

ს. დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიისა და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტი

ხელნაწერის უფლებით

ლი ა შ ი ო შ ვ ი ლ ი

ნორადრენალინით გამოწვეული Na,K-ATPაზური სისტემის
რეგულაციის მექანიზმი

03. 00. 04 – ბიოქიმია

ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო
ხარისხის მოსაპოვებლად წარდგენილი დისერტაციის

ა ვ ტ ო რ ე ფ ე რ ა ტ ი

თბილისი 2006 წ.

ნაშრომი შესრულებულია ი. ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტში.

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი,
ზურაბ ქომეთიანი

ოფიციალური ოპონენტები:

1. ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი
მ. გორდეზიანი 03. 00. 04
2. ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორი
ნ. კოშორიძე 03. 00.04

დისერტაციის დაცვა შედგება 2006 წლის _____ საათზე ს. დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიის და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტის სადისერტაციო საბჭოს (B. 03. 04. 1) სხდომაზე.

დისერტაციის გაცნობა შესაძლებელია ს. დურმიშიძის სახელობის ბიოქიმიის და ბიოტექნოლოგიის ინსტიტუტის ბიბლიოთეკაში.

მისამართი: 380 059, თბილისი, დ. აღმაშენებლის ხეივანი, მე-10 კმ.

ავტორეფერატი დაიგზავნა 2006 წლის _____

სადისერტაციო საბჭოს სწავლული მდივანი,
ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატი

ნ. შენგელია

თემის აქტუალობა. ცოცხალი მატერიის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ნიშან-თვისებას წარმოადგენს ინფორმაციის მიღება და გადაამუშავება. 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, უჯრედის თითქმის ყველა სასიცოცხლო პროცესში იღებს მონაწილეობას, მაგრამ მისი მთავარი დანიშნულებაა ATP-ის ენერჯის ხარჯზე Na^+ და K^+ ასიმეტრიული განაწილების შექმნა და შენარჩუნება, რაც თავის მხრივ ტრანსმემბრანული ელექტრული პოტენციალის გენერაციის საფუძველს წარმოადგენს. მონოვალენტური კათიონების აქტიური ტრანსპორტის განხორციელების გარდა, Na,K-ATP-აზა, თავისი ელექტროგენურობის გამო, უშუალოდ მონაწილეობს პოტენციალის გენერაციაში, სადაც მისი წვლილი დაახლოებით 10–30%-ს შეადგენს. აღნიშნულიდან გამომდინარე ნათელია, რომ ელექტროგენური კომპონენტის ცვლილება გამოიწვევს Na,K-ATPაზური სისტემის წილის შეცვლას მემბრანული პოტენციალის გენერაციის პროცესში, ე. ი. Na,K-ATPაზა თავისი ელექტროგენურობის გამო 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 (Кометиани и др., 1975; Цакадзе, Кометиани, 1990; Adam-Vizi, Hernandez, 1987; Bertorello et al., 1990; Rodriguez, 1992), 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.

კვლევის მიზანი და ამოცანები. კვლევის ძირითად მიზანს წარმოადგენს იმ მოლეკულური მექანიზმის გაშიფვრა, რომელიც საფუძველად უდევს კატექოლამინური ნეიროტრანსმიტერებით, კერძოდ კი ნორადრენალინით (NA), და სინაფტოსომების ციტოზოლში აღმოჩენილი სინაფტოსომური გამააქტივებელი ფაქტორით (SF_a) Na,K-ATPაზას რეგულაციას და ამ რეგულაციის ფუნქციური მნიშვნელობის დადგენა. გარდა ამისა, ჩვენი მიზანი იყო გაგვერკვია თავის ტვინის მიკროსომული ფრაქციის მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზას მოლეკულური მექანიზმი და შეგვედარებინა სინაფსური მემბრანების Na,K-ATPაზას მოლეკულურ მექანიზმთან. აქედან გამომდინარე, ჩვენი კვლევის ამოცანას შეადგენდა:

- 1) დეტალურად შეგვესწავლა NA-ის Na,K-ATPაზაზე მოქმედების სპეციფიკა, როგორც ცალკე, ასევე სინაფტოსომურ SF_a-თან ერთად. ამ მიზნით შევისწავლეთ Na⁺-ის და K⁺-ის ტრანსპორტის სტოქიომეტრიის ცვლილება:
 - ა) Na,K-ATPაზაზე NA-ის მოქმედების შედეგად;
 - ბ) Na,K-ATPაზაზე NA-ისა და SF_a-ს ერთდროული ზემოქმედებისას, ფერმენტის მუშაობის MgATP ($[MgATP] > [ATP_f] = [Mg_f^{++}]$) და Mg_f⁺⁺ ($[Mg_f^{++}] > [ATP_f]$) დამოკიდებულ ციკლებში (შესაბამისად OPS და OPM რეჟიმებში).
- 2) თავის ტვინის მიკროსომული ფრაქციის მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATP აზას მოქმედების პრინციპიალური სქემის დადგენა და მისი შედარებითი ანალიზი სინაფსური მემბრანების Na,K-ATP აზას მოლეკულურ მექანიზმთან.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე. დღეს, როდესაც ეჭვს არ იწვევს NT –სა და SF_a-ს მნიშვნელობა Na,K-ATPაზას რეგულაციაში და შესაბამისად თავის ტვინის ინტეგრალურ მოქმედებაში, ბოლომდე არ იყო გარკვეული ამ ზემოქმედების მოლეკულური მექანიზმი. ჩვენი კვლევის შედეგად ცალსახად იქნა ნაჩვენები, რომ NA-ის ზემოქმედების შედეგად მუშაობის OPS რეჟიმში მყოფი, სინაფსურ მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზა ინჰიბირდება და გადადის OPM რეჟიმში. იცვლება Na⁺-ის და K⁺-ის ტრანსპორტული სტოქიომეტრია და Na⁺/K⁺=3/2 ნაცვლად ხდება Na⁺/K⁺=3/1 ან 3/0, ე. ი. იზრდება ელექტროგენურობის კოეფიციენტი. დავადგინეთ აგრეთვე, რომ K⁺-ის, როგორც აქტივატორის მიმართ, NA წარმოადგენს ინჰიბიტორს უცვლელი თვისობით, ხოლო Na⁺-ის, როგორც აქტივატორის მიმართ, NA წარმოადგენს ინჰიბიტორს ორგვარი ეფექტით.

დავადგინეთ აგრეთვე, რომ NA-სა და SF_a-ს ერთდროული ზემოქმედების შედეგად სინაფსურ მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზა არ იცვლის მუშაობის რეჟიმს, მაგრამ იხსნება NA-ის Na,K-ATPაზაზე მოქმედების ინჰიბიტორული ეფექტი, ფერმენტი აქტივდება და SF_a წარმოადგენს აქტივატორს უცვლელი თვისებებით Na⁺-ის, როგორც აქტივატორის მიმართ. Na⁺-ისა და K⁺-ს ტრანსპორტული სტოქიომეტრია რჩება უცვლელი Na⁺/K⁺=3/2 (OPS) და Na⁺/K⁺=3/0 ან 3/1 (OPM)

ძალზე მნიშვნელოვანი, რაც გამოიკვამ ჩვენი კვლევის შედეგად არის ის ფაქტი, რომ მიკროსომულ ფრაქციებში ლოკალიზებული და სინაფსური მემბრანების Na,K-ATPაზების მოლეკულური მექანიზმები განსხვავებულია. მიკროსომულ Na,K-ATPაზას არ გააჩნია OPM და OPA რეჟიმში მუშაობის უნარი ე. ი. Mg_f^{++} და ATP_f დაკავშირებულ ფოსფორილებულ ინტერმედიატებს არა აქვთ კატალიზის უნარი.

ნაშრომის თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა. წინამდებარე ნაშრომი მნიშვნელოვნად აღრმავებს ჩვენს ცოდნას იმ მექანიზმების შესახებ, რომელთა საშუალებითაც ხდება ნეიროტრანსმიტერებისა და სინაფტოსომური ფაქტორის (SF_a) მოქმედება Na,K-ATPაზაზე. Na,K-ATPაზა წარმოადგენს ქიმიური სინაფსური გადაცემის რეგულატორს, რაც ახლებურად წარმოაჩენს მის როლს ტვინის ინტეგრალურ მოქმედებაში.

მიღებული შედეგები შესაძლებელია გამოყენებული იქნას ნევროლოგიასა და ფსიქიატრიაში, რადგან ფსიქოტროპულ მედიკამენტთა უმრავლესობა თავის ეფექტს აღწევს სინაფსში მიმდინარე ბიოქიმიურ პროცესებზე ზემოქმედების გზით. მათსადაამე გასათვალისწინებელია მათი მოქმედება Na,K-ATPაზურ სისტემაზე.

სამუშაოს აპრობაცია და პუბლიკაციები. დისერტაციის აპრობაცია შედგა ი. ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტის მემბრანოლოგიის ლაბორატორიის გაფართოებულ სხდომაზე (თბილისი, 2006 წ.)

დისერტაციის მასალები გამოქვეყნებულია 3 სამეცნიერო ნაშრომში.

დისერტაციის სტრუქტურა და მოცულობა. დისერტაციის საერთო მოცულობა შეადგენს . . ნაბეჭდ გვერდს. იგი მოიცავს შესავალს, ლიტერატურის მიმოხილვას, კვლევის მეთოდებს, ექსპერიმენტულ მონაცემებს და შედეგებს, მონაცემების განხილვას და დასკვნებს. დისერტაციას თან ერთვის ციტირებული ლიტერატურის . . დასახელება. ნაშრომი ილუსტრირებულია . . სურათით, . . ცხრილით და . . სქემით.

კვლევის ობიექტი და მეთოდები. კვლევის ობიექტად ვიყენებდით თეთრი ვირთაგვას თავის ტვინიდან მიღებულ სუბუჯრედულ ფრაქციებს, რომლებიც მიღებული იყო დიფერენციალური ცენტრიფუგირების მეთოდით, საქაროზის სხვადასხვა კონცენტრირების გრადიენტში. ძირითადად ვიყენებდით სინაფსური მემბრანების ფრაქციას, რომელიც ტექსტში აღნიშნულია როგორც P_2W_p და მიკროსომულ ფრაქციას. ფრჩხილებში მითითებულია საქაროზას ის კონცენტრაციები, რომელთა შორისაც არის მიღებული ფრაქცია. აღნიშნული ფრაქციების მიღებისას ვხელმძღვანელობდით დე რობერტისისა და ვიტაკერის რეკომენდაციებით (De Robertis, 1969; Wittaker, 1969).

სინაფტოსომურ ფაქტორს ვღებულობდით ნერვული დაბოლოებებით მდიდარი უხეში მიტოქონდრიული ფრაქციების ოსმოსური შოკის შემდეგ მიღებული ფრაქციის შემდგომი ცენტრიფუგირებით. სინაფსური ფაქტორის შემადგენელი კომპონენტების განცალკევების მიზნით ვიყენებდით გელ-ფილტრაციას, რომელიც

ხდებოდა ფირმა «LKB» ტიპის დანადგარზე. ფრაქციების კონცენტრირება ხდებოდა სეფადექს G-25-ის საშუალებით.

ცილის კონცენტრაციას ვზომავდით ლოურის მეთოდით (Lowry et al., 1951). Na,K-ATP-ური აქტიობა განისაზღვრებოდა, როგორც ჯამური ATP-ის ოუბაინ-მგრძნობიარე ნაწილი. ოუბაინ-არამგრძნობიარე ნაწილი მიღებული იყო როგორც Mg-ATP-ისა.

არაორგანული ფოსფორის რაოდენობის განსაზღვრისთვის ვიყენებდით ჩვენს ლაბორატორიაში მოდიფიცირებულ ფისკე-სუბაროუს მეთოდს (Fiske, Subbarow 1925) და კაზანოვ-მასლოვას მეთოდს (Казанова, Маслова, 1980). ATP-ურ აქტიობაზე ვმსჯელობდით ფერმენტის მიერ ATP-ის დაშლით გამოყოფილი არაორგანული ფოსფორის (P) რაოდენობით mg ცილაზე საათში, Na,K-ATP-ური აქტიობა სინაფსურ მემბრანებში შეადგენდა 50-70 (მmol)-ს, ხოლო მიკროსომულ პრეპარატებში 10-15 (მmol) P_i mg ცილაზე საათში. MgATP –ის, Mg_f⁺⁺ და ATP_f –ის კონცენტრაციის განსაზღვრა ხდებოდა MgATP-ის კომპლექსის დისოციაციის კონსტანტას მნიშვნელობის გათვალისწინებით (K_d=0,085) (Plesner 1981).

Na,K-ATP აზური სისტემის კინეტიკური ანალიზის თეორიული საფუძვლები.

Na,K-ATP აზური სისტემის ფერმენტული რეაქციის სიჩქარე მრავალი ცვლადის – სულ მცირე ხუთი ფიზიოლოგიური ლიგანდის MgATP, Mg_f⁺⁺, ATP_f, Na⁺ და K⁺ ფუნქციაა. თითოეული მათგანი ფერმენტზე შეიძლება მოქმედებდეს აქტივაციის ან ინჰიბიციის სახით. ფერმენტული რეაქციის საწყისი სიჩქარის გასაანალიზებლად საჭიროა V=f(S, Mg_f⁺⁺, ATP_f, Na⁺, K⁺) ფუნქციის დაყვანა ერთი ცვლადის ფუნქციამდე, როდესაც დანარჩენი ლიგანდები იქნება მუდმივი სიდიდეები. მაშინ, კერძო შემთხვევაში, როდესაც რეაქციის მიმდინარეობის პირობები უცვლელია, ფერმენტის ფუნქციონალური ერთეულის სტრუქტურული მუდმივობისას, საწყისი ფერმენტული სიჩქარე იქნება ერთცვლადიანი 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 α_i და β_i ინდივიდუალური სიჩქარის კონსტანტებისა და მუდმივი ლიგანდების კონცენტრაციების ნამრავლის ჯამია, X - ცვლადი ლიგანდის კონცენტრაციაა, 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); ხოლო სტაციონალურ წონასწორობაში p=h+q და s=k+q. შემოდის ახალი პარამეტრი q, რომელსაც ეწოდება «სირთულის პარამეტრი» და მისი რიცხობრივი მნიშვნელობა დამოკიდებულია ფერმენტული სისტემის მოლეკულური მექანიზმის სირთულეზე. n, m, და p პარამეტრების ფიზიკური არსის

დადგენის შემდეგ დგება მათი რიცხოვრივი მნიშვნელობის განსაზღვრის საკითხი, რისთვისაც ვიყენებდით მემბრანოლოგიის ლაბორატორიაში შემუშავებულ კომპიუტერულ პროგრამას.

მრავალუბნიანი ფერმენტული სისტემების მოლეკულური მექანიზმის გაშიფვრისათვის გამოვიყენეთ მემბრანოლოგიის ლაბორატორიაში დამუშავებული მიდგომა, კერძოდ კინეტიკური მრუდების გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდი, რომელიც «მინიმალური მოდელის პრინციპთან “ ერთად იძლევა ფერმენტული სისტემის კინეტიკური სქემის დადგენის საშუალებას. მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდი გულისხმობს ფუნქციის პირველი და მეორე წარმოებულების ნულთან ტოლობის განსაზღვრას, რაც შესაბამისად მოტრიალების და გადაღუნვის წერტილების განსაზღვრის საშუალებას იძლევა; აგრეთვე ფუნქციის პირველი და მეორე წარმოებულების ნიშნის განსაზღვრას, რაც იძლევა ინფორმაციას მრუდის ზრდადობა-კლებადობის და ამოხსენილობა-ჩაზნეილობის შესახებ. მნიშვნელოვანია აგრეთვე იმ წერტილების დადგენა, რომელზეც გაივლის კოორდინატთა სათავეში გამავალი მხები. «მინიმალური მოდელის პრინციპი» გულისხმობს ფერმენტის ფორმების და მათ შორის რეაქციის საფეხურების მინიმალური რაოდენობის შერჩევას, რომლებიც გარკვეული წესით არიან დაკავშირებული და ლიგანდის ნებისმიერ კონცენტრაციაზე უზრუნველყოფენ თეორიული და ექსპერიმენტული მრუდების გეომეტრიული ფორმების თანხვედრას.

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა.

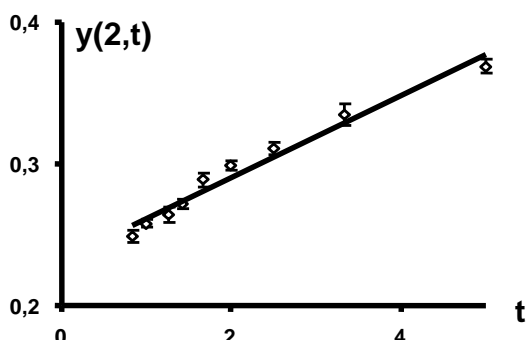
1. NA-ის გავლენა Na,K-ATPაზური სისტემის ელექტროგენურობაზე.

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 ტრანსმემბრანული პოტენციალის გენერაციაში. Na,K-ATPაზური აქტიობა და მისი ელექტროგენურობა რეგულირებადია და უჯრედში არსებობს ამ რეგულაციის განსაზღვრული სისტემები. რეგულაციის ამ პროცესში განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ნეიროტრანსმიტერების როლის დადგენა, რადგანაც არსებული მონაცემების საფუძველზე, ნეიროტრანსმიტერები მონაწილეობენ რეგულაციის აღნიშნულ პროცესში, მაგრამ უცნობია Na,K-ATPაზას ელექტროგენურ კომპონენტზე მათი მოქმედების მექანიზმი. ამიტომაც მნიშვნელოვანია იმის გარკვევა, თუ რა ცვლილებას იწვევს ნეიროტრანსმიტერების, კერძოდ NA-ის, მოქმედება Na^+ -ის და K^+ -ის ტრანსპორტის სტოქიომეტრიის ცვლილების თვალსაზრისით, რადგან ელექტროგენურობა არის ურთიერთსაწინააღმდეგო მხარეს Na^+ -ის და K^+ -ის არათანაბარი რაოდენობით გადატანის შედეგი.

ცნობილია, რომ არსებობს $Na,K-ATPაზას Mg^{++}(Mg^{++} > ATP_f), MgATP(MgATP > ATP_f = Mg^{++})$ და $ATP_f (ATP_f > Mg^{++})$ დამოკიდებული ციკლები (შესაბამისად OPM, OPS, და OPA რეჟიმები).

Na,K-ATPაზას ელექტროგენურ კომპონენტზე NA-ის მოქმედების მექანიზმის დადგენისთვის, თავდაპირველად შევისწავლეთ OPS რეჟიმში მომუშვე ფერმენტის

აქტიობის დამოკიდებულება K^+ -ის კონცენტრაციიდან, სარეაქციო არეში NA-ის არ არსებობისას. ცნობილია, რომ OPS რეჟიმში, როცა $[NA]=0$, K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი ტოლია 2.



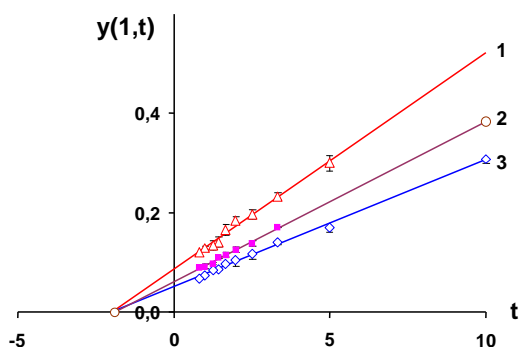
სურ. 1. Na,K-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება K^+ -ის კონცენტრაციისგან OPS რეჟიმში.

$y(2,t) = f(t)$ კოორდინატა სისტემაში

სარეაქციო არის შემადგენლობა:

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

სურ. 1–ზე ნაჩვენებია OPS რეჟიმში, როცა $[NA]=0$, Na,K-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება K^+ -ის კონცენტრაციიდან $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატა სისტემაში (სადაც $y(r;t)=\sqrt{u} = f(t)$, $u=1/v$, v – Na,K-ATPაზური აქტიობაა, $t=1/[K^+]$). აღებული გვექონდა K^+ -ის ვარიაბელური კონცენტრაცია 0,1 mM–დან 1,2 mM–მდე. მრუდების გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდმა აჩვენა, რომ $\sqrt{u} = f(t)$ ფუნქციის სარწმუნო ლინეარიზაცია მიიღწევა იმ შემთხვევაში როცა $r=2$ (ექსპერიმენტულად გამოთვლილი აუცილებელი აქტივატორების რიცხვი (R_0), პირველ მიახლოებაში ჰემმარტი მნიშვნელობიდან გადახრის (R_0-n), და რეგრესიის კოეფიციენტების (a ; b) მნიშვნელობები წარმოდგენილია ცხრილში 1) წარმოდგენილი ექსპერიმენტული მასალის საფუძველზე შეიძლება ითქვას, რომ OPS რეჟიმში, როცა $[NA]=0$, K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი ტოლია 2-ის, რაც ემთხვევა ლიტერატურაში არსებულ მონაცემებს.



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

$y(1;t)=f(t)$ კოორდინატა სისტემაში.

სარეაქციო არის შემადგენლობა:

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

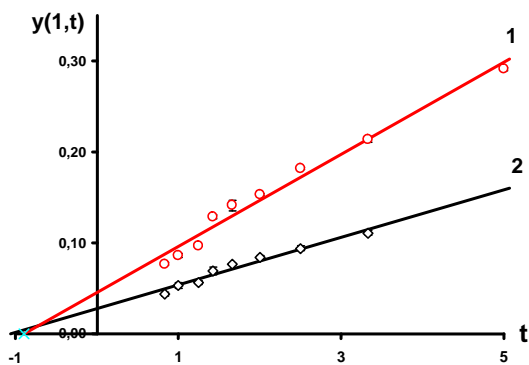
$[NA]=0.1 mM$ (ხაზი 1)

$[NA]=0.05 mM$ (ხაზი 2)

$[NA]=0.025 mM$ (ხაზი 3)

სურ. 2–ზე წარმოდგენილია OPS რეჟიმში NA–ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციისას Na,K-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება K^+ -ის კონცენტრაციიდან $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატა სისტემაში(სადაც $y(r;t)=\sqrt{u} = f(t)$, $u=1/v$, v – Na,K-ATPაზური აქტიობაა, $t=1/[K^+]$) აღებული გვექონდა K^+ -ის ვარიაბელური კონცენტრაცია 0,1 mM–დან 1,2 mM–მდე. სურათიდან ნათლად ჩანს, რომ სამივე შემთხვევაში $\sqrt{u} = f(t)$ ფუნქციის სარწმუნო ლინეარიზაცია მიიღწევა იმ შემთხვევაში, როცა $r=1$ (ექსპერიმენტულად გამოთვლილი აუცილებელი აქტივატორების რიცხვი

(R_0), პირველ მიახლოებაში ჭეშმარიტი მნიშვნელობიდან გადახრის (R_0-n), და რეგრესიის კოეფიციენტების (a ; b) მნიშვნელობები წარმოდგენილია ცხრილში 1). წარმოდგენილი მონაცემების საფუძველზე შეიძლება ითქვას, რომ OPS რეჟიმში NA-ის არსებობისას K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის, განკუთვნილი უბნების რიცხვი ტოლია 1-ის. ამრიგად, OPS რეჟიმში მომუშავე ფერმენტზე NA-ის ზემოქმედებით იცვლება K^+ -ის აქტივატორული უბნების რიცხვი და ნაცვლად 2-ისა ხდება 1, რაც დამახასიათებელია OPM რეჟიმისათვის. ეს კი გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ NA-ის ზემოქმედებით Na,K-ATPაზური სისტემა მუშაობის OPS რეჟიმიდან გადადის მუშაობის OPM რეჟიმში. გარდა ამისა სურ. 2-დან ჩანს, რომ NA-ის ფიქსირებული კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად იზრდება რეგრესიის ხაზების დახრა, იზრდება აგრეთვე ორდინატთა ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთები და წრფეები აბსცისათა ღერძზე იკვეთებიან ერთ წერტილში, რაც მიუთითებს, რომ ამ პირობებში NA წარმოადგენს არასპეციფიკურ ინჰიბიტორს და იგი არ ცვლის ფერმენტის თვისობას K^+ -ის მიმართ. (Kometiani, 2005).



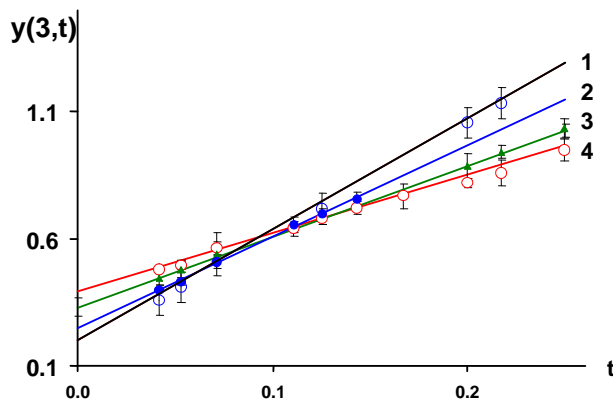
სურ. 3. Na,K-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება K^+ -ის კონცენტრაციისგან OPM რეჟიმში.
 $y(1;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში.
 სარეაქციო არის შემადგენლობა:
 $[MgATP]=1,8mM$, $[Mg^{++}]=3 mM$, $[ATP]=0,05 mM$,
 $[NaCl]=147 mM$.
 $[NA]=0.1 mM$ (ხაზი 1)
 $[NA]=0$ (ხაზი 2)

გამოთქმულ მოსაზრებას, რომ NA-ის მოქმედებით Na,K-ATPაზა მუშაობის OPS რეჟიმიდან გადადის OPM რეჟიმში, აძლიერებს სურ. 3-ზე წარმოდგენილი მონაცემები, სადაც ნაჩვენებია OPM რეჟიმში მყოფი Na,K-ATPაზას ფერმენტული აქტივობის K^+ -ის კონცენტრაციიდან დამოკიდებულება $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში (სადაც $y(r;t)=\sqrt{u}=f(t)$, $u=1/v$, v – Na,K-ATPაზური აქტიობაა, $t=1/[K^+]$) სარეაქციო არეში NA-ის არ არსებობისას და 0,1 mM NA-ის დამატებისას. ამ შემთხვევაშიცაღებულ გვექონდა K^+ -ის ვარიაბელური კონცენტრაცია 0,1mM-დან 1,2mM-მდე. როგორც სურათიდან ჩანს,ორივე შემთხვევაში $\sqrt{u}=f(t)$ ფუნქციას ასიმპტოტა აქვს, როცა $r=1$ (ექსპერიმენტულად გამოთვლილი აუცილებელი აქტივატორების რიცხვი (R_0), პირველ მიახლოებაში ჭეშმარიტი მნიშვნელობიდან გადახრის (R_0-n), და რეგრესიის კოეფიციენტების (a ; b) მნიშვნელობები წარმოდგენილია ცხრილში 1). აღნიშნული ექსპერიმენტული მონაცემები მიუთითებს, რომ OPM რეჟიმში NA-ის მოქმედებით არ იცვლება K^+ -ის აქტივატორული უბნების რიცხვი და რჩება 1-ის ტოლი. სურ. 3-დან ჩანს, რომ სარეაქციო არეში NA-ის დამატებისას იზრდება რეგრესიის ხაზების დახრა და ორდინატაზე მოჭრილი მონაკვეთები, წრფეები აბსცისათა ღერძზე იკვეთებიან ერთ წერტილში, ე. ი. აღნიშნულ პირობებში NA მოქმედებს როგორც არასპეციფიკური

ინჰიბიტორი, რომელიც არ ცვლის ფერმენტის თვისობას K^+ -ის მიმართ (Kometiani, 2005).

OPS რეჟიმში მყოფ Na,K -ATP-ის ზემოქმედების შედეგად K^+ -ის აქტივატორული უბნების რიცხვის ცვლა ორიდან ერთამდე მიგვანიშნებს იმაზე, რომ შესაძლებელია ფერმენტული სისტემა იცვლის მუშაობის რეჟიმს და OPS რეჟიმიდან გადადის OPM რეჟიმში, მაგრამ ამის საბოლოოდ დასამტკიცებლად უნდა ვნახოთ რა ემართება Na^+ -ის აქტივატორული უბნების რიცხვს.

დადგენილია, რომ როცა $[NA]=0$, OPM რეჟიმში მყოფ Na,K -ATP-ის K^+ -ის კონცენტრაციიდან დამოკიდებულებით შეუძლია იმუშაოს ორ განსხვავებულ პირობებში, რომლებიც განსხვავდებიან Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვით, კერძოდ, $n(Na^+)=4$, როცა $[K^+] > 100mM$ და $n(Na^+)=3$, როცა $[K^+] < 100 mM$.

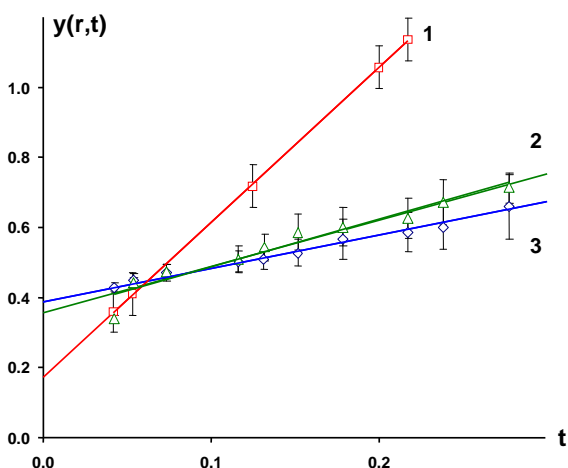


სურ. 4. Na,K -ATP-ის აქტივობის დამოკიდებულება Na^+ -ის კონცენტრაციისგან შეზღუდულ სიდიდეებში OPS რეჟიმში .
 $y(3;t)=f(t)$ კოორდინატა სისტემაში. სარეაქციო არის შემადგენლობა:
 $[MgATP]=1.8mM$, $[Mg^{++}]=[ATP]=0.4 mM$,
 $[KCl]=125 mM$.
 $[NA]=0$ (ხაზი 1)
 $[NA]=0.025 mM$ (ხაზი 2)
 $[NA]=0.05 mM$ (ხაზი 3)
 $[NA]=0.1 mM$ (ხაზი 4)

სურ.4-ზე წარმოდგენილია OPS რეჟიმში Na,K -ATP-ის აქტივობის დამოკიდებულება Na^+ -ის კონცენტრაციიდან $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატა სისტემაში, (სადაც $y(r;t)=\sqrt{u} = f(t)$, $u=1/v$, v – Na,K -ATP-ის აქტივობა, $t=1/[Na^+]$), NA -ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის პირობებში. სარეაქციო არე ისე იყო შერჩეული, რომ ფერმენტს ემუშავა $MgATP$ დამოკიდებულ ციკლში K^+ -ის მაღალი ფიქსირებული კონცენტრაციის პირობებში ($[KCl]=125mM$), Na^+ -ის კონცენტრაცია იყო ვარიაციული $4,4 mM$ -დან $24,4 mM$ -მდე.

აღნიშნული მონაცემების საფუძველზე, მრუდების გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდმა აჩვენა, რომ $\sqrt{u} = f(t)$ ფუნქციის სარწმუნო ლინეარიზაცია მიიღწევა იმ შემთხვევაში, როცა $r=3$ (ექსპერიმენტულად გამოთვლილი აუცილებელი აქტივატორების რიცხვი (R_0), პირველ მიახლოებაში ჭეშმარიტი მნიშვნელობიდან გადახრის (R_0-n), და რეგრესიის კოეფიციენტების (a ; b) მნიშვნელობები წარმოდგენილია ცხრილში 1). აღნიშნული მონაცემებიდან ჩანს, რომ Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი როგორც NA -ის გარეშე, ისე NA -ის დამატებისას არ იცვლება და ტოლია 3. სურათიდან ჩანს, რომ NA -ის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად რეგრესიის ხაზების დახრა მცირდება, ხოლო ორდინატა ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთები იზრდება. წრფეების გადაკვეთა ხდება კოორდინატა სისტემის I მეოთხედში.

ამასთან, Na^+ -ის დაბალი კონცენტრაციისას, $[\text{Na}^+] < 10 \text{ mM}$, ადგილი აქვს NA-ით გამოწვეულ აქტივაციას, ხოლო Na^+ -ის მაღალი კონცენტრაციისას, $[\text{Na}^+] > 10 \text{ mM}$, NA-ით გამოწვეულ ინჰიბიციას, ე. ი. NA ამ პირობებში წარმოადგენს ორგვარი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორს (Kometiani, 2005). ის ფაქტი, რომ მუშაობის OPS რეჟიმში მყოფ Na, K-ATPase -ზე NA-ის ზემოქმედების შედეგად Na^+ -ის აქტივატორული უბნების რიცხვი არ იცვლება და რჩება 3-ის ტოლი, ერთი შეხედვით ეწინააღმდეგება ჩვენს მიერ ადრე გამოთქმულ ვარაუდს იმის შესახებ, რომ NA-ის მოქმედებით Na, K-ATPase ური სისტემა OPS რეჟიმიდან გადადის OPM რეჟიმში, რადგან, თუ ეს ვარაუდი სწორია, მაშინ უნდა შეცვლილიყო Na^+ -ის აქტივატორული უბნების რიცხვი და ნაცვლად 3-ისა, NA-ის მოქმედების შედეგად უნდა გამხდარიყო 4, რაც დამახასიათებელია OPM რეჟიმისთვის (როცა $[\text{K}^+] > 100 \text{ mM}$).



სურ. 5. Na, K-ATPase ური 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).

აღნიშნულ წინააღმდეგობას ხსნის და საბოლოოდ ამტკიცებს ჩვენი ვარაუდის სისწორეს სურ. 5-ზე წარმოდგენილი მონაცემები, სადაც ერთდროულად ნაჩვენებია OPS რეჟიმში Na, K-ATPase ური აქტივობის დამოკიდებულება Na^+ -ის კონცენტრაციიდან $y(r;t)=f(t)$ კოორდინატებში და OPM რეჟიმში Na, K-ATPase ური აქტივობის დამოკიდებულება Na^+ -ის კონცენტრაციიდან ამავე კოორდინატებში, სარეაქციო არეში $0,1 \text{ mM}$ NA-ის დამატებისას (2 ხაზი) და NA-ის გარეშე (3 ხაზი). OPS რეჟიმში სარეაქციო არე ისეთივე შედგენილობის იყო, როგორც სურ.4-ზე, ხოლო OPM რეჟიმში – როგორც სურ. 3-ზე. მრუდების გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდმა აჩვენა, რომ $\sqrt{u} = f(t)$ ფუნქციას, (სადაც $u=1/v$, v – Na, K-ATPase ური აქტივობა, $t=1/[\text{Na}^+]$), ასიმპტოტა აქვს მაშინ, როცა

- $r=4$ ——— OPM რეჟიმი, სარეაქციო არეში $[\text{NA}] = 0$ (3 ხაზი)
- $r=3$ ——— OPM რეჟიმი, სარეაქციო არეში $[\text{NA}] = 0,1 \text{ mM}$ (2 ხაზი)
- $r=3$ ——— OPS რეჟიმი, სარეაქციო არეში $[\text{NA}] = 0$ (1 ხაზი)

(ექსპერიმენტულად გამოთვლილი აუცილებელი აქტივატორების რიცხვი (R_0), პირველ მიახლოებაში ჰემმარიტი მნიშვნელობიდან გადახრის ($R_0 - n$), და რეგრესიის კოეფიციენტების (a ; b) მნიშვნელობები წარმოდგენილია ცხრილში 1).

აღნიშნული ექსპერიმენტული მონაცემები გვიჩვენებს, რომ OPM რეჟიმში NA-ის ზემოქმედებით Na^+ -ის აქტივატორული უბნების რიცხვი იცვლება და

ნაცვლად 4-ისა ხდება 3. ამასთან, წრფეების გადაკვეთა ხდება საკოორდინატო სიბრტყის I მეოთხედში, ზუსტად ისევე, როგორც სურ. 4-ზე. აქედან გამომდინარე ვასკვნით, რომ სურ. 4-ზე გამოსახული 2, 3 და 4 წრფეები შეესაბამება ფერმენტის მუშაობის OPM რეჟიმს. ამგვარად, ჩვენ გვაქვს სრული და ამომწურავი ექსპერიმენტული მონაცემები, რომლებზედაც დაყრდნობით შეგვიძლია ერთმნიშვნელოვნად დავასკვნათ, რომ NA წარმოადგენს მოდიფიკატორს, რომლის მოქმედებითაც Na,K-ATPაზა მუშაობის OPS რეჟიმიდან გადადის OPM რეჟიმში, რასაც თან ახლავს Na⁺-ისა და K⁺-ის ტრანსპორტული სტოქიომეტრიის ცვლილება და ნაცვლად Na⁺: K⁺=3:2 ხდება Na⁺: K⁺=3:1 ან 3:0; შესაბამისად, ადგილი აქვს ელექტროგენურობის კოეფიციენტის ზრდას, რაც თავის მხრივ განაპირობებს Na,K-ATPაზური სისტემის წილის გაზრდას ტრანსმემბრანული პოტენციალის გენერაციაში.

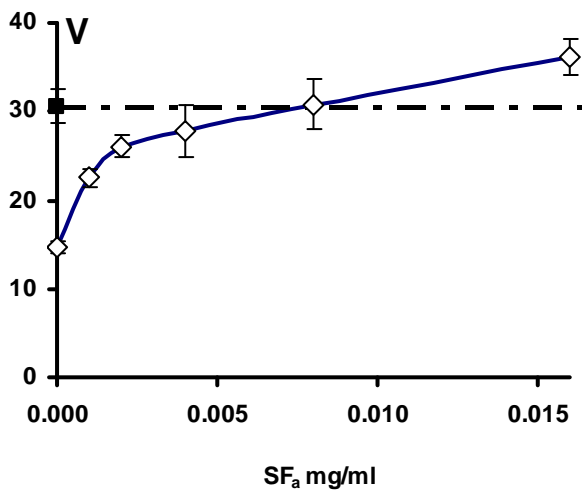
ცხრილი 1. 1, 2, 3, 4, 5-სურათებზე გამოსახული ფუნქციების პარამეტრები.

$y(r,t) = \sqrt{1/V} = f(t)$	t	r	R ₀	R _{0-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	-

2. Na,K-ATPაზური სისტემის NA-ით და SF_a რეგულაციის მექანიზმი.

როგორც აღვნიშნეთ, სინაფსურ მემბრანებში აღმოჩენილია Na,K-ATPაზას ნეიროტრანსმიტერებით რეგულაციის ახალი სისტემა. ნეიროტრანსმიტერების მოქმედება, თავის მხრივ, რეგულირდება სინაფტოსომების ციტოზოლში აღმოჩენილი ცილოვანი 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 და მათი მოქმედება სპეციფიურია სინაფსური გადაცემისთვის. დღეისთვის ბოლომდე არაა შესწავლილი NA-ისა და SF_a-ას Na,K-ATPაზაზე მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი, რომლის გარკვევა დამატებით ინფორმაციას მოგვცემს ამ რეგულაციის ფუნქციონალური მნიშვნელობის შესახებ. ამიტომაც ცხადია, რომ საჭიროა NA/SF_a დამოკიდებული აქტივაციის მექანიზმის დეტალურად შესწავლა. ამ მიზნით შესწავლილი იქნა Na,K-ATPაზას მუშაობის

OPS და OPM რეჟიმებში Na^+ -ისა და SF_a -ას გავლენა Na^+ -ისა და K^+ -ის ტრანსპორტის სტოქიომეტრიაზე.



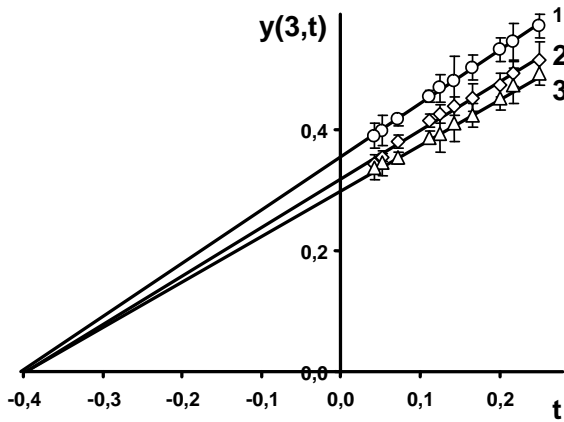
სურ. 6. NaK-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება SF_a კონცენტრაციიდან OPS რეჟიმში.
 სარეაქციო არე: $[\text{MgATP}] = 2.08 \text{ mM}$,
 $[\text{Mg}^{++}] = [\text{ATP}_f] = 0.42 \text{ mM}$, $[\text{NaCl}] = 145 \text{ mM}$,
 $[\text{KCl}] = 5 \text{ mM}$, $[\text{NA}] = 0.1 \text{ mM}$.

სურ. 6-ზე ნაჩვენებია სარეაქციო არეში Na^+ -ის არსებობისას Na,K-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება SF_a -ას კონცენტრაციიდან OPS რეჟიმში. წყვეტილი ხაზით აღნიშნულია Na,K-ATPაზური აქტიობა ამავე რეჟიმში Na^+ -ისა და SF_a -ას გარეშე. როგორც სურათიდან ჩანს, სარეაქციო არეში 0,1 mM Na^+ -ის დამატების შედეგად Na,K-ATPაზური აქტიობა მცირდება დაახლოებით 62,9 %-ით. სარეაქციო არეში SF_a -ას დამატებისას Na^+ -ის ინჰიბიციური ეფექტი თანდათანობით იხსნება და ფერმენტის საწყისი აქტიობა აღდგება სარეაქციო არეში 0,008 მგ/მლ SF_a -ას დამატებისას, ხოლო SF_a -ას უფრო მაღალი კონცენტრაციისას ფერმენტის საწყისი აქტიობა იზრდება. აქედან გამომდინარე, სამუშაოდ შერჩეული იქნა SF_a -ას შემდეგი კონცენტრაციები: 1) 0,001 მგ/მლ, როდესაც დაწყებულია Na^+ -ის ინჰიბიციური ეფექტის მოხსნა, მაგრამ ჯერ კიდევ არ არის აღდგენილი Na,K-ATPაზური აქტიობა და 2) 0,016 მგ/მლ, როდესაც მთლიანად მოხსნილია Na^+ -ის ინჰიბიციური ეფექტი და ფერმენტის საწყისი აქტიობა გაზრდილია.

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

სურ.7-ზე ნაჩვენებია OPS რეჟიმში Na,K-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება Na^+ -ის კონცენტრაციიდან $y(r;t) = f(t)$ კოორდინატთა სისტემაში, (სადაც $y(r;t) = \sqrt{u} = f(t)$, $u = 1/v$, v - Na,K-ATPაზური აქტიობა, $t = 1/[\text{Na}^+]$), სარეაქციო არეში SF_a -ას სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციისა და Na^+ -ის ერთდროული არსებობისას. აღებული გვექონდა Na^+ -ის ვარიაბელური კონცენტრაცია 4 mM-დან 24 mM-მდე. მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდიდან გამომდინარე, სამივე შემთხვევაში $\sqrt{u} = f(t)$ ფუნქციის სარწმუნო ლინეარიზაცია მიიღწევა მაშინ, როცა $r = 3$, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ აღნიშნულ პირობებში Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 3. სურათიდან ჩანს, რომ SF_a -ას ფიქსირებული კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად რეგრესიის ხაზების დახრა მცირდება, მცირდება აგრეთვე ორდინატთა

ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთები და წრფეები აბსცისათა ღერძზე იკვეთებიან ერთ წერტილში. აღნიშნულ მონაკვეთებზე დაყრდნობით ვასკვნით, რომ SF_a წარმოადგენს აქტივატორს უცვლელი თვისობით Na⁺-ის მიმართ.



სურ. 7. Na,K-ATP-აზური 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 ± 0.0030 (ხაზი 1)
 [SF_a]=0.001 mM. $y(3,t) = 0.8000t + 0.3180$ -a/b= 0.3975 ± 0.0022 (ხაზი 2)
 [SF_a]=0.016 mM. $y(3,t) = 0.7509t + 0.2983$ -a/b= 0.3972 ± 0.0056. (ხაზი 3)

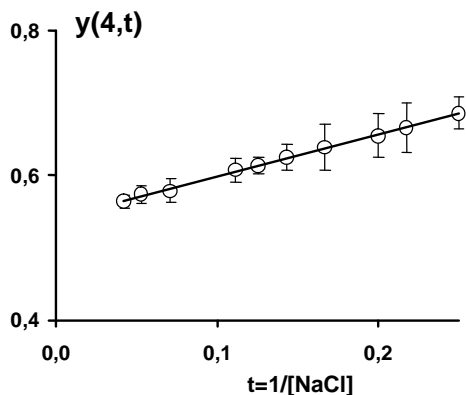
ცხრილი 2. აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უზნების რაოდენობის დამოკიდებულება [SF_a]-დან OPS რეჟიმში.

სარეაქციო არე; [MgATP]=2.08 mM, [Mg⁺⁺]=[ATP_f]=0.42 mM, [NA]= 0.1 mM.

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

ცხრილ 2-ში მოცემულია სარეაქციო არეში 0,1 mM NA-ის არსებობისას OPS რეჟიმში Na⁺-ისა და K⁺-ის აქტივატორული უზნების რიცხვის დამოკიდებულება SF_a-ასკონცენტრაციიდან. ცხრილიდან ჩანს, რომ OPS რეჟიმში NA-თან ერთად სარეაქციო არეში SF_a-ას სხვადასხვა კონცენტრაციის დამატებისას ყველა შემთხვევაში Na⁺-ის აქტივატორული უზნების რიცხვი ტოლია 3-ის, ხოლო K⁺-ის აქტივატორული უზნების რიცხვი ტოლია 2-ის; ე. ი., SF_a-ს დამატება NA-თან ერთად არ ცვლის Na⁺-ისა და K⁺-ის ტრანსპორტის სტოქიომეტრიას Na:K⁺=3:2. რადგანაც, OPM რეჟიმისთვის დამახასიათებელია, რომ K⁺-ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უზნების რიცხვი არის 1 ან 0, ამიტომ ცალსახად შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ NA-ისა და SF_a-ას ერთდროული მოქმედების შედეგად Na,K-ATP-აზური სისტემა რჩება მუშაობის OPS რეჟიმში და არ გადადის OPM რეჟიმში.

Na,K-ATPაზზე NA-ისა და SF_a-ას ერთდროული ზემოქმედების მექანიზმის სრულად შესწავლისათვის, გამოვიკვლიეთ OPM რეჟიმში მყოფ ფერმენტზე მათი გავლენა.



სურ. 8. Na,K-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება Na⁺-ის კონცენტრაციისგან OPM რეჟიმში NA-ისა და SF_a-ს ერთდროული არსებობისას.

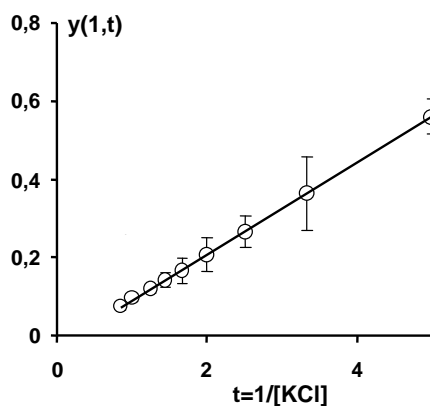
y(4;t)=f(t) კოორდინატთა სისტემაში.

სარეაქციო არის შემადგენლობა:

[MgATP]=1 mM, [Mg⁺⁺]=3 mM, [ATP_f]=0.028 mM, [KCl]=125 mM, [NA]=0.1mM, [SF_a]=0.016 mg/ml.

R = 4.022 ± 0.034; (R-n) = -0.133; ⇒ n(Na⁺) = 4.

სურ.8-ზე ნაჩვენებია OPM რეჟიმში Na,K-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება Na⁺-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/[Na⁺]), სარეაქციო არეში NA-ისა და SF_a-ას ერთდროული არსებობისას. სურათიდან ჩანს, რომ $\sqrt[r]{u}$ = f(t) ფუნქციის სარწმუნო ლინეარიზაცია მიიღწევა მაშინ, როცა r=4 რაც ნიშნავს, რომ სარეაქციო არეში NA-ისა და SF_a-ას ერთდროული არსებობისას, K⁺-ის მაღალი კონცენტრაციის პირობებში ([KCl]=125mM), Na⁺-ის როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არ იცვლება და ტოლია 4-ის.



სურ. 9. Na,K-ATPაზური 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 mM, [Mg⁺⁺]=3 mM, [ATP_f]=0.028 mM, [NaCl]=144 mM, [NA]=0.1mM, [SF_a]=0.016 mg/ml.

R=1.002±0.005; (R-n)= -0.013; ⇒ n(K⁺) = 1.

სურ. 9-ზე წარმოდგენილია NA-ისა და SF_a-ას ერთდროული არსებობისას OPM რეჟიმში Na,K-ATPაზური აქტივობის 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⁺]). მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდმა აჩვენა, რომ $\sqrt[r]{u}$ = f(t) ფუნქციას ასიმპტოტა აქვს მაშინ, როცა r=1, რაც ნიშნავს რომ OPM რეჟიმში NA-ისა და SF_a-ას ერთდროული მოქმედებისას K⁺-ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი, უცვლელია და ტოლია 1-ის.

ამრიგად, წარმოდგენილი ექსპერიმენტული მასალის საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ სინაფსურ მემბრანებში ლოკალიზებულ Na,K-ATPაზურ სისტემაზე NA-ისა და SF_a-ას ერთდროული ზემოქმედების შედეგად იხსნება NA-ით გამოწვეული ინჰიბიციური ეფექტი, ფერმენტი აქტივდება, მაგრამ არ იცვლის მუშაობის რეჟიმს. არ იცვლება აგრეთვე Na⁺-ისა და K⁺-ის ტრანსპორტის სტოქიომეტრია და იგი რჩება იმ რეჟიმის შესაბამისი, რომელშიც იმყოფება ფერმენტული სისტემა, კერძოდ Na:K⁺=3:2 (OPS) და Na:K⁺=3:1 ან 3:0 (OPM).

3. მიკროსომული Na,K-ATPაზას მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი.

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, Na,K-ATPაზაზე ნეიროტრანსმიტერების მოქმედებას ფუნქციონალური მნიშვნელობა აქვს და ნეიროტრანსმიტერების, კერძოდ კი NA-ის, მოქმედებით სინაფსურ მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზა გადადის მუშაობის OPS რეჟიმიდან OPM რეჟიმში, რომლისთვისაც დამახასიათებელია მაღალი ელექტროგენურობის კოეფიციენტი. მეორეს მხრივ, ნეიროტრანსმიტერების მოქმედების ეფექტი არ ვლინდება არამიელინოზირებულ აქსონში, ვირთაგვას თავის ტვინის მიკროსომულ ფრაქციაში, ღვიძლისა და თირკმლის მემბრანებში ლოკალიზებულ Na,K-ATPაზაზე, ე. ი. Na,K-ATPაზაზე ნეიროტრანსმიტერების მოქმედების ეფექტი ცალსახად არის დაკავშირებული ქიმიურ სინაფსურ გადაცემასთან. ამასთანავე ცნობილია, რომ თირკმლის მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზას მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი განსხვავდება სინაფსური მემბრანების Na,K-ATPაზას მოქმედების მოლეკულური მექანიზმისგან მუშაობის OPM და OPA რეჟიმების არ არსებობით (Куталиа и др., 1989). თირკმლის Na,K-ATPაზას შეუძლია იმუშაოს OPO რეჟიმში, სადაც Na⁺-ისა და K⁺-ის ტრანსპორტი ხორციელდება მიმდევრობითი მექანიზმით და OPS რეჟიმში, სადაც Na⁺-ისა და K⁺-ის ტრანსპორტი ხორციელდება ერთდროული მექანიზმით. ორივე შემთხვევაში ტრანსპორტირებული კათიონების სტოქიომეტრია ერთნაირია, კერძოდ, Na:K⁺=3:2.

აღნიშნულის გამო დავინტერესდით, ხომ არ განსხვავდებოდა თავის ტვინის მიკროსომულ ფრაქციაში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზა სინაფსური მემბრანების Na,K-ATPაზასგან მოქმედების მოლეკულური მექანიზმით, რადგანაც, თუ ნეიროტრანსმიტერების Na,K-ATPაზაზე მოქმედების ეფექტი მდგომარეობს ფერმენტის OPS რეჟიმიდან OPM რეჟიმში გადაყვანაში, მაშინ მიკროსომული Na,K-ATPაზას არამგრძობელობა ნეიროტრანსმიტერებისადმი შეიძლება გამოწვეული იყოს OPM რეჟიმის არარსებობით. ამ ვარაუდის საფუძველს გვაძლევს ის ფაქტიც, რომ Na,K-ATPაზა ოლიგომერული სისტემაა და მისი ძირითადი ა და ბ სუბერთეულების რამდენიმე იზომერი არსებობს (Robinson, Fleshner, 1974). თირკმლის მემბრანებში გვხვდება Na,K-ATPაზას ერთი იზომერი, მაშინ, როცა თავის ტვინში Na,K-ATPაზას რამდენიმე იზომერი არსებობს, რომლებიც სუბუჯრედულ ფრაქციებში არათანაბრადაა განაწილებული (Swedner, 1979).

სინაფსურ მემბრანებსა და თირკმლის მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზების დეტალურად შესწავლილი მოლეკულური მექანიზმების გაანალიზების შედეგად დავასკვნით, რომ თავის ტვინის მიკროსომული ფრაქციის Na,K-ATPაზას სრული მოლეკულური მექანიზმის გამიფრისათვის აუცილებელია ოთხი ტიპის ექსპერიმენტის ჩატარება:

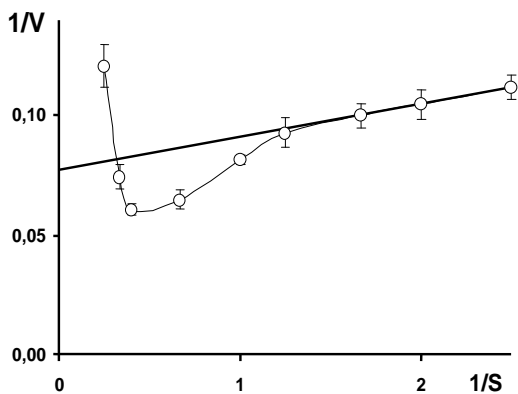
1) თავის ტვინის მიკროსომულ ფრაქციაში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზას ოლიგომერული სტრუქტურის დადგენა;

2) S-ის (MgATP) კონცენტრაციების ფართო დიაპაზონში Na⁺ და K⁺-ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვის დადგენა;

3) Mg⁺⁺ -ის დაკავშირებისთვის განკუთვნილი უბნების ტიპისა და რიცხვის დადგენა;

4) ATP_f-ის დაკავშირებისთვის განკუთვნილი უბნების ტიპისა და რიცხვის დადგენა.

პირველ რიგში შევისწავლეთ მიკროსომულ მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზას ფერმენტული აქტიობის დამოკიდებულება S-ის კონცენტრაციიდან, რაც წარმოდგენილია სურ.10-ზე.



სურ. 10. NaK-ATPაზური აქტიობის (V) დამოკიდებულება სუბსტრატის (S=[MgATP] mM) კონცენტრაციიდან შებრუნებულ სიდიდეებში. $[Mg^{++}] = [ATP_{free}] = \sqrt{K_T S}$; [NaCl]=145 mM, [KCl]=5 mM.

სურ.10-დან ჩანს, რომ $1/v=f(1/s)$ მრუდს რთული გეომეტრიული ფორმა აქვს. კერძოდ, არგუმენტის მცირე სიდიდეებისას ფუნქცია კლებადია, ხოლო შემდეგ გადადის ზრდად ფუნქციაში, რომელიც არგუმენტის მაღალი მნიშვნელობისას უახლოვდება ასიმპტოტას და გააჩნია მკვეთრად გამოხატული ერთი მოტრიალებისა და ერთი გადაღუნვის წერტილი. ზღვრებში, როდესაც $t \rightarrow 0$ და $t \rightarrow \infty$ (სადაც $t=1/s$) ფუნქციის პირველ და მეორე წარმოებულებს აქვს 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, 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 $t \rightarrow \infty$) პირველ და მეორე წარმოებულებს აქვს სხვადასხვა ნიშანი, ამიტომ ფერმენტს გააჩნია მინიმუმ ორი სუბსტრატული უბანი, რადგან ცნობილია, რომ ფერმენტის ა სუბერთეულს აქვს მხოლოდ ერთი სუბსტრატული უბანი. ამიტომაც ცხადია, რომ მიკროსომული Na,K-ATPაზა წარმოადგენს მინიმუმ დიდერს (Kometiani, 1987). აღსანიშნავია, რომ ზუსტად ასეთივე ფორმის მრუდები აქვს $1/v=f(1/s)$ ფუნქციას სინაფტოსომებსა და თირკმლის მემბრანებში ლოკალიზებული Na,K-ATPაზების შემთხვევაშიც.

ამის შემდეგ შევისწავლეთ თავის ტვინის მიკროსომული მემბრანების Na,K-ATPაზას Na⁺-ითა და K⁺-ით აქტივაციის მექანიზმები OPM და OPA რეჟიმებში, S-ის

შედარებით დაბალი კონცენტრაციის დროს $[S]=1 \text{ mM}$. Na,K-ATP-აზური აქტიობის Na^+ -ის კონცენტრაციიდან დამოკიდებულების შესწავლისას აღებული იყო K^+ -ის ორი ფიქსირებული კონცენტრაცია – $[\text{KCl}]=50 \text{ mM}$ და $[\text{KCl}]=125 \text{ mM}$, ხოლო K^+ -ის კონცენტრაციიდან დამოკიდებულების შესწავლისას აღებული იყო Na^+ -ის ფიქსირებული კონცენტრაცია $[\text{NaCl}]=145 \text{ mM}$.

ცხრილი. 3. Na,K-ATP-აზური აქტიობის დამოკიდებულება Na^+ -ის ($[\text{K}^+] = \text{const}$) და K^+ -ის ($[\text{Na}^+] = \text{const}$) კონცენტრაციებიდან OPM და OPA რეჟიმებში.

ფერმენტის მუშაობის რეჟიმი	[MgATP]	[Mg ⁺⁺]	[ATP _f]	[Na ⁺]	[K ⁺]	Na,K-ATP-აზური 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

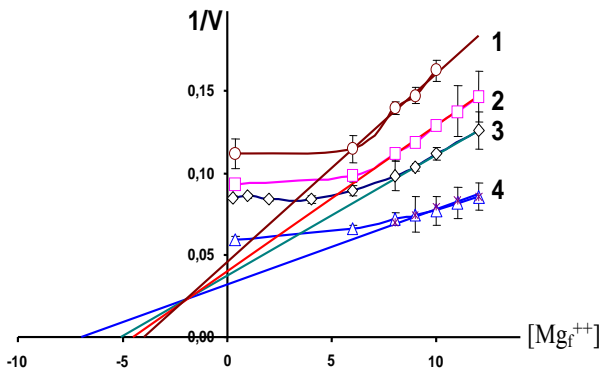
ცხრ.3–დან ნათლად ჩანს, რომ აღნიშნული პირობების დროს, როგორც OPM, ისე OPA რეჟიმებში ფერმენტული აქტიობა ნულის ტოლია, რაც მიანიშნებს იმაზე, რომ მიკროსომულ Na,K-ATP-აზას, სინაფსური Na,K-ATP-აზასგან განსხვავებით, არა აქვს მუშაობის OPM და OPA რეჟიმები. მაშინ, როცა OPS რეჟიმში აღინიშნება ფერმენტული აქტიობა და Na^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 3, ხოლო K^+ -ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი არის 2. (ცხრ. 4)

ცხრილი 4. აუცილებელ აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რაოდენობის განსაზღვრა

($A=[\text{ATP}_f]$; $M=[\text{Mg}^{++}]$; $S=[\text{MgATP}]$. V_0 – აქტიობა $[\text{KCl}]=0$ 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	$\sqrt{1/V} = f(1/[\text{Na}])$ $[\text{Na}^+] < 25 \text{ mM}$	$3.002 \leq R \leq 3.007$ $s(R) \leq 0.008$; $(R-n) \leq 0.272$ $n(\text{Na}) = 3$
	[NaCl]=145 mM	$\sqrt{1/(V-V_0)} = f(1/[\text{K}])$ $[\text{K}^+] < 1.2 \text{ mM}$	$2.004 \leq R \leq 2.008$ $s(R) \leq 0.007$; $(R-n) \leq 0.342$ $n(\text{K}) = 2$

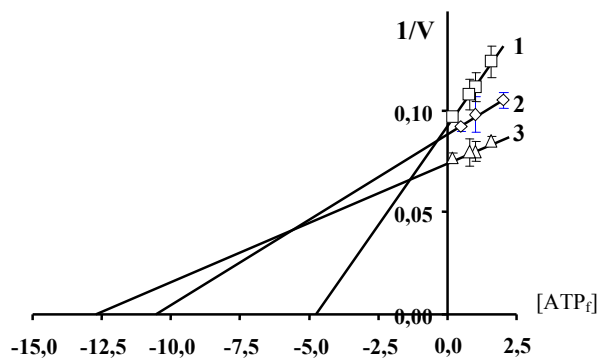
სურ.11-ზე წარმოდგენილია მიკროსომული Na,K-ATPაზას ფერმენტული აქტიობის (შებრუნებულ სიდიდეში) დამოკიდებულება Mg_f^{++} -ის კონცენტრაციიდან S-ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის დროს.



სურ. 11. NaK-ATPაზური აქტიობის შებრუნებული სიდიდის (1/V) დამოკიდებულება თავისუფალი $[Mg^{++}]$ კონცენტრაციიდან. $S=[MgATP]=const$: $S=0.5$ mM (1); $S=0.8$ mM (2); $S=1.0$ mM (3); $S=1.5$ mM (4). $[NaCl]=145$ mM, $[KCl]=5$ mM. $[Mg^{++}] = K_r S / [ATP_f]$.

მაღალი კონცენტრაციებისას ფერმენტული აქტიობა შესამჩნევად მცირდება და $1/v=f(Mg_f^{++})$ ფუნქცია უახლოვდება ასიმპტოტას, ხოლო Mg_f^{++} -ის შედარებით დაბალი კონცენტრაციებისას აქტიობა შეუმჩნევლად იცვლება და მრუდები გადადიან თითქმის ჰორიზონტალურ ხაზში. $1/v=f(Mg_f^{++})$ მრუდებს არ გააჩნიათ გადაღუნვის წერტილი, მაგრამ აქვთ ერთი მოტრიალების წერტილი. აღსანიშნავია, რომ S-ის ფიქსირებული კონცენტრაციების ზრდასთან ერთად, ასიმპტოტების დახრა (SI) მცირდება, მცირდება აგრეთვე ორდინატაზე მოკვეთილი მონაკვეთები (Int), ხოლო ასიმპტოტების მიერ აბსცისათა ღერძზე მოკვეთილი მონაკვეთები იზრდება და ასიმპტოტების გადაკვეთა ხდება კოორდინატა სისტემის II მეოთხედში. რთული გეომეტრიული ფორმის მრუდების კინეტიკური ანალიზის მეთოდიდან გამომდინარე, ცალსახად შეიძლება დავასკვნათ, რომ მიკროსომულ Na,K-ATPაზას აქვს Mg_f^{++} -ის დაკავშირების ერთი უბანი და Mg_f^{++} -ი არის სრული ინჰიბიტორი.

მსგავსი სურათია $1/v=f(ATP_f)$ ფუნქციის შემთხვევაშიც. ეს ნათლად ჩანს სურ. 12-ზე, სადაც ნაჩვენებია S-ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციისას Na,K-ATPაზური აქტიობის (შებრუნებულ სიდიდეში) დამოკიდებულება ATP_f -ის კონცენტრაციიდან.



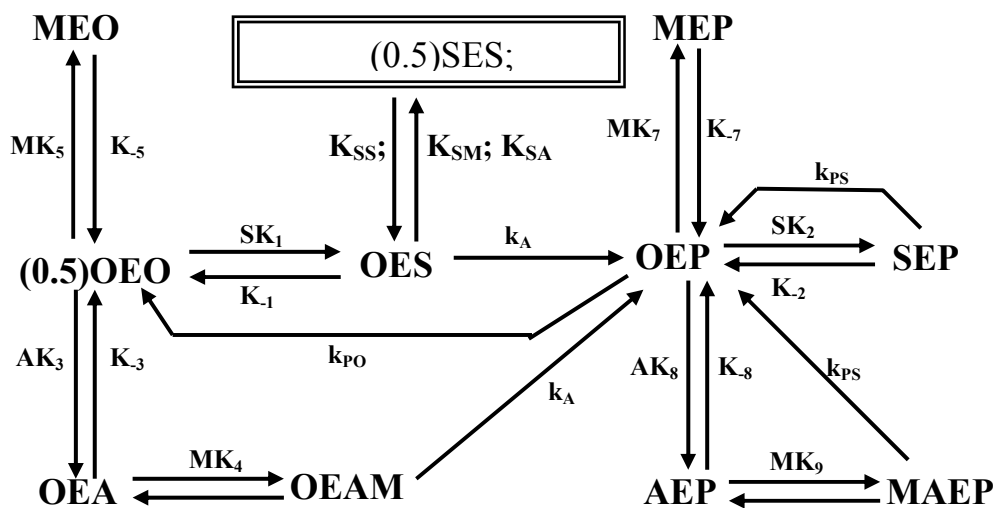
სურ. 12. NaK-ATPაზური აქტიობის შებრუნებული სიდიდის (1/V) დამოკიდებულება თავისუფალი $[ATP_{free}]$ კონცენტრაციიდან. $S=[MgATP]=const$: $S=0.8$ mM (1); $S=1.0$ mM (2); $S=1.5$ mM (3). $[NaCl]=145$ mM, $[KCl]=5$ mM. $[ATP_f] = K_r S / [Mg^{++}]$

სურ. 12-დან ჩანს, რომ ATP_f -ის მაღალი კონცენტრაციებისას $1/v=f(ATP_f)$ ფუნქციას, ყველა შემთხვევაში გააჩნია ასიმპტოტა, რომელთა დახრა (SI) S-ის

ფიქსირებული კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად მცირდება, მცირდება აგრეთვე ორდინატა ღერძზე მოჭრილი მონაკვეთი (Int), ხოლო აბსცისაზე მოკვეთილი მონაკვეთი იზრდება და ასიმპტოტების გადაკვეთა ხდება კოორდინატა სისტემის II მეოთხედში. ისევე როგორც Mg_f^{++} -ის შემთხვევაში, მიკროსომულ Na,K-ATPას აქვს ATP_f -ის დაკავშირების ერთი უბანი და ATP_f -ი წარმოადგენს სრულ ინჰიბიტორს. რადგან ორივე შემთხვევაში ($1/v=f(Mg_f^{++})$ და $1/v=f(ATP_f)$) ასიმპტოტების გადაკვეთა ხდება კოორდინატა სისტემის II მეოთხედში. ამიტომაც მიკროსომული Na,K-ATPასთვის Mg_f^{++} და ATP_f -ი წარმოადგენენ ინჰიბიტორებს კლებადი თვისობით, რაც ნიშნავს, რომ S-ის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად მცირდება ფერმენტის თვისობა Mg_f^{++} და ATP_f -ის მიმართ.

ზემოთ მოყვანილი ექსპერიმენტული მონაცემებისა და სინაფსური მემბრანების Na,K-ATPას არსებული ყველაზე სრულყოფილი კინეტიკური სქემის (Kometiani, 1987) საფუძველზე, შეიძლება შევადგინოთ მიკროსომული Na,K-ATPას მოქმედების პრინციპული კინეტიკური სქემა. როგორც ექსპერიმენტული მონაცემებიდან გაირკვა, მიკროსომულ Na,K-ATPას არ გააჩნია მუშაობის OPM და OPA რეჟიმები, Mg_f^{++} და ATP_f -ი წარმოადგენენ სრულ ინჰიბიტორებს და ფერმენტის MEP და AEP ფორმებს არ გააჩნიათ კატალიზის უნარი.

პლესნერმა და ქომეთიანმა (Plesner, 1981; Kometiani, 1987) თავის დროზე აჩვენეს, რომ იმ შემთხვევაში, როდესაც ATP_f -ი უკავშირდება ფერმენტის სუბსტრატულ უბანს, შემდგომში მას შეიძლება დაუკავშირდეს Mg_f^{++} და ფერმენტზე მოხდეს სუბსტრატის აწყობა და კატალიზი (Plesner 1981). ეს შემთხვევა ნაჩვენებია და დამტკიცებულია, როგორც სინაფსური მემბრანების, ისე თირკმლის Na,K-ATPასთვის (Куталиа и др., 1989). ამიტომ, მიკროსომული Na,K-ATPას კინეტიკურ სქემაში ჩავრთეთ $OEO \rightarrow OEA \rightarrow OEAM \rightarrow OEP$ განშტოებაც. შესაბამისად, მიკროსომული Na,K-ATPას მოქმედების პრინციპულ კინეტიკურ სქემას ექნება შემდეგი სახე:



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

$$q = \frac{K_T K_3 K_4 K_{S1}}{K_{-3} (k_A + K_{-4})}; \quad Q = \frac{K_T K_9 K_8 K_{S2}}{K_{-9} (k_{PS} + K_{-8})}; \quad K_{S1} = \frac{k_A + K_{-1}}{K_1}; \quad K_{S2} = \frac{k_{PS} + K_{-2}}{K_2}; \quad K_{0M} = \frac{K_{-5}}{K_5};$$

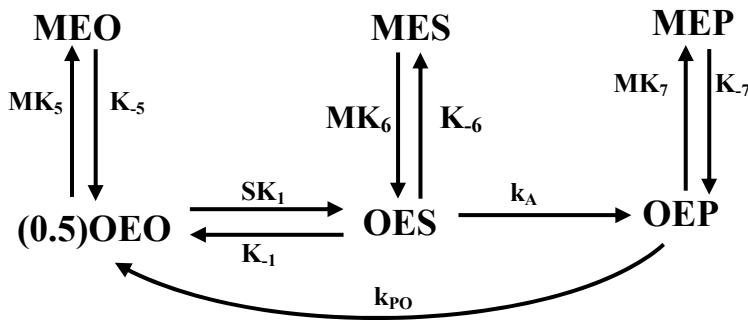
$$K_{0A} = \frac{K_{-3}}{K_3}; \quad K_{PM} = \frac{K_{-7}}{K_7}; \quad K_{PA} = \frac{K_{-8}}{K_8}.$$

მაშინ, კინგ-ალტმანის მეთოდის გამოყენებით, შესაძლებელია გამოვიყვანოთ მიკროსომული Na,K-ATP-ზას სტაციონარული ფერმენტული სიჩქარის ანალიტიკური ფორმულა:

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

მიკროსომული Na,K-ATP-ზას მოქმედების მოლეკულური მექანიზმის მიღებული სქემატური და ანალიტიკური გამოსახულება სრულად ეთანხმება ზემოთ მოყვანილ ექსპერიმენტულ და ლიტერატურულ მონაცემებს (Sweadner, 1979), მაგრამ სქემა 1-ში დასაზუსტებელია ფერმენტის MES, SES, MEP და AEP ფორმების არსებობა. ამ თვალსაზრისით განვიხილოთ შემთხვევა, როცა ATP-ის კონცენტრაცია იმდენად მცირეა, რომ შესაძლებელია მისი უგულებელყოფა და ამასთან, აღებულია S-ის შედარებით მცირე კონცენტრაცია, მაშინ, სიჩქარის განტოლებაში (2):

$A/K_{0A} \approx 0$, $A/K_{SA} \approx 0$, $A/K_{PA} \approx 0$, $S/K_{SS} \approx 0$ და $S/K_{S2} \approx 0$ შესაბამისად ზემოთ მოყვანილი სქემა გამარტივდება და გვექნება:



ხოლო სიჩქარის განტოლების ანალიტიკური ფორმულა მიიღებს შემდეგ სახეს:

$$\frac{e_0}{V} = (Int) + (Sl)M = \left[\left(\frac{1}{k_A} + \frac{1}{k_{P0}} \right) + \frac{K_{S1}}{k_A S} \right] + \left[\left(\frac{1}{k_A K_{PM}} + \frac{1}{k_{P0} K_{MS}} \right) + \frac{K_{S1}}{k_A K_{0M}} \frac{1}{S} \right] M \quad (3)$$

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

$$\begin{aligned} \frac{d(SI)}{dS} &= -\frac{K_{S1}}{k_A K_{OM} S^2} < 0; & \lim_{S \rightarrow 0}(SI) &= \infty; & \lim_{S \rightarrow \infty}(SI) &= \left(\frac{1}{k_A K_{PM}} + \frac{1}{k_{P0} K_{MS}} \right); \\ \frac{d(Int)}{dS} &= -\frac{K_{S1}}{k_A S^2} < 0; & \lim_{S \rightarrow 0}(Int) &= \infty; & \lim_{S \rightarrow \infty}(Int) &= \left(\frac{1}{k_A K_{PM}} + \frac{1}{k_{P0} K_{MS}} \right); \\ \lim_{S \rightarrow \infty} \left(-\frac{(Int)}{(SI)} \right) &= -\frac{1}{K_{OM}}; & \lim_{S \rightarrow \infty} \left(-\frac{(Int)}{(SI)} \right) &= -\frac{(k_A K_{MS} + k_{P0} K_{PM})}{K_{PM} K_{MS} (k_A + k_{P0})} \\ \frac{d}{dS} \left(-\frac{(Int)}{(SI)} \right) &= \frac{K_{S1}}{k_A} \left[\frac{1}{k_A} \left(\frac{1}{K_{OM}} - \frac{1}{K_{MS}} \right) + \frac{1}{k_{P0}} \left(\frac{1}{K_{OM}} - \frac{1}{K_{PM}} \right) \right] \end{aligned} \quad (4)$$

სქემა 2-ის საფუძველზე მიღებული ანალიტიკური მრუდების გეომეტრიული ფორმა (4) ემთხვევა ექსპერიმენტულად მიღებული მრუდების (სურ. 10, 11, 12) გეომეტრიულ ფორმას. ანალოგიური სიტუაცია იქნება, თუ S-ის შედარებით მცირე კონცენტრაციისას ავიღებთ Mg_f^{++} -ის ძალიან მცირე კონცენტრაციებს და $M/K_{OM} \approx 0$, $M/K_{SM} \approx 0$, $M/K_{PM} \approx 0$, $S/K_{SS} \approx 0$ და $S/K_{S2} \approx 0$

ამგვარად, სქემა 1-ის საფუძველზე თეორიულად გამოთვლილი ყველა მრუდის გეომეტრიული ფორმა ზუსტად შეესაბამება ექსპერიმენტულად მიღებულ მრუდებს, რის საფუძველზეც შეიძლება ჩაითვალოს, რომ გაშიფრულია მიკროსომული Na,K-ATPაზას მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი და სქემა 1 წარმოადგენს მიკროსომული Na,K-ATPაზას მინიმალურ მოდელს, რომელიც ძალიან უახლოვდება ფერმენტის მუშაობის ჭეშმარიტ სქემას. ამ სქემიდან ჩანს, რომ

- 1) მიკროსომული Na,K-ATPაზა წარმოადგენს დიმერს;
- 2) ფერმენტს შეუძლია მუშაობა მიმდევრობითი (OPO) და ერთდროული (OPS) ტრანსპორტის რეჟიმებში;
- 3) ფერმენტის სუბსტრატულ უბანზე შეიძლება მოხდეს ATP-ის დაკავშირება, რომელსაც შემდგომ შეიძლება დაუკავშირდეს Mg_f^{++} და ფერმენტზე მოხდეს სუბსტრატის აწყობა და კატალიზი;
- 4) ფერმენტს აქვს ერთი სრული ინჰიბიტორებისთვის განკუთვნილი Mg_f^{++} -ის დაკავშირების უბანი და ფერმენტთან Mg_f^{++} -ის დაკავშირების შედეგად წარმოიქმნება ჩიხური განშტოება;
- 5) ფერმენტს გააჩნია ერთი სრული ინჰიბიტორებისთვის განკუთვნილი ATP-ის დაკავშირების უბანი;

სინაფსური მემბრანების Na,K-ATPაზასგან განსხვავებით, მიკროსომული Na,K-ATPაზას MEP და AEP ფორმებს არ გააჩნიათ კატალიზური აქტიობა, რითაც აიხსნება OPM და OPA რეჟიმების არ არსებობა. შედარებისას ნათლად ჩანს, რომ მიკროსომული Na,K-ATPაზას და თირკმლის მემბრანების Na,K-ATPაზას მოქმედების 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, სქემა 1 სრულ თანხმობაშია პლესნერის მიერ მოწოდებულ სქემასთან (Plesner, 1981), სადაც მას ასევე განხილული აქვს სიტუაცია S-ის დაბალი კონცენტრაციის პირობებში.

დასკვნები

- I. ნორადრენალინის (NA) ზემოქმედების შედეგად მუშაობის OPS რეჟიმში მყოფი, სინაფსური მემბრანებში ლოკალიზებული, NaK-ATPაზა 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_a) ერთდროული ზემოქმედების შედეგად სინაფსური მემბრანებში ლოკალიზებული NaK-ATPაზის მუშაობის OPS და OPM რეჟიმები არ იცვლება, მაგრამ იხსნება NA ინჰიბიტორული ეფექტი; ფერმენტული სისტემა აქტივირდება და SF_a წარმოადგენს აქტივატორს უცვლელი თვისობით Na^+ -ის, როგორც აქტივატორის მიმართ. ტრანსპორტული სტოქიომეტრია რჩება უცვლელი; $Na^+/K^+=3/2$, (OPS) და $Na^+/K^+=3/0$ ან $3/1$, (OPM).
- III. მიკროსომულ ფრაქციაში ლოკალიზებული და სინაფსური მემბრანების NaK-ATPაზების მოლეკულური მექანიზმები განსხვავებულია. მიკროსომულ Na,K-ATPაზას 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_f -დაკავშირებული ფოსფორილებული ინტერმედიატი.

დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებულ შრომათა სია

1. Shioshvili L., Jariashvili T., Kometiani Z. The influence of Noradrenaline on the Na,K-ATPase system electrogenic. J. Biol. Phys. Chem., 2006, v. 6, N 2.
2. შიოშვილი ლ., ქომეთიანი ზ. მიკროსომული Na,K-ATPაზას მოლეკულური მექანიზმი. საქართველოს მეცნიერებათა აკადემიის მაცნე, ბიოლოგიის სერია A, 2006, ტ. 32, 4.
3. Shioshvili L. Mechanizms of Na,K-ATPase system regulation bu Noadrenaline. Proc. Georg. Acad. Sci., Biol. Ser. B., 2006, v. 4, N 3, pp. 12-16.

Институт биохимии и биотехнологии им. С. Дурмишидзе

На правах рукописи

Л и я Ш и о ш в и л и

**Механизм регуляции Na,K-АТФазной системы,
вызванный норадреналином**

03. 00. 04 – Биохимия

А в т о р е ф е р а т

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Тбилиси 2006 г.

Работа выполнена в Институте физиологии им. И. С. Бериташвили.

Научный руководитель: доктор биологических наук,
профессор Зураб Кометиани

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
М. Гордезиани 03. 00. 04

доктор биологических наук
Н. Кошоридзе 03. 00. 04

Защита диссертации состоится 2006 г. часов на заседании Диссертационного совета Института Биохимии и биотехнологии им. С. Дурмишидзе.

Ознакомление диссертации возможно в библиотеке Института Биохимии и биотехнологии им. С. Дурмишидзе.

Адрес: 380 059, Тбилиси, аллея Давида Агмашенебели, 10-й км.

Автореферат разослан 2006 г.

**Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук**

Н. Шенгелия

Актуальность темы. Одной из значительных свойств живой материи является принятие и обработка информации. Для изучения механизма передачи информации необходимо детальное знание биохимических и физиологических процессов, происходящих в синапсе, т. к. процессы, происходящие в синапсе, являются основой интегрального действия центральной нервной системы. В этих процессах значительную роль играет Na,K-АТРаза (Na^+ и K^+ активированная и Mg^{++} стимулируемая аденозинтрифосфатаза ЕС3.6.1.3).

Na,K-АТРаза представляет собой очень значительную ферментную систему, которая принимает участие почти во всех жизненно важных процессах, происходящих в клетке, но её главное назначение – это на основе энергии АТФ создание и сохранение асимметричного распределения ионов Na^+ и K^+ , что в свою очередь представляет основу трансмембранного электронного потенциала.

Na,K-АТРаза, в силу своей электрогенности, непосредственно участвует в генерации потенциала, где её роль составляет $\approx 10-30\%$.

Из вышеуказанного вытекает, что изменение электрогенного компонента приведёт к изменению части Na,K-АТРазной системы в процессе мембранной генерации потенциала, поэтому Na,K-АТРаза в силу своей электрогенности является регулятором синаптической передачи. В регуляции данной системы особенно значительна регуляция Na,K-АТРазной активности нейротрансмиттерами (NT) и факторами (SF) белковой природы, которые обнаружены в цитозоле нервных окончаний.

Исходя из функции нейротрансмиттеров, которые непосредственно участвуют в процессах синаптической передачи, а белковый фактор (SFa) участвует как непосредственно на Na,K-АТРаду, так и в процессах регулируемых NT на Na,K-АТРаду и хотя вокруг данного вопроса существует множество важнейших исследований (Кометиани и др., 1975; Цакадзе, Кометиани 1990; Adam-vizi 1980; Hernandez 1987; Bertorello et al 1990; Rodrigues, 1992), не до конца расшифрован механизм молекулярного действия NT и SFa на Na,K-АТРаду и не определена регуляторная роль Na,K-АТРады в интегральном действии мозга.

Кроме этого, факт, что эффект действия NT разный для разных субклеточных фракций мозга, в частности, эффект не проявляется в микросомальной фракции мозга, поэтому возможно, что Na,K-АТРаза локализованная в синаптической мембране головного мозга различается от Na,K-АТРады, локализованной в микросомальной фракции механизмом молекулярного действия.

Предыдущая работа представляет анализ дополнительных исследований, результаты которого дают значительную информацию о молекулярном механизме регуляции Na,K-АТРады посредством нейротрансмиттеров и синаптосомальным фактором и её функциональном значении.

Цель работы. Основной целью настоящей работы явилось расшифровка (изучение) того молекулярного механизма, который лежит в основе регуляции Na,K-АТРады катехоламинным нейротрансмиттером, в частности норадреналином (NA) и синаптосомальным активирующим фактором (SFa) и функциональное значение этого эффекта.

Кроме этого, нашей целью являлось выяснение молекулярного механизма Na,K-АТРады, локализованной в микросомальной фракции головного мозга и сравнение с молекулярным механизмом Na,K-АТРады, локализованной в синаптической фракции головного мозга.

Для этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Детально изучить эффект действия NA на Na,K-АТРаду, как отдельно, так и совместно с синаптосомальным фактором (SFa). С этой целью изучили изменение стехеометрии ионов Na^+ и K^+ :

а) при действии NA на Na,K-АТРаду;

б) при совместном действии NA и SFa на Na, K-АТФазу, при работе фермента в режиме $MgATP ([MgATP] > [ATP_f] > [ATP_f] = [Mg_f^{++}])$ и $Mg^{++} ([Mg_f^{++}] > [ATP_f])$ (соответственно OPS и OPM режимах).

2. Установить принципиальную схему действия Na,K-АТФазы, локализованной в микросомальной фракции головного мозга и ее сравнение с действием Na,K-АТФазы, локализованной в синаптических мембранах.

Научная новизна работы. Сегодня, когда не вызывает сомнения значение действия NT и SFa на регуляцию Na,K-АТФазы и соответственно на интегральное действие головного мозга, не до конца выяснен вопрос действия NT и SFa на молекулярный механизм фермента.

В результате наших исследований однозначно показано, что в результате действия NA происходит ингибция Na,K-АТФазы, локализованной в синаптической мембране, и которая находясь в режиме работы OPS, переходит в OPM режим. Изменяется транспортная стехеометрия ионов Na^+ и K^+ . Вместо $Na^+/K^+=3/2$ имеем $Na^+/K^+=3/1$, а это значит, что увеличивается и электрогенный коэффициент. Также установили, что NA представляет ингибитор с неизменяемым сродством по отношению к K^+ , как к активатору, а к Na^+ как к активатору представляет ингибитор с двойным эффектом.

Также установили, что в результате одновременно действия NA и SFa на Na,K-АТФазу, локализованную в синаптических мембранах головного мозга, не изменяется режим работы, но изменяется ингибиторный эффект действия NA на Na,K-АТФазу, фермент активируется и SFa представляет активатор с неизменяемым сродством к Na^+ , как к активатору. Транспортная стехеометрия Na^+ и K^+ не изменяется $Na^+/K^+=3/2$ (OPS) и $Na^+/K^+=3/или 1$ (OPM).

Многозначительным фактором выясненным в результате наших исследований, является то что Na,K-АТФаза, локализованная в микросомальной фракции и Na,K-АТФаза синаптических мембран, различаются механизмом молекулярного действия. У микросомальной Na,K-АТФазы нет OPM и OPA режимов работы, поэтому Mg_f^{++} и ATP_f связанные фосфорилированные интермедиаты не имеют каталитической способности.

Теоритическое и практическое значение работы. Результаты и выводы данного исследования расширяют и значительно дополняют существующие знания и представления о тех механизмах, посредством которых происходит воздействие NT и SFa на Na,K-АТФазу. Na,K-АТФаза является регулятором в химической синаптической передаче, что по новому выявляет ее роль в интегральном действии мозга.

Полученные результаты могут быть использованы в неврологии и психиатрии, т. к. большинство психотропных медикаментов достигают своего эффекта путем воздействия на те биохимические процессы, которые протекают в синапсе. Поэтому, нужно учесть их воздействие на Na,K-АТФазную систему.

Апробация работы и публикации. Апробация диссертации состоялась в Институте физиологии им. И. Бериташвили на расширенном заседании лаборатории мембранологии (Тбилиси 2006 г.). Материалы диссертации опубликованы в 3-х научных трудах.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, обсуждения полученных результатов, заключения и выводов. Содержит рисунков, таблиц и схем, библиографию и список сокращений.

Объект и методы исследования. В исследованиях были использованы субклеточные фракции головного мозга белых крыс, полученные методом дифференциального

центрифугирования при различных концентрациях сахарозы. В основном использовалась синаптическая фракция мембран, которая в тексте упоминается как P2Wp, и микросомальная фракция. В скобках указывалась концентрация сахарозы, в градиенте которой была получена данная фракция. Для получения указанных фракций руководствовались рекомендациями де Робертиса и Витакера (De Robertis, 1969, Wittaker, 1969).

Синаптосомальный фактор получали из богатой нервными окончаниями грубой митохондриальной фракции, полученной в результате осмотического шока последующим центрифугированием. С целью выделения компонента синаптосомального фактора использовали гель-фильтрацию, которая происходила на приборе фирмы "LKB". Фракционирование происходило с помощью сефадекса G-25.

Концентрация белка определялась методом Лоури (Lowry et al., 1951). Активность Na,K-АТФазы измерялась, как суммарная ауабаин-чувствительная часть АТФазы. Нечувствительную к ауабаину часть принимали за Mg-АТФазную активность.

Количество неорганического фосфора определяли модифицированным методом Фиске-Суббароу (Fiske, Subbarow, 1925) и методом Казанов-Маслова (Казанов, Маслова, 1980).

За единицу активности фермента принимали количество образованного продукта (Фн) реакции на один мг белка в час. В синаптических мембранах активность составляет $\approx 50-70 \mu\text{mol}$, в микросомальном препарате $10-15 \mu\text{mol}$ Pi мг белка в час.

Концентрации MgATP, Mg_f^{++} , ATP_f определяли с учетом константы диссоциации комплекса MgATP ($K_d=0,085$) (Plesner, 1981).

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ОСНОВА КИНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА Na,K-АТФАЗНОЙ СИСТЕМЫ

Скорость ферментативной реакции Na,K-АТФазы является функцией минимум 5 физиологических лиганд MgATP, Mg_f^{++} , ATP_f , Na^+ , K^+ , каждая из которых может действовать на фермент в роли активатора или ингибитора. Для анализа начальной скорости реакции необходимо $V=f(S, \text{Mg}_f^{++}, \text{ATP}_f, \text{Na}^+, \text{K}^+)$ довести функцию до функции одного лиганда, когда остальные будут постоянными величинами.

Тогда в частном случае, когда в процессе реакции условия не меняются, при постоянной составляющей фермента, начальная ферментная скорость будет функцией одной изменяемой, которая выражается следующей аналитической формулой:

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

где α_i и β_i является суммой произведения концентрации индивидуальной скорости и концентрации постоянных лиганд, x - концентрация изменяемого лиганда. n , m и p представляют степенные параметры и их положительные числа.

В случае быстрого равновесия n - представляет предназначенную для обязательных активаторов число участков, m - число участков, предназначенное для абсолютных ингибиторов (Chkadua, Kometiani, 1997).

При быстром равновесии $p=h$ (где h -является числом с промежуточным эффектом), $S=K$ (где, k - суммарное число). При стационарном равновесии $p=h+q$, а $S=k+q$. Новый параметр q - «коэффициент сложности» и его числовое значение зависит от сложности действия молекулярного механизма фермента. После выяснения физического значения параметров n , m , p необходимо установить их числовое значение, для чего используется компьютерная программа, разработанная в лаборатории мембранологии.

Для расшифровки молекулярного механизма многоучастковой ферментной системы в лабораторной мембранологии разработан математический подход, в частности, метод кинетического анализа геометрических кривых, который вместе с “принципом минимальной модели” дает возможность составления кинетической схемы. Данный метод подразумевает определение первой и второй производной функции, что соответственно дает возможность определения точек поворота и загиба, а также определение знаков первой и второй производной функции. Это, в свою очередь, дает информацию об увеличении и уменьшении кривой функции и их выпукло-вогнутости. Также важно установление тех точек, которые пройдут в точке пересечения координат. ”Принцип минимальной модели” подразумевает определение формы фермента и между ними выбирают минимальное количество ступеней реакции, которые в определенном порядке взаимосвязаны и при любом значении лиганда дает возможность соответствия геометрической формы теоретических и экспериментальных кривых.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСЛУЖЕНИЕ

1. Влияние NA на электрогенность Na,K-АТРазной системы

В интегральном действии головного мозга активную роль играет Na,K-АТРазная система, чья роль особенно значительна в процессах, происходящих в нервных клетках. Ее роль стала более значительной после того, как выяснилось, что она электрогенна и непосредственно участвует в процессах трансмембранной генерации.

Активность Na,K-АТРазы и ее электрогенность регулируются существующими в клетке системами. Особенно значительно установление роли нейротрансмиттеров в данных процессах, т.к на основе существующих данных нейротрансмиттеры участвуют в регуляции указанных процессов, но неизвестен механизм действия нейротрансмиттеров на электрогенный компонент Na,K-АТРазы. Поэтому важно установление того, какое изменение вызывает действие NT, в частности его действие с точки зрения изменения стехеометрии, т. к. электрогенность является взаимнопротивоположным для Na^+ и K^+ .

Известно, что для Na,K-АТРазы существуют разнозависимые циклы: Mg^{++} (Mg_f^{++} . АТР_f), MgATP ($\text{MgATP} > \text{АТР}_f = \text{Mg}_f^{++}$) и АТР ($\text{АТР}_f > \text{Mg}_f^{++}$) соответствующие следующим режимам ОРМ, ОРS и ОРА. Для выяснения механизма действия NA на электрогенный компонент Na,K-АТРазы в первую очередь изучили зависимость активности фермента работающего в ОРS режиме от концентрации K^+ , когда в реакционной среде отсутствовал NA. Известно, что в ОРS режиме, когда $[\text{NA}] = 0$, число участков, K^+ , предназначенных для обязательных активаторов равно 2 ($n(\text{K}^+) = 2$).

На 1-ом рисунке показана зависимость активности Na,K-АТРазы, работающей в ОРS режиме от концентрации K^+ $y(r;t) = f(t)$, где $y(r;t) = \sqrt[r]{u} = f(t)$, $u = 1/v$, v - активность Na,K-АТРазы, $t = 1/[\text{K}^+]$. Концентрация K^+ варировала в пределах 0,1 мМ-1,2 мМ. Метод анализа формы геометрической кривой показал, что $\sqrt[r]{u} = f(t)$ достоверная линеаризация функции достигается, когда $r = 2$ (экспериментально вычисленное число участков для обязательных активаторов (R_0) в первом приближении переходит от истинного значения ($R_0 - n$), а значения коэффициентов регрессии представлены в таблице 1).

На основе экспериментального материала можно сказать, что в ОРS режиме, когда $[\text{NA}] = 0$, число участков K^+ , предназначенных для обязательных активаторов, равно 2, что совпадает с данными литературы.

На рисунке № 2 представлена зависимость активности Na,K-АТРазы, работающей в ОРS режиме при различных фиксированных концентрациях NA от концентрации K^+ $y(r;t) = f(t)$ в системе координат (где, $y(r;t) = f(t)$, $U = 1/V$, V -активность Na,K-АТРазы, $t = 1/[\text{K}^+]$).

Концентрация K^+ варировала в пределе 0,1 мМ-1,2 мМ. Как видно из рисунков во всех трех случаях $\sqrt{u}=f(t)$ достоверная линеаризация достигается при $r=1$ (экспериментально вычисленное число участков для обязательных активаторов (R_o) в первом приближении отходит от истинного значения (R_o-n), а коэффициенты регрессии представлены в таблице 1).

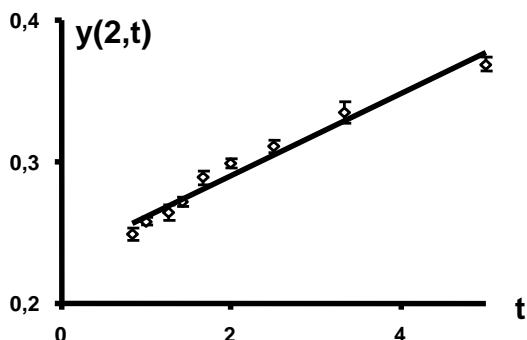


Рис.1. Зависимость Na,K-АТФазной активности от концентрации K^+ в OPS режиме.

$$y(2,t) = f(t) \text{ в координатах.}$$

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

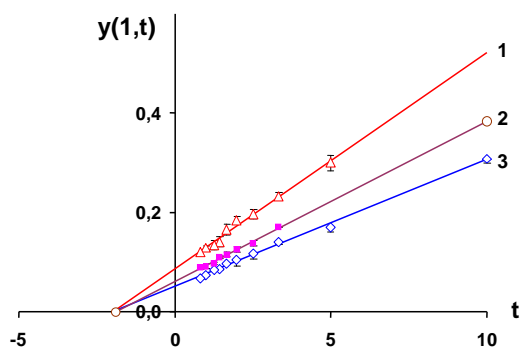


Рис 2.-. Зависимость Na,K-АТФазной активности от концентрации K^+ в OPS режиме.

$$y(1;t)=f(t) \text{ в координатах.}$$

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

Из представленных результатов можно сказать, что в OPS режиме при присутствии в реакционной среде NA, число учтков K^+ , предназначенных для обязательных активаторов, равно 1. Таким образом, у фермента, работающего в OPS режиме под действием NA, изменяется число участков K^+ , предназначенных для обязательных активаторов от 2 до 1, но мы знаем, что это характерно для ОРМ режима. Поэтому, это дает возможность предположить под действием NA Na,K-АТФазы, работающая в OPS режиме, переходит в ОРМ режим. Кроме этого, как видно из рисунка 2, при увеличении фиксированных концентраций NA увеличивается наклон прямых регрессии, а также увеличиваются отложенные на оси ординат отрезки и прямые на оси абсцисс пересекаются в одной точке, что указывает о том, что в данных условиях NA представлен неспецифическим ингибитором и не изменяет средство фермента к K^+ (Kometiani, 2005).

Высказанное предположение о том, что при наличии NA, Na,K-АТФазы из OPS режима переходит в ОРМ режим работы, усиливают данное представление на рисунке 3, где показана активность фермента, работающего в ОРМ от концентрации K^+ в отсутствие NA и при концентрации NA, равной 0,1 мМ. Концентрация K^+ вновь была в пределах 0,1 мМ-1,2 мМ. Как видно из рисунков, в обоих случаях $\sqrt{u}=f(t)$, у функции (где, $U=1/V$, $t=1/[K^+]$) асимптота, когда $r=1$ (экспериментально вычисленное число участков для обязательных активаторов (R_o), в первом приближении истинное значение изменяется (R_o-n), а коэффициенты регрессии (a,b) представлены в таблице 1. Экспериментальные данные указывают на то, что в ОРМ режиме под действием NA не изменяется число участков для K^+ и остается равным 1. Из рисунка 3 также видно, что при добавлении NA в реакционную

среду увеличивается наклон прямых регрессий и отрезки на оси ординат, а прямые пересекаются на оси абсцисс в одной точке. Таким образом, в указанных условиях NA действует как неспецифический ингибитор, который не меняет сродство фермента к K^+ (Kometiani, 2005).

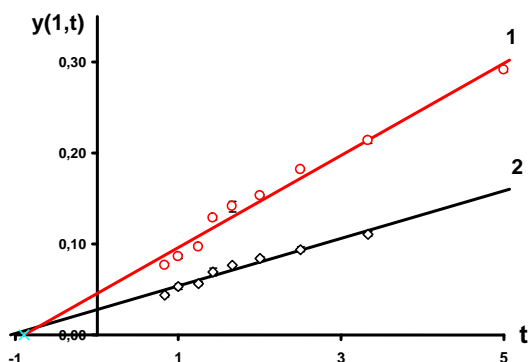


Рис. 3. Зависимость Na,K-АТФной активности от концентрации K^+ в ОРМ режиме.

$y(1;t)=f(t)$ в координатах.

Реакционная среда

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

$[NaCl]=147mM$.

$[NA]=0.1mM$ (линия 1)

$[NA]=0mM$ (линия 2)

Изменение числа участков предназначенных для K^+ от 2 к 1, в OPS режиме, под действием NA указывает на то, что ферментная система возможно меняет режим работы и из OPS переходит в ОРМ, но для окончательного доказательства необходимо знать, что происходит с числом участков, предназначенных для Na^+ .

Установлено, что когда $[NA]=0$, Na,K-АТФаза находящаяся в ОРМ, режиме может работать в двух различных условиях, которые различаются числом участков Na^+ , предназначенных для обязательных активаторов, в частности, $n(Na^+)=4$, когда $[K^+]>100mM$ и $n(Na^+)=3$, когда $[K^+]<100mM$.

На рисунке 4 представлена зависимость активности Na,K-АТФазы от концентрации Na^+ $y(r;t)=f(t)$ в системе координат в условиях различной фиксированной концентрации NA. Условия реакционной среды были подобраны таким образом, чтобы фермент работал в MgATP зависимом цикле в условиях высокой фиксированной концентрации K^+ ($[KCl]=125mM$), концентрация Na^+ была вариабельна от 4,4 mM до 24,4 mM. На основе указанных данных, метод анализа геометрических кривых показал, что $\sqrt[3]{u} = f(t)$, (где $U=V$, $t=1/[Na^+]$, V - активность Na,K-АТФазы) истинная линеаризация функции во всех случаях достигается тогда, когда $r=3$. (экспериментально вычисленное число участков, предназначенных для обязательных активаторов (R_0), в первом приближении изменение истинного значения (R_0-n), а коэффициенты регрессии (a,v) представлены в таблице 1).

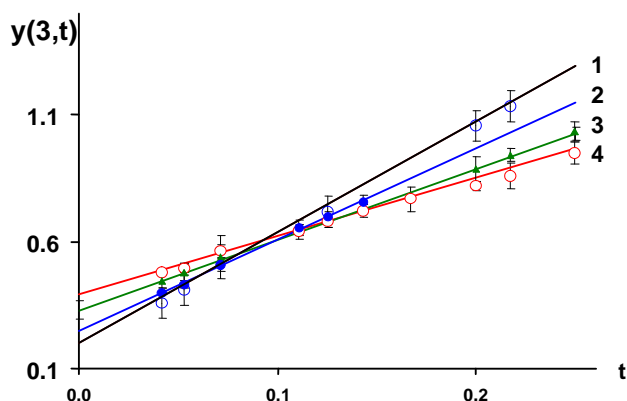


Рис. 4. Зависимость Na,K-АТФной активности от концентрации Na^+ в OPS режиме.

$y(3;t)=f(t)$ в координатах.

Реакционная среда

$[MgATP]=1.8mM$, $[Mg^{++}]=[ATP]=0.4mM$,

$[KCl]=125mM$.

$[NA]=0$ (линия 1)

$[NA]=0.025mM$ (линия 2)

$[NA]=0.05mM$ (линия 3)

$[NA]=0.1mM$ (линия 4)

Из указанных данных видно, что для Na^+ число участков предназначенных для обязательных активаторов равно 3, как без присутствия NA в реакционной среде, так и при наличии. Из рисунка видно, что при увеличении концентрации NA, уменьшается наклон

прямых регрессий, а отложенные на оси ординат отрезки увеличиваются, прямые пересекаются в первой четверти оси координат. При этом, при низкой концентрации Na^+ $[\text{Na}^+] < 10 \text{ mM}$ место имеет активация, вызванная NA, при высокой концентрации Na^+ $[\text{Na}^+] > 10 \text{ mM}$ ингибция, вызванная NA. Таким образом, NA в этих условиях представляет собой модификатор с двойным эффектом. Тот факт, что Na,K-АТРаза находящаяся в OPS режиме, под действием NA, число участков для обязательных активаторов для Na^+ не изменяется и остается равной 3, с одного взгляда противоречит высказанному нами предположению о том, что под действием NA Na,K-АТРазная система из OPS режима переходит в OPM режим. Если это предположение верно, тогда должно было измениться число участков обязательных активаторов для Na^+ и вместо того, чтобы под действием NA должно измениться до 4-х, что характерно для OPM режима (когда $[\text{K}^+] > 100 \text{ mM}$).

Указанное противоречие снимается и окончательно доказывают правоту нашего предположения. Данные представленные на рис.5, где одновременно показана зависимость активности Na,K-АТРазы работающей в режиме OPS от концентрации Na^+ $y(r;t)=f(t)$ в координатах, и зависимость активности Na,K-АТРазы, работающей в OPM режиме от концентрации Na^+ в тех же координатах. Когда в реакционной среде 0,1 mM NA - 2 линия, без NA -3 линия. В OPS режиме реакционная среда была того же состава, что и на данных, представленных 4 рисунком, в OPM режиме-как на рис.3. Метод анализа геометрической кривой показал, что $\sqrt{u} = f(t)$ функция (где $U=1/V$, $t=1/[\text{Na}^+]$, V-активность Na,K-АТРазы) имеет асимптоту тогда, когда

$r=4$ - OPM режим, реакционная среда $[\text{NA}]=0$ (3 линия)

$r=3$ -OPM режим, реакционная среда $[\text{NA}]=0.1 \text{ mM}$ (2 линия)

$r=3$ -OPS режим, реакционная среда $[\text{NA}]=0$ (1 линия)

((Ro) в первом приближении истинное изменение (Ro-n), коэффициенты регрессии (a,v) представлены в таблице 1).

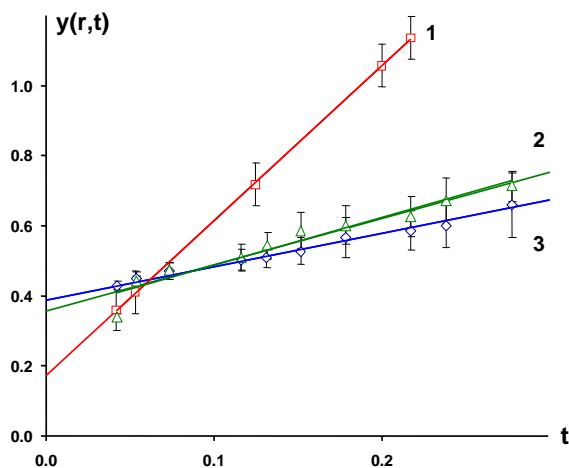


Рис. 5. Зависимость Na,K-АТРазной активности от концентрации Na^+ в обратных величинах.

В OPS режиме $[\text{NA}]=0$, ($r=3$) (линия 1).

в OPM режиме, $[\text{NA}]=0.1 \text{ mM}$, ($r=3$) (линия 2).

в OPM режиме $[\text{NA}]=0$, ($r=4$). (линия 3).

В OPS режиме такие же условия, как на рис. 4. а – в OPM режиме, как на рис. 3.

Представленные экспериментальные данные показывают, что в OPM режиме под влиянием NA, число активационных участков для Na^+ изменяется и вместо 4 становится 3. Пересечение прямых происходит в первой четверти координационной системы, точно так, как представлено на рис.4. Из этого можно заключить, что прямые 2,3 и 4, представленные на рис. 4, соответствуют работе фермента в OPM режиме.

Таким образом, мы имеем полный и исчерпывающий экспериментальный материал, который дает возможность однозначно заключить, что NA представляет собой модификатор, под действием которого Na,K-АТРаза из работы в OPS режиме переходит в OPM режим, что приводит к изменению транспортной стехеометрии ионов Na и K и вместо $\text{Na}^+/\text{K}^+=3/2$ имеем $\text{Na}^+/\text{K}^+=3/1$. Соответственно имеет место увеличение электрогенного коэффициента, что в

свою очередь способствует увеличению трансмембранного потенциала генерации Na,K-АТРазной системы.

Таблица 1. Параметры функции, отображенных на рис. 1, 2, 3, 4 и 5.

$y(r,t) = \sqrt[3]{1/V} = f(t)$	t	r	R ₀	R _{0-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	-

2. Механизм регуляции Na,K-АТРазной системы NA и SFa

Как было отмечено раньше, в синаптических мембранах обнаружен новый механизм регуляции Na,K-АТРазы нейротрансмиттерами. Действие NT в свою очередь регулируется фактором белковой природы SFa, обнаруженным в цитозоле синаптосом. При добавлении упомянутого фактора снимается ингибация, вызванная NT-ами и фермент резко активизируется (Kometiani, Jariashvili, 2001). Регуляция Na,K-АТРазы NT-ами и SFa имеет функциональное значение и их действие специфическое для синаптической передачи. К сегодняшнему дню не до конца изучен молекулярный механизм действия NA и SFa на Na,K-АТРазу. Выяснение этого даст нам дополнительную информацию о функциональном значении регуляции, поэтому необходимо детальное изучение NA/SFa зависимого активационного механизма. С этой целью была изучена работа Na,K-АТРазы в OPM и OPS режимах при действии NA и SFa и изменение транспортной стехеометрии Na⁺ и K⁺.

На 6-ом рисунке показана зависимость активности Na,K-АТРазы от концентрации SFa в OPS режиме, когда в реакционной среде присутствует NA. Пунктиром обозначена активность Na,K-азы в том же режиме, только без NA и SFa.

Как видно из рисунка, в результате добавления в реакционную среду 0,1 mM NA активность Na,K-АТРазы уменьшается на ≈62,9%. При добавлении в реакционную среду SFa ингибиторный эффект NA постепенно снимается начальная активность фермента восстанавливается при добавлении в реакционную среду 0,008 мг/мл SFa, при более высоких концентрациях SFa начальная активность фермента возрастает. Основываясь этим были выбраны следующие концентрации SFa:

- 1) 0,001 мг/мл, при которой снимается ингибиционный эффект, вызванный NA, но активность Na,K-АТРазы не восстановлена.
- 2) 0,016 мг/мл когда полностью снимается ингибиционный эффект и начальная активность фермента повышается.

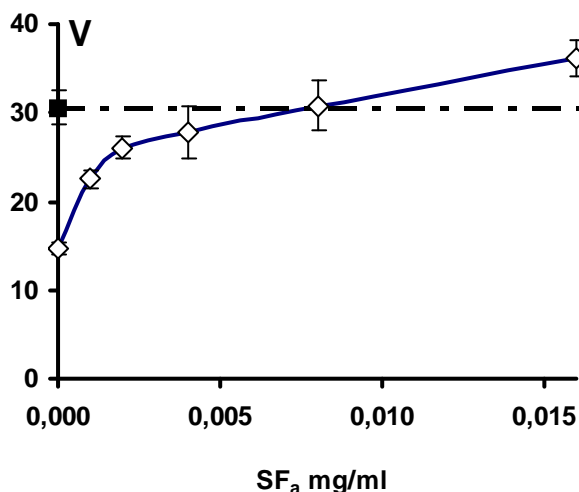


Рис. 6. Зависимость NaK-АТФазной активности от концентрации SF_a в OPS режиме.

Реакционная среда:
 $[MgATP]=2.08$ mM, $[Mg^{++}]=[ATP_f]=0.42$ mM,
 $[NaCl]=145$ mM, $[KCl]=5$ mM,
 $[NA]=0.1$ mM.

После этого была изучена транспортная стехеометрия Na^+ и K^+ под действием NA и SF_a в OPS режиме. Для этого рассчитали в данном режиме число участков, предназначенных для обязательных активаторов.

На рис.7 представлена зависимость Na,K-АТФазной активности в OPS режиме от концентрации Na^+ $y(r;t)=f(t)$ в системе координат. Реакционная среда содержала фиксированные концентрации SF_a и NA одновременно. Концентрация Na^+ варировала в пределе от 4мМ до 24 мМ.

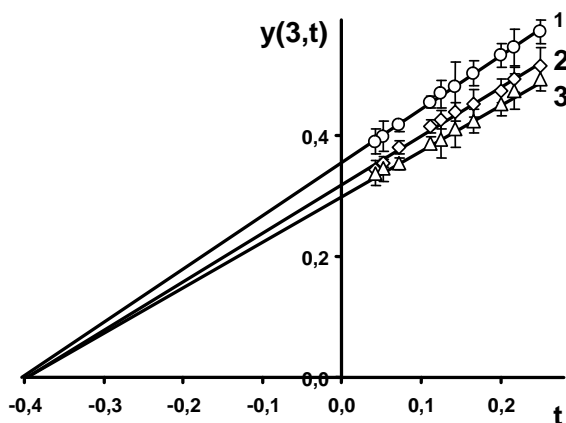


Рис. 7. Зависимость Na,K-АТФазной активности от концентрации Na^+ в OPS при наличии в реакционной среде NA и SF_a .

$y(3;t)=f(t)$ в координатах.

Реакционная среда:

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

$[KCl]=125$ mM, $[NA]=0.1$ mM

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

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

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

Исходя из метода геометрической формы кривой, можно сказать, что во всех трех случаях функция $\sqrt[3]{u} = f(t)$, (где, $U=1/V$, $t=1/[Na^+]$), истинная линеаризация достигается тогда, когда $r = 3$, что указывает на то, что в данных условиях число участков предназначенных для обязательных активаторов равно 3. Из рисунка видно, что при увеличении фиксированной концентрации SF_a наклон регрессии уменьшается, уменьшаются также отложенная на оси координат отрезки, а прямые на оси абсцисс пересекаются в одной точке. Основываясь на эти данные, можно заключить, что SF_a представлен как активатор с неизменным сродством по отношению к Na^+ .

В таблице № 2 представлена зависимость числа участков, представленных для обязательных активаторов для Na^+ и K^+ от концентрации SF_a , а в случае, когда реакционная среда содержит 0,1 mM NA в OPS режиме работы. Из таблицы видно, что в данных условиях число участков для Na^+ равно трем $n(Na^+)=3$, для K^+ -2 $n(K^+)=2$. Таким образом, при добавлении SF_a вместе с NA не меняет транспортную стехеометрию для Na^+ и K^+ - $3Na^+/2K^+$, т. к. для ОРМ режима характерным для K^+ числом участков является 1 или 0. Поэтому можно

однозначно заключить, что в результате одновременного действия SF_a и NA - Na, K-АТФазная система остается в OPS режиме, не переходит в OPM режим.

Таблица 2. Зависимость количества участков необходимых активаторов от концентрации SF_a в OPS режиме.

Реакционная среда: [MgATP]=2.08 mM, [Mg⁺⁺]=[ATP_i]=0.42 mM, [NA]= 0.1 mM.

Условия эксперимента	[SF], mg/ml	Количество участков необходимых активаторов n(Na ⁺) и n(K ⁺)
[NaCl]=144 mM=const $\sqrt[4]{1/V} = f(1/[K^+])$	0.001	R=2.0038±0.163; (R-n)=-0.2704; ⇒ n(K ⁺)=2
	0.016	R=2.0014±0.073; (R-n)=-0.1714; ⇒ n(K ⁺)=2
[KCl]=125 mM=const $\sqrt[4]{1/V} = f(1/[Na^+])$	0	R=3.0001±0.094; (R-n)=-0.2438; ⇒ n(Na ⁺)=3
	0.001	R=3.0371±0.182; (R-n)=0.0974; ⇒ n(Na ⁺)=3
	0.016	R=3.0015±0.083; (R-n)=0.0631; ⇒ n(Na ⁺)=3

Для полного изучения механизма действия SF_a и NA изучили действие фермента, работающего в OPM режиме.

На рис.№ 8 показана зависимость активности Na,K-АТФазы от концентрации Na⁺ в координатах y(r;t)=f(t), когда в реакционной среде присутствуют NA и SF_a. Из рисунка видно, что в данных условиях функция $\sqrt[4]{u} = f(t)$, (где U=1/V; t=1/[Na⁺]) достигает истинной линеаризации, когда r=4, это означает, что при высоких концентрациях K⁺ ([KCl]=125 mM), число участков для обязательных активаторов Na⁺ не изменяется и равно четырем n(Na⁺)=4.

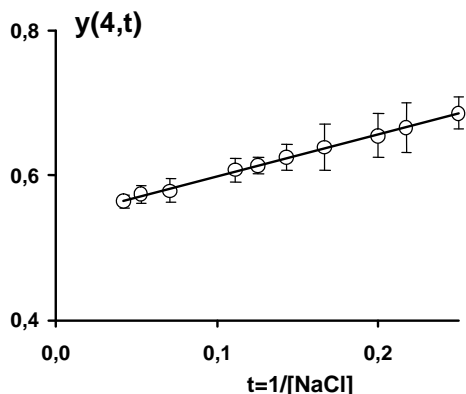


Рис. 8. Зависимость Na,K-АТФазной активности от концентрации Na⁺ в OPM режиме при одновременном наличии в реакционной среде NA и SF_a.
 $y(4;t)=f(t)$ в координатах.

Реакционная среда:
[MgATP]=1 mM, [Mg⁺⁺]=3 mM, [ATP_i]=0.028 mM,
[KCl]=125 mM, [NA]=0.1mM, [SF_a]=0.016 mg/ml.
R = 4.022 ± 0.034; (R-n) = -0.133; ⇒ n(Na⁺) = 4.

На 9 рис. представлена зависимость активности Na,K-АТФазы от концентрации K⁺ в системе координат y(r;t)=f(t), когда фермент работает в OPM режиме, в присутствии NA и SF_a в реакционной среде. Метод анализа геометрической формы кривой показал, что функция $\sqrt[4]{u} = f(t)$, (где U=1/V; t=1/[Na⁺]) имеет асимптоту, когда r=1, что означает, что в OPM режиме при одновременном воздействии NA и SF_a, число участков, предназначенных для K⁺, как обязательного активатора не изменяется и равно 1 n(K⁺)=1.

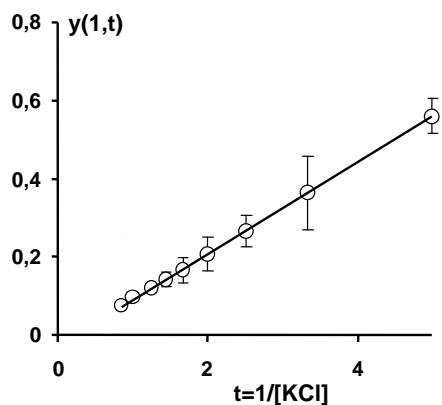


Рис. 9. Зависимость Na,K-АТФазной активности от концентрации K^+ в ОРМ режиме при одновременном наличии в реакционной среде NA и SF_a .

$y(1;t)=f(t)$ в координатах

Реакционная среда:

$[MgATP]=1$ mM, $[Mg^{++}]=3$ mM, $[ATP_i]=0.028$ mM,
 $[NaCl]=144$ mM, $[NA]=0.1$ mM, $[SF_a]=0.016$ mg/ml.

$R=1.002\pm 0.005$; $(R-n)=-0.013$; $\Rightarrow n(K^+)=1$.

Таким образом, на основе представленного экспериментального материала можем заключить, в результате одновременного воздействия NA и SF_a на Na,K-АТФазу, локализованную в синоптических мембранах снимается ингибция, вызванная NA, и фермент активируется. Не изменяется транспортная стехеометрия Na^+ и K^+ и она остается соответственно того режима, в которой находится Na,K-АТФаза, в частности $Na^+/K^+=3/2$ (OPS) и $Na^+/K^+=3/1$ или $3/0$ (ОРМ).

Молекулярный механизм действия микросомальной Na,K-АТФазы. Действие нейротрансмиттеров на Na,K-АТФазу, как уже было отмечено раньше, имеет функциональное значение, в частности действие норадреналина на Na,K-АТФазу, локализованную в синоптических мембранах, вызывает переход фермента из OPS режима в ОРМ режим, для которого характерен высокий электрогенный коэффициент.

С другой стороны, эффект нейротрансмиттеров не проявляется в аксоне, в микросомальной фракции головного мозга крыс и в мембранах почек, в которых локализована Na,K-АТФаза. Таким образом, эффект нейротрансмиттеров на Na,K-АТФазу несомненно связан с химической передачей. Вместе с этим известно, что молекулярный механизм действия Na,K-АТФазы, расположенной в мембранах почек, различается от таковых, расположенных в синаптических мембранах, тем, что в микросомах Na,K-АТФаза не имеет ОРМ и ОРА режимов работы (Куталия и др.1989).

Почечная Na,K-АТФаза может работать и в ОРО режиме, где транспорт Na^+ и K^+ происходит поочередным механизмом и в OPS режиме, где транспорт Na^+ и K^+ происходит одновременно. В обоих случаях стехеометрия данных ионов одинакова, и равна $Na^+/K^+=3/2$.

В виду отмеченного факта, мы заинтересовались не отличается ли Na,K-АТФаза механизмом молекулярного действия, расположенная в микросомах головного мозга от Na,K-АТФазы, расположенной в синаптических мембранах, т. к. эффект действия нейротрансмиттеров заключается в переходе из OPS режима в ОРМ режим, то не чувствительность микросомальной Na,K-АТФазы к нейротрансмиттерам может быть вызвана отсутствием ОРМ режима. Возможность данного предположение дает тот факт, что Na,K-АТФаза олигомерная система и существует несколько изомеров ее основных α и β субединиц (Robinson, Flashner, 1974). В микросомах почек встречается один изомер Na,K-АТФазы, тогда как у Na,K-АТФазы головного мозга существует несколько изомеров, которые в субклеточных фракциях распределены неравномерно (Swadner, 1979). В результате детального изучения молекулярного механизма действия Na,K-АТФазы можно заключить, что для полной расшифровки молекулярного механизма действия Na,K-АТФазы микросомальной фракции необходимо провести эксперименты четырех типов:

- 1) Установление олигомерной структуры Na,K-АТФазы, локализованной в микросомах головного мозга.

- 2) Установление в широком диапазоне концентраций у субстрата (MgATP) числа участков Na^+ и K^+ , предназначенных для обязательных активаторов.
- 3) Установление типов участков связывания, предназначенных для Mg_f^{++} .
- 4) Установление числа и типов участков, предназначенных для связывания ATP_f .

Как уже было отмечено ранее, Na,K-АТРаза почек и Na,K-АТРаза, расположенная в синаптических мембранах головного мозга, различаются отсутствием ОРМ и ОРА режимами. Поэтому, в первую очередь, мы изучили активационный эффект Na^+ -ем и K^+ -ем для Na,K-АТРаза микросом головного мозга в режимах работы ОРМ и ОРА при сравнительно низких концентрациях субстрата $[\text{S}]=1 \text{ mM}$. При изучении зависимости Na,K-АТРаза от концентрации Na^+ были взяты фиксированные концентрации для K^+ $[\text{KCl}]=50 \text{ mM}$ и $[\text{KCl}]=125 \text{ mM}$, а для изучения зависимости активности Na,K-АТРаза от концентрации K^+ была взята фиксированная концентрация для Na $[\text{NaCl}]=145 \text{ mM}$.

Таблица 3. Зависимость Na,K-АТРазной активности от концентрации Na^+ ($[\text{K}^+]=\text{const}$) и от концентрации K^+ ($[\text{Na}^+]=\text{const}$) в ОРМ и ОРА режимах

Режим работы фермента	$[\text{MgATP}]$	$[\text{Mg}_f^{++}]$	$[\text{ATP}_f]$	$[\text{Na}^+]$	$[\text{K}^+]$	Na,K-АТРазная активность
ОРМ	1mM	4mM	0,02mM	145mM	$\leq 1,2\text{mM}$	0
				$\leq 20\text{mM}$	50mM	0
					125mM	0
		0,85mM	0,1mM	145mM	$\leq 1,2\text{mM}$	0
				$\leq 20\text{mM}$	50mM	0
					125mM	0
ОРА	1mM	0,1mM	0,85mM	145mM	$\leq 1,2\text{mM}$	0
				$\leq 20\text{mM}$	50mM	0
					125mM	0

Из данной таблицы ясно видно, что при данных условиях в режимах ОРМ и ОРА работы активность фермента равна нулю, что указывает на то, что микросомальная Na,K-АТРаза не работает в данных режимах (ОРМ и ОРА), тогда как в OPS режиме ($\text{S} \gg \text{A} = \text{M}$) наблюдается ферментная активность и число участков для Na^+ , предназначенных для обязательных активаторов равна трем, а для K^+ -равна двум

Таблица 4. Определение количества участков для необходимых активаторов ($\text{A}=[\text{ATP}_f]$; $\text{M}=[\text{Mg}_f^{++}]$; $\text{S}=[\text{MgATP}]$. V_0 – активность при $[\text{KCl}]=0$)

Реакционная среда	Фиксированный лиганд	Качественное преобразование	n
A = M S = 0.8 mM S = 1 mM S = 2 mM	$[\text{KCl}]=0$ $[\text{KCl}]=50 \text{ mM}$ $[\text{KCl}]=125 \text{ mM}$	$\sqrt{1/V} = f(1/[\text{Na}])$ $[\text{Na}^+] < 25 \text{ mM}$	$3.002 \leq R \leq 3.007$ $\sigma(R) \leq 0.008$; $(R-n) \leq 0.272$ $n(\text{Na}) = 3$
	$[\text{NaCl}]=145 \text{ mM}$	$\sqrt{1/(V-V_0)} = f(1/[\text{K}])$ $[\text{K}^+] < 1.2 \text{ mM}$	$2.004 \leq R \leq 2.008$ $\sigma(R) \leq 0.007$; $(R-n) \leq 0.342$ $n(\text{K}) = 2$

Можно предположить, что микросомальная и синаптосомальная Na,K-АТРаза отличаются только режимами работы, хотя при равных и минимальных концентрациях и модификаторов $[\text{MgATP}] \gg [\text{ATP}_f] = [\text{Mg}_f^{++}]$, когда вероятность связывания ATP_f и Mg_f^{++} с ферментом минимальна, молекулярный механизм действия для обоих ферментных систем

должна быть идентична, хотя, для установления молекулярного механизма действия Na,K-АТФазы микросом необходимо последующее исследование.

В первую очередь была изучена зависимость активности микросомальной Na,K-АТФазы от концентрации субстрата. Эта зависимость представлена на рис. № 10.

Рис. 10

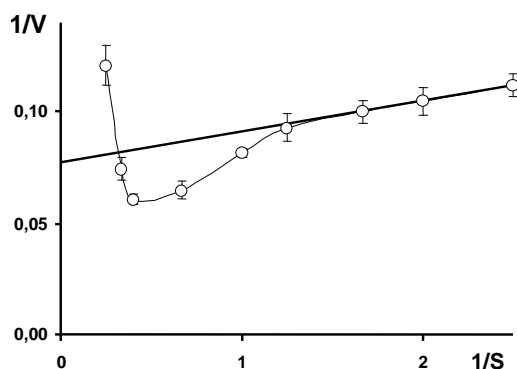


Рис. 10. Зависимость NaK-АТФазной активности от концентрации субстрата ($S=[MgATP]$ mM) в обратных величинах

$$[Mg^{++}] = [ATP_{free}] = \sqrt{K_T S} ; [NaCl]=145 \text{ mM}, [KCl]=5 \text{ mM}.$$

Как видно из рисунка, $1/V=f(1/S)$ кривая имеет сложную геометрическую форму, в частности при малых значениях аргумента функция уменьшается, хотя дальше переходит в возрастающую функцию, которая при высоких концентрациях аргумента приближается к асимптоте и имеет резко выраженные точки поворота и перегиба. В пределах, когда $t \rightarrow 0$ и $t \rightarrow \infty$ (где $t=1/S$), первая производная функции имеет разные знаки, также разные знаки имеет вторая производная функции в пределах, когда $t \rightarrow 0$ и $t \rightarrow \infty$.

С помощью использования метода кинетического анализа для сложных геометрических форм (Кометиани, 2005) можно однозначно заключить, что т. к. функция $1/V=f(1/S)$ при малых концентрациях имеет асимптоту, а также точку поворота и перегиба и в пределе $t \rightarrow 0$ и $t \rightarrow \infty$ первая и вторая производные имеют разные знаки, то фермент имеет минимум два участка связывания для субстрата.

Поскольку известно, что субединицы фермента имеют только один участок для субстрата, тогда ясно, что точно такие формы имеет функция $1/V=f(1/S)$ в случае Na,K-АТФазы, локализованной в синапсе и в почках.

Сложную форму имеют также кривые выражающие зависимость $1/V=f(Mg_f^{++})$. Это видно из рис.11, где представлена зависимость активности Na,K-АТФазы (в обратных величинах) от концентрации Mg_f^{++} при различных фиксированных концентрациях субстрата (s).

Как видно из рисунка, во всех случаях, когда концентрация Mg_f^{++} высокая, активность фермента значительно уменьшается и функция $1/V=f(Mg_f^{++})$ приближается к асимптоте, а при сравнительно низких концентрациях Mg_f^{++} -активность незначительно изменяется и кривые переходят почти на горизонтальную линию. При $1/V=f(Mg_f^{++})$ кривые не имеют точку перегиба, хотя имеют одну точку поворота. Нужно отметить также, что при увеличении фиксированных концентраций субстрата наклон (slope) асимптот уменьшается, уменьшаются также отрезки, отложенные на оси ординат (Intersept). Хотя отрезки отложенные на оси абсцисс, с помощью асимптот-увеличиваются и пересечение асимптот происходит во второй четверти системы координат.

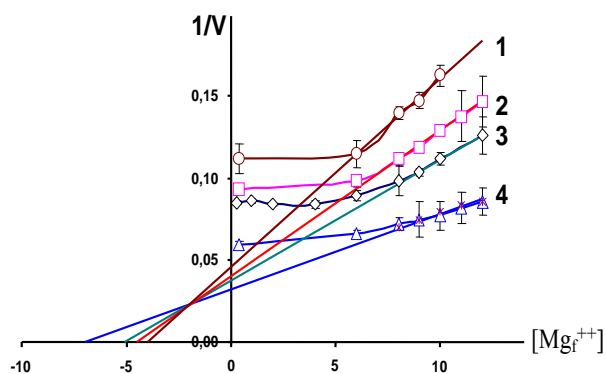


Рис. 11. Зависимость NaK-АТРазной активности в обратной величине от концентрации $[Mg^{++}]$. $S=[MgATP]=const$: $S=0.5$ mM (1); $S=0.8$ mM (2); $S=1.0$ mM (3); $S=1.5$ mM (4). $[NaCl]=145$ mM, $[KCl]=5$ mM. $[Mg^{++}] = K_i S / [ATP_f]$.

Основываясь на метод кинетического анализа для сложных геометрических кривых, можно однозначно заключить, что микросомальная Na,K-АТРаза имеет один участок связывания для Mg_f^{++} и Mg_f^{++} является абсолютным ингибитором.

Похожая картина наблюдается в случае, когда $1/V=f(ATP_f)$. Это ясно видно из рис.12, где показана зависимость активности Na,K-АТРазы (в обратных величинах) от концентрации ATP_f при различных фиксированных концентрациях субстрата(s)

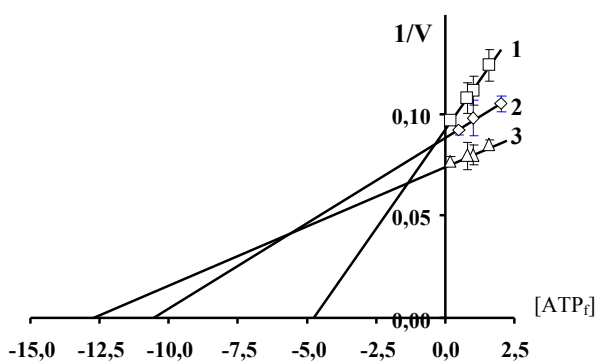


Рис. 12. Зависимость NaK-АТРазной активности в обратной величине от концентрации $[ATP_{free}]$

$S=[MgATP]=const$: $S=0.8$ mM (1); $S=1.0$ mM (2); $S=1.5$ mM (3). $[NaCl]=145$ mM, $[KCl]=5$ mM. $[ATP_f] = K_i S / [Mg^{++}]$

Из данного рисунка видно, что при высоких концентрациях ATP_f функция $1/V=f(ATP_f)$ во всех случаях имеет асимптоту, чей наклон (slop) при увеличении фиксированных концентраций субстрата уменьшается, также уменьшается отрезок, отложенный на оси ординат (Intesept), хотя отложенный на ось абсцисс отрезок увеличивается и пересечение асимптот происходит на 2 четверти системы координат.

Как и в случае с фиксированным Mg_f^{++} , микросомальная Na,K-АТРаза имеет один участок для связывания ATP_f и ATP_f представляет абсолютный ингибитор, т. к. в обоих случаях $1/V=ff(Mg_f^{++})$ и $1/V=f(ATP_f)$ пересечение асимптот происходит во второй четверти системы координат. Поэтому, для микросомальной Na,K-АТРазы Mg_f^{++} и ATP_f представляют собой ингибиторы с уменьшающим сродством, что означает, что вместе с увеличением концентрации субстрата (s) уменьшается сродство фермента к Mg_f^{++} и ATP_f .

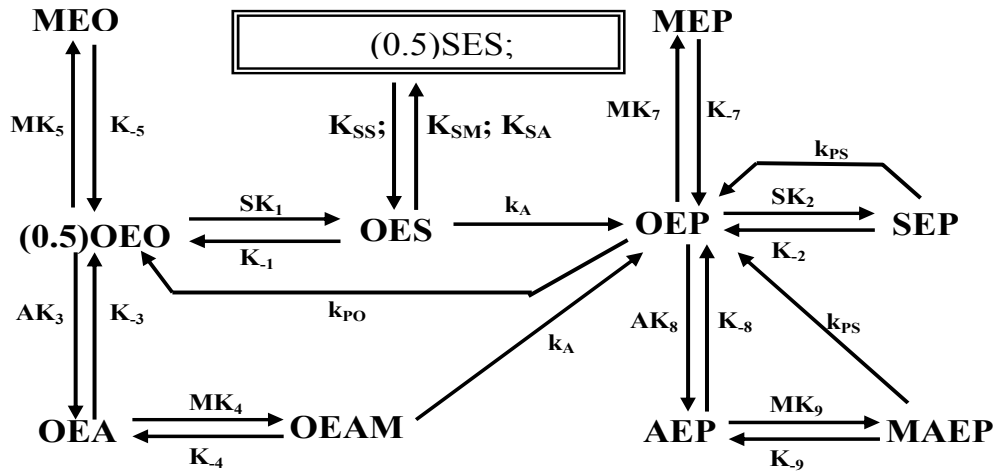
На основе выше представленных экспериментальных данных и существующей полноценной кинетической схемы для Na,K-АТРазы синаптических мембран (Кометиани, 1987), можно составить принципиальную кинетическую схему действия для микросомальной Na,K-АТРазы.

Как выяснилось из экспериментального материала, микросомальная Na,K-АТРаза не имеет ОРМ и ОРА режимов работы, а Mg_f^{++} и ATP_f представляют собой абсолютные ингибиторы, а формы МЕР и АЕР фермента не имеют способность катализа.

Плеснер и Кометиани (Plesner, 1981; Cometiani, 1987) в свое время показали, что в том случае, когда АТР_f связывается с ферментом в субстратном участке, в последующем с ним может связаться Mg⁺⁺ и на ферменте может произойти сбор субстрата и катализ. Этот случай показан и доказан как для Na,K-АТРаы синаптических мембран, так и для почечной Na,K-АТРаы (Куталиа и др., 1989). Поэтому, в кинетическую схему Na,K-АТРаы микросом включили ветвь ОЕО→ОЕА→ОЕАМ→ОЕР.

Соответственно принципиальная кинетическая схема действия микросомальной Na,K-АТРаы имеет следующее лицо:

Схема 1



Внесем обозначения:

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

$$q = \frac{K_T K_3 K_4 K_{S1}}{K_{-3}(k_A + K_{-4})}; \quad Q = \frac{K_T K_9 K_8 K_{S2}}{K_{-9}(k_{PS} + K_{-8})}; \quad K_{S1} = \frac{k_A + K_{-1}}{K_1}; \quad K_{S2} = \frac{k_{PS} + K_{-2}}{K_2}; \quad K_{0M} = \frac{K_{-5}}{K_5};$$

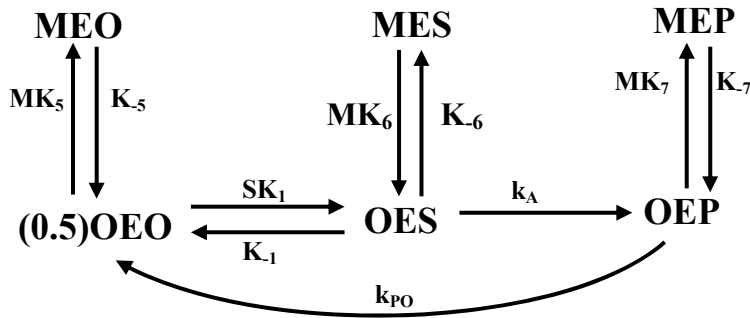
$$K_{0A} = \frac{K_{-3}}{K_3}; \quad K_{PM} = \frac{K_{-7}}{K_7}; \quad K_{PA} = \frac{K_{-8}}{K_8}.$$

Представленная схема в стационарном равновесии имеет следующую аналитическую формулу (вывод которой возможен с помощью метода Кинг-Альтмана)

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

Молекулярный механизм действия микросомальной Na,K-АТФазы и схематически и его аналитическое выражение полностью соответствует с выше поставленным экспериментальным материалом и с литературными данными (Sweadner,1979), но в схеме необходимо уточнить существующие в схеме формы MES, SES, MEP, AEP. С этой целью рассмотрели случай, когда конц. АТФ_f настолько мала, что возможно ее пренебрежение вместе с этим взята сравнительно малая концентрация субстрата, тогда в уравнении реакции (1) $A/K_{OA} \approx 0$, $A/K_{SA} \approx 0$, $A/K_{PA} \approx 0$, $S/K_{SS} \approx 0$ и $S/K_{S2} \approx 0$ т.к. фермент является димером и существует всего один участок связывания для Mg_f^{++} , поэтому схема 1 может быть упрощена и будет

Схема 2



Аналитическая формула скорости примет следующее лицо:

$$\frac{e_0}{V} = (Int) + (Sl)M = \left[\left(\frac{1}{k_A} + \frac{1}{k_{P0}} \right) + \frac{K_{S1}}{k_A S} \right] + \left[\left(\frac{1}{k_A K_{PM}} + \frac{1}{k_{P0} K_{MS}} \right) + \frac{K_{S1}}{k_A K_{OM}} \frac{1}{S} \right] M \quad (3)$$

Из уравнения (3) легко можно вычислить зависимость коэффициента асимптоты от конц. субстрата ($Sl=f(s)$, $Int=f(s)$ и $Int/sl=\phi(s)$), их производные и границы.

$$\begin{aligned} \frac{d(Sl)}{dS} &= -\frac{K_{S1}}{k_A K_{OM} S^2} < 0; & \lim_{S \rightarrow 0}(Sl) &= \infty; & \lim_{S \rightarrow \infty}(Sl) &= \left(\frac{1}{k_A K_{PM}} + \frac{1}{k_{P0} K_{MS}} \right); \\ \frac{d(Int)}{dS} &= -\frac{K_{S1}}{k_A S^2} < 0; & \lim_{S \rightarrow 0}(Int) &= \infty; & \lim_{S \rightarrow \infty}(Int) &= \left(\frac{1}{k_A K_{PM}} + \frac{1}{k_{P0} K_{MS}} \right); \\ \lim_{S \rightarrow \infty} \left(-\frac{(Int)}{(Sl)} \right) &= -\frac{1}{K_{OM}}; & \lim_{S \rightarrow \infty} \left(-\frac{(Int)}{(Sl)} \right) &= -\frac{(k_A K_{MS} + k_{P0} K_{PM})}{K_{PM} K_{MS} (k_A + k_{P0})} \\ \frac{d}{dS} \left(-\frac{(Int)}{(Sl)} \right) &= \frac{K_{S1}}{k_A} \left[\frac{1}{k_A} \left(\frac{1}{K_{OM}} - \frac{1}{K_{MS}} \right) + \frac{1}{k_{P0}} \left(\frac{1}{K_{OM}} - \frac{1}{K_{PM}} \right) \right] \end{aligned} \quad (4)$$

Основываясь на схему № 2 можно сказать, что полученные геометрические формы аналитических кривых совпадают с кривыми, полученными экспериментально (Рис.10, 11, 12). Аналогичная система сложится е при сравнительно низкой концентрации S возьмем очень низкие концентрации для Mg_f^{++} $M/K_{OM} \approx 0$, $M/K_{SM} \approx 0$, $S/K_{SS} \approx 0$, $S/K_{S2} \approx 0$ и $M/K_{PM} \approx 0$.

Таким образом, на основе схемы № 1 можно сказать, что геометрическая форма кривых, введенных теоретически точно соответствует с экспериментально полученными кривыми. На основе этого можно считать, что расшифрован молекулярный механизм действия микросомальной Na,K-АТФазы и схема № 1 представляет собой минимальную модель Na,K-АТФазы, которая сильно приближается к истинной работе фермента.

Из схемы № 1 видно, что:

1) Микросомальная Na,K-АТФаза является димером.

2) Фермент может работать последовательно в ОРО и OPS режимах.

3) На субстратном участке фермента может произойти связывание с ATP_f , к которым затем может связаться Mg_f^{++} и на ферменте может произойти сбор и катализ фермента.

4) Фермент имеет один участок связывания для абсолютных ингибиторов для Mg_f^{++} и в результате соединения с ферментом образуется тупиковое разветвление.

5) Фермент имеет один участок для связывания с ATP_f .

В отличие от Na,K -АТРаза синаптических мембран МЕР и АЕР формы, микросомальной Na,K -АТРаза не имеют каталитическую активность, чем и объясняется отсутствие ОРМ и ОРА режимов работы данного фермента.

При сравнении ясно видно, что микросомальная Na,K -АТРаза и Na,K -АТРаза почек имеют одинаковые молекулярные механизмы действия и не имеют ОРМ и ОРА режимов.

Многозначительно и то, что в случае низких концентраций субстрата, т.е. когда нет OPS режима, схема №1 находится в полном соответствии со схемой, предложенной Плеснером (Plesner, 1981), где у него также рассмотрена ситуация в условиях с низкой концентрацией субстрата.

Выводы

- I. Локализованная в синаптических мембранах NaK -АТРаза, под воздействием норадреналина (NA), переходит из работы в режиме OPS в режим ОРМ.
 - a) Сродство к субстрату дефосфорилированной субединицы резко уменьшается, но увеличивается сродство к ионам Mg^{++}
 - b) Изменяется стохиометрия транспорта: вместо $Na^+/K^+=3/2$ становится $Na^+/K^+=3/1$ или $Na^+/K^+=3/0$; т. е. увеличивается коэффициент электрогенности.
 - c) По отношению K^+ , как активатору, NA представляет ингибитор с постоянным сродством; По отношению Na^+ , как активатору, NA представляет ингибитор с двойным эффектом.
- II В результате одновременного воздействия NA и синаптического фактора (SF), у локализованной в синаптических мембранах NaK -АТРаза не меняются OPS и ОРМ режимы работы, но снимается ингибиторный эффект NA и ферментная система активируется. По отношению Na^+ , как активатору, SF представляет активатор с постоянным сродством. Стохиометрия не изменяется: $Na^+/K^+=3/2$, (OPS) и $Na^+/K^+=3/0$ или 1, (ОРМ).
- III. Локализованные в микросомальной и синаптической фракции NaK -АТРаза имеют различные молекулярные механизмы. Микросомальная NaK -АТРаза не имеет ОРМ режим работы и, соответственно, NA и SF не воздействуют на NaK -АТРадную активность; т. е. Mg -связанный фосфорилированный интермедиат не катализируется. Также не катализируется ATP_f -связанный фосфорилированный интермедиат.