Res. Commun., 1985, 127, 857-869.
46. Forman N., Cluseaud F. Cell specific expression of the gamma submit of the Na,K-ATPase and its isoforms in the kidney. 10th International Conf. on Na,K-ATPase and related cation pumps. Elsinore, Denmark, 8-14 Aug, 2002.
47. Fiske C.H. and Subbarov Y. The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem., 1925, 66, 375-400.
48. Gilbert Y.C., Willie M. B., Davidson D. V. Nerve terminal ATPases as possible trigger for neurotransmitter release. Nature, 1975, 255, 237-238.
49. Glynn I.M., Karlsh S.J.D. Different approaches of the mechanism of the sodium pump. Energy transformation in Biological systems, Amsterdam, 1975, 205-223.
50. Glynn I.M., Karlsh S.J.D. ATP hydrolysis associated with an uncoupled sodium flux though the sodium pump: evidence for allosteric effects of intercellular ATP and extracellular sodium. J. Physiol., 1976, v. 256, 465-496.

51. Glynn I.M., Karlish S.J.D. In: Membranes and transport. Ed.: A. Martonosi, N. Y., Plenum Press, 1982, 1, 529-536.
52. Glynn I.M. The Na⁺,K⁺-transporting adenosine triphosphatase. In: Enzyme of Biol. Memb. Ed: Martonosi A.M., New York, Plenum Press, 2nd Ed., 1985, 35-114.
53. Hansen O., Heilbronn E., Karlsson K., Samuelsson B. E. The lipid composition of the electric organ of the ray, *Torpedo mormorata* with specific reference to sulatides and Na,K-ATPase. *J. Lipid. Res.*, 1979, 20, 4, 509.
54. Hernandez R. Y., Conder-Lara M. Brain Na,K-ATPase activity possibly regulation by a specific serotonin receptor. *Brain Res.*, 1987, 7, 408, 1-2, 399-402.
55. Hernandez R. Y., Conder-Lara M. Na,K-ATPase regulation by neurotransmitters. *Neurochem., Int.*, 1992, 20, 1, 1-10.
56. Hernandez R. Y., Conder-Lara M. Brain Na,K-ATPase regulation by serotonin and norepinephrine in normal and kindled rats. *Brain Res.*, 1992, 16, 593, 2, 239-244.
57. Ho I. K., Deasaiah D. Catecholamine sensitive ATPase in the central nervous system. *Cathecholamines. Basic and Clinical frontiers*, v. 1, Proc. of the 1st Lot. Catecholamine Symp., N. Y., 1978, 532.
58. Jariashvili T., Kharebava G. Influence of constitutes of the synaptosomal factor on the Na,K-ATPase activity. *Bull.Georg. Acad. Sci.*, 2000, v. 162, N 3, 558-560.
59. Jariashvili T. Some aspects of regulation of Na,K-ATPase by neurotransmitters. *Bull. Georg. Acad. Sci.*, 2001, v. 163, N 2, 343-345.
60. Jean D.H. Albers R.W., Koval G. Sodium-potassium activated ATPase of *Electrophorus electricus* organ. *J. Biol. Chem.*, 1975. 250, 1034-1040.
61. Jorgensen P.L. Purification and characterization of Na⁺,K⁺-ATPase. III.

- Purification from the outer medulla of mammalian kidney after selective removal of membrane components by sodium dodecylsulphate. *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 356, 36-52.
62. Jorgensen P.L. Mechanism of the Na^+ , K^+ -pump. Protein structure and conformations of pure (Na^+ , K^+)-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1982, 694, 27-68.
 63. Jorgensen P. L. Principal conformations of the α -subunit and ion transport. *Curr. Top. membranes and Transp.*, 1983, 19, 377.
 64. Karlisch S. J. D. Characterization of conformation changes in Na , K -ATPase labeled with fluorescein in the active site. *J. Bioenerg. Biomemb.*, 1980, 12, 111-136.
 65. Karlisch S. J. D., Leib W. R., Stein W. D. Combined effect of ATP and phosphate on rubidium exchange mediated by Na , K -ATPase reconstituted into phospholipid vesicles. *J. Physiol., London*, 1982, 328, 330-350.
 66. Karlisch S. J. D., Kempner E.S. Minimal functional unit for transport and enzyme activities of (Na^+ , K^+)-ATPase as determined by radiation inactivation. *Biochem et Biophys. Acta*, 1984, 776, 288-289.
 67. Karlisch S. J. D. Organizations of the membrane domain of the Na , K -pump. In: *Na , K -ATPase and related transport ATPases*. Ed: L. A. Beague, P. J. Gradsby, N. Y., 1997, 30-44.
 68. Klodos I., Ottolenghi P. In: *Abstracts of the 4th Conf. on Na , K -ATPase*. Ed: Glynn, Cambridge Univ. Publ. House, 1984, 21.
 69. Kometiani Z.P. Method of curve form analysis for solution enzyme kinetic problems. *Bull. Georgia SSR Acad. Sci.*, 105, 1982 401-404 (in Russian).
 70. Kometiani Z, Tsakadze L., Jariashvili T. Functional significance of the effect of neurotransmitters on the Na , K -ATPase system. *J. Neurochem.*, 1984,

v. 42, N 5, 1246-1250.

71. Kometiani Z., Jariashvili T.. The Na,K-ATPase regulation by neurotransmitters in ontogeny. Arch. of Physiol. and Biochem., 2001, v. 108, 14, p. 360-370.
72. Kometiani Z. Basis of kinetic analysis of the multi-site enzyme systems, Tbilisi, 2005.
73. Kyte Y. Properties of the two polypeptides of sodium and potassium dependent adenosine triphosphatase. J. Biol. Chem., 1972, 247, 7642-7649.
74. Lane L. K., Anner B. M., Wollick E. T., Ray M. V., Schwartz T. Effect of phospholypase: A. treatment of the partial reactions of and oubain binding to a purified sodium and potassium activated ATPase. Biocehm. Pharmacol., 1978, 27, 225-231.
75. Levit D.C. The mechanism of the sodium pump. Biochem. Biophys. Acta, 1980, 604, 321-345.
76. Lingrel I. B., Moseley A. E., Cougnon M. H., Dostanic I. Differential roles of the alpha isoformes of the Na,K-ATPase. 10th Inter. Conf. on Na,K-ATPase and Related Cation Pumps. Elsinore, Denmark, 8-14, Aug 2002.
77. Logan J. D., Donovan G. The effects of noradrenaline, 5-hydroxytryptamine and dopamine on synaptic membrane ATPase. J. Physiol., 1975, 250, 1, 47-49.
78. Plesner L., Plesner I., Norby I., Klodos J. The study state kinetic mechaniosm of ATP hydrolysis catalyzed by membrane bound Na,K-ATPase from ox brain (minimal model). Biochem. Byophys. Acta, 1981, 643, 483-494.
79. Post R. L., Morrit G. R., Kirosolving C. R., Allright C. D. Membrane ATPase as a participant in the active transport of Na and K in human

- erythrocytes. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 1797-1809.
80. Post R. L., Ser A. K., Rosenthal A. S. A phosphorylated intermediate in adenosine triphosphate dependent sodium and potassium transport across kidney membranes. *J. Biol. Chem.*, 1965, 1437-1447.
81. Potton W. P. The mechanism of ACl release from parasympathic nerves. *J. Physiol.*, 1971, 215, 819-848.
82. Reeves et al. Isolation and characterization of Na,K-proteolipid. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980. v. 94, 1591.
83. Repke K. Ditrich F. Subunit interaction: determination of reactivity and cooperativity of Na,K-ATPase. *Na,K-ATPase Struct. and Kinet. L.*, 1979, 487-502.
84. Robinson J.D. Nucleotide and divalent cation interactions with the (Na⁺, K⁺) dependent ATPase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1974, 341, 232-247.
85. Robinson J.D., Flashner M.S. The (Na⁺, K⁺) activated ATPase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1979, 549, 145-176.
86. Robinson J.D. Transport ATPase. *Handbook of Neurochemistry*. 1983, 4, 173-193.
87. Rodriguez de Lores Arnaiz G., Antonelli de Gomez de Lima, Girardi E. Different properties of two brain extracts separated in sephadex G-50 that modify synaptosomal ATPase activities. *Neurochem. Res.*, 1988, 13 (3), 229-235.
88. Rodriguez de Lores Arnaiz G., In: Search of synaptosomal Na,K-ATPase regulators. *Mol. Neurobiol.*, 1992, 6, 4, 359-375.
89. Rodriguez de Lores Arnaiz G., Pena C. Characterization of synaptosomal membrane Na,K-ATPase inhibitors. *Neurochem. Int.*, 1995, 27, 4-5, 319-327.
90. Shoner et al. On the mechanism of Na⁺ and K⁺-stimulated hydrolysis of adenosine triphosphate. 2. Comparison of nucleotide specificities of

- Na⁺ and K⁺-activated ATPase and Na⁺-dependent phosphorylation of cell membranes. *J. Biochem.*, 1968, 7, 102-109.
91. Shurmans Stekhoven, E. Bontin S.L. Transport adenosine triphosphatases: Properties and Function. *Physiological Reviews*, 1981, 61, 1-76.
 92. Skou J. Ch The influence of some cations ions on Na,K-ATPase from peripheral nerves. *J. Biochem. et Biophys. Acta*, 1957, 23, 394-401.
 93. Skou J. Ch. Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na⁺ and K⁺. *Biochim. Biophys Acta*, 1962, 58, 314-340.
 94. Skou J.Ch. Enzymatic basis for active transport of Na⁺ and K⁺ across all membrane. *Physio. Rev.*, 1965, 45, 596-617.
 95. Skou J.Ch., Esmann M. Eosin a fluorescent probe of ATP binding to the Na,K-ATPase. *Biochem. Biophys. Acta*, 1981, 647, 232-240.
 96. Skou J.Ch., Esmann M. The Na,K-ATPase. *J. of Bioenergetics and Biomembranes*, 1992, 24, 3, 249-261.
 97. Stein et al. A model for the active transport of sodium and potassium ions as mediated by a tetrameric enzyme. *Proc. Natt. Acad. Sci., USA*, 1973, 70, 275-278.
 98. Tsukada Y., Akagawa K. Stimulation effect of nervous system adv. Dopamine. *Res. Proc. Satell. Symp. STH., Int. Congr Pharmacol., Okigawa*, 1981, Oxford, e. a., 1982, 31-142.
 99. Vizi E. S. Stimulation by inhibition of (Na⁺,K⁺,Mg⁺⁺)-activated ATPase of acetylcholine release in cortical slices from rat brain. *J. Physiol.*, 1972, 226, 95-117.
 100. Voth D., York K. Untersuchungen zum weehabet der mikrosomolen ATPaser aus Ratterhirn. *Naturwissemschafften.*, 1967, 54, 5, 117-118.
 101. Whittam R.,Chapperfield A. R. The reaction mechanism of the sodium pump. *Biochem. Biophys. Acta*, 1975, 415, 149-171.

102. Zibber et al. Detection and localization of a cytoplasmic domain on the b-subunit of Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.*, 1987, 262, 4349-4354.