ავტორის სტილი დაცულია

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ს ო ფ ი ო ძ ნ ე ლ ა ძ ე

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი ბიოლოგიის მიმართულება

Cl^- და HCO_3^- –ით აქტივირებული ATPაზების მოქმედების მექანიზმის შესწავლა

ს ა დ ო ქ ტ ო რ ო დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა

ხელმძღვანელები:

პროგრამის ხელმძღვანელი,

თსუ სრული პროფესორი, *ნანა კოშორიძე*

ბიოლ. მეცნ. დოქტორი

სამეცნიერო ხელმძღვანელი,

ივ. ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული

ბიომედიცინის ცენტრის, მემბრანოლოგიის *ლეილა წაქაძე*

განყოფილების მთავარი მეცნიერ-თანამშრომელი,

ბიოლ. მეცნ. დოქტორი, პროფესორი

თბილისის უნივერსიტეტის გამომცემლობა

თბილისი 2013 წელი

შინაარსი:

1. შესავალი....4
2. ლიტერატურული მიმოხილვა, ATPაზების კლასიფიკაცია....5
3. P-ტიპის ATPაზები....7
4. P-ტიპის ტრანსპორტული ATPაზების კინეტიკური თავისებურება....12
5. Na, K-ATPაზური სისტემის კინეტიკური სქემები....15
6. Ecto-ATPაზა....21
7. Cl-ის ფიზიოლოგიური როლი და Cl-ATPაზა....22
8. HCO_3^--ის ფიზიოლოგიური როლი და Mg^{2+}-HCO_3^-ATPაზა....27
9. ნერვული დაბოლოების ანიონური არხები....29
10. ანიონების განაწილება უჯრედში....30
11. კვლევის მიზანი და ამოცანები....31
12. მეთოდიკა. სუბუჯრედული ფრაქციების მიღება....32
13. სინაფსური მემბრანების ფრაქციის მიღება....34
14. მიკროსომული ფრაქციის მიღება....37
15. სინაპტოსომური ფრაქციის მიღება....38
16. ცილის კონცენტრაციის კოლორიმეტრული განსაზღვრა ლოურის მეთოდით....40
17. არაორგანული ფოსფორის რაოდენობრივი განსაზღვრა კოლორიმეტრული მეთოდით, კაზანოვ-მასლოვას მოდიფიცირებული მეთოდი....41
18. ფერმენტული აქტიობის განსაზღვრა: Na,K-ATPაზური აქტიობის განსაზღვრა....42
19. ანიონური ATP-აზების განსაზღვრა....43
20. ფოლინ-ჩიოკალტეს რეაქტივის დამზადება (ლოურის მეთოდით ცილის გაზომვის მეთოდისათვის)....44
21. კინეტიკური მრუდების გეომეტრიული ფორმის ანალიზი; მეთოდის პრინციპი (თეორიული საფუძვლები)....45
22. მონაცემების სტატისტიკური დამუშავება....51
23. ორ სიდიდეს შორის განსხვავების სარწმუნოობის შეფასება....53
24. რეგრესიული ანალიზი....54
25. მიღებული სამეცნიერო შედეგები. Cl-ATPაზისა HCO_3-ATPაზების განაწილება განწილება სუბუჯრედული ფრაქციების მიხედვით....55

26. Cl-ATPაზას მოლეკულური მექანიზმის ექსპერიმენტული შედეგები.....57

27. Mg-დამოკიდებული HCO_3-ATPაზა, ექსპერიმენტული შედეგები.....64

28. Mg-არადამოკიდებული HCO_3^-ATPაზა, ექსპერიმენტული შედეგები 67

29. Mg^{2+}-არადამოკიდებული HCO_3^--ანიონებით აქტივირებული ATPაზა-„Ecto" ATPაზა.....74

30. მიღებული შედეგების განხილვა. Cl-ATPაზას მოლეკულური მექანიზმის შედეგების განხილვა.....76

31. Cl-ანიონით აქტივირებული ATPაზას ექსპერიმენტული შესწავლის შედეგები.....82

32. Mg-დამოკიდებული HCO_3-ATPაზა, შედეგების განხილვა.....83

33. Mg-დამოკიდებული HCO_3-ATPაზას ექსპერიმენტული შესწავლის შედეგები.....84

34. Mg-არადამოკიდებული HCO_3^-ATPაზას მიღებული სამეცნიერო შედეგების განხილვა.....85

35. Mg^{2+}-არადამოკიდებული HCO_3^-ATPაზა და Mg^{2+}-დამოკიდებული HCO_3^-ATPაზას დასკვნითი შედარებითი ანალიზი.....87

36. დასკვნა.....88

37. ნაშრომის თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა.....89

38. ნაშრომის მეცნიერული სიახლე.....90

39. შრომების სია.....91

40. გამოყენებული ლიტერატურა.....92

შესავალი

ლიტერატურაში მითითებულია ანიონდამოკიდებული, მაგნიუმით აქტივირებული ATP-ის ჰიდროლიზი, კერძოდ HCO_3^- და Cl^- იონებით აქტივაცია (არსებობს მითითება სხვა ანიონებით აქტივაციაზეც). მათი მოქმედება ძირითადად დაფიქსირებულია ბაქტერიებსა და ეუკარიოტებში, Aplysia Californica-ს და გომბეშოს (Bufo Bufo) ზოგიერთ ორგანოში, როგორიცაა წვრილი ნაწლავის ეპითელური ქსოვილის ბაზოლატერალური მემბრანა, მტკნარი წყლის გველთევზას ფარფლის მემბრანული ფრაქცია, Aplysia-ს ვეზიკულების პლაზმური მემბრანა და ვირთაგვას პანკრეასული მილაკები, ვირთაგვას თავის ტვინის მემბრანული ვეზიკულები და სხვა.

ანიონების ასიმეტრიული განაწილება მემბრანაში (out >>in) განაპირობებს მათ პასიურ ტრანსპორტს კონცენტრაციული გრადიენტით, რომლის რევერსიულ სისტემას წარმოადგენს აქტიური ტრანსპორტული მექანიზმის არსებობა.

ტრანსპორტულ ATPაზებს განსაკუთრებით მნიშვნელოვანი როლი ენიჭებათ უჯრედის ფუნქციონირებაში. უზრუნველყოფენ რა კათიონთა ასიმეტრიულ განლაგებას მემბრანაში ATP-ის ჰიდროლიზის ხარჯზე, ისინი წარმოადგენენ რთულ ბიოლოგიურ მექანიზმს, რომელსაც ენერგიის ერთი სახე გადაყავს მეორეში.

ტრანსპორტული ATPაზების კლასიფიკაციიდან აღსანიშნავია "P-ტიპის" ATPაზები, რომელთაც გააჩნიათ ფოსფორილირებული ინტერმედიატი და ახორციელებენ ორ საფეხურიან კატალიზს ფოსფორილირებისა და დეფოსფორილირების რეაქციას Mg·ATP კომპლექსის მონაწილეობით.

P-ტიპის ATPაზებს მიეკუთვნება პლაზმური მემბრანების ATPაზები, როგორიცაა Na,K-ATPაზა, Ca,Mg-ATPაზა, H-ATPაზა, K,H-ATPაზა და ორვალენტიანი კათიონებით (Zn^{2+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}) აქტივირებული ATPაზები [1, 2]. P-ტიპის ATPაზებს შესაძლებელია მიეკუთვნებოდეს ანიონებით ATP-ის ჰიდროლიზის აქტივაციაც.

1. ლიტერატურული მიმოხილვა

1. 1. ATPაზების კლასიფიკაცია

პროკარიოტული და ეუკარიოტული უჯრედების ტრანსპორტული ATPაზები შეიძლება დავყოთ ოთხ ძირითად ჯგუფად (ტიპად). ესენია: P-ტიპის, V-ტიპის, F-ტიპისა და A-ტიპის ATPაზები. მათი საერთო ნიშანია იონების ტრანსპორტი ATP-ის მაკროერგული ბმის ხარჯზე და ინტეგრალური ცილის ოლიგომერული სტრუქტურა, რომლის სუბერთეულებს ახასიათებთ ჰიდროლიზური, რეგულატორული, არხისა და გადამტანის თვისებები, ე. ი. წარმოადგენენ ჭეშმარიტ ტრანსპორტულ მანქანებს.

F-ტიპის ATPაზები ნანახია ეუკარიოტების მიტოქონდრიებსა და ქლოროპლასტებში, ასევე ბაქტერიებში; V-ტიპის ATPაზები ნანახია ეუკარიოტების ვაკუოლებსა და ბაქტერიებში; A-ტიპის ATPაზები – ძირითადად წყალმცენარეებში, ხოლო P-ტიპის ATPაზები გვხვდება ყველა ტიპის უჯრედში, დაწყებული ბაქტერიებიდან, დამთავრებული ადამიანით.

V-ტიპის ATPაზები შედარებით სუსტად არის შესწავლილი. ვაკუოლური ATPაზები (V-ATPაზები) არის მრავალ სუბერთეულიანი კომპლექსები, რომლებიც გვხვდება ყველა ეუკარიოტულ უჯრედში და პასუხისმგებლია შიდაუჯრედულ კომპარტმენტში წყალბადის ტრანსპორტზე. ასეთი კომპარტმენტებია ენდოსომები, ლიზოსომები, გოლჯის მემბრანები, კლარიტინით შეფუთული ვეზიკულები, ზოგიერთი ტიპის სეკრეტორული გრანულები, აგრეთვე მცენარეების და საფუარების ცენტრალური ვაკუოლები. ყველა ამ შიდაუჯრედულ კომპარტმენტს აქვს გარკვეული შიდა pH მნიშვნელობა, რომელიც მიიღწევა V-ATPაზების ფუნქციონირების შედეგად. ზოგიერთ უჯრედში აღნიშნული ATPაზები შეიძლება მონაწილეობდნენ ისეთ მნიშვნელოვან პროცესებში, როგორიცაა რეცეპტორ-განპირობებული ედოციტოზი; პოსტრანსლაციური მოდიფიკაცია; სეკრეტორულ გზებზე ცილების ჩალაგება; ცილების დეგრადაცია და მეორადი ტრანსპორტი; ნეიროტრანსმიტერების გამონთავისუფლება [3] V-ტიპის, F-ტიპისა და A-ტიპის ATPაზების ძირითადი სტრუქტურა მსგავსია და მათ შესაძლოა ჰქონდეთ მოქმედების მსგავსი მექანიზმი. ისინი ATP-ის ჰიდროლიზის შედეგად მიღებული ქიმიური ენერგიის საფუძველზე ქმნიან ტრანსმემბრანული იონების ელექტროქიმიურ პოტენციალთა სხვაობას [4]. აღნიშნული ATPაზები აწარმოებენ H^+ ანდა Na^+ ტრანსპორტს [5]. ყველა ეუკარიოტული F-ტიპის ATPაზას ATP-ის ჰიდროლიზის ხარჯზე გადააქვს 3–4 H^+ მიტოქონდრიიდან, ანდა ქლოროპლასტების თილაკოიდების შიგნით. ბაქტერიულ F-ტიპის ATPაზებს ATP-ის ჰიდროლიზის ხარჯზე უჯრედიდან გარეთ გამოაქვს 3–4 H^+, ანდა Na^+. ეს ფერმენტები მუშაობენ, აგრეთვე, საწინააღმდეგო მიმართულებითაც, ასინთეზებენ ATP-ს [6]. V-ტიპის ATPაზებს შეუძლიათ, ATP-ის ჰიდროლიზის ხარჯზე, გადაქაჩონ 2–3 H^+, მაგრამ მათ F-ATPაზებისაგან განსხვავებით, არ გააჩნიათ ATP-ის სინთეზის უნარი. ამის მიზეზი შესაძლოა იყოს მემბრანულ სექტორში არსებული ცვლილებები, კერძოდ c სუბერთეულის დუბლიკაცია.

სამივე, F-ტიპის, V-ტიპისა და A-ტიპის ATPაზების, ჰოლოფერმენტი შედგება კატალიზური F_1 , V_1, A_1 და მემბრანული F_0 , V_0 და A_0 სექტორებისაგან. V_0 (სუბერთეულები a, d, e და პროტეოლიპიდური სუბერთეულები c, c', c") და V_1 (სუბერთეულები A და B) ერთმანეთთან დაკავშირებულია ცილოვანი ღეროთი (სუბერთეულები D და F), რომელსაც ATP-ის ჰიდროლიზის ენერგია გადააქვს პროტეოლიპიდურ რგოლამდე და ხმარდება მის მოძრაობას. აღნიშნული რგოლი დაკავშირებულია a სუბერთეულში პროტონის არხთან, რომელიც მართავს იონის ტრანსპორტირებას კონცენტრაციული გრადიენტის საწინააღმდეგო მიმართულებით. V-ATPაზას ორი სექტორი ერთმანეთთან დაკავშირებულია სტატორით, რომელიც წარმოადგენს მემბრანასთან დაკავშირებულ E და G სუბერთეულებს. V–ATPაზას გააჩნია აგრეთვე არაჰომოლოგიური d, C და H სუბერთეულები, რომლებიც შესაძლოა პასუხისმგებელი იყვნენ V–ATPაზას თავისებურებებზე. d სუბერთეული მემბრანულ სექტორს ციტოპლაზმის მხრიდან უკავშირდება პერიფერიულად. C და H სუბერთეულები, წარმოდგენილია მხოლოდ ეუკარიოტებში. აქედან H სუბერთეული აუცილებელია ფერმენტული აქტიობისათვის, ხოლო C სუბერთეულს აქვს აქტინისა და ნუკლეოტიდის დაკავშირების უნარი. F_0 შედგება 1a, 1b და 12 c სუბერთეულებისაგან. a სუბერთეული მემბრანას განსჭოლავს 5-6-ჯერ, b სუბერთეული ერთხელ, ხოლო c სუბერთეული ორჯერ. ზოგიერთი F-ტიპის ATPაზა, როგორიცაა, მაგალითად, Acetobacterium Woodii-ს Na^+ გადამტანი ATPაზა, სავარაუდოდ, მოიცავს 3 განსხვავებულ, მაგრამ ჰომოლოგიურ c სუბერთეულს. F_1 სექტორი მოიცავს 3α, 3β, 1χ, 1δ და 1ε სუბერთეული. ეუკარიოტული F-ტიპის ATPაზები უფრო რთულია, ვიდრე ბაქტერიული ფერმენტული კომპლექსები. α, β, δ და F_1 ჰექსამერი (α_3 β_3) შეიცავს სტატორს, რომელსაც ატრიალებს (ხრახნის მსგავსად) როტორი, რომელიც შედგება c, ε და χ სუბერთეულებისაგან. F-ტიპის ATPაზებს გააჩნიათ ორი ტრანსმემბრანული სეგმენტი, V-ტიპის ATPაზებს – ოთხი, ხოლო A-ტიპის ATPაზებს – ექვსი ტრანსმემბრანული სეგმენტი. F-ტიპის ATPაზების α, β და c სუბერთეული ჰომოლოგიურია, შესაბამისად, V- და A-ტიპის ATPაზების B, A და c- (ან K-) სუბერთეულების.

როგორც უკვე ავღნიშნეთ, V-, F- და A-ტიპის ATPაზები ერთმენეთის მსგავსია, მაგრამ ჰომოლოგიურია მათი კატალიზური და მემბრანული სექტორები და არა ცენტრალური სუბერთეულები, რომლებიც აკავშირებენ კატალიზურ და მემბრანულ სექტორებს [7]. V-, F- და A-ტიპის ATPაზების ტრანსპორტის რეაქციას აქვს შემდეგი სახე:

$$nH^+_{in}\ [or\ nNa^+_{in}] + ATP \leftrightarrow nH^+_{out}\ [or\ nNa^+_{out}] + P_i$$

ამრიგად, V-, F- და A-ტიპის ATPაზები პროტონების (ან Na^+) გადამტანებია; არ გააჩნიათ ფოსფორილებული ინტერმედიატი; ისინი წარმოადგენენ მაღალმოლეკულურ და მრავალ სუბერთეულიან ოლიგომერებს; მათზე არ მოქმედებს ვანადატი. ამ ATPაზების ინჰიბიტორებია: SH – რეაგენტები (NEM – N-ეთილმალეიმიდი და P-ქლორმერკურიბენზოატი); KNO_3; KSCN (V-ტიპის ATPაზების); ოლიგომიცინი, ვენტურიციდინი, მერკურიალები და კადმიუმი (F–ATPაზები).

1. 2. P-ტიპის ATPაზები

P-ტიპის ATPაზები ქმნიან ფერმენთა ფართო ჯგუფს, რომელთა წარმომადგენლები გვხვდება ყველა ტიპის უჯრედში, დაწყებული ბაქტერიებიდან, დამთავრებული ადამიანით. P-ტიპის ATPაზების წარმომადგენლები ასრულებენ სხვადასხვა ფუნქციას. ასე, მაგალითად, გენერირებენ იონურ გრადიენტს, რომელიც ისეთი განსხვავებული პროცესების საფუძველია, როგორიცაა სასიგნალო ფუნქცია, ენერგიის მარაგის შექმნა და მეორადი აქტიური ტრანსპორტი. ცხოველებში P-ტიპის ATPაზების ზოგიერთი წარმომადგენელი მონაწილეობს კუჭის მჟავიანობის შექმნაში; თირკმლებში – სითხის სეკრეციასა და რეასორბციის პროცესში; კუნთის რელაქსაციაში; Ca^{2+}-დამოკიდებული სიგნალის ტრანსდუქციაში და სხვ. სახელწოდება P-ტიპი მიუთითებს, რომ ყველა მათგანი ტრანსპორტის მომენტში წარმოქმნის ფოსფორილებულ „ინტერმედიატს" [8, 9], რეაქციის მსვლელობისას ATP-ის მესამე ფოსფატი გადაიტანება აქტიური ცენტრის ასპარგანის მჟავის კარბოქსილის რადიკალზე, რის შედეგადაც წარმოიქმნება ფოსფოფერმენტი. აქტიურ ცენტრში ფოსფორის ნაცვლად, შეიძლება მაღალი თვისობით ჩანაცვლდეს ვანადატ-იონი, რომელიც წარმოადგენს P-ტიპის ATPაზების სპეციფიკურ ინჰიბიტორს.

P-ტიპის ATPაზების კლასიფიკაცია დაფუძნებულია მათ ამინომჟავურ შემადგენლობაზე. კერძოდ, ნაკლებად ცვლადი „დაცული" შუაგულის (concerved core) და არა ძლიერ ვარიაბელური N- და C- ტერმინალური უბნების ამინომჟავურ თანმიმდევრობაზე. ამის შედეგად, გამოყოფილ იქნა 159 სხვადასხვა სახის P-ტიპის ATPაზა, რომლებიც დააჯგუფეს მათ მიერ ტრანპორტირებადი და მუშაობის გამააქტივებელი იონთა სპეციფიკურობის საფუძველზე და გამოყვეს 5 დიდი ჯგუფი. თითოეული ჯგუფი თავის მხრივ, იყოფა ქვეჯგუფებად [10].

I-ჯგუფში შედის გარდამავალი და მძიმე მეტალით აქტივირებული ATPაზები. I_A ქვეჯგუფის ATPაზა ჩართულია K^+ –ის ტრანსპორტში. I_B ჯგუფი, თავის მხრივ, შეიძლება გაიყოს სულ მცირე ორ ქვეჯგუფად. ერთი მოიცავს Cu^+\Ag^+–ATPაზას, ხოლო მეორე ქვეჯგუფი ჩართულია გარდამავალი და მძიმე მეტალების ტრანსპორტში.

P-ტიპის ATPაზების II ჯგუფი დაყოფილია 4 განსხვავებულ ქვეჯგუფად. II_A და II_B ქვეჯგუფის ATPაზები აწარმოებენ Ca^{2+}–ის ტრანსპორტს, კერძოდ II_A ქვეჯგუფს მიეკუთვნება სარკოპლაზმური რეტიკულუმის Ca-ATPაზა, ხოლო II_B ქვეჯგუფს მიეკუთვნება პროტოპლაზმური მემბრანის Ca-ATPაზა. II_C ჯგუფი მოიცავს ერთმანეთის მონათესავე Na,K-ATPაზასა და ცხოველური უჯრედების H,K-ATPაზას. II_D ქვეჯგუფის მიეკუთვნება სოკოების ATPაზების მცირე რაოდენობა რომელთა ფუნქცია ჯერ-ჯერობით უცნობია.

P-ტიპის ATPაზების III ჯგუფი მოიცავს მცენარეებისა და სოკოების H-ATPაზას (III_A ქვეჯგუფი) და პატარა ქვეჯგუფს, რომელშიც შედის Mg-ATPაზა (III_B ქვეჯგუფი). აღსანიშნავია, რომ P-III_A ტიპის ATPაზები სპეციფიკურია მცენარეებისა და სოკოებისათვის, ხოლო P-II_C ტიპის ATPაზები – ცხოველური უჯრედებისათვის. ATPაზების ეს ორი ჯგუფი, თუმცა არ არის ერთმანეთის მონათესავე, მაგრამ, როგორც ჩანს ასრულებენ დამატებით ფუნქციას მცენარეებში, სოკოებსა და

ცხოველებში; სახელდობრ, ისინი ქმნიან ელექტროქიმიურ გრადიენტს, რომელიც გამოიყენება, როგორც ენერგიის წყარო მეორადი ტრანსპორტისათვის.

P-ტიპის ATPაზების IV ჯგუფის ზოგიერთი ATPაზა მონაწილეობს ფოსფოლიპიდების ტრანსპორტში. მიუხედავად ამისა P-IV ტიპის ATPაზების ტრანსპორტის სპეციფიკურობა დავის საგანია.

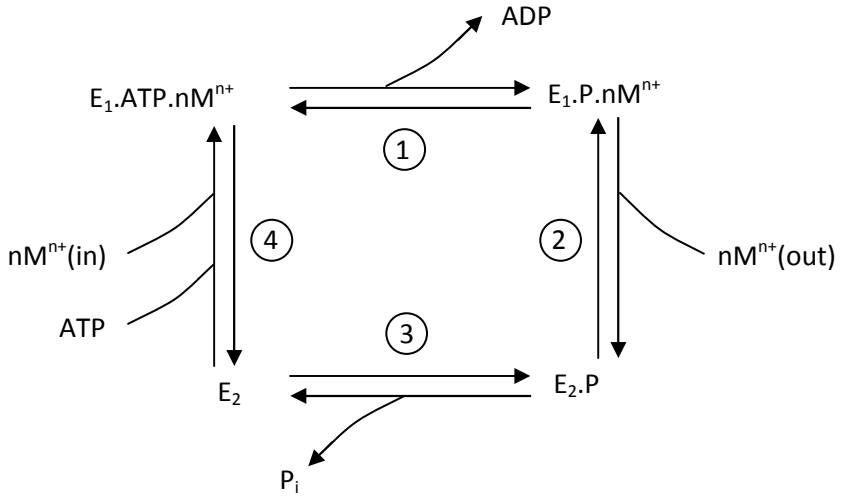
P-ტიპის ATPაზები, ძირითადად, შედგებიან α და β სუბერთეულებისაგან. α სუბერთეული პასუხისმგებელია იონების ტრანსპორტისა და ATP-ის ჰიდროლიზზე. β გლიკოზირებული სუბერთეული კი არ მონაწილეობს იონების ტრანსპორტში, მაგრამ მნიშვნელოვანია αβ კომპლექსის მემბრანაში განთავსებისათვის. იგი უზრუნველყოფს სუბერთეულის მემბრანაში ჩასმის გაადვილებას, პოსტ-ტრანსლაციურ პროცესში სუბუჯრედული მემბრანის კარგ მონიშვნასა და კატალიზური სუბერთეულის სტაბილიზაციას. როგორც გამოირკვა, Na,K-ATPაზას შემთხვევაში, β სუბერთეული განაპირობებს თავის ტვინის სინაფსური მემბრანებისა და სხვა ფრაქციებსა და ქსოვილებში Na,K-ATPაზას მოქმედების მოლეკულურ მექანიზმების სხვადასხვაობას [11, 12]. P-ტიპის ATPაზების ზოგიერთ წარმომადგენელს, მაგალითად Na,K-ATPაზას, გააჩნია დამატებითი, ქსოვილ-სპეციფიკური γ სუბერთეული. Na,K-ATPაზას α სუბერთეული, სავარაუდოდ, გავლენას ახდენს კინეტიკურ პარამეტრებზე და ჰომოლოგიურია ფორის წარმომქმნელი პოლიპეპტიდების ოჯახისათვის, თუმცა, ზოგიერთი მეცნიერი უარყოფს, რომ α სუბერთეული არის Na,K-ATPაზას შემადგენელი ნაწილი, რადგანაც მისი ფუნქციური როლი არ არის დადგენილი და იგი ცნობილია მხოლოდ სტრუქტურული შესწავლით.

P-ტიპის ATPაზების უმეტესობის α ჯაჭვი შედგება დაახლოებით 1000 ამინომჟავური ნაშთისაგან (~100kda), რომლებიც ქმნიან ტრანსმემბრანული სეგმენტების ლუწ რიცხვს იმ ანგარიშით, რომ N და C ბოლო ლოკალიზებული იყოს ციტოპლაზმურ მხარეს. P-ტიპის ATPაზების სტრუქტურული თავისებურებები განვიხილოთ Ca,Mg-ATPაზას მაგალითზე [13, 14]. Ca,Mg-ATPაზას α სუბერთეულის 70% ლოკალიზებულია ციტოპლაზმაში, 25% მემბრანაში, ხოლო 5% მემბრანის მოსაზღვრე სივრცეში. კატალიზური უბანი რომელიც მოიცავს ATP-ის დაკავშირებისა (N-დომენი) და ფოსფორილების (P-დომენი) საიტს, ლოკალიზებულია ფართო ციტოპლაზმურ მარყუჟში მეოთხე და მეხუთე ტრანსმემბრანულ სეგმენტს შორის, მაშინ როდესაც იონების ტრანსლოკაციის საიტი არის მემბრანაში. ATP-ის დაკავშირების საიტი (N-დომენი) და ფოსფორილების საიტი (P-დომენი) არის ორი რეგიონი, რომელიც ხასიათდება მაღალი ჰომოლოგიურობით P-ტიპის ATPაზების ოჯახებისათვის. კერძოდ, თანმიმდევრობები: KGAPE – ATP-ის დაკავშირების საიტისათვის და DKTGTLT, სადაც D არის ფოსფორილების საიტი. მეორე ჯგუფის P ტიპის ATPაზების α სუბერთეულის ტრანსმემბრანული სეგმეტისათვის დამახასიათებელია PEGL თანამდევრობა, რომელიც I ჯგუფის ATPაზებისათვის იცვლება CPX თანმიმდევრობით. სწორედ ამიტომ, I ჯგუფის P-ტიპის ATPაზებს, სხვაგვარად CPX ATPაზებს უწოდებენ [15]. β სუბერთეული შედგება 300 ამინომჟავური ნაშთისაგან. N-ტერმინალურ ბოლოს მოსდევს პატარა ციტოპლაზმური და ტრანსმემბრანული სეგმენტები, ხოლო β ჯაჭვის 80% ლოკალიზებულია ექსტრაუჯრედულ სივრცეში. ეს ექსტრაუჯრედული რეგიონი მოიცავს უმცირეს 3 გლიკოლიზებულ ასპარაგინს. შაქრების მასა შეადგენს დაახლოებით 10kDa [16].

P-ტიპის ATPაზების ცენტრალური ნაწილი განსაზღვრავს მეტალის იონის სპეციფიკურობას, ხოლო N-ტერმინალური ნაწილი ასრულებს რეგულატორულ როლს, ურთიერთქმედებს რა გადამტანის სხვა ნაწილებზე [17, 18, 15].

P-ტიპის ATPაზების მემბრანული რეგიონი შემოსაზღვრულია ფოსფოლიპიდებით. ვინაიდან ცილის სიმკვრივე მემბრანაში იცვლება, მათი შემომსაზღვრელი ფოსფოლიპიდების რიცხვიც განსხვავებულია თითოეული P-ტიპის ATPაზასათვის. მათი ფუნქციონირებისათვის საკმარისია ფოსფოლიპიდების მინიმალური რაოდენობა. არაიონური დეტერგენტები უზრუნველყოფენ ATPაზას აქტიური ფორმის სოლუბილიზაციას. მთლიანი დელიპიდიზაცია, როგორც წესი, იწვევს აქტიობის დაკარგვას, რაც კვლავ აღდგება ფოსფოლიპიდების დამატებისას.

როგორც უკვე აღინიშნა, P-ტიპის ATPაზების მუშაობა განაპირობებს მემბრანის გავლით იონთა ტრანსპორტს არედან, სადაც მისი კონცენტრაცია ნაკლებია, არეში, სადაც ამ იონთა კონცენტრაცია მაღალია. ასეთი მუშაობა საჭიროებს ენერგიას, რომლის წყაროცაა ATP-ის ჰიდროლიზი. ორი პროცესი – იონების გადაადგილება და ATP-ის ჰიდროლიზი ერთმანეთთანაა შერწყმული. ეს კარგად არის ასახული P-ტიპის ATPაზების ზოგად კინეტიკურ სქემაში (სქემა 1), ე.წ. “ $E_1\backslash E_2$ მოდელში”, რომელიც გამოხატავს გარდაქმნების მინიმალურ რიცხვს, რომელიც საჭიროა ტრანსპორტის ციკლის შესასრულებლად.

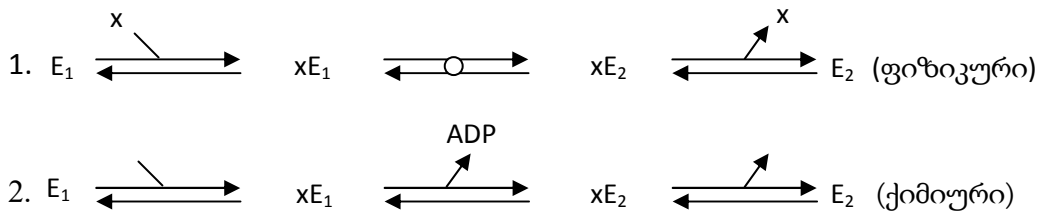


სქემა 1. იონთა ტრანსპორტის “$E_1\backslash E_2$ მოდელი”

როგორც სქემა 1-დან ჩანს, ტრანსპორტული x იონის რიცხვია n (nX). ამ სქემაში მონაცვლეობს შექცევადი საფეხურები, სადაც იონი უკავშირდება და გამონთავისუფლდება ATPაზიდან და ქიმიური საფეხური, რომლის დროსაც ATPაზა იცვლის კონფორმაციულ მდგომარეობას. ამ სქემაში E_1-ს აქვს X იონისადმი მაღალი თვისობა და დაკავშირების უბანი ორიენტირებულია იმ კომპარტამენტისაკენ, სადაც იონის კონცენტრაცია დაბალია. nX დაკავშირების

შემდეგ (საფეხური 1) ATPაზა შეიძლება ფოსფორილდეს ATP-ით (საფეხური 2). E_1~P (Xn) ფორმაში ფოსფატი კოვალენტურადაა დაკავშირებული ფოსფორილების უბნის ასპარტატთან და nX არის ოკლუდირებული. ეს ნიშნავს, რომ იონი იმყოფება ისეთ მდგომარეობაში, რომელიც აფერხებს იონის სწრაფ მიმოცვლას მემბრანის მეორე მხარეს არსებულ იონთან და მიუწვდომელია მემბრანის ორივე მხრიდან. E_1~P (Xn) არასტაბილურია, იცვლის კონფორმაციას და გარდაიქმნება E_2-P ფორმად (საფეხური 3). ამ ცვლილებებისას X იონის მიმართ ATPაზას თვისობა მცირდება. სატრანსპორტო უბანი ორიენტირებულია იმ კომპარტმენტისაკენ, სადაც იონის კონცენტრაცია მაღალია და nX დისოცირდება ATPაზადან მეოთხე საფეხურზე E_2-P ჰიდროლოზდება და ATPაზა მზადაა, რომ დაიწყოს ახალი ციკლი. P-ტიპის ATPაზების ციკლის მნიშვნელოვანი თვისებაა, მისი შექცევადობა. იონის გრადიენტის არსებობისას, ATP შეიძლება სინთეზირდეს ADP და არაორგანული ფოსფორიდან (P_i) ფერმენტის E_1~P (Xn) და E_2-P ფორმები ერთმანეთისაგან ქიმიურად განსხვავებულია. E_1~P (Xn) ურთიერთქმედებს ADP-თან და სინთეზირებს ATP-ს, ე.ი ADP-მგრძნობიარეა. E_2 ფორმას შეუძლია არაორგანული ფოსფორით ფოსფორილება, რის გამოც P-ტიპის ATPაზა მგრძნობიარეა ვანადატის მიმართ, რომელიც იძლევა "ჩიხურ განშტოებას" E_2-ფორმასთან. როგორც უკვე ავღნიშნეთ, ვანადატ-იონი P-ტიპის ATPაზების სპეციფიკური ძლიერი ინჰიბიტორია. ამრიგად, სქემა 1-ზე გამოსახული E_1\E_2 მოდელი მოიცავს P-ტიპის ATPაზას ორ ძირითად კონფორმაციულ მდგომარეობას. E_1 ფოსფორილდება ATP-ით, ხოლო E_2 არაორგანული ფოსფორით. ამ ორ მდგომარეობას შორის ქიმიური გადართვა აისახება nX-ის მიერ მაღალი თვისობის უბნების დაკავებით.

სქემა 1 არის ძლიერ გამარტივებული სქემა, სადაც მხოლოდ ერთ კონფორმაციულ ცვლილებას აქვს ადგილი; ქიმიური და ვექტორული პროცესები ერთმანეთთანაა გადაჯაჭვული; არ არის ცნობილი იონთა ტრანსლოკაციის მექანიზმი; P ტიპის ATPაზებში, ისევე როგორც სხვა ტრანსპორტულ ATPაზებში, ერთმანეთთან შერწყმულია ქიმიური (ATP-ის ჰიდროლიზი) და ფიზიკური (იონთა ტრანსპორტი) პროცესები:



თუ განვიხილავთ იონთა გადატანის პროცესს, მაშინ უნდა აღინიშნოს, რომ ტრანსპორტი მოიცავს რამდენიმე ეტაპს: გადასატანი იონის დაკავშირებას მემბრანის ერთ მხარეს; იონის ოკლუდირების ეტაპს; მის გადატანას მემბრანის მეორე მხარეს და გამონთავისუფლებას. ATP-ის ენერგია იხარჯება $E_1 \rightarrow E_2$ კონფორმაციულ გადასვლაზე და ეს გადასვლა შერწყმულია ATP /ADP ცვლასთან. მაკროერგული ფოსფატის გადასვლა არამაკროერგულში ($E_1P \rightarrow E_2P$) განსაზღვრავს გადასატანი იონის მიმართ თვისობის ცვლილებას და მემბრანის მეორე მხარეს ხდება ამ იონის გამოთავისუფლება. შემდეგი ეტაპი კი დეფოსფორილებაა. თუმცა,

შეიძლება ადგილი ჰქონდეს კოტრანსპორტსაც, როგორც ეს ხდება, მაგალითად, Na,K-ATPაზას შემთხვევაში.

P ტიპის ATPაზების მოქმედების მოლეკულური მექანიზმის შესახებ მონაცემები საკმაოდ მწირია. P-ტიპის ATPაზების თითოეული წარმომადგენლისათვის დასადგენია იონთა ტრანსლოკაციისა და ტრანსპორტის მექანიზმები; დასაზუსტებელია ფერმენტულ რეაქციათა თანამიმდევრობაში კათიონების დაკავშირებისა და გამონთავისუფლების ადგილები; შესასწავლი და დასადგენია კათიონთა დაკავშირების შესაძლო სტექიომეტრიის ცვლილება; გასარკვევია მოდიფიკატორთა ხასიათი; დასადგენია რა არის ფერმენტული სისტემის ფუნქციური ერთეული – მონომერი, თუ დიმერი და სხვ. გამონაკლისს წარმოადგენს Na,K-ATPაზა, რომლის მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი სრულად იქნა გაშიფრული ივ. ბერიტაშვილის მემბრანოლოგიის ლაბორატორიაში ზ. ქომეთიანის მიერ.

1. 3. P-ტიპის ტრანსპორტული ATPაზების კინეტიკური თავისებურება

ნივთიერებათა ტრანსპორტი, მათი ტრანსმემბრანული გადაადგილება, აუცილებელი რგოლია არა მარტო ნივთიერებათა ცვლაში, არამედ მთლიანად ცოცხალი ორგანიზმის ცხოველქმედებისათვის, დაწყებული ბაქტერიებიდან, ცხოველური უჯრედის ჩათვლით. როგორც ანიონების, ასევე კათიონების აქტიური ტრანსპორტი სპეციალური იონური ტუმბოებით ხორციელდება, რომლებიც თავის მხრივ წარმოადგენენ მემბრანაში ლოკალიზებულ მოლეკულურ მანქანებს, რომლებიც უზრუნველყოფენ იონების ტრანსპორტს კონცენტრაციული გრადიენტის საწინააღმდეგოდ, ძირითადად ATP-ის ქიმიური ენერგიეს ხარჯზე. აქედან გამომდინარე, იონურ ტუმბოებს ახასიათებთ ATP-ჰიდროლაზური აქტიობა და ხშირად იონური ტუმბოს ანალოგიურად ხმარობენ ტერმინს "ტრანსპორტული ATP-აზები". მათ შესწავლას დიდი თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა აქვს, როგორც ფუნქციური ბიოქიმიის, ასევე მედიცინისა და ნანობიოლოგიის თვალსაზრისით.

დღესდღეობით შესწავლილია მრავალი ტრანსპორტული ATP-აზა (Tr-ATPაზა), როგორიცაა Na,K-ATPაზა, Ca-ATPაზა (კათიონური ATPაზები), HCO_3-ATPაზა და Cl-ATPაზა (ანიონური ATPაზები), K,H-ATPაზა (პროტონული ATPაზა), ორვალენტიანი იონებით (Zn, Cu, Ni, Mg, Mn) გააქტივებული ATPაზები. ორვალენტიანი, მძიმე მეტალებით გააქტივებული Tr–ATPაზების არსებობა ასევე აღინიშნევა ბაქტერიულ მემბრანებში [19, 20, 21, 22]. თუმცა ნაკლებად არის ცნობილი ამ ATPაზების მოლეკულური მექანიზმი (მათი მუშაობის პრინციპიალური კინეტიკური სქემები), რომელიც ყველაზე მეტად იქნება მიახლოებული შესაბამისი ფერმენტის ჭეშმარიტ მოლეკულურ მექანიზმთან. მოლეკულური მექანიზმის გაშიფვრა და მათი რეგულაციის პრინციპების დაგენა საშუალებას მოგვცემს ჩამოყალიბდეს Tr-ATPაზების, განსაკუთრებით P ტიპის ATPაზების ზოგადი თავისებურებანი.

P ტიპის ATPაზების დამახასიათებელ ნიშანს წარმოადგენს: 1. მათი ფუნქციონირებისას წარმოიქმნება ფოსფორილირებული ინტერმედიატი, რომელსაც გადამწყვეტი მნიშვნელობა ენიჭება ტრანსპორტის განხორციელებისათვის. Tr-ATPაზების მუშაობის ზოგადი პრინციპებიდან გამომდინარე, შესაბამისი ლიგანდების არსებობისას (კათიონები, ანიონები), ფერმენტს შესაძლებელია ჰქონდეს მინიმუმ ორი კონფორმაციული მდგომარეობა, რომელიც განსაზღვრავს ორ განსხვავებულ თვისობას სატრანსპორტო იონის მიმართ (დაბალი და მაღალი თვისობა). იმისათვის, რომ შესრულდეს ტრანსპორტი, ფერმენტული სისტემის მუშაობის დასაწყისში მან უნდა გამოავლინოს მაღალი თვისობა დასაკავშირებელი იონის მიმართ, ხოლო ტრანსპორტის შესრულების შემდეგიონის მიმართ თვისობის შემცირების ხარჯზე უნდა მოხდეს ამ იონისაგან ფერმენტის განთავისუფლება. 2. გრაფიკულად ტრანსპორტული ფერმენტული სისტემებისათვის V=f(X) (X არის სატრანსპორტო იონი) კინეტიკურ მრუდს რთული გეომეტრიული ფორმა აქვს. იონის კონცენტრაციიდან რეაქციის სიჩქარის ამსახველი მრუდი ზარის ფორმისაა,

რომლის აღმავალი ფაზა შეესაბამება იონის დაკავშირებისა და გადატანის პროცესს, ხოლო დაღმავალი – მის გამონთავისუფლებას. ზოგ შემთხვევაში, სატრანსპორტო იონის გარკვეულ კონცენტრაციულ ფარგალში აღმავალი ფაზის შემდეგ მრუდი გადადის მკვეთრად გამოხატულ პლატოში, ე. ი. აღწევს მოჩვენებით ზღვრულ სიჩქარეს, რასაც მოსდევს დაღმავალი ფაზა.

ზემოთ აღნიშნული კინეტიკური მრუდის სურათი მიღებულია ყველა Tr-ATPაზებისათვის, რომლებიც ახორციელებენ ერთი ტიპის იონის ტრანსპორტს. კოტრანსპორტის შემთხვევაში, როდესაც ხდება ორი იონის ტრანსპორტი (მაგ. Na,K-ATPაზა), მიღებულია ანალოგიური ფორმის გრაფიკი. ცხადია, რომ Tr-ATPაზების ამგვარი კინეტიკური სურათი წარმოადგენს აუცილებელ, მაგრამ არასაკმარის პირობას Tr-ATPაზური სისტემების მუშაობისათვის [23].

Tr-ATPაზების ზოგადი კინეტიკური თავისებურებების წარმოჩენის საუკეთესო მაგალითს წარმოადგენს Na,K-ATPაზური სისტემის კინეტიკური სქემა (მინიმალური მოდელი). რთული გეომეტრიული ფორმის კინეტიკური მრუდების ანალიზის მეთოდის საფუძველზე [24] შესაძლებელი გახდა Na,K-ATPაზური სისტემის მოლეკულური მექანიზმის გაშიფვრა და მისი სრულყოფილი პრინციპული სქემის (მოდელის) შემუშავება (იხ. თავი 1. 4), რომელიც ემყარება ლიტერატურაში არსებული მოსაზრებებს, ხსნის ამ საკითხზე არსებულ ყველა ექსპერიმენტულ ფაქტს და მოიცავს Na,K-ATPაზის ყველა შესაძლო რეჟიმს. პრინციპული მნიშვნელობა ენიჭება იმ ფაქტს, რომ Tr-ATPაზების ჭეშმარიტ სუბსტრატს წარმოადგენს MgATP-ის კომპლექსი და არა თავისუფალი ATP [25, 26, 27]. ამ სქემის მიხედვით Na,K-ATPაზას აქვს ოლიგომერული სტრუქტურა ერთ α სუბერთეულზე ერთი ნუკლეოტიდური უბნით. მინიმალური მოდელის პრინციპიდან გამომდინარე (იგი გულისხმობს ფერმენტის ფორმებისა და მათ შორის რეაქციების საფეხურების მინიმალური რაოდენობის შერჩევას, რომლებიც გარკვეული წესით არიან დაკავშირებული და ლიგანდის ნებისმიერ კონცენტრაციაზე უზრუნველყოფენ თეორიული და ექსპერიმენტული მრუდების გეომეტრიული ფორმების თანხვედრას), Na,K-ATPაზის კინეტიკური სქემების შედგენისას ავტორები გამოდიან იმ მოსაზრებიდან, რომ Na,K-ATPაზა წარმოადგენს დიმერს ორი αβ სუბერთეულით [28]. ერთი სუბერთეულის მდგომარეობა შეუღლებულია დიმერის მეორე სუბერთეულის გადასვლებთან. დიმერის მონომერები შეიძლება არსებობდნენ სხვადასხვა კონფორმაციულ მდგომარეობაში (E_1, E_2). აღსანიშნავია, რომ დიმერში მონომერების კონფორმაციულ მდგომარეობას განსაზღვრავს ერთის მხრივ დაკავშირებული ლიგანდი, ხოლო მეორეს მხრივ, მეორე მონომერის კონფორმაციული მდგომარეობა. ამრიგად, შეიძლება ითქვას, რომ დიმერში მონომერები ურთიერთქმედებენ გარკვეული კანონზომიერებით. E_1 წარმოადგენს Na^+-ის ფორმას და მონომერების აღნიშნულ კონფორმაციულ მდგომარეობაში ყოფნას Na^+-ის გარდა განაპირობებს MgATP, Mg_f და ATP_f. E_2 კი არის K^+-ის ფორმა და მოცემული იონის გარდა მის არსებობას ხელს უწყობს არაორგანული ფოსფორი. კატალიზური აქტიობა აქვს დიმერს, რომლის მონომერებიც იმყოფებიან სხვადასხვა კონფორმაციულ მდგომარეობაში. პრინციპული კინეტიკური სქემის

მიხედვით, Na,K-ATPაზას შეუძლია იმუშაოს, როგორც თანმიმდევრულად, ისე ერთდროული ტრანსპორტის რეჟიმში: ფერმენტის ოლიგომერულ სტრუქტურაში თითოეული პროტომერი იონებთან ურთიერთქმედებს თანმიმდევრულად, ხოლო მთელი კომპლექსის მუშაობა სინქრონიზებულია იმდაგვარად, რომ ერთი პროტომერი უკავშირდება Na^+-ს, მეორე კი ამ დროს დაკავშირებულია K^+-თან. თანმიმდევრულ რეჟიმში მონაწილეობს მხოლოდ მაღალი თვისობის კატალიზური უბანი, ხოლო ერთდროულში – დაბალი თვისობის უბანი. სქემაში გათვალისეინებულია, რომ ერთ სუბერთეულზე მხოლოდ ერთი კატალიზური უბანი არსებობს. ამ უბანს შეიძლება დაუკავშირდეს Mg_f და ATP_f. ამ სქემაში ადრე არსებული ყველა სქემისაგან განსხვავებით გათვალისწინებულია ის კონფორმაციული ცვლილებებიც, რომლებიც გამოწვეულია ამ ლიგანდების მოქმედებით.

პრინციპიალური სქემა საშუალებას იძლევა სრულიად გაშიფრულიყო Na,K-ATPაზური სისტემის რეგულაცია ფიზიოლოგიური ლიგანდების (MgATP, ATP, Mg^{2+}, Na^+ და K^+) მონაწილეობით. ამ სქემიდან გამომდინარეობს შემდეგი კინეტიკური თავისებურებანი, რაც მეტად მნიშვნელოვანია არა მარტო Na,K-ATPაზის, არამედ ყველა სატრანსპორტო სისტემის სტრუქტურული ორგანიზაციისა და მოლეკულური მექანიზმის დასადგენად: 1. Na,K-ATPაზური სისტემის ფუნქციურ ერთეულს აქვს ოლიგომერული სტრუქტურა, რომელსაც ერთდროულად შეუძლია დაიკავშიროს ნატრიუმისა და კალიუმის იონები იმდაგვარად, რომ დაკავშირებული იონის საერთო რიცხვი არ აღემატებოდეს ხუთს. ფერმენტის მოლეკულა წარმოადგენს დიმერს. 2. Tr-ATPაზების ჭეშმარიტ სუბსტრატს წარმოადგენს MgATP-ის კომპლექსი. დასაშვებია კომპლექსის აწყობა ფერმენტზე (მხოლოდ შემდეგი თანმიმდევრობით – ჯერ ATP, შემდეგ Mg^{2+}). 3. თავისუფალი ATP და Mg^{2+} წარმოადგენენ მოქმედების ფართო სპექტრის მოდიფიკატორებს. მათი კონცენტრაციის აბსოლუტური მნიშვნელობა, ისევე, როგორც მათი შეფარდება, განსაზღვრავს Na,K-საქაჩავის მუშაობას შეუღლებული ტრანსპორტის სხვადასხვა რეჟიმში. 4. Na,K-ATPაზური სისტემას შეუძლია იმუშაოს ტრანსპორტირებადი ლიგანდის როგორც თანმიმდევრულ, ასევე ერთდროულ რეჟიმში. უჯრედშიდა K^+ და MgATP სისტემას ანაცვლებენ თანმიმდევრული რეჟიმის მხარეს, მაშინ, როდესაც მათი კონცენტრაციის გაზრდა სისტემას წევს ერთდროული ტრანსპორტის მხარეს.

1. 4. Na,K-ATPაზური სისტემის კინეტიკური სქემები

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

ფერმენტის მრავალი თვისების ასახსნელად ხშირად გამოყენებულ ერთ-ერთ პირველ სქემას წარმოადგენს პოსტ-ალბერსის თანმიმდევრული მოდელი [29, 30], რომლის მიხედვითაც რეაქცია მიმდინარეობს საფეხურებრივად და სხვადასხვა ეტაპზე ჩართავს Na^+ და K^+ იონებს

(სქემა 2)

$E_1 + Na^+ + MgATP \rightarrow Na(E_1)MgATP \rightarrow Na(E_1P)MgADP \rightarrow Na(E_1P)Mg + ADP$ $Na(E_1P)Mg \rightarrow (E_2P)Mg + Na^+$

$(E_2P)Mg + K^+ \rightarrow K(E_2P)Mg \rightarrow K(E_2)Mg? + P_i$

$K(E_2)Mg? \rightarrow K(E_1)Mg? \rightarrow (E_1)Mg? + K^+$

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

ამ სქემის მიხედვით ყველა სტადია შექცევადია, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ საქაჩავი შესაძლებელია გამოყენებული იქნას, როგორც ATP-ის ენერგიის იონურ გრადიენტში გარდამქმნელი, ისე – იონური გრადიენტის ქიმიურ ენერგიაში გარდამქმნელი. Na,K-ATPაზას საშუალებით ასეთი გზით მიღებულია ერითროციტებში ATP, ADP-ისა და Pi-საგან [31, 32].

Na,K-ATPაზას ფუნქციონირებას შედარებით სრულად აღწერს ის მოდელები, რომლებიც ფერმენტს განიხილავენ, როგორც ოლიგომერულ სისტემას. ამ მხრივ მნიშვნელოვანია სტეინის მიერ შემოთავაზებული მოსაზრებები [33], რომელიც შემდგომ რეპკემ განავითარა [34].

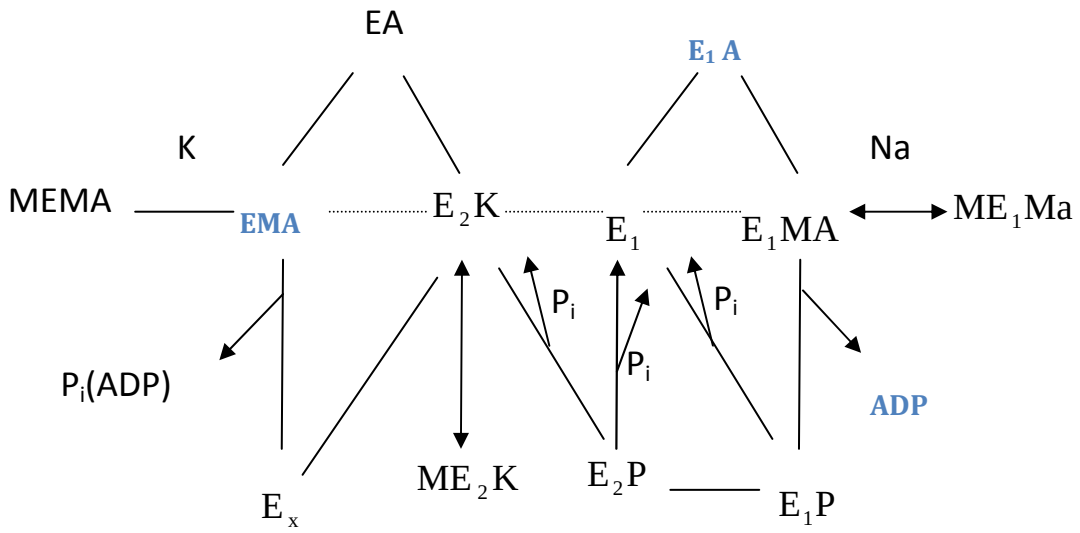
რეპკეს ჰიპოთეზის თანახმად, Na,K-ATPაზური რეაქცია ხორციელდება ერთი პროტომერით. K^+-ს ფერმენტი გადაჰყავს ოლიგომერულ ფორმაში. ამ პირობებში, დაბალი თვისობის ცენტრზე ATP-ის მიერთება ინდუცირებს მეზობელი მაღალი

თვისობის ცენტრიდან ADP-ის გამოთავისუფლებას. ეს კი განაპირობებს დიმერის მუშაობის სინქრონიზაციას ისე, რომ ერთი პროტომერის ენდერგონული სტადია ემთხვევა მეორე პროტომერის ეკზერგონულ სტადიას [34]. სქემა ვარაუდობს, რომ ფერმენტის პროტომერები მთლიანად იდენტურები არ არიან და შესაძლებელია ნუკლეოტიდდამაკავშირებელი ცენტრები ერთმანეთისაგან კონფიგურაციით განსხვავდებოდნენ.

პროტომერების შეუღლებული მოქმედება საფუძვლად უდევს ლევიტის მოლეკულურ მოდელს [35]. ეს მოდელი არის ცდა, შეათანხმოს სხვადასხვა შეხედულებანი Na^+ და K^+ ტრანსპორტისათვის ATP-ის ენერგიის გამოყენების მექანიზმებზე. იგი თითქმის აერთიანებს პოსტ-ალბერსის, ვიტამისა და რეპკეს ძირითად დებულებებს და ამავე დროს, თავისუფალია წინამორბედი მოდელების ნაკლოვანებებისაგან. ამ მოდელის ძირითადი განსხვავება პოსტ-ალბერსის სქემიდან არის ის, რომ მასში განიხილება Na^+ და K^+ იონთა ერთდროული და არა თანმიმდევრული გადატანა. კარლიშისა და მისი თანამშრომლების მიერ შემოთავაზებული სქემა უფრო სრულყოფილია, ვიდრე წინამორბედი სქემები [36, 37]. იგი განსაზღვრავს ყველა ინტერმედიატისათვის (გარდა Mg^{++} იონის შესაძლო დისოციაციისა) სპეციფიკურ საფეხურს. იგი, ფაქტიურად, პოსტ-ალბერსის გაფართოებული სქემაა ფოსფოფერმენტის ორი ფორმითა (E_1P და E_2P) და ოკლუდირებული K^+-ფორმით. სქემა შედგება ათი ცალკეული საფეხურისაგან (ხუთი E_1 და ხუთი E_2; ხუთი ფოსფორილირებული და ხუთი დეფოსფორილირებული). კარლიშის სქემამ აჩვენა თითოეულ სუბერთეულზე მაღალი და დაბალი თვისობის უბნების არსებობა, თუმცა ვერ ხსნის, თუ როგორ ფუნქციონირებენ აქტიური ცენტრები - ერთმანეთისაგან დამოუკიდებლად, თუ შეთანხმებით; ამ სქემის ძირითადი უპასუხო კითხვაა: შესაძლებელია თუ არა ორივე სუბერთეულის ერთ და იგივე მდგომარეობაში (E_1/ E_1 ან E_2/E_2) ყოფნა.

Na,K-ATPაზური სისტემის მოლეკულური მქანიზმის ასახსნელად შედარებით სრულყოფილი კინეტიკური სქემა მოწოდებულია პლესნერის მიერ [38]:

სქემა 3.



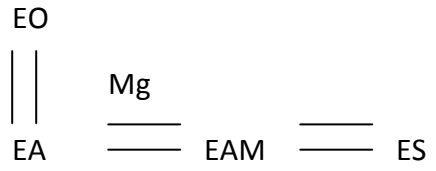
ამ სქემის მიხედვით, ფერმენტის მოლეკულას გააჩნია მხოლოდ ერთი სუბსტრატული უბანი, რომლის თვისობა სუბსტრატის მიმართ განისაზღვრება ცილის კონფორმაციული მდგომარეობით. ამ შემთხვევაში განიხილება Na,K-ATPაზას მონომერული ფორმა, რომელიც პასუხისმგებელია Na,K-ATPაზას ყველა გამოვლინებაზე, მათ შორის ტრანსპორტულ ფუნქციაზეც.

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

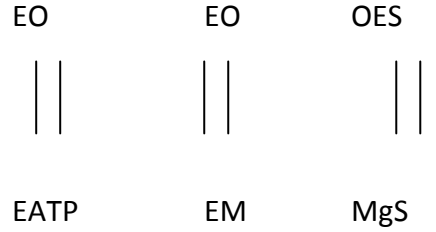
პლესნერის დამსახურება შემდეგშია:

1) მან მკაცრად დაამტკიცა, რომ სუბსტრატი არის Mg-ATP-ის კომპლექსი და არა ATP;

2) სუბსტრატის აწყობა შესაძლებელია მოხდეს ფერმენტულ სისტემაზე, მაგრამ ამისათვის აუცილებელია ჯერ ATP-ის და შემდეგ Mg^{++}-ის დაკავშირება;



3) აღმოაჩინა ჩიხები:



4) დაამტკიცა 0-ATPაზას არსებობა.

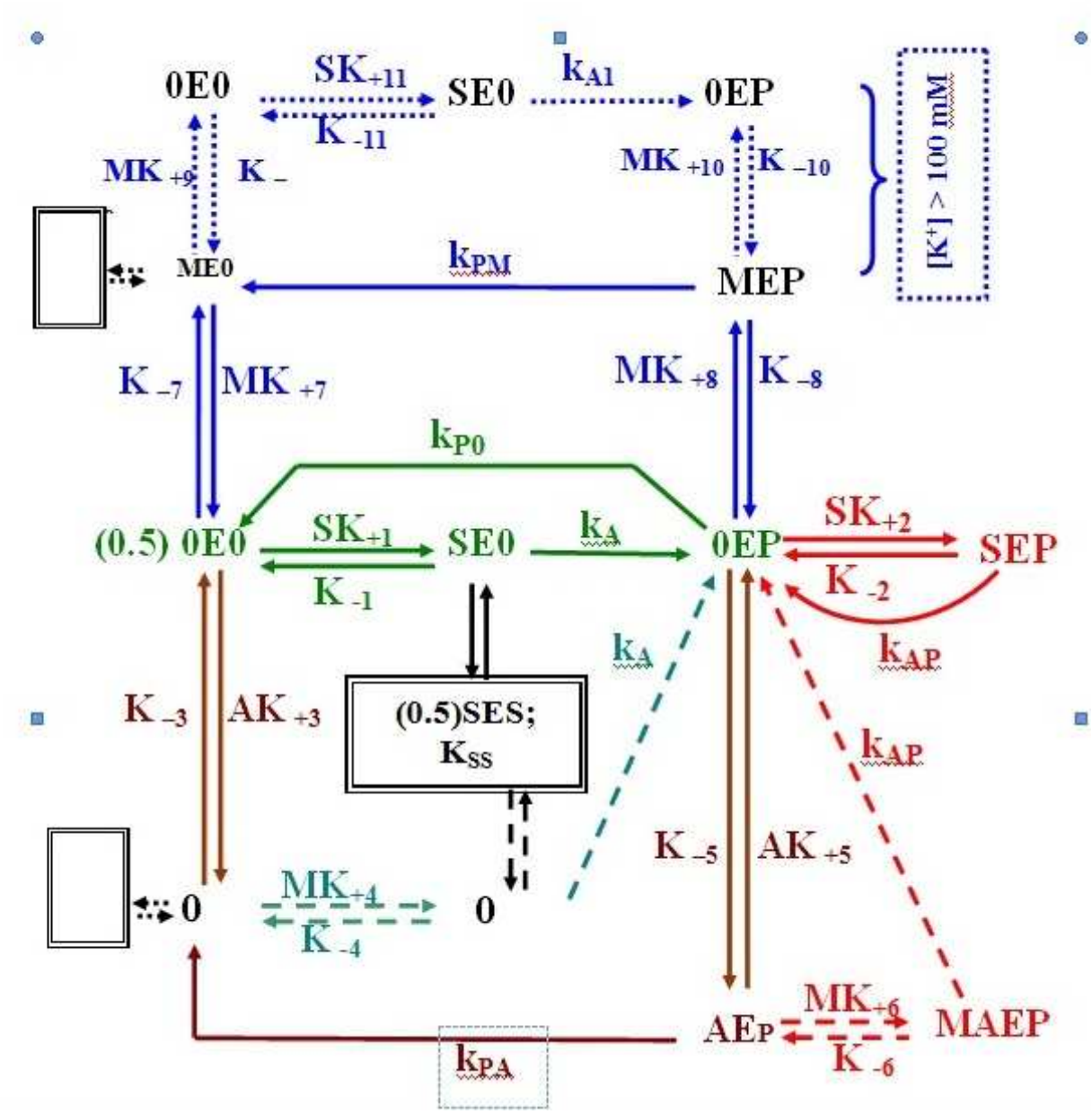
ყველაზე სრულყოფილ კინეტიკურ სქემას წარმოადგენს ქომეთიანის მიერ მოწოდებული კინეტიკური სქემა, რომელიც ემყარება როგორც სადღეისოდ არსებულ ლიტერატურულ მონაცემებს, ისე იმ ექსპერიმენტებს, რომელიც მიღებულია მის მიერვე დამუშავებული კინეტიკური მრუდების გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდით. სქემა აკმაყოფილებს ლიტერატურაში არსებულ თეორიულ მოსაზრებებს, ხსნის ამ საკითხზე არსებულ ყველა ექსპერიმენტულ ფაქტს და მოიცავს Na,K-ATPაზას ყველა შესაძლო რეჟიმს [39].

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

ამ სქემაში, ადრე არსებული ყველა სქემისაგან განსხვავებით, იგულისხმება ის კონფორმაციული ცვლილებებიც, რომელიც გამოწვეულია ამ ლიგანდების მოქმედებით. სქემა უშვებს Na,K-ATPაზას მიერ ATP-ის ჰიდროლიზს Na^+ და K^+ იონების არარსებობისას. სუბსტრატის დაბალი კონცენტრაციებისათვის (s<1mM) *υ=f(s)* დამოკიდებულება დეტალურად არის შესწავლილი პლესნერის მიერ [38]. ამ ფარგალში ქომეთიანის მონაცემები ემთხვევა პლესნერის მონაცემებს და, შესაბამისად, მის მოდელს. თუმცა, მაღალ კონცენტრაციებში ფიქსირებული [M]-ის დროს *υ=f(s)* დამოკიდებულებას აქვს არასწორხაზოვანი დამოკიდებულება და არ ეთანხმება პლესნერის "მინიმალურ მოდელს", რომლის თანახმადაც, ფიქსირებული [M]-ის დროს შებრუნებულ სიდიდეებში სწორხაზოვნება სუბსტრატის მაღალ კონცენტრაციებშიც უნდა შენარჩუნდეს.

ამრიგად, ექსპერიმენტულმა გამოკვლევებმა აჩვენა პლესნერის მოდელის გაფართოებისა და ზოგიერთი ფორმის დამატების აუცილებლობა, რათა ახსნილიყო ექსპერიმენტული მონაცემებით მიღებული შესაბამისი თეორიული *υ=f(s)* დამოკიდებულება. *υ=f(S, A, M)* დამოკიდებულების თეორიული ანალიზითა და მისი ექსპერიმენტთან შედარებით შეიქმნა სქემა, რომელიც მიღებულია როგორც პრინციპიალური სქემა [39]. (სქემა 3).

ამ სქემაზე OEO აღნიშნავს ფერმენტის ფორმას, როდესაც არცერთი ნუკლეოტიდამაკავშირებელი უბანი არ არის დაკავებული (E-ში იგულისხმება ფერმენტის ფუნქციონალური რგოლი). სქემის მთავარი დამახასიათებელია მასში კატალიზის უნარის მქონე ფოსფორილირებული ინტერმედიატების - MEP, SEP და AEP არსებობა, რომელთაც შეუძლიათ დეფოსფორილირება. ამით ხაზი ესმება თავისუფალი Mg^{++} და თავისუფალი ATP-ის როლს, რომლებსაც აქვთ უნარი გადაიყვანონ სისტემა სუბსტრატის – Mg-ATP-ის ჰიდროლიზის ძირითადი გზიდან დამატებით ვარიანტებზე. ეს გადაყვანა დამოკიდებულია ლიგანდების – [A] და [M] შეფარდებაზე.



S << 1 mM **S >> 1 mM**

M ≡ [Mg^{++}[, A ≡ [ATP$_f$], S ≡ [MgATP]

სქემა 4. Na,K-ATPაზური სისტემის მინიმალური მოდელი

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

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

1)როდესაც [M]>>[A] (ზედა გზა, $k_A k_{pm}$); OPM რეჟიმი

2) [M]≈ [A] (შუა გზა, $k_A k_{ps}$); OPS რეჟიმი

3) [A] >>[M] (ქვედა გზა, $k_A k_{pA}$); OPA რეჟიმი

ამ სქემის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი უპირატესობა მდგომარეობს იმაში, რომ შეიცავს ფერმენტის ისეთ დამატებით ფორმებს, რომელნიც მგრძნობიარე არიან Mg^{++} და ATP-ის მიმართ, რაც *υ=f(S, A, M)* ფუნქციის არასწორხაზოვნების ახსნის საშუალებას იძლევა ცვლადების ფიქსირებისა და ვარირების სხვადასხვა პირობებში. ნაჩვენებია, რომ ეს ფორმები განსხვავდებიან Na^+ და K^+ იონების დაკავშირების უბნების რიცხვით და შესაბამისად, არსებობს რეაქციათა სხვადასხვა ციკლები სხვადასხვა ენდოგენურობის კოეფიციენტით. [Mg^{++}] სიჭარბისას ფერმენტულ სისტემას შეუძლია იმუშაოს იონთა გადატანის რეჟიმით: $4Na^+$:$1K^+$ და $4Na^+$:$0K^+$ უჯრედგარე არეში K^+-ის სიჭარბისას ([K^+]>100mM), ან ასევე $3Na^+$:$1K^+$ და $3Na^+$:$0K^+$ უჯრედგარე არეში K^+-ის ნაკლებობისას ([K^+]<100mM).

ამრიგად საბოლოოდ უნდა ითქვას, რომ ქომეთიანის მიერ შემოთავაზებული Na,K-ATPაზური სისტემის მუშაობის ამსახველი კინეტიკური სქემა (სქემა 3) ყველაზე უფრო მიახლოებულია Na,K-ATPაზას ჭეშმარიტ მოლეკულურ მექანიზმთან.

1. 5. Ecto-ATPაზა

გასული საუკუნის მეორე ნახევარში ცნობილი გახდა ისეთი ფერმენტების არსებობის შესახებ, რომლებთაც აქვთ ექსტრაუჯრედული ATP-ის ჰიდროლიზის უნარი. მკვლევარები სკეპტიციზმით უყურებდნენ უჯრედის მემბრანის გარეთ ATP-ის დაკავშირების უბნის არსებობას და ფიქრობდნენ, რომ ATP მკაცრად შიდაუჯრედულია. შემდგომმა გამოკვლევამ ნათელი გახადა ამ ATP-აზების (მათ უწოდეს ecto-ATPაზები) არსებობა და გამოიკვეთა მათი საერთო დამახასიათებელი ნიშნები: 1) აქტივაცია ორვალენტიანი კათიონებით და ზოგიერთი ანიონით, 2) არ არიან მგრძნობიარე P, F და V ტიპის ATP-აზების ინჰიბიტორების მიმართ, 3) აქვთ უნარი ჰიდროლიზი გაუკეთონ ნუკლეოტიდ ტრი, დი და მონოფოსფატებს.

ამ თვისებების გათვალისწინებით შემოღებული იქნა ახალი ტერმინი E-ტიპის ATPაზები, რომელიც აერთიანებს ყველა იმ ფერმენტულ სისტემას, რომელსაც ახასიათებს ზემოთ ჩამოთვლილი ნიშნები. ამრიგად ecto-ATPაზები გვევლინებიან E-ტიპის ATPაზების წარმომადგენლებად. ამ ტიპის ATP-აზების კვლევის სიახლის გამო ჯერ კიდევ ბევრი კითხვის ნიშანი არსებობს. ნომენკლატურის თვალსაზრისით, E-ტიპის ATPაზები აერთიანებს ecto-ATPაზებს (ჰიდროლიზს უკეთებენ ATP-ს ADP-მდე), ecto-აპირაზებს (გარდაქმნიან ATP-ს და ADP –ს AMP-მდე), ecto-5 –ნუკლეოტიდაზებს (გარდაქმნიან AMP-ს ადენოზინამდე). სტრუქტურის თაობაზე მიღწეულ იქნა შეთანხმება, რომ მთლიანი ფილოგენეზური ხის ორგანიზმების E-ტიპის ATPაზების სტრუქტურა მსგავსია. ხერხემლიანების ecto-ATPაზები წარმოდგენილია 50-60KDa ცილით, რომელიც სხვადასხვა უჯრედებში სხვადასხვა ხარისხითაა გლიკოზირილებული და წარმოადგენს ჰომოოლიგომერს 2-3 მონომერით.

ვარაუდობენ, რომ ecto-ATPაზა, შესაძლოა, მნიშვნელოვან როლს თამაშობდეს სინაფსური გადაცემის რეგულაციაში. არის მონაცემები ecto-ATPაზების შესაძლო როლზე ლიმფოციტების ფუნქციონირებაში, თირკმლის დაავადებებში, ეპილეფსიასა და სიმსივნურ პროცესებში. [40, 41, 42, 43].

E-ტიპის ATPაზების შესწავლის სფეროში ყველაზე სუსტი წერტილია აღნიშნული ATPაზების მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი (იგულისხმება ფერმენტული სისტემის სუბსტრატის, მოდიფიკატორების ტიპის და რიცხვის დადგენა, ფერმენტის მუშაობის კინეტიკური სქემის შექმნა) რომლის შესახებაც არაფერი არა არის ცნობილი. სწორედ მოლეკულური მექანიზმის ცოდნაა მათი ფუნქციონალური როლის უკეთ შესწავლის საწინდარი.

1. 6. Cl-ის ფიზიოლოგიური როლი და Cl-ATPაზა

ქლორი აქტიური ნივთიერებაა, მას შეუძლია შეუერთდეს ბუნებაში არსებულ თითქმის ყველა ელემენტს და გვხვდება მხოლოდ შენაერთის სახით (ყველაზე ხშირად NaCl-ის სახით). ნატრიუმის ქლორიდი არის ქლორის ბუნებრივი წყარო. ეს ელემენტი შედის კუჭის წვენის შემადგენლობაში და აგრეთვე იმ პრეპარატებში, რომლებიც გამოიყენება კუჭ-ნაწლავის დაავადებების სამკურნალოდ.

თუ გავითვალისწინებთ Cl^--ის Na^+-თან კავშირს, უნდა აღინიშნოს, რომ ორგანიზმში ამ ორი ელემენტის მოხვედრა მჭიდროდაა დაკავშირებული ერთმანეთთან. მოზრდილი ადამიანის ორგანიზმში არის დაახლოებით 100 გრამი Cl^- (0,14% ორგანიზმის მასის).

Cl^--ის იონი თამაშობს მნიშვნელოვან ბიოლოგიურ როლს ორგანიზმში. მაგალითად:

1) Cl^--ის იონი მონაწილეობს ოსმოსურ წონასწორობაში, რადგან ის არის ორგანიზმის ძირითადი არაუჯრედული ანიონი;

2) GABA-ის (გამა-ამინოერბომჟავა) მოქმედებისას (ГАМК-დამამუხრუჭებელი მედიატორი, მისი მოქმედების მექანიზმი შემდეგია: დამამუხრუჭებელი ნეირონის გაღიზიანებისას იზრდება პოსტსინპსური მემბრანის გამტარობა Cl^--ის იონისათვის. Cl^--ის მცირე რაოდენობის გასვლაც კი ახდენს პოსტსინაპსური მემბრანის ჰიპერპოლარიზაციას, შედეგად ამაგზნებელი სიგნალი ვერ აღწევს ზღურბლის დონეს.), Cl^--ის იონები ახდენენ დამამუხრუჭებელ ეფექტს ნეირონებზე, მოქმედების პოტენციალის შემცირების გზით;

3) ქმნიან ხელსაყრელ არეს კუჭის წვენის ფერმენტების მოქმედებისათვის;

4) ააქტივებენ ფერმენტების მთელ რიგს.

Cl^--ის იონს აქვს ოპტიმალური რადიუსი, იმისათვის, რომ შევიდეს უჯრედის მემბრანაში. სწორედ ამით აიხსნება მისი მონაწილეობა Na^+-სა და K^+-ის იონებთან ერთად ოსმოსური წნევის შექმნასა და წყლისა და მარილის ცვლის რეგულაციაში.

ადამიანის მინიმალური მოთხოვნილება Cl^--ის მიმართ შეადგენს 800 მგ. საიდანაც უჯრედში აკუმულირდება 10-15%, აქედან 1/3-დან - 1/2-მდე ერითროციტებში, 85% კი-უჯრედშორის სივრცეში. Cl^- გროვდება ვისცერალურ ქსოვილებში, კანსა და ჩონჩხის კუნთებში. ის შეიწოვება მსხვილი ნაწლავით. მისი შეწოვა და ექსკრეცია მჭიდროდაა დაკავშირებული ნატრიუმის და ბიკარბონატის იონებთან და მცირედ უკავშირდება მინერალოკორტიკოიდებს და Na/K-ATP-აზის აქტიობას.

Cl^--ის ძირითადი ნაწილი ორგანიზმიდან გამოიყოფა შარდთან ერთად (90-95%), განავალით (4-8%) და კანის მეშვეობით (2%მდე). Cl^--ის ექსკრეცია დაკავშირებულია K^+-თან, Na^+-თან და HCO_3^--თან (ტუტემჟავური ბალანსი). ქლორის არხები წარმოდგენილია ბევრი ტიპის უჯრედებში: მიტოქონდრიულ მემბრანებში და ჩონჩხის კუნთებში, ეს არხები ასრულებენ მნიშვნელოვან ფუნქციებს სითხის

მოცულობის რეგულაციაში, იონების ტრანსეპითელიალურ ტრანსპორტში და მემბრანული პოტენციალის სტაბილიზაციაში, მონაწილეობენ უჯრედული pH-ის შენარჩუნებაში.

შედარებით ცუდადაა შესწავლილი Cl^--ის მონაწილეობით გამოწვეული ცალკეული პათოლოგიები. არ არის შესწავლილი ადამიანის მიერ Cl^--ის დღეღამური მოთხოვნილების ნორმაც კი. Cl^--ის დეფიციტისას ადამიანებში აღინიშნება ალკალოზი (ორგანიზმის ტუტე-მჟავური წონასწორობის დარღვევა), ანორექსია (მადის დაკარგვა) და ყაბზობა. კლინიკურმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ ქლორი არის ჰორმონალური (რენინ-ანგიოტენზინ-ალდოსტერონის) სისტემის რეგულატორი და ასრულებს პათოგენეტიკური დეტერმინანტების "ნატრი-დამიკიდებული" ჰიპერტენზიის როლს, როგორც შიგაუჯრედული სითხის მოცულობის რღვევის, ტუტე-მჟავური ბალანსის და ჰომეოსტაზის პათოგენეტიკური ფაქტორი. დადგენილია, რომ ბავშვებს, რომლებიც დიდი ხნის განმავლობაში იკვებებოდნენ Cl-ით ღარიბი საბავშვო საკვებით, უნვითარდებოდათ ჰოპოკალიემიის სიმპტომი.

ცხოველებში შესწავლამ აჩვენა, რომ Cl^--ის დეფიციტი იწვევს ზრდის შეჩერებას, გაუწყლოებას, მადის შემცირებას, სისხლში ქლორის დონის შემცირებას და ბიკარბონატის დონის ზრდას. ხმოვანი გამღიზიანებლის მოქმედება და Cl^--ის დეფიციტი ვირთაგვებში ადვილად იწვევს ტეტანიას.

აუცილებელია შენარჩუნებული იქნას ორგანიზმში ქლორისა და ნატრიუმის შემცველობის პროპორციის დაცვა (1:2). მოზრდილებში ქლორის დღეღამური ბრუნვა შეადგენს 85-250 მილი მოლს. ქლორის პასიური ტრანსპორტი მემბრანაში ხორციელდება სპეციფიური ქლორის არხებით [44].

სავარაუდოდ ლიტერატურაში ცნობილია პლაზმურ მემბრანაში ქლორის ტრანსპორტის სამი სახე: ანიონთან HCO_3^- შეუღლებული ანტიპორტი, Na^+-თან შეუღლებული სიმპორტი და ელექტროქიმიური პროცესი [45]. ქლორი ტრანსპორტირდება მემბრანის შიგნითა მხრიდან გარეთ კონცენტრაციული გრადიენტის საწინააღმდეგოდ. ანიონ დამოკიდებული ტრანსპორტი ითვლება ბიოლოგიურ აქტიურ ტრანსპორტად, იონურ საქაჩავად (ტუმბოდ) [46, 47].

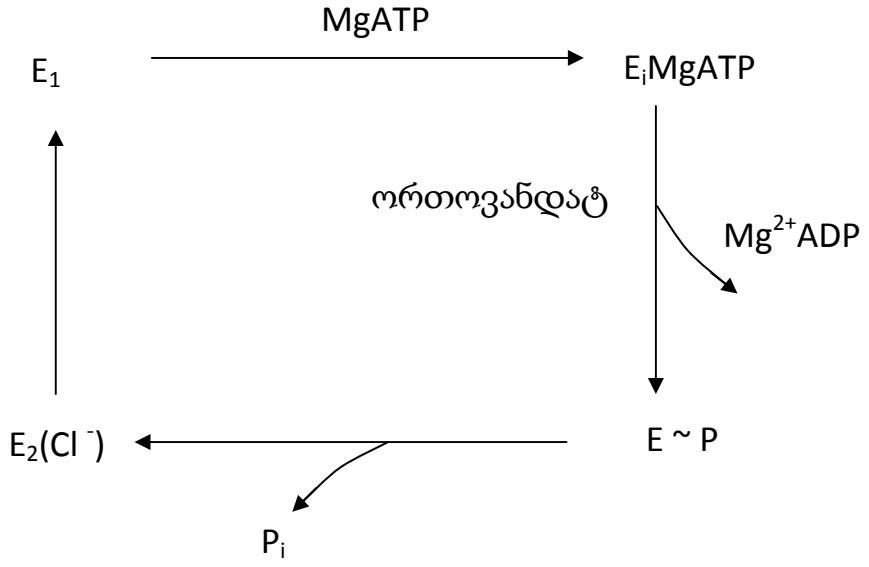
არსებობს მთელი რიგი ლიტერატურული მონაცემებისა Cl^--ით აქტივირებული ATPაზების შესახებ.

ზოგიერთ ორგანოში, როგორიცაა Aplysia Californica-ს [48] და გომბეშოს (Bufo Bufo) წინა ნაწლავის ეპითელური ქსოვილის ბაზოლატერალური მემბრანა [49, 50], მტკნარი წყლის გველთევზას ფარფლის მემბრანული ფრაქცია [51], Aplysia-ს ვეზიკულების პლაზმური მემბრანა და ვირთაგვას პანკრეასული მილაკები [52], ვირთაგვას თავის ტვინის მემბრანული ვეზიკულები [53] Cl^--ის იონებით გამოწვეული აქტივაცია Cl^--ATPაზურ რეაქციად არის მიჩნეული, რომელიც უნდა მონაწილეობდეს Cl^--ის აქტიურ ტრანსპორტში. უკანასკნელი წლების ლიტერატურული მონაცემებით არ გამორიცხავენ, რომ Cl^--ATPაზა შესაძლებელია წარმოადგენდეს მემბრანის გარეთა ზედაპირზე მიმართულ Cl^--ის ტრანსლოკაციურ ელექტროგენურ სისტემას („Cl^--ის საქაჩავი” ანუ ტუმბო).

Aplysia-ს უჯრედებში ელექტროფიზიოლოგიური მეთოდებით შესწავლილია Cl^--ის ტრანსპორტის თვისებები და სავარაუდო ელექრტოგენური Cl^--ის ტუმბო. ის მსგავსია სხვა იონგადამტანი ტუმბოებისა, რაც დამახასიათებელია P ტიპის ATP-აზებისათვის [49].

ზოგი ავტორი Cl^--ის მატრანსპორტირებელ სისტემას ყოფს ორ ნაწილად: Cl^--ით სტიმულირებული ATP-აზური აქტიობა და ATP დამოკიდებული Cl^- -ის აქტიური ტრანსპორტი. ნაჩვენებია, რომ ორთოვანადატი (P ტიპის ATP-აზების სპეციფიური ინჰიბიტორი) ინჰიბირებს ორივე სისტემას. ასევე ნაჩვენები იქნა, რომ ორივე - Cl^--ით სტიმულირებული ATP-აზური აქტიობა და ATP დამოკიდებული Cl^--ის ტრანსპორტი ემსახურება ერთი და იგივე სატრანსპორტო მექანიზმს [49].

ნავარაუდევია, რომ Mg–ის იონები განსაზღვრავენ ფოსფორილირებას. Cl^--ის კონცენტრაციის ზრდა ამცირებს ფოსფოპროტეინების დონეს. Cl^- პასუხისმგებელია დეფოსფორილირებაში ენზიმური რეაქციის თანმიმდევრობით მიმდინარეობაზე. Cl^--ის 10mM-მდე კონცენტრაციის მატება მაქსიმალურად ზრდის დეფოსფორილირების სტადიას (სქემა 5).



სქემა 5.

ორთოვანადატი ინჰიბირებს ფოსფოპროტეინის ფორმირებას, ის მიუთითებს ენზიმში ფოსფორილირებული ადგილის არსებობაზე. ასევე ინჰიბირებს Cl^--ით სტიმულირებულ ATP-აზას აქტიობას, ATP დამოკიდებულ Cl^--ის ტრანსპორტს და ATP-ით გამოწვეულ ენზიმის ფოსფორილირებას (სქემა 5) [49].

Cl^--ATP-აზის A-520 kDa პროტეინის კომპლქსი გამოყოფილი იქნა ვირთაგვას თავის ტვინიდან. ის შეიცავს 4 პროტეინულ სუბერთეულს (51, 55, 60 და 62 kDa).

51 kDa-იანი პროტეინი წარმოდგენილია, როგორც კოვალენტური ფოსფოენზიმის სუბერათეული. Cl^--ATP-აზის კატალიზური უბანი შეადგენს 100 kDa, მსგავსად P ტიპის ATPაზებისა [54].

EDTA-თი დამუშავებული მიკროსომები, გამოყოფილი ვირთაგვას თავის ტვინიდან, ძირითადად შეიცავს 200-500 ნმ დიამეტრის მემბრანულ ვეზიკულებს, რომლბიც მდიდარია Cl^--ით და Na/K-ATP-აზით [55]. ATP-დამოკიდებული Cl^--ის შეწოვა ხორციელდება Cl-ის კონცენტრაციის გაზრდისას Km=7,4mM. ეს პროცესი დამოკიდებულია იყო არეში pH-ის მნიშვნელობაზე - 7,4 და ტემპერატურაზე - 37-42^{0}C [53].

ეტაკრინის მჟავა სპეციფიურად დამოუკიდებლად ინჰიბირებს ATP-დამოკიდებული Cl^--ის შეწოვას (57μM). N-ეთილმალეიმიდი (0,1 mM) და Na-ვანადატი (1 mM) კი ნაწილობრივ ინჰიბირებენ. ეს პროცესი ამყარებს აზრს, რომ Cl^- -ATP-აზა ტვინში აქტიურად ტრანსპორტირებს Cl^--ის იონს. Na/K/Cl-კოტრანსპორტის ინჰიბიტორი, ფუროსემიდი (0,1 mM), ამცირებს Cl^--ის კონცენტრაციას [53, 56, 58].

Cl^--ATP-აზას აქტიობა ნანახია ჩანასახოვან, ნეონატალურ და მოწიფულ ვირთაგვებში. ის სწრაფად იზრდება პოსტნატალური პერიოდის მე-20 დღიდან [59]. ქლორის საქაჩავის მოქმედების თანმიმდევრობა შემდეგია: ფოსფორილირება Mg^{2+}-ით და დეფოსფორილირება Cl^--ით. სტექიომეტრია არის ასეთი: 1ATP : 1Cl, Mg^{2+}, pH 7,8 [60].

შესწავლილია ფოსფოლიპაზას ეფექტი მიკროსომულ Cl^--ATP-აზაზე ვირთაგვას თავის ტვინში. ფოსფოლიპაზა A2 და ფოსფოლიპაზა C Cl^--ATP-აზურ აქტიობას, აგრეთვე Na,K-ATPაზას ამცირებენ 8-50%ით, მაგრამ Mg-ATPაზა არ იცვლება. Cl^--ATP-აზა საჭიროებს ინაქტური მემბრანების ლიპიდებს, განსაკუთრებით ფოსფატიდილ ინოზიტოლს, რომლის თანაობისას აქვს მაქსიმალური აქტიობა [61].

Cl^-ის კონცენტრაცია პერიკარიუმში უპრო დაბალია, ვიდრე დენდრიტებში. Cl^-ის საქაჩავის ინჰიბიტორი – ეტაკრინის მჟავა ზრდის პერიკარიუმის Cl^-ის შემცველობას, მაგრამ არა დენდრიტებისას. ფუროსემიდი და ბუმეტანილი იწვევენ Cl^-ის შემცირებას, ინჰიბირებენ რა $Na^+/K^+/2Cl^-$ კოტრანსპორტს, უმეტესად დენდრიტში. ეს მონაცემები აჩვენებს, რომ Cl^-ის განაწილება დამოკიდებულია გადამტანის ლოკალიზაციის სპეციფიურობაზე [62].

Cl^-/HCO_3^-ATPაზის აქტიობა მგრძნობიარეა ქლორის ტრანსპორტის ინჰიბიტორების მიმართ (ეტაკრინის მჟავა და ფუროსემიდი) [63].

Cl-ATPაზის და Na,K-ATPაზის ენზიმური აქტიობა და პროტეინული დონე შესწავლილი იქნა ალცჰეიმერის დაავადებსას. Cl-ATPაზა და Na,K-ATPაზას აქტიობები შემცირებულია ალცჰეიმერის დაავადებით დაავადებულ ტვინში. ამ დროს შეიძლება შემცირდეს Na^+, K^+ და Cl^- გრადიენტი უჯრედის მემბრანის გასწვრივ, რაც იწვევს ნეირონულ სიკვდილს [64, 65].

ალცჰეიმერის დაავადებით დაავადებულ პაციენტთა ტვინში, სადაც ფოსფატიდილინოზიტოლ-4-კინაზის აქტიობა შემცირებულია, Cl-ATPაზას აქტიობაც მცირდება ანუ Cl-ATPაზას აქტიობა რეგულირდება ფოსფატიდილინოზიტოლ- 4 –მონოფოსფატით. ფერმენტის აქტიობის ცვლილება იწვევს ადამიანის ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებს [54, 56].

Cl-ATPაზა [EC 3. 6. 3. 11] არის ფერმენტი, რომელიც აკატალიზებს რეაქციას: $ATP+H_2O+Cl_{out}=ATP+P_i+Cl_{in}$ [66, 67].

ამგვარად, ლიტერატურული მონაცემებით დაფიქსირებულია Cl^--ATP-აზის კატალიზურ უბანში ფოსფორილირებული ინტერმედიატის არსებობა. Cl^--ATP-აზა ფოსფორილირდება Mg-ით და დეფოსფორილირდება Cl^--ით, მსგავსად კათიონტრანსპორტირებადი P- ტიპის ATP-აზებისა [49].

1. 7. HCO_3^--ის ფიზიოლოგიური როლი და Mg^{2+}-HCO_3^--ATPაზა

ბიკარბონატი არის სასიცოცხლო ტუტე კომპონენტი, რომელიც ინარჩუნებს ადამიანის ორგანიზმის ბუფერული სისტემის ტუტე-მჟავურ ჰომეოსტაზს - pH-ს. ორგანიზმში CO_2-ის 70-75% გარდაიქმნება ნახშირმჟავად (H_2CO_3) და სწრაფად - ბიკარბონატად (HCO_3^-). ნახშირმჟავასთან ერთად, როგორც ცენტრალური ინტერმედიატის ნაირსახეობა, ბიკარბონატი და წყალი წარმოქმნის ბუფერულ სისტემას, რომელიც ინარჩუნებს საჭირო წონასწორობას და უწევს სწრაფ წინააღმდეგობას pH-ფაქტორის ძლიერ ცვლილებებს, როგორც მჟავა, ასევე ტუტე მიმართულებით. ეს ძალიან მნიშვნელოვანია ცენტრალური ნერვული სისტემის ქსოვილების დასაცავად, სადაც pH-ის ცვლილება ნებიემიერი მიმართულებით შეიძლება დამღუპველი აღმოჩნდეს [68, 69].

არაორგანულ ანიონებს შორის HCO_3^- წარმოადგენს ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ფიზიოლოგიურად მოქმედ, კატალიზური ფუნქციის მატარებელ ანიონს. ATPაზას, რომელიც აქტივდება HCO_3ით და საჭიროებს Mg^2-ის იონებს, იწოდება Mg-დამოკიდებული, HCO_3-ით სტიმულირებული ATPაზა ($MgHCO_3$-ATPაზა, E.C. 3. 6. 1. 3) [70].

HCO_3-ATPაზური აქტიობა ასოცირდება როგორც ტუტე ფოსფატაზა. ტუტე ფოსფატაზა შეიცავს Zn და წარმოადგენს მეტალოპროტეინს. EDTA ინჰიბირებს ფერმენტს Zn-ის დაკავშირების გამო აქტიურ ცენტრში. ნანახია, რომ HCO_3-ატფაზა და ტუტე ფოსფატაზა ინჰიბირდება EDTA-ს დამატებით Mg-ის თანდასწრებისას. EDTA ინჰიბირებს ორივე ფერმენტს და ეს ინჰიბიცია ორივე შემთხვევაში დაკავშირებულია Zn-ის შემცველობასთან [71].

ანიონურ ATPაზებს შორის გავრცელებულ ფერმენტად ითვლება ბიკარბონატის იონებით აქტივირებული MgATPაზა. $MgHCO_3$-ATPაზა ჰიდროლიზური ფერმენტია. ის გვხვდება სხვადასხვა ცხოველთა კუჭქვეშა ჯირკვლის ლორწოვანაში [72], ძაღლის ყბისქვეშა ჯირკვალში [73], ღვიძლში [74], ცხოველური უჯრედების მიტოქონდრიებში, მცენარეთა მიტოქონდრიებსა და ქლოროპლასტებში, აგრეთვე უჯრედის მემბრანასა და ბაქტერიების ქრომატოფორებში [75, 76, 77]. უფრო მოგვიანებით აღმოჩენილია ცხოველებისა და მცენარეების პლაზმურ მემბრანებში. ამ ATPაზის აქტიობის განსაზარვრით სხვადასხვა ქსოვილებში, კერძოდ გული, თავის ტვინი, ღვიძლი, თირკმელები, დიაფრაგმა, კუჭის ლორწოვანი და ერითროციტის მემბრანები, ნაჩვენები იქნა, რომ ყველაზე დიდი რაოდენობით ეს ფერმენტი არის გულსა და დიაფრაგმაშიდა საერთოდ სეკრეტორულ ქსოვილებში, ხოლო ყველაზე მცირე რაოდენობით ერითროციტების მემბრანასა და თავის ტვინში. ფერმენტის აქტიურობა არეში HCO_3 იონის შეტანით იზრდება [78]. ნავარაუდევია ამ ფერმენტის მონაწილეობა მემბრანაში ბიკარბონატის იონების აქტიური ტრანსპორტის პროცესში და pH-ის რეგულაციში.

ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილში შესწავლილია Mg^{2+}-დამოკიდებული, HCO_3^--ით სტიმულირებული ATP-აზას არსებობა. დადგენილია ფერმენტის განაწილება ჯირკვლის ქსოვილის სუბუჯრედულ ფრაქციებში,

კორელაცია ფარისებრი ჯირკვლის სხვადასხვა პათოლოგიასა და HCO_3^--ATP-აზას აქტივობას შორის. ნანახია, რომ პათოლოგიების შემთხვევაში ჯირკვლის სუბუჯრედულ სტრუქტურებში ადგილი აქვს HCO_3^--ATP-აზური აქტივობის ცვლილებას. ფერმენტის კინეტიკური პარამეტრების (V_{max}, K_m) შესწავლით დადგენილია, რომ სხვადასხვა პათოლოგიისას აღინიშნება როგორც ფერმენტის აქტივობის, ასევე HCO_3^--იონისადმი მისი თვისების შეცვლაც, რაც, სავარაუდოდ, განპირობებული უნდა იყოს ჯირკვლის ქსოვილში მიმდინარე პათოლოგიური ცვლილებით [79, 80].

შესწავლილია გალაქტოზო და ინოზიტსპეციფიური ლექტინების გავლენა HCO_3^-- ATP-აზურ აქტივობაზე ქათმის თავის ტვინის გლიის უჯრედებზე. აღმოჩნდა, რომ HCO_3^-- ATP-აზური აქტიობა დამოკიდებულია ლექტინების კონცენტრაციის ცვლილებაზე [81].

ლიტერატურაში $MgHCO_3$-ATPაზას მოლეკულური მექანიზმი არ არის დადგენილი. მემბრანოლოგიის ლაბორატორიაში შემუშავებული თანამედროვე კინეტიკური მეთოდი საფუძველს იძლეოდა შეგვესწავლა ფერმენტის კინეტიკური მახასიათებლები და შეგვექმნა მისი მინიმალური მოდელი.

1. 8. ნერვული დაბოლოების ანიონური არხები

არსებობს მონაცემები ქლორის პასიურ ტრანსპორტზეც, რომელიც ხორციელდება ქლორის არხებით. ისინი ლოკალიზებულია ცხოველური უჯრედების როგორც პლაზმურ, ასევე შიდაუჯრედული ორგანელების მემბრანებზე. ამ არხების საშუალებით ხორციელდება ანიონების გადანაცვლება მემბრანის გარე ზედაპირიდან უჯრედის შიგნით კონცენტრაციული გრადიენტის მიმართულებით. Cl^--ის იონები მემბრანაში გადიან ძალინ ნელა. მცირე რაოდენობით Cl^--ის გადასვლა იწვევს პოსტსინაფსური მემბრანის ჰიპერპოლარიზაციას.

ქლორის არხები ასრულებენ მთავარ როლს შიდაუჯრედული pH-ის, უჯრედის მოცულობის, ნერვის აგზნებადობის რეგულაციაში და მოსვენების პოტენციალის განსაზღვრაში. ქლორის არხები ნანახია სინაპსურ ვეზიკულებში, მიტოქონდრიებში, მიკროსომებში და სხვა შიდაუჯრედულ ორგანელებში. რესინაპსის ზედაპირულ მემბრანაზე ნანახია სამი ტიპის ქლორის არხი:

1. ლიგანდ დამოკიდებული ქლორის არხები, რომელთაც შეადგენს გამა-ამონო ერბომჟავა (GABA) და გლიცინით რეგულირებადი ქლორის არხები; ლიგანდდამოკიდებული ქლორის არხები მიეკუთვნება არხების ფართო ოჯახს – ნიკოტინურ, გლიცინ და GABA რეცეპტორის არხებს. ფუნქციურად აქტიური არხი შედგება ხუთი ჰომოლოგიური მემბრანის გამჭოლი სუბერთეულისაგან, რომლებიც ქმნიან იონის გამტარ არხს.

2. Ca^{2+} დამოკიდებული ან Ca^{2+}-ით აქტივირებულიქლორის არხები. ნაჩვენებია, რომ უჯრედების უმეტესობაში აღნიშნული არხებით მიღებული ქლორის ნაკადი მონაწილეობს უჯრედის მოცულობის რეგულაციაში. ნეირონებში ამ არხების აქტივაცია იწვევს აქსონის აგზნებადობის და ტრანსმიტერის გაყოფის შემცირებას.

3. პოტენციალ-დამოკიდებული ქლორის არხები, ნანახია *Torpedo*-ს ელექტრულ ორგანოში [82].

ბევრი ქლორის არხი ასევე ტრანსპორტირებს HCO_3^- ანიონს [83].

1. 9. ანიონების განაწილება უჯრედში

ლიტერატურული მონაცემებით HCO_3^- და Cl^- ბევრად მეტია უჯრედგარე სივრცეში ვიდრე უჯრედის შიგნით. ამ ანიონების შიგაუჯრედული კონცენტრაცია ბევრად მცირეა, ვიდრე ეს მოსალოდნელი იყო პასიური განაწილებისაგან [62]. სწორედ ეს გრადიენტი უჩვენებს HCO_3^- და Cl^-აქტიური ტრანსპორტული სისტემის არსებობას [84, 85].

ანიონების განაწილება უჯრედში

ცხრილი 1

	in	out
HCO_3^-	11mM	283mM
HPO^{2-}_4	50mM	1mM
SO^{2-}_4	10mM	0,5mM
Cl^-	3mM	103mM

2. კვლევის მიზანი და ამოცანები

ლიტერატურაში ცნობილია ტრანსპორტული ATPაზების ორი დიდი კლასი: კათიონური (Na,K-ATPაზა, Ca,Mg-ATPაზა, H-ATPაზა, K,H-ATPაზა და ა.შ.) და ანიონური (Cl-ATPაზა და HCO_3^- ATPაზა) ATPაზები. კათიონური ATPაზები უკეთაა შესწავლილი, ანიონურ ATPაზებზე კი ინფორმაცია ნაკლებია.

წარმოდგენილი ნაშრომის მიზანია დავაფიქსიროთ ანიონური ATPაზური აქტიობის არსებობა ვირთაგვას თავის ტვინის პლაზმურ მემბრანულ ფრაქციებში, კერძოდ სინაფსურ, მიკროსომულ, ვეზიკულურ და მიტოქონდრიულ მემბრანებში; შევისწავლოთ ენზიმის მოლეკულური მექანიზმი, რთული გეომეტრიული მრუდის ფორმის ანალიზის მეთოდის გამოყენებით და განვსაზღვროთ მისი ადგილი ATPაზების ზოგად კლასიფიკაციაში.

3. მეთოდიკა

3. 1. სუბუჯრედული ფრაქციების მიღება

კვლევის ობიექტად ძირითადად გამოიყენებოდა თეთრი ვირთაგვას თავის ტვინიდან მიღებული სხვადასხვა სუბუჯრედული ფრაქცია, რომლებიც მიიღება დიფერენციალური ცენტრიფუგირების მეთოდით საქაროზას სიმკვრივის სხვადასხვა გრადიენტში. სუბუჯრედული ფრაქციების მიღებისას გამოყენებული იყო დე რობერტისისა [86] და ვიტაკერის [87] რეკომენდაციები.

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

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

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

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

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

$$\frac{\upsilon^2}{\ln\frac{R_2}{R_1}}=const; \qquad \frac{Gt}{R_0\ln\frac{R_2}{R_1}}=const$$

სადაც υ ბრუნვათა რიცხვია, რომლის ერთეულიცაა ბრ/წთ. G - კუთხური აჩქარებაა, რომელიც გამოიხატება ვარდნის აჩქარების ერთეულებში და გამოითვლება ფორმულით: G=ω/g, სადაც, ω - კუთხური სიჩქარეა, g-თავისუფალი ვარდნის აჩქარება – 981სმ/წთ^2; G-ს ბრუნვებში გადასაყვანად, ანდა პირიქით, ბრუნვების G-ში გადასაყვანად ვიყენებთ ფორმულას:

$$G=\frac{R_0\upsilon^2}{90000}; \qquad \upsilon=300\sqrt{\frac{G}{R_0}}$$

ცენრტიფუგირების დროდ აღებულია ბრუნვის დაწყებიდან ცენტრიფუგის გამოთიშვამდე დრო.

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

5 000g-მდე – K-23 ცენტრიფუგა,

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

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

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

3. 2. სინაფსური მემბრანების ფრაქციის მიღება

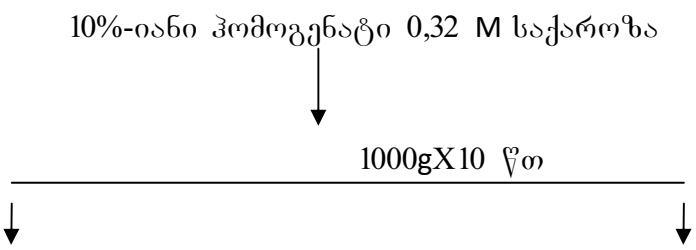
20-25 თეთრი ვირთაგვას ახლადამოღებულ თავის ტვინს სწრაფად ვაციებდით 4°C-მდე და ვაკეთდებდით ნაზ ჰომოგენიზაციას ხელის ჰომოგენიზატორით საქაროზას 0,32 m ხსნარში, ისე, რომ მზადდებოდა 10%-იანი ჰომოგენატი. საჰომოგენიზაციო ხსნარი კრისტალური ტრისით წინასწარ მიიყვანებოდა pH-ის საჭირო მნიშვნელობამდე (7,0-7,2).

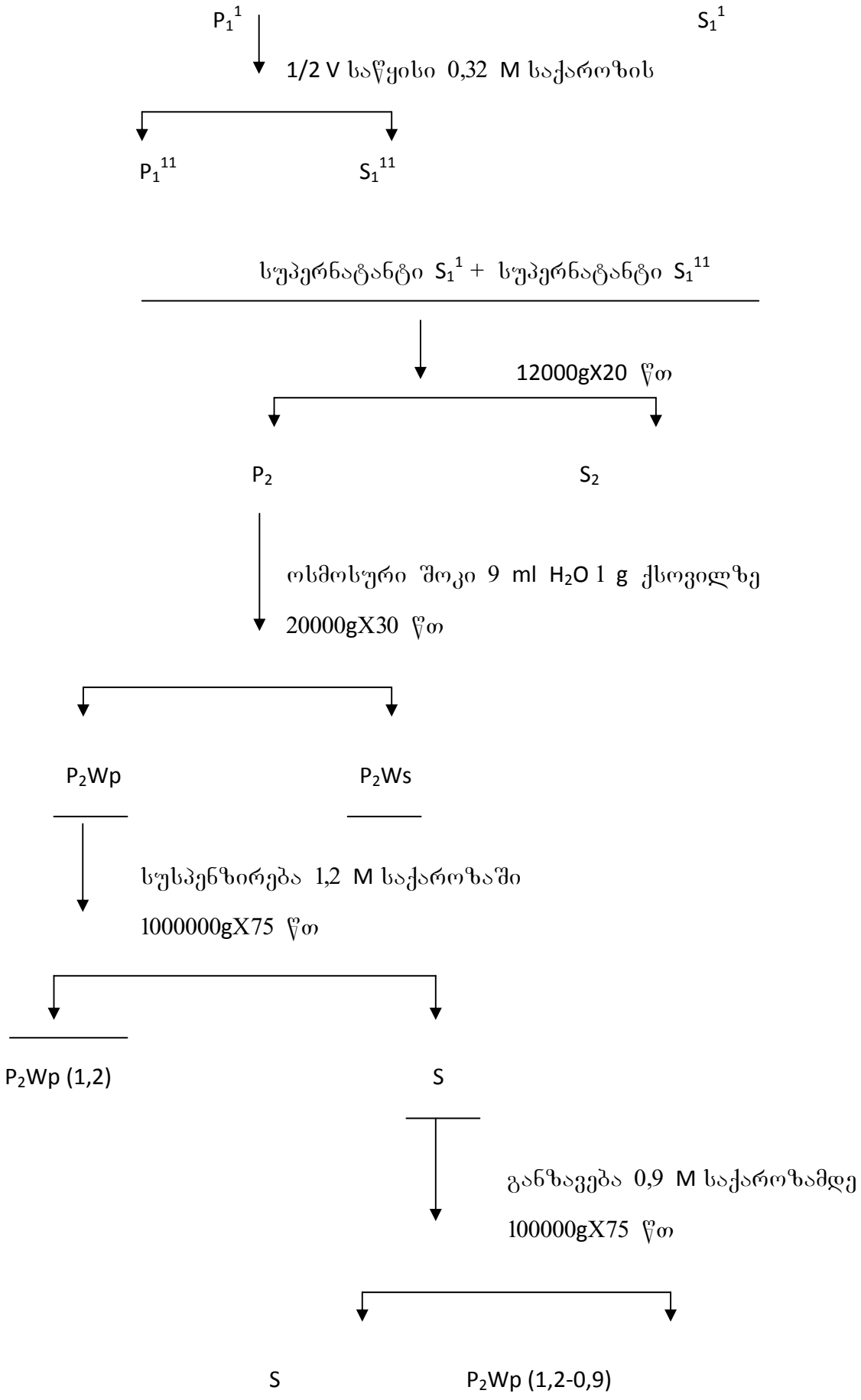
მიღებული ჰომოგენატი ცენტრიფუგირდებოდა 1000gX10 წთ. სუპერნატანტი დროებით ინახებოდა მაცივარში, ხოლო ნალექი ირეცხებოდა საწყისი მოცულობის ნახევარ ($^1/_2V_0$) 0,32 m საქაროზას ხსნარში და ხელახლა ცენტრიფუგირდებოდა იგივე პირობებში. პირველად და მეორედ მიღებულ სუპერნატანტებს ვაერთიანებდით ადრე მიღებულთან, ხოლო ნალექს (P_1), რომელიც შედგებოდა დაუგლეჯავი უჯრედებისა და ბირთვებისაგან და წარმოადგენს ე. წ. უხეშ ბირთვულ ფრაქციას, ვღვრიდით.

გაერთიანებული ზედა ხსნარი (S_1) ცენტრიფუგირდებოდა 12 000gX20 წთ. მიღებულ სუპერნატანტში (S_2) არის მიკროსომები, ნალექი (P_2)კი შეიცავს მიტოქონდრიებს, მიელინსა და სინაპტოსომებს თავისი შიგთავსით. ოსმოსური შოკის (1 გრ. საწყის ქსოვილზე 9 ml ცივი ბიდისტილატის დამატება) მოქმედებით მიღებულ სუსპენზიას ვაცენტრიფუგირებდით 20 000gX30 წთ. მიღებულ ნალექს (P_3) ამ რეჟიმით გამოეყოფოდა სუპერნატანტი, რომელიც შედგება მემბრანის უწვრილესი ნაგლეჯებისაგან – მიკროსომებისაგან, ვეზიკულებისაგან და უჯრედის განზავებული ციტოზოლისაგან. ნალექი P_2W_p შეიცავს მიტოქონდრიებს, სინაფსური წარმოშობის მემბრანებს, მათ შორის, შემაერთებელ კომპლექსს, და მიელინს. აღნიშნული ნალექი სუსპენზირდებოდა 1,2 m საქაროზას ხსნარში და ცენტრიფუგირდებოდა 100000gX75 წთ. ამ დროს ხდებოდა მიტოქონდრიების მოცილება სინაფსური მემბრანებისაგან. მიღებული ნალექი (P_4) შეიცავდა სუფთა მიტოქონდრიებს. სუპერნატანტს ვაზავებდით 0,9 m საქაროზამდე და ხელახლა ვაცენტრიფუგირებდით 100 000gX75 წთ.

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

სქემა 6 - <u>სინაფსური ფრაქციის მიღება</u>




P_1^1
S_1^1
1/2 V საწყისი 0,32 M საქაროზის
P_1^{11}
S_1^{11}
სუპერნატანტი S_1^1 + სუპერნატანტი S_1^{11}
12000gX20 წთ
P_2
S_2
ოსმოსური შოკი 9 ml H_2O 1 g ქსოვილზე
20000gX30 წთ
P_2Wp
P_2Ws
სუსპენზირება 1,2 M საქაროზაში
1000000gX75 წთ
P_2Wp (1,2)
S
განზავება 0,9 M საქაროზამდე
100000gX75 წთ
S
P_2Wp (1,2-0,9)

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

3. 3. მიკროსომული ფრაქციის მიღება

მიკროსომულ ფრაქციას ვღებულობდით ვირთაგვის თავის ტვინიდან სკოუს მეთოდით, მცირედი მოდიფიცირებით [88].

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

3. 4. სინაპტოსომური ფრაქციის მიღება

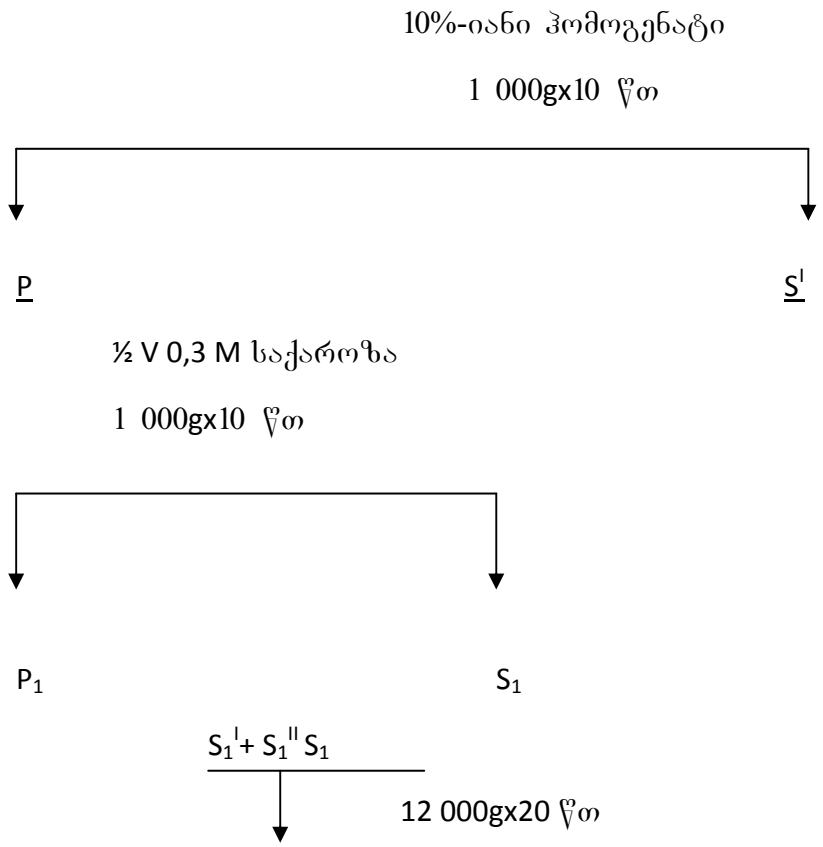
სინაპსური ფაქტორის, SF-ის, მისაღებად, უხეშ მიტოქონდრიულ ფრაქციას (P_2, სქემა 6) უკეთდებოდა ოსმოსური შოკი და ცენტრიფუგირდება 20 000gx30 წთ. მიღებული სუპერნატანტი P_2W_s, შეიცავს სინაპტოსომურ ფაქტორს. ზედმეტი, გაყოლილი მემბრანული მემბრანული წარმონაქმნების მოცილების მიზნით, P_2W_s ცენტრიფუგირდება 100 000gx30 წთ. მიღებული ზედა ხსნარი გამოიყენება როგორც გასუფთავებული სინაპტოსომური ფაქტორის მისაღები საწყისი ხსნარი (სქემა 8).

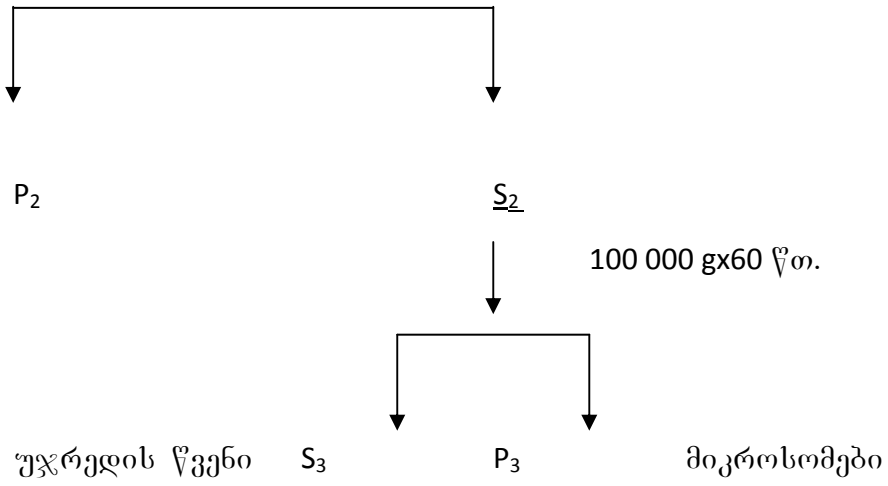
საინფსური ფაქტორის შემადგენელი აქტივატორული (SF_a) და ინჰიბიტორული (SF_i) კომპონენტების განცალკევების მიზნით ვახდენდით გელიოფილტრაციას. გელფილტრაცია ხდებოდა ფირმა „LKB"-ს ტიპის დანადგარზე, 2x40 სვეტზე. გელის მომზადება და ელუირება ხდებოდა ბიდისტილატით pH 7,0-ზე. ცილის განსაზღვრა ხდებოდა 280 nM სიგრძის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

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

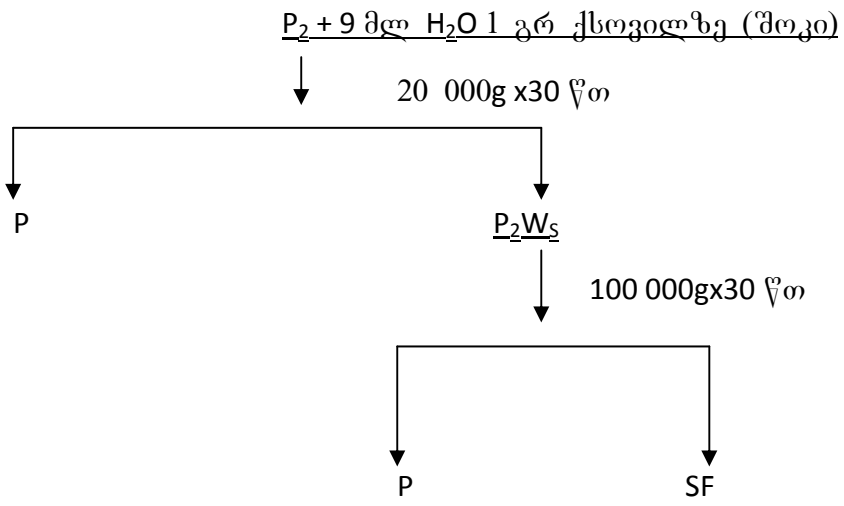
მიღებული ელუატების კონცენტრირებას ვახდენდით სეფადექს C–25-ით (Pharmacia, შვედეთი).

სქემა 7. მიკროსომული ფრაქციის მიღება





სქემა 8. სინაფსური ფაქტორის მიღება



3. 5. ცილის კონცენტრაციის კოლორიმეტრული განსაზღვრა ლოურის [90] მეთოდით.

მეთოდის პრინციპი. მოცემული მეთოდი აერთიანებს ბიურეტის რეაქციას (ე.ი. რეაქციას პეპტიდურ კავშირებზე) და ფოლინის რეაქციას (თიროზინსა და ტრიფტოფანზე). ცილის რაოდენობრივი განსაზღვრის ყველა არსებულ მეთოდებს შორის ლოურის მეთოდი წარმოადგენს ყველაზე მგრძნობიარე და ზუსტ მეთოდს. რეაქტივები:

რეაქტივი A – ნატრიუმის კარბონატის 2%-იანი ხსნარი, დამზადებული 0,1 მოლარულ ნატრიუმის ტუტეზე;

რეაქტივი B – გოგირდმჟავა სპილენძის 0,5%-იანი ხსნარი, დამზადებული 1%-იან ნატრიუმის ციტრატზე;

რეაქტივი C – რეაქტივი A და რეაქტივი B ერთმანეთს ერევა შეფარდებით 50:1 (გაზომვის წინ);

რეაქტივი D – ფოლინ-ჩოკალტეუს რეაქტივი.

რეაქციის მსვლელობა: 0,5 მლ ცილის შემცველი ხსნარი ერევა 2,5 მლ რეაქტივ C ხსნართან და ყოვნდება ათი წუთი ოთახის ტემპერატურაზე. შემდეგ ემატება 0,25 მლ რეაქტივი D, ირევა და 30 წთ-ის შემდეგ იზომება ოპტიკური სიმკვრივის სიდიდე 750 ან 500ნმ ტალღის სიგრძეზე. გაზომვა წარმოებს საკონტროლო კიუვეტის მიმართ, რომელიც შეიცავს იგივე კომპონენტებს ცილის გარდა.

ფერის ინტენსიობისა და საკალიბრო მრუდის მიხედვით ისაზღვრება ცილის კონცენტრაცია. საკალიბრო მრუდის აგებისათვის სტანდარტად გამოიყენება ადამიანის ან ხარის ლიოფილიზირებული ალბუმინი.

ოპტიკური სიმკვრივის მიღებული შედეგები გადაიზომება ორდინატას ღერძზე, ხოლო ცილის კონცენტრაცია – აბსცისთა ღერძზე.

რიგი ნაერთები ხელს უშლიან განსაზღვრის მსვლელობას. მათ რიცხვს მიეკუთვნება გლიცინი, ფოსფატის ბუფერი, Tris-HCl ბუფერი

3. 6. არაორგანული ფოსფორის რაოდენობრივი განსაზღვრა კოლორიმეტრული მეთოდით, კაზანოვ-მასლოვას მოდიფიცირებული მეთოდი

მეთოდის პრინციპი იგივეა, რაც ფისკე-სუბაროუს მეთოდის. ერთ მლ არაორგანული ფოსფორის ნიმუშს ემატება ერთნახევარი მლ ნარევი, რომელიც თავის მხრივ შეიცავს 1 წილ ტოლი მოცულობების 2,5% ამონიუმის მოლიბდატს ($(NH_4)_2MoO_4$), 5Nგოგირდმჟავას (H_2SO_4) და 4 წილ დისტილირებულ წყალს (1:1:4). შემდეგ ემატება 0,2 მლ 0,02%-იანი კალას ქლორიდის ხსნარი, რომელსაც დამატებული აქვს კონცენტრირებული ძმარმჟავა (CH_3COOH) ფერის სტაბილიზაციისათვის (ყოველ 10 მლ კალას ქლორიდის ($SnCl_2$) წყალხსნარზე 0,2 მლ). ნიმუში ინტენსიურად ინჯღრევა, ყოვნდება ოთახის ტემპერატურაზე 15წთ. ამის შემდეგ ნიმუშს ემატება 1 მლ დისტილირებული წყალი, ინჯღრევა და იზომება სპექტოფოტომეტრზე. კონტროლად იღება ყველა ხსნარი იგივე მოცულობებით. ნიმუშის მაგივრად კი 1 მლ დისტილირებული წყალი. გაზომვა ხდება 735 ნმ-ზე [91].

3. 7. ფერმენტული აქტიობის განსაზღვრა: Na,K-ATPაზური აქტიობის განსაზღვრა

Na,K-ATPაზური აქტიობა განისაზღვრება, როგორც ჯამური ATPაზას ოუაბაინმგრძნობიარე ნაწილი. ჯამური ATPაზასათვის საინკუბაციო არე სტანდარტულია და შეიცავს NaCl-ს 120-145 mM კონცენტრაციის ფარგლებში, KCl–ს 5-20mM, $MgCl_2$–ს 2-3mM და ATP–ს 2-3mM, 50mM ტრის-HCl ბუფერს (pH=7,7), რაც შეესაბამება Na,K-ATPაზას მუშაობის ოპტიმალურ პირობებს. არეში ფერმენტული პრეპარატის რაოდენობა არ აღემატება 100-150 mg-ს.

ოუაბაინმგრძნობიარე ნაწილი განისაზღვრება ზემოთ აღნიშნულ არეში 0,2mM ოუაბაინის დამატებით, ზოგჯერ კი ცალკე შედგენილი საინკუბაციო არით, რომელიც შედგება 0,2mM ოუაბაინისა და $MgCl_2$-სგან, რაც Na^+ უბნის სრული დაკეტვის გარანტიას იძლევა. ჯამურ და ოუაბაინმგრძნობიარე აქტიობას შორის სხვაობა შეადგენს Na,K-ATPაზურ აქტიობას და არის დაახლოებით შემდეგი: 1) OPM რეჟიმისათვის $Mg_f^{++}/ATP_f \geq 4$. 2) $OPA–ATP_f/Mg^{++} \geq 4$. 50-70μmol Pi/mg ცილაზე საათში.

სუბსტრატის, Mg^{++}-ს და ATP_f-ს კონცენტრაციის განსაზღვრა ხორციელდება Mg-ATP-ის კომპლექსის დისოციაციის კონსტანტის მნიშვნელობის გათვალისწინებით (K_d=0,085) [92].

ყველა რეაგენტს ემატება 0-4°C-ზე, რის შემდეგაც სინჯარები ინჯღრევა და თავსდება თერმოსტატში საინკუბაციოდ 37°C-ზე. ინკუბაცია გრძელდება 15წთ. რეაქცია ჩერდება ტემპერატურის სწრაფი ცვლილებით, სინჯარების ერთდროული გადატანით თერმოსტატიდან ყინულოვან აბაზანაში 0-4°C-ზე, სადაც ყოვნდება 5-6 წთ. ამის შემდეგ ისაზღვრება არაორგანულ ფოსფორი.

ATP-აზურ აქტიობაზე მსჯელობა ხდება ფერმენტის მიერ ATP-ის დაშლით გამოყოფილი არაორგანული ფოსფორის რაოდენობის მიხედვით. აქტიობა გამოხატულია მიკრომოლებში (μM) გამოყოფილი ფოსფორის რაოდენობით mg ცილაზე საათში (μM.P/mg ცილა/სთ).

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

3. 8. ანიონური ATP-აზების განსაზღვრა

HCO_3 –ATP-აზა შესაძლებელია განისაზღვროს ორი მიდგომით: 1. სხვაობით ნატრიუმის ბიკარბონატის შემცველ საინკუბაციო არესა და ექვიმოლარულ კონცენტრაციის ნატრიუმის ქლორიდის შემცველ არეს შორის, ან 2. HCO_3 იონისა და მის გარეშე არეს შორის სხვაობით [93].

Cl-ATP-აზური აქტიობა ასევე ისაზღვრება ორი საშუალებით: 1. ქლორის შემცველ და ქლორის არაშემცველ არეს შორის სხვაობით, ან 2. ქლორისა და ეტაკრილინის მჟავას შემცველ და ქლორის შემცველ არეს შორის სხვაობით [49].

ანიონური ATP-აზების განსაზღვრისას რეკომენდირებულია საინკუბაციო არეში EDTA-ს ან EGTA-ს შეტანა (0,4-1მილიმოლი კონცენტრაციით).

ATP-აზების ხვედრით აქტიობაზე მსჯელობა შეიძლება ATP-ის დაშლით გამოყოფილი არაორგანული ფოსფორის რაოდენობით მგ ცილაზე საათში.

3. 9. ფოლინ-ჩიოკალტეს რეაქტივის დამზადება (ლოურის მეთოდით ცილის გაზომვის მეთოდისათვის)

1. მრგვალძირა კოლბაში ისხმება 350მლ დისტილირებული წყალი. ემატება 50გ ნატრიუმის ვოლფრამატი ($Na_2WO_4 2H_2O \cdot 2H_2O$), 12,5გ ნატრიუმის მოლიბდატი ($Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$) და ირევა მთლიანად გახსნამდე. მიღებულ ხსნარს ემატება 25მლ 85%-იანი ფოსფორმჟავას ხსნარი, 50მლ კონცენტრული მარილმჟავა და ნარევი დუღდება უკუმაცივარში 10სთ-ის განმავლობაში. შემდეგ ემატება 75გ გოგირდმჟავა ლითიუმი, 25მლ დისტილირებული წყალი და 3 წვეთი ბრომი. დუღდება, ოღონდ უკუმაცივრის გარეშე 15წთ გამწოვში ბრომის მოსაცილებლად. ცივდება ოთახის ტემპერატურაზე და დისტილირებული წყლით ივსება 500მლ-მდე. ირევა და იფილტრება. ფილტრატიდან აიღება 1მლ, ზავდება 10-ჯერ დისტილირებული წყლით და იტიტრება 0,1M ნატრიუმის ტუტის ხსნარით ფენოლფტალეინის გამოყენებით. ამის შემდეგ მთელ მოცულობას ემატება წყლის ისეთი რაოდენობა, რომ მჟავის საბოლოო კონცენტრაცია შეადგენს 1N. ხსნარი დიდხანს ინახება მუქ მინის ჭურჭელში, მიშლიფული თავით [94].

3. 10. კინეტიკური მრუდების გეომეტრიული ფორმის ანალიზი; მეთოდის პრინციპი (თეორიული საფუძვლები) [95]

მრავალუბნიანი ფერმენტული სისტემების შემთხვევაში, ზოგადად ფერმენტული სიჩქარე (V) მრავალცვლადიანი ფუნქციაა და ძირითადად დამოკიდებულია სუბსტრატის, გარდაქმნის პროდუქტების, მოდიფიკატორების კონცენტრაციაზე და რეაქციის მიმდინარეობის პირობებზე. ამ პირობების განმსაზღვრელი ფაქტორებია ფერმენტის ფუნქციონალური ერთეულის სტრუქტურული მუდმივობა (იგულისხმება ასოციაცია-დისოციაცია, და პოლიმერიზაციის პროცესები), ტემპერატურა, იონური ძალა, p და სხვა. კერძო შემთხვევაში, როდესაც რეაქციის მიმდინარეობის პირობები უცვლელი რჩება და რეაქციაში მონაწილე ყველა ლიგანდის კონცენტრაცია მუდმივია ერთის გარდა, მაშინ საწყისი ფერმენტული სიჩქარე V (პროდუქტების არარსებობის შემთხვევაში), როგორც ერთცვლადიანი V=f(x) ფუნქცია, სწრაფ და სტაციონალურ წონასწორობაში გამოისახება შემდეგი ანალიტიკური ფორმულით:

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

სადაც $\alpha_i > 0$ და $\beta_i > 0$ არის ინდივიდუალური სიჩქარის კონსტანტების და მუდმივი ლიგანდის კონცენტრაციების ნამრავლის ჯამი, x ცვლადი ლიგანდის კონცენტრაციაა, n, m და p წარმოადგენენ ხარისხობრივ პარამეტრებს და მთელი დადებითი რიცხვებია. ფერმენტული სისტემის მოლეკულური მექანიზმის გაშიფვრისთვის სიჩქარის ძირითადი განტოლების ხარისხობრივი პარამეტრების ფიზიკური არსის დადგენა და ექსპერიმენტული მონაცემების საფუძველზე მათი განსაზღვრა შესაძლებელი გახდა როგორც სწრაფ, ისე სტაციონალურ წონასწორობაში. სწრაფი წონასწორობის შემთხვევაში n-წარმოადგენს აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილ უბნების რიცხვს, m-სრული ინჰიბიტორებისთვის განკუთვნილ უბნების რიცხვს, [96]. p არის ნაწილობრივი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი. სწრაფი წონასწორობის დროს p=h და S=k. ე.ი. h არის ნაწილობრივი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორებისთვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი. k წარმოადგენს უბნების სუმარულ რიცხვს.

k=n+m+h

სტაციონალურ წონასწორობაში კინგ-ალტმანის მეთოდის გამოყენებამ ნათელი გახადა, რომ n, m და h ხარისხობრივი პარამეტრების ფიზიკური არსი უცვლელია, მხოლოდ შემოდის ახალი პარამეტრი q , რომელსაც ეწოდება სირთულის კოეფიციენტი და მისი რიცხობრივი მნიშვნელობა დამოკიდებულია ფერმენტული სისტემის მოლეკულური მექანიზმის სირთულეზე. ამრიგად, გვექნება p=h+q და s=k+q. სწრაფი წონასწორობის პირობებში q=0. n, m და p პარამეტრების ფიზიკური არსის დადგენის შემდეგ დგება მათი რიცხობრივი მნიშვნელობის განსაზღვრის საკითხი. ერთუბნიანი ფერმენტული სისტემის შემთხვევაში წინდაწინაა ცნობილი ერთ-ერთი მთავარი კინეტიკური პარამეტრი, უბნების რიცხვი, ხოლო K_m და V_{max} დადგენა შესაძლებელია იმ ტრანსფორმაციული ფორმულების გამოყენებით,

რომლებიც უზრუნველყოფენ V=f(x) ჰიპერბოლური მრუდის ლინეარიზაციას. მრავალუბნიანი ფერმენტული სისტემის შემთხვევაში კი V=f(x) მრუდს რთული გეომეტრიული ფორმა აქვს აღნიშნულ შემთვევაში ის ტრანსფორმაციის ფორმულები, რომლებიც გამოიყენებოდა ერთუბნიანი სისტემებისთვის, არ იძლევა კინეტიკური პარამეტრების დადგენის საშუალებას და საჭირო გახდა ახალი მიდ-გომების ძიება. აქედან გამომდინარე n, m და p პარამეტრების განსაზღვრისთვის და ე. ი. მრავალუბნიანი ფერმენტული სისტემების მოლეკულური მექანიზმის გაშიფვრისათვის. გამოვიყენეთ მემბრანოლოგიის ლაბორატორიაში დამუშავებული მათემატიკური 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 წარმოებულებების ნიშნის და ნულთან ტოლობის განსაზღვრას, რაც შესაბამისად მოტრიალების და გადაღუნვის წერტილების განსაზღვრის საშუალებას იძლევა, იმ წერტილების დადგენას, 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 მრუდეების გეომეტრიული ფორმების თანხვედრას. n, m და p პარამეტრების დადგენის შემდგომ "მინიმალური მოდელის პრინციპიდან" გამომდინერე იქმნება თეორიული სქემა, რომლის საფუძველზეც უნდა გამოვიყვანოთ ანალიტიკური ფორმულა. მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდი თეორიული მრუდის გეომეტრიული ფორმის დადგენის საშუალებას იძლევა, რომელიც შემდგომ დარდება ექსპერიმენტულ მრუდთან. სწორედ ექსპერიმენტული მრუდეების და შესაბამისი მოდელის თეორიული მრუდეების გეომეტრიული ფორმების შედარება და მსგავსება წარმოადგენს ერთადერთ კრიტერიუმს, რომლითაც ფასდება მოდელის მიახლოება ფერმენტის ჭეშმარიტ მოლეკულურ მექანიზმთან.

n-პარამეტრის განსაზღვრა

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

აუცილებელი აქტივატორების (n) განსაზღვრისთვის კი შემუშავებული იქნა სპეციალური მეთოდი და შესაბამისი კომპიუტერული პროგრამა. მეთოდის პრინციპს საფუძვლად უდევს U(r,t) ფუნქციის შემდგომი თვისება:

$$U(r,t)=\left[\frac{t^{n}\sum_{i=0}^{s}\beta_i t^{-i}}{\sum_{i=0}^{p}\alpha_i t^{-i}}\right]^{\frac{1}{r}} \qquad (2).$$

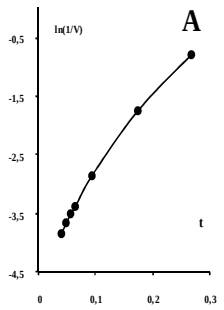
(r,t) ფუნქციისთვის არსებობს ღია ინტერვალი $(t_0;+\infty)$, სადაც ფუნქციას აქვს ჩაზნექილი ფორმა, როდესაც r<n, ამოზნექილი ფორმა როცა r>n, ხოლო როდესაც r=n, (r,t) ფუნქციას გააჩნია ასიმპტოტა. ამრიგად, თუ ექსპერიმენტული წერტილები მოთავსდება კორექტულ სამუშაო ინტერვალში, მაშინ როდესაც r=n, აღნიშნულ წერტილებზე გავლებული რეგრესიის ხაზის შემთხვევაში აწონილი საშუალო კვადრატული ცდომილება (MU), გასაშუალოებული აპროქსიმაციის კოეფიციენტი (MV) და $F_{ტესტი}$ ღებულობს მინიმალურ, ხოლო კორელაციის კოეფიციენტი (CC) მაქსიმალურ მნიშვნელობას. ასიმპტოტის ფორმულას აქვს შემდეგი სახე:

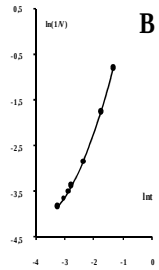
$$U_n = A_n + B_n t = \sqrt[n]{\frac{\beta_0}{\alpha_0}}\cdot\left[\frac{1}{n}\left(\frac{\beta_1}{\beta_0}-\frac{\alpha_1}{\alpha_0}\right)-t\right]. \quad (3)$$

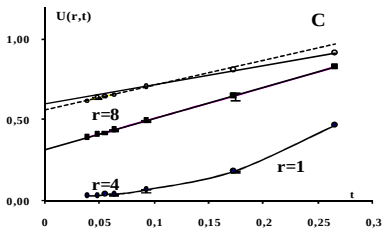
ამრიგად, ნათელია, რომ განსაკუთრებული ყურადღება უნდა მივაქციოთ სამუშაო ინტერვალის მდებარეობას. ასე მაგალითად: სამუშაო ინტერვალზე "სახიფათო წერტილების" (მოტრიალების და გადაღუნვის წერტილები) არსებობა, შეიძლება გახდეს n-ის არასწორი განსაზღვრის მიზეზი. სამუშაო ინტერვალს გააჩნია ორი ზღვარი: ზედა ზღვარი დამოკიდებულია ფერმენტული რეაქციის მოლეკულური მექანიზმის ბუნებიდან, ვინაიდან მისგან გამომდინარე, მრუდს შეიძ-ლება ჰქონდეს "სახიფათო წერტილები". ამიტომ მათი ამოგდების თვალსაზრისით ვიხილავთ ინტერვალს V=f(x) ფუნქციის პირველ მოტრიალების წერტილამდე, სამუშაო ინტერვალზე lnu=f(t) მრუდს უნდა ჰქონდეს ამოზნექილი ფორმა, ე. ი. $(\ln u)''_{tt}<0$, ხოლო ფუნქციას lnu=f(lnt) არ უნდა ჰქონდეს გადაღუნვის წერტილები. სამუშაო ინტერვალის ქვედა საზღვარი კი მოთავსებულია ექსტრემალურად მცირე სიჩქარეების უბანში და რიცხვი შეიძლება იყოს ცთომილების რიგის. ამიტომ ამის გამოსარიცხად გამოთვლებიდან ამოსაგდებია წერტილები, რომელთა ფარდობითი ცთომილება აღემატება 0,2-ს. ($\varepsilon(v)>0{,}2$). ამრიგად, ზემოთ აღნიშნული პირობები სამუშაო ინტერვალის კორექტულად არჩევის შესაფასებლად, საჭიროა განვსაზღვროთ რამდენადაა დაშორებული $\overline{R}$ n-ისგან, სადაც $\overline{R}$ n პარამეტრის ის მნიშვნლობაა, რომლისთვისაც ადგილი აქვს მრუდის მაქსიმალურ დაახლოებას სწორ ხაზთან. $\left|\overline{R}-n\right|$-ის გამოთვლა შესაძლებელია როგორც პირველ, ისე მეორე მიახლოებაში. n-ის განსაზღვრის მეთოდის დემონსტრაციისთვის განვიხილოთ OPM რეჟიმში Na,K-ATPაზური სისტემის აქტივაცია (V) Na-ის იონებით (x). სარეაქციო არის შემადგენლობა იყო 0,85 მ MgATP; 0,024 mM ATP_f; 3mM $MgCl_2$ და 141 mM KCl. პირველ ეტაპზე ხორციელდება კორექტული სამუშაო ინტერვალის შერჩევა. ექსპერიმენტულ წერტილებზე აგებულ ln(1/V)=f(t) მრუდს აქვს ამოზნექილი ფორმა [სურ. 1], ხოლო ln(1/V)=f (lnt) მრუდს არ გააჩნია გადაღუნვის წერტილები [სურ. 1.]. ე.ი. შეიძლება ჩაითვალოს, რომ სამუშაო ინტერვალი კორექტულად არის

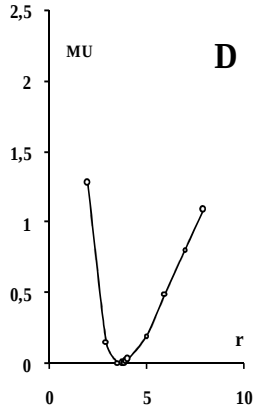
შერჩეული და არ ამოვარდება არცერთი ექსპერიმენტული წერტილი. შემდგომ ეტაპზე ხორციელდება r პარამეტრის ვარირება ბიჯით $\Delta r=1$ და r-ის ყოველი მნიშ-ვნელობისათვის ითვლება $U(r,t)=\sqrt[r]{1/v}$ და მისი ცდომილება $\sigma(r;t)=\frac{1}{r}(v)^{-\frac{1}{r}+1}\sigma(v)$.

ყოველი r-ისთვის ხდება რეგრესიის ხაზის განსაზღვრა $U_r = A_r + B_r t$ (სურ.C)









და დგინდება $\Delta = U_r - u(r,t)$ გამოსახულების ნიშნების განაწილება. ითვლება აწონილი საშუალო კვადრატული ცთომილება (MU), გასაშუალოებული აპროქსიმაციის კოეფიციენტი (MV), სწორხაზოვნების საზომი (F_{exsp}) და კორელაციის კოეფიციენტი (CC):

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

(4)

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

სადაც k წერტილების რიცხვია (პარალელური გაზომვების რიცხვი მუდმივია). შემდგომ ეტაპზე ითვლება $\overline{R}$, R_1 და R_2.

1) $\overline{R}$ ფასდება r-ის იმ მნიშვნელობით, როდესაც MV, F_{eqsp} და MU აქვს მინიმალური მნიშვნელობა, ხოლო CC ღებულობს მაქსიმალურ მნიშვნელობას;
2) R_1 სიდიდე ფასდება r-ის მნიშვნელობით, რომლის დროსაც იწყება singΔ_i განაწილების არევა;
3) R_2 სიდიდე ფასდება r-ის მნიშვნელობით, რომლის დროსაც მთავრდება singΔ_i განაწილების არევა.

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

$$(\overline{R} - n)_1 = \frac{(R_2 - R_1) \cdot t_1 t_2}{(t_1 + t_2)}$$ პირველ მიახლოებაში

$$(\overline{R} - n)_2 = \frac{(\overline{R} - R_2) \cdot t_2^2 + (\overline{R} - R_1) \cdot t_1^2}{(t_2 - t_1)}$$ მეორე მიახლოებაში

სადაც t_1 და t_2 სამუშაო ინტერვალის საწყის და საბოლოო წერტილებს წარმოადგენენ. განხილული მაგალითის შემთხვევაში შეიძლება ითქვას, რომ აწონილი საშუალო კვადრატული ცთომილება მინიმალურ მნიშვნელობას ღებულობს როცა r=4 (სურ.1.), აუცილებელი აქტივატორების გამოთვლილი მნიშვნელობა უტოლდება $\overline{R} = 3{,}8 \pm 0{,}034$, ხოლო $(\overline{R} - n)$-ისთვის პირველ და მეორე მიახლოებაში გვექნება $(\overline{R} - n)_1 = -0{,}045$ (პირველ მიახლოებაში) და $(\overline{R} - n)_2 = -0{,}131$ (მეორე მიახლოებაში).

m-პარამეტრის განსაზღვრა

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

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

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

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

p-პარამეტრის განსაზღვრა

p პარამეტრის რიცხობრივი მნიშვნელობის დადგენის პრობლემა სრულად გადაწყვეტილი არ არის, მაგრამ შესაძლებელია მისი გარკვეული შეფასება. V=f(x) ფუნქციის შემთხვევაში გეომეტრიული ფორმის ანალიზის მეთოდის გამოყენებამ ნათელი გახადა, რომ ფუნქციის მოტრიალების წერტილების რიცხვი (ν) უტოლდება ან ნაკლებია 2p-1($\nu \le 2p-1$). აქედან გამომდინარე, თუ ექსპერიმენტულ მრუდზე ჩვენ გვაქვს ν მოტრიალების წერტილი, მივიღებთ უტოლობას $p \ge \frac{\nu+1}{2}$. ამრიგად, ექსპერიმენტული მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზის შედეგად ჩვენ შეგვიძლია განვსაზღვროთ p პარამეტრის შესაძლო მნიშვნელობიდან მისი ქვედა ზღვარი.

3. 11. მონაცემების სტატისტიკური დამუშავება

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

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

$$\overline{X} = \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n} \quad ; \qquad \sigma_X = \sqrt{\frac{\left(\overline{X} - X_i\right)^2}{n(n-1)}}$$

სადაც n–პარალელურ გაზომვათა რიცხვია.

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

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

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

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

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

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

შემდეგ, სერიის ყველა მონაცემი, ცდომილების ჩათვლით, მრავლდებოდა ამ კოეფიციენტზე. ნორმირება კეთდებოდა ყველა სერიისთვის (გამოვდიოდით იმ

მოსაზრებიდან, რომ სხვადასხვა სერიის აქტიობებს შორის არის ხაზოვანი დამოკიდებულება). ხშირად ეს კოეფიციენტი ერთის ტოლი იყო, მაგრამ შემოწმება ხდებოდა ყოველთვის ყველა სერიისათვის.

ნორმირებულ შედეგებს, რომელიც წარმოდგენილი იყო $x_1 \pm \sigma_1$, $x_2 \pm \sigma_2, ..., x_n \pm \sigma_n$-ის სახით, ვასაშუალებდით აწონვის მეთოდით [Агекян, 1968], რისთვისაც ვითვლიდით საშუალო წონას (W), აწონილ საშუალოს და აწონილი საშუალო არითმეტიკულის საშუალო კვადრატულ ცდომილებას.

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

სადაც n – სერიების რიცხვია.

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

$$\frac{\sigma_z^2}{n_z - 1} = \left[f_x^{'}\right]^2 \frac{\sigma_x^2}{n_x - 1} + \left[f_y^{'}\right]^2 \frac{\sigma_y^2}{n_y - 1}.$$

ჩვენ ვიყენებდით ამ ფორმულის კერძო შემთხვევას:

1. თუ A=const; $Z = Ax$, შესაბამისად, $\overline{Z} = A\overline{x}$; $\sigma_z = A\sigma_x$; $n_z = n_x$

2. Na,K-ATPაზას გამოთვლისათვის, სადაც $Z = x - y$, მივიღებთ $\overline{Z} = \overline{x} - \overline{y}$ და $\sigma_z^2 = \sigma_x^2 + \sigma_y^2$.

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

3. 12. ორ სიდიდეს შორის განსხვავების სარწმუნოობის შეფასება

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

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

$$\mathbf{F_{exp} = \frac{n_X \sigma_X^2}{n_Y \sigma_Y^2}}$$

მრიცხველში იწერება უფრო დიდი ციფრი.

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

$$\mathbf{t = \frac{|X - Y|}{\sqrt{\left(\frac{1}{n_X} + \frac{1}{n_Y}\right)\left(\frac{S_X + S_Y}{n_X^2 + n_Y^2}\right)}}}$$

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

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

$$t = \frac{|X - Y|}{\sqrt{\sigma_X^2 + \sigma_Y^2}} \quad ;$$

ხოლო თავისუფლების ხარისხი გამოითვლება ფორმულით:

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

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

3. 13. რეგრესიული ანალიზი

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

რეგრესიის კოეფიციენტები განისაზღვრებოდა ფორმულით:

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

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

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

4. მიღებული სამეცნიერო შედეგები

4. 1. Cl-ATPაზისა HCO_3-ATPაზების განაწილება განწილება სუბუჯრედული ფრაქციების მიხედვით

ცხრილ 2-ში მოცემულია Cl-ATPაზას განაწილება თავის ტვინის ზოგიერთ სუბუჯრედულ ფრაქციაში (SJC, მიკროსომები, მიტოქონდრიები და ვეზიკულები). ხვედრითი და ფრაქციის აქტიობების გამოთვლით ჩანს, რომ Cl-ATPაზას განაწილებაში ფრაქციებს შორის პრინციპული სხვაობა არ არის, თუმცა შედარებით მაღალი აქტივობა აღინიშნება მიკროსომებში. თვისობრივად ანალოგიური შედეგი გამოვლინდა Mg-დამოკიდებულ და Mg-არადამოკიდებულ HCO_3-ATPაზების სინაფსური, მიკროსომული და მიტოქონდრიალური მემბრანების ფრაქციაში.

ცხრილი 2

Cl-ATPაზური აქტივობის განაწილება სუბუჯრედულ ფრაქციაში.

აქტივობა	სინაპტოსომური	მიკროსომული	მიტოქონდრიალური	ვეზიკულური
ხვედრითი $\mu molP_i$/სთ	145.14±8	174.92±12	143.79±14	154.12±26
ფრაქციის $\mu molP_i$/სთ.მგ.ცილა	9.68±0.52	14.58±1.05	9.59±1.64	19.265±4.58

განსხვავდება სინაფსური ვეზიკულებით მდიდარი ფრაქცია, რომელიც ხასიათდება Cl-ATPაზის მაღალი აქტიობით და არ შეიცავს HCO_3-ATPაზებს (ცხრილი 3), Mg-დამოკიდებულ და Mg-არადამოკიდებულს.

ცხრილი 3

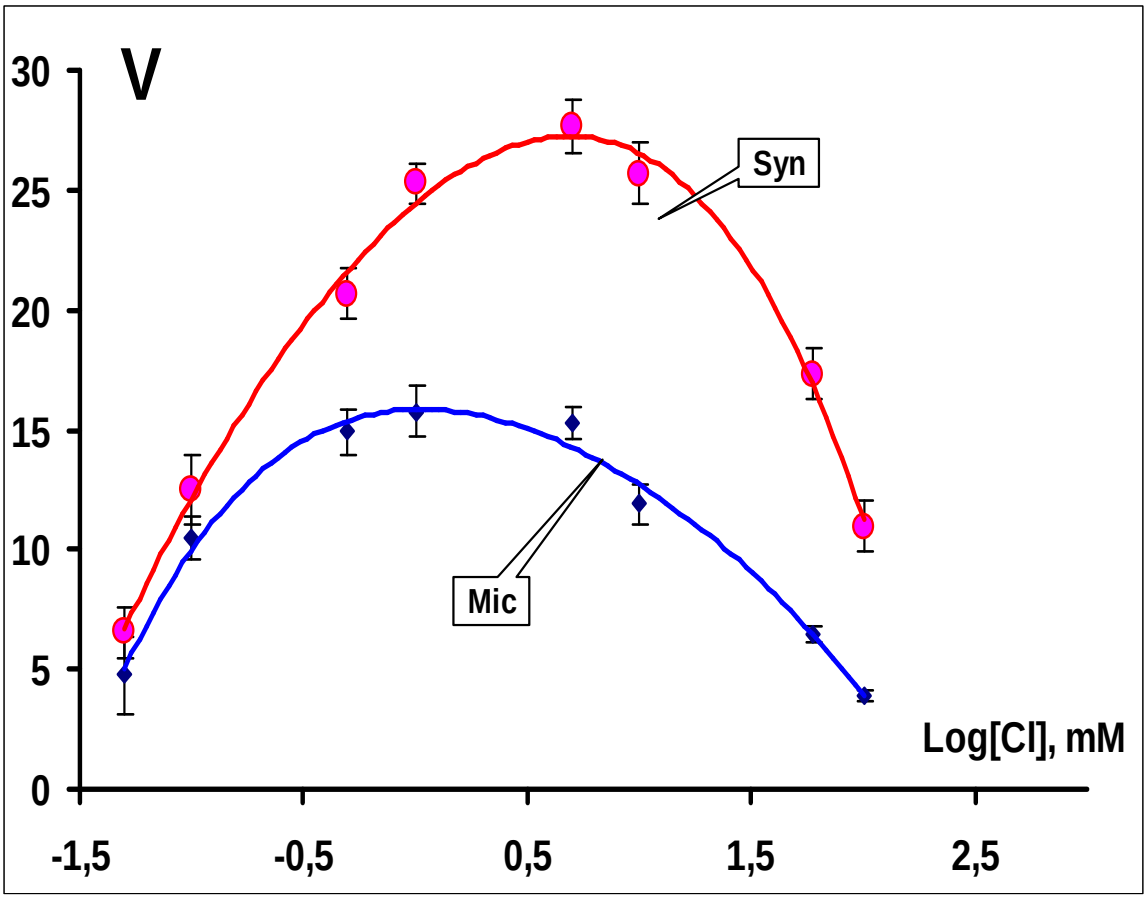
HCO_3^--ATPაზის განაწილება სუბუჯრედულ ფრაქციებში

	Mg=0		Mg≠0	
	ხვედრითი აქტივობა	ფრაქციის აქტივობა	ხვედრითი აქტივობა	ფრაქციის აქტივობა
რაქცია	μMp$_i$/mg,სთ, ცილა	μMp$_i$/სთ	μMp$_i$/mg,სთ, ცილა	μMp$_i$/სთ
მიტოქონდრიები [-1,4]	11,79±0,23	118±2,31	13,60±0,84	136±8,40
მიკროსომები [-0.32]	6,02±0,16	77,2±1,88	17,91±0.91	214±10,9
ვეზიკულები [-0,6]	8,17±1,12	65,4±8,97	–	–
სინაპტოსომური მემბრანა [1,2-0,8]	8,94±2,49	132±37,3	7,28±1,35	109±20.18

ფრჩხილებში მითითებულია საქაროზის გრადიენტი, რომელშიც მიღებულია ფრაქცია.

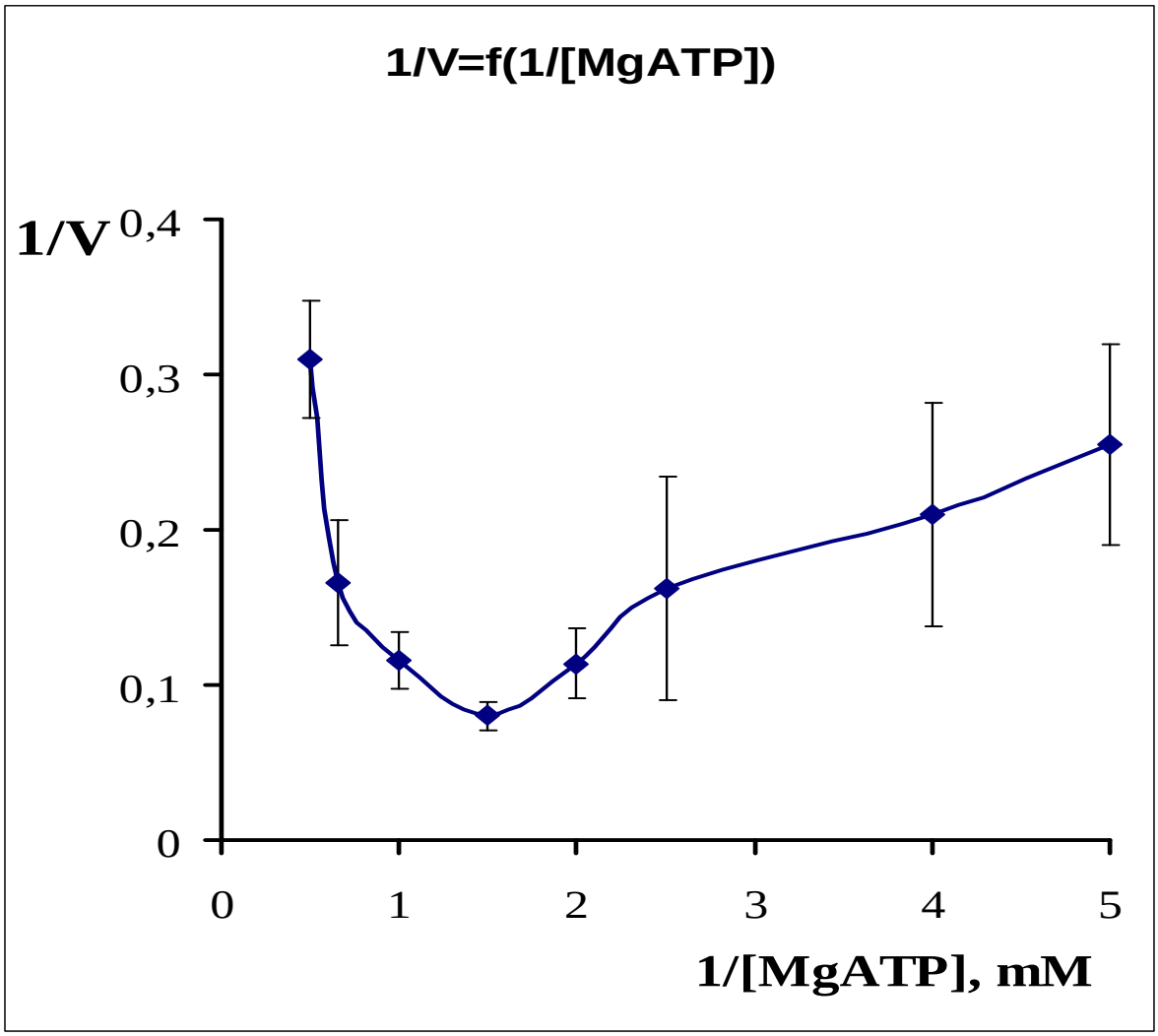
Mg დამოკიდებული და Mg-არადამოკიდებული ATPაზები განხილული იქნება პარაგრაფ 4. 3 და 4. 4-ში.

4.2 Cl-ATPაზას მოლეკულური მექანიზმის ექსპერიმენტული შედეგები



სურათი 1. Cl-ATPაზური აქტიობის (V) დამოკიდებულება Cl^-ის იონების კონცენტრაციიდან (ლოგარითმებში) სინაფსურ (Syn) და მიკროსომულ (Mic) ფრაქციაში. ცილა -0.022 მგ/მლ, ATP 2mM, Mg 2mM, Tris-მალატი 30mM, pH 7.7, ოუაბაინი 0,2mM.

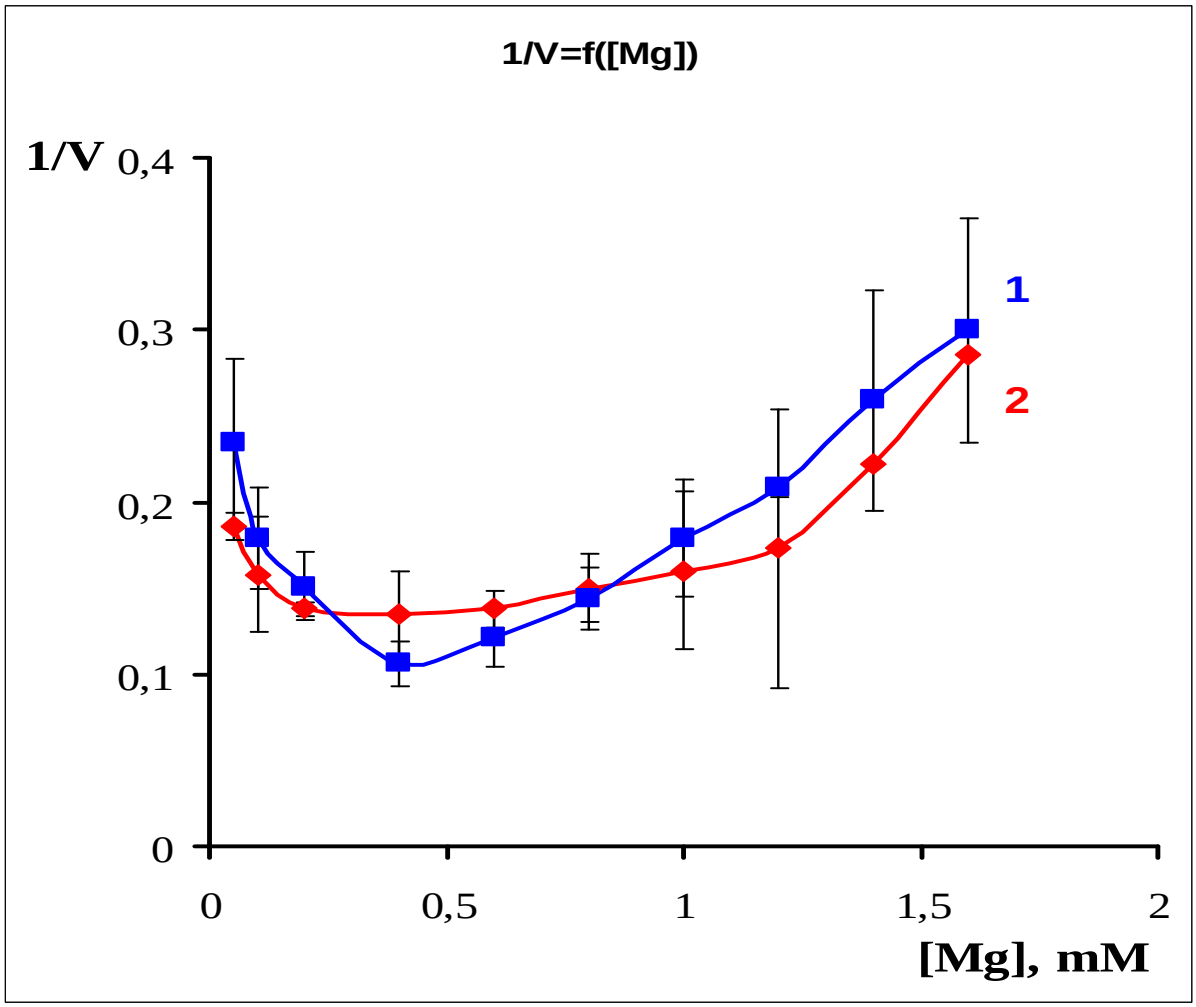
სურათზე 1 წარმოდგენილია Mg-დამოკიდებული ATP-ის ჰიდროლიზი Cl^--ის იონების კონცენტრაციაზე სინაფსური მემბრანებისა და მიკროსომების ფრაქციაში. $V=f[Cl^-]$ მრუდის ფორმა მსგავსია ორივე შემთხვევაში. იცვლება მხოლოდ ფერმენტის ხვედრითი აქტივობა. მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზით ნათლად ვლინდება ზარისებური ფორმა აღმავალი და დაღმავალი ფაზით Cl^--ის კონცენტრაციიდან დამოკიდებულებით.



სურათი 2. Cl-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება სუბსტრატის (S=MgATP) კონცენტრაციაზე, ორმაგშებრუნებულ სიდიდეებში, როდესაც $Mg_f = ATP_f$.

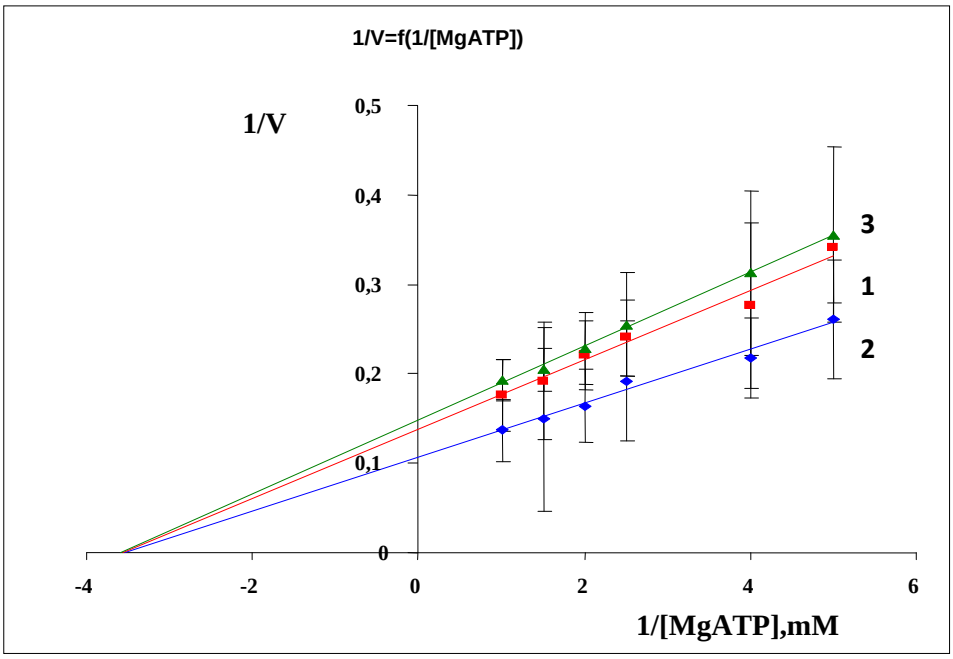
სურათზე 2 წარმოდგენილია ორმაგშებრუნებულ სიდიდეებში Cl-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება MgATP კონცენტრაციაზე.

ორივე შემთხვევაში, 1/V=f(1/MgATP) ფუნქციას გააჩნია ასიმპტოტა არგუმენტის მაღალი მნიშვნელობებისას. MgATP-ის საშუალო კონცენტრაციებისას ფუნქციას გააჩნია მოტრიალებისა და გადაღუნვის წერტილი. არგუმენტის მცირე მნიშვნელობებისას კი ადგილი აქვს ფერმენტული სისტემის ინჰიბიციას. არგუმენტის დიდი მნიშვნელობისას (ექსტრემალურად მცირე MgATP დროს) 1/V=f(1/MgATP) ფუნქციის სწორხაზოვნება აუცილებელი და საკმარისი პირობაა იმის დასტურად, რომ [Mg·ATP] კომპლექსი წარმოადგენს ფერმენტული სისტემის ჭეშმარიტ სუბსტრატს.



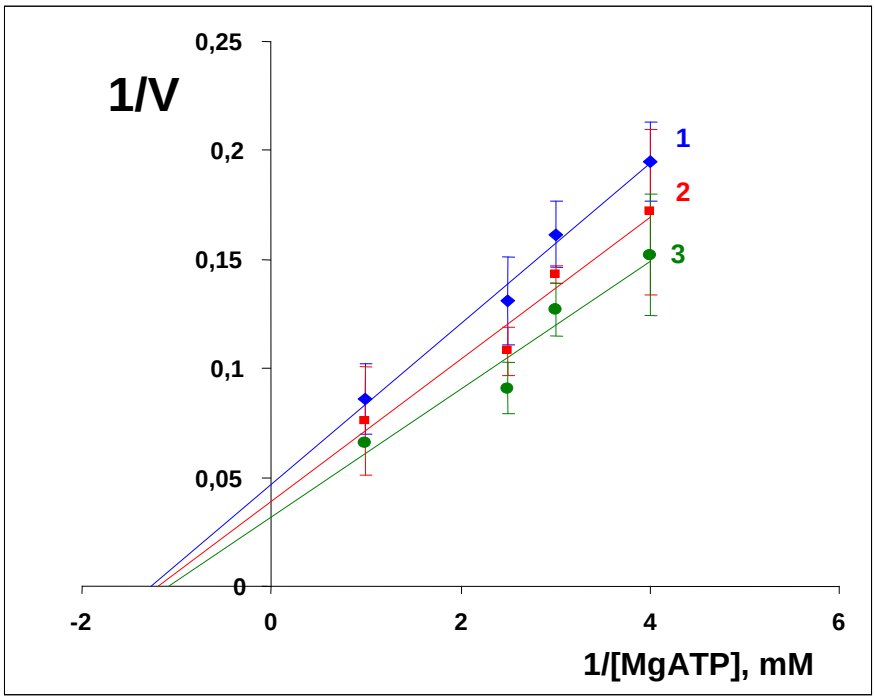
სურათი 3. Cl-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება [Mg_f] კონცენტრაციიდან სუბსტრატის ფიქსირებული მნიშვნელობისას (S_1=0,5mM; S_2=1,5mM). მიკროსომული ფრაქცია. ცილა= 0,025 mg/ml.

ცნობილია, რომ თავისუფალი ლიგანდები (Mg_f და ATP_f) ტრანსპორტული ATPაზების (კერძოდ NaK-ATPაზას) მოდიფიკატორებია. აღნიშნული ლიგანდების ეფექტი შევისწავლეთ Cl^--ATPაზაზე სუბსტრატის სხვადასხვა ფიქსირებული მნიშვნელობისას. სურათზე 3 წარმოდგენილია ATPაზური აქტიობის ცვლილების ხასიათი Mg_f კონცენტრაციაზე სუბსტრატის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის (0.5mM და 1.5mM) პირობებში.



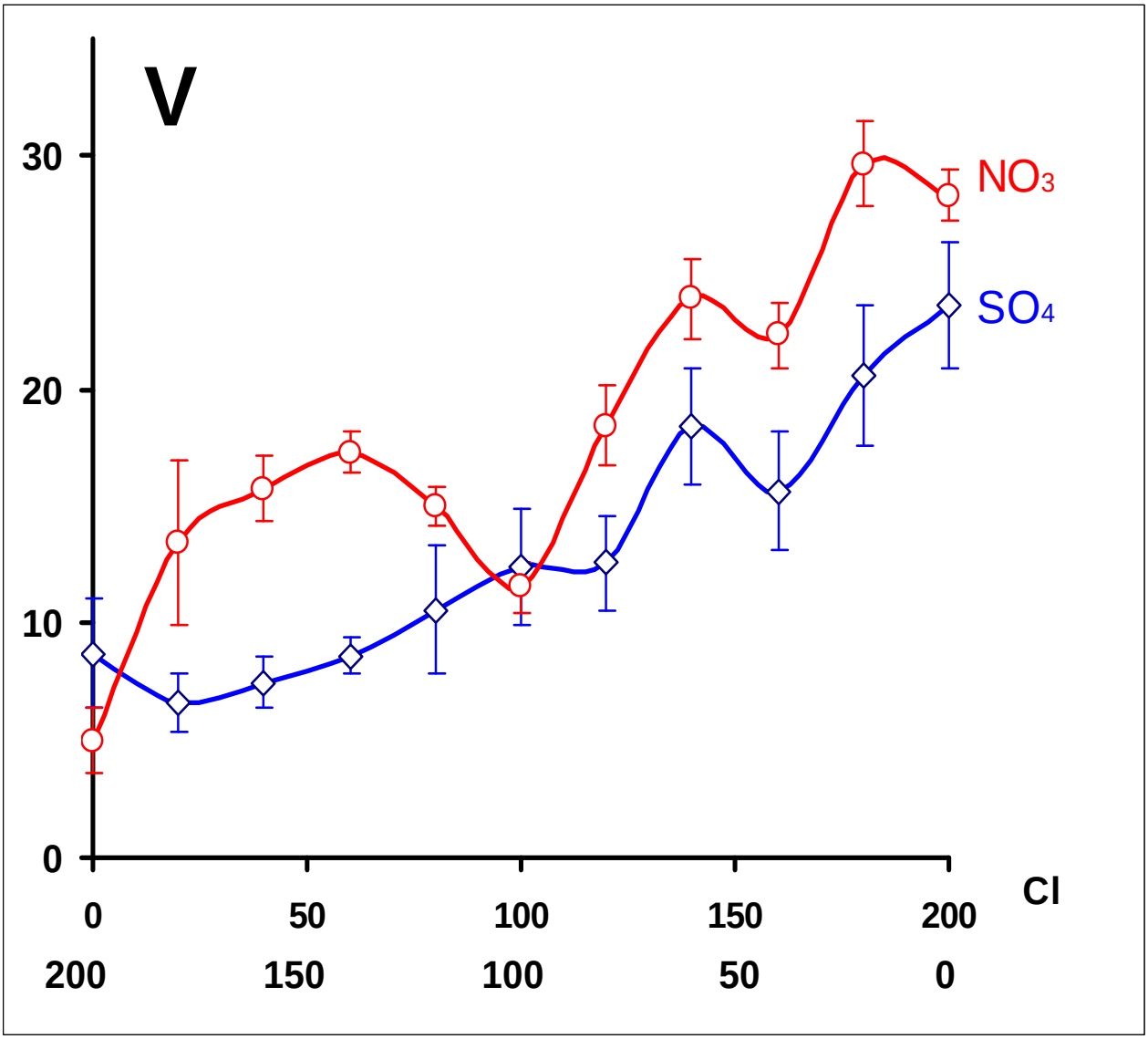
სურათი 4. Cl-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულება სუბსტრატის კონცენტრაციაზე ორმაგშებრუნებულ სიდიდეებში, [Mg_f] სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციების დროს. 1. [Mg_f]=0,2mM; 2. [Mg_f]=0,5mM; 3. [Mg_f]=1,2mM;

სურათზე 4 ჩვენ ვხედავთ Cl-ATPაზური აქტივობის დამოკიდებულებას სუბსტრატის კონცენტრაციაზე, ორმაგშებრუნებულ კოორდინატებში, Mg-ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის დროს. სუბსტრატის ექსპერიმენტალური კონცენტრაციები შერჩეულია ისე, რომ V=f(S) ჰქონდა სწორხაზოვანი დამოკიდებულება არგუმენტის მცირე კონცენტრაციისას. აღნიშნულ პირობებში Mg_f-ის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად წრფეების დახრა და ორდინატაზე გადაკვეთა იზრდება, ხოლო წრფეების ურთიერთგადაკვეთა ხდება აბსცისათა ღერძზე, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ არ იცვლება ფერმენტის თვისობა სუბსტრატეს მიმართ Mg_f სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის დროს, რეაქციის მაქსიმალური სიჩქარე კი იზრდება [Mg_f] კონცენტრაციის ზრდისას, Mg_f-ის კონცენტრაციის შემდგომი ზრდა (Mg_f>0,8mM) კი იწვევს აქტივობის დაცემას.



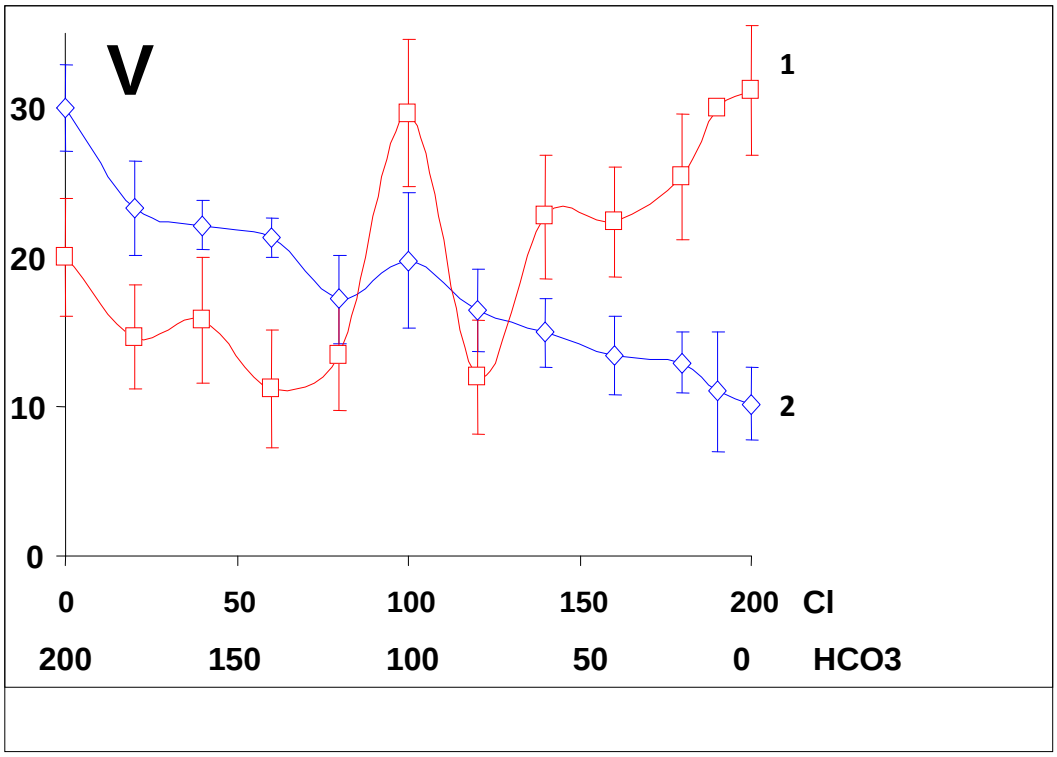
სურათი 5. Cl-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება სუბსტრატის კონცენტრაციაზე ორმაგშებრუნებული კოორდინატებში Cl-ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის დროს: 1-Cl_1=5mM, 2-Cl_2=10mM, 3-Cl_3=15mM.

სურათზე 5 წარმოდგენილია Cl-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება სუბსტრატიდან Cl^-ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის დროს ორმაგშებრუნებულ სიდიდეებში. 1/V=f(1/x) ფუნქცია წრფივია და აქვს ასიმპტოტა, ე. ი. Cl^- იონები Cl^--ATPაზისათვის აქტივატორია. რეგრესიის კოეფიციენტების გამოთვლით და წრფეების ურთიერთგადაკვეთის წერტილის განსაზღვრით შესაძლებელია ფერმენტული სისტემის მოდიფიკატორის (კონკრეტულად Cl^-ის იონების) მოქმედების ხასიათის გარკვევა. ასიმპტოტებისათვის რეგრესიის კოეფიციენტების გამოთვლით მივიღეთ, რომ ეს პარამეტრი ერთნაირია სუბსტრატის სხვადასხვა ფიქსირებული კონ. დროს, ე.ი. წრფივი ფუნქციების ურთიერთგადაკვეთა ხდება აბსცისთა ღერძთან ერთ წერტილში. ეს კი იმის მაჩვენებელია, რომ ფერმენტის თვისობა სუბსტრატის მიმართ არ იცვლება Cl^-ის კონცენტრაციის ცვლილებისას. სუბსტრატის და Cl-ის იონების დაკავშირება ხორციელდება რანდომული მექანიზმით.



სურათი 6. Cl-ისა და სხვა ანიონების (N^-) შეფარდებით გამოწვეული MgATP-ის ჰიდროლიზი (მოკროსომები). $N^-_1=NO_3^-$, $N^-_2=SO_4^{2-}$.

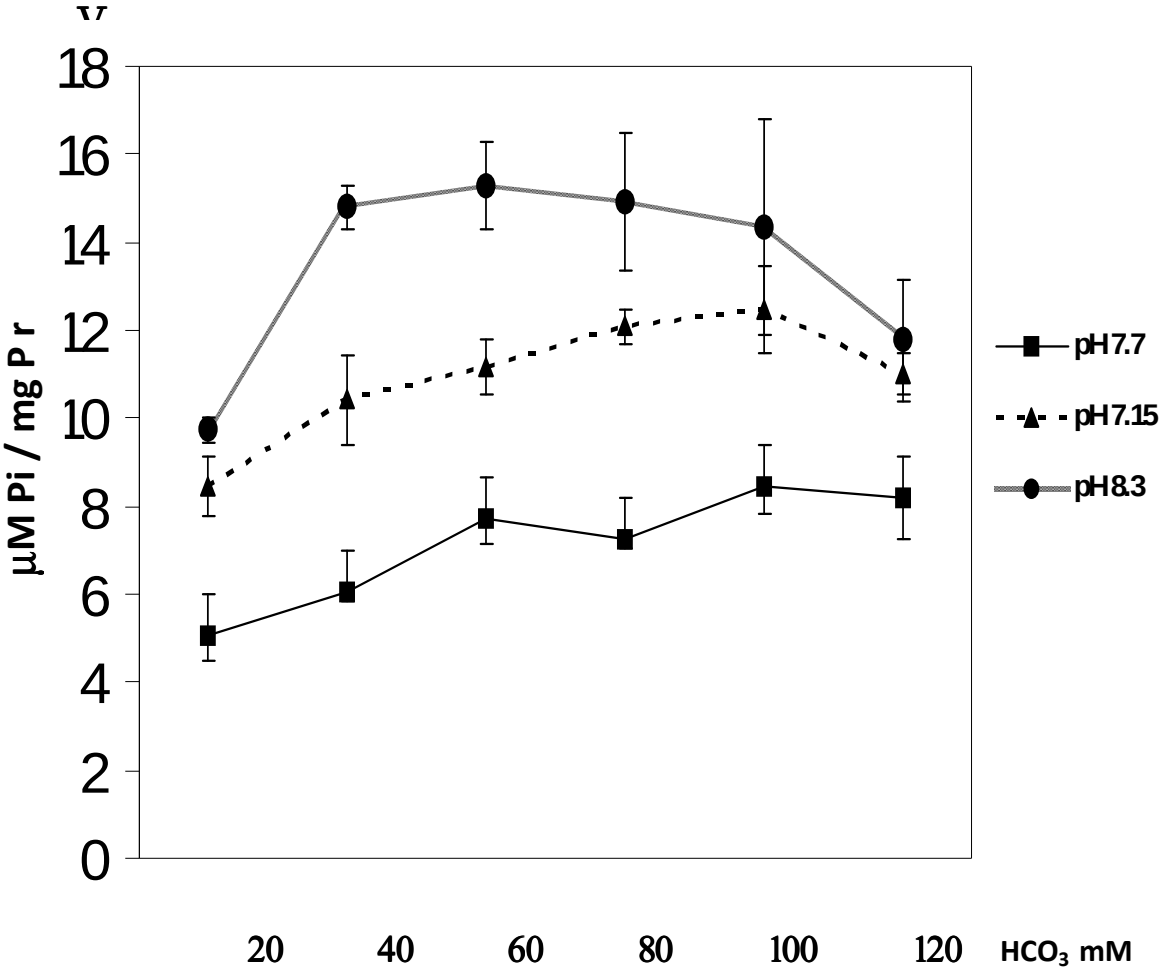
სურათზე 6 და სურათზე 7 წარმოდგენილია ქლორისა და სხვა ანიონების შეფარდებით მიღებული აქტიობების ამსახველი მრუდები.



სურათი 7. Cl^--ისა და HCO_3-ის სხვადასხვა კონცენტრაციების შეფარდებით მიღებული აქტივობა. 1-სინაპტოსომები (Sin), 2-მიკროსომები(Mic).

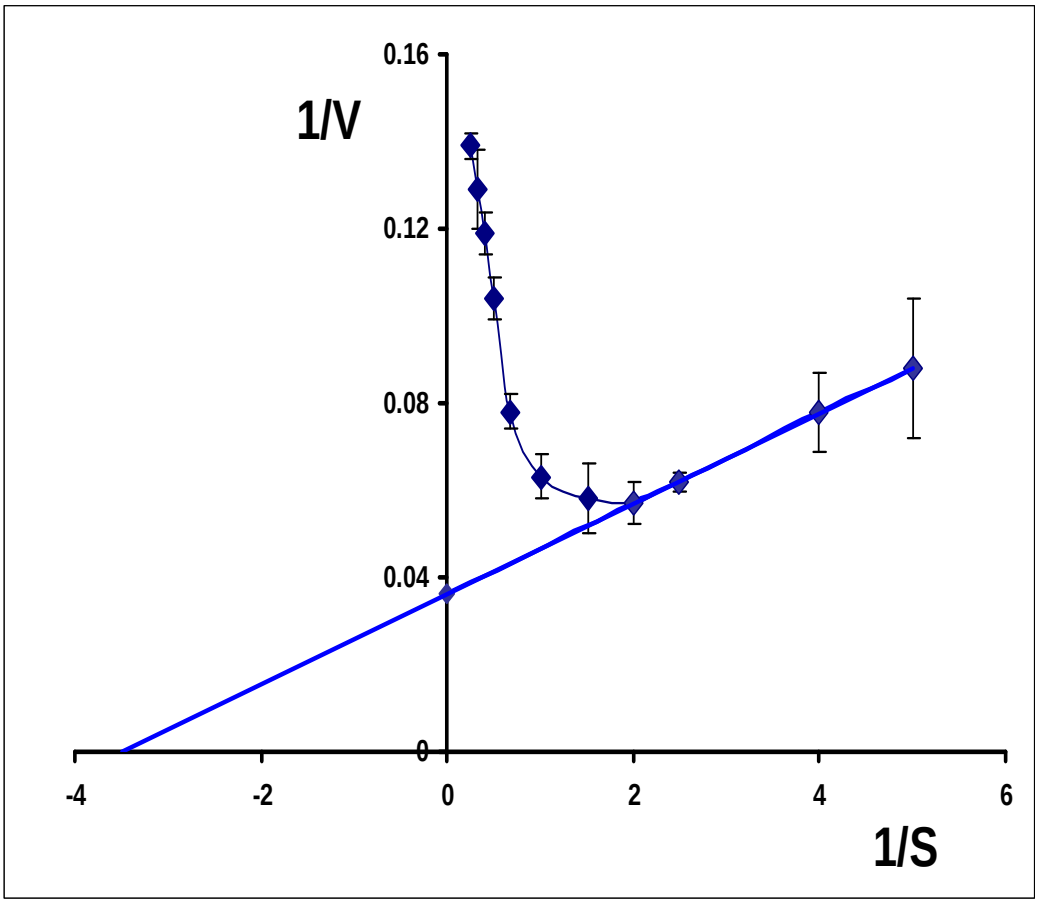
ანიონების ჯამური კონცანტრაცია ყოველი კონკრეტული შემთხვევებისათვის შეადგენდა 200 mM-ს. სურათზე 6 0/200 mM (1 მრუდი) ასახავს NO_3-ATPაზურ აქტივობას, 0/200 mM (2 მრუდი) - SO_4-ATPაზას. სურათზე 7 შესატყვისად 1 მრუდი გამოხატავს Mg·HCO_3-ATP-აზურ აქტიობას, ხოლო 2 მრუდი Cl-ATPაზას. კიდურა კონცენტრაციები უჩვენებს კონკრეტული ანიონებით გამოწვეულ ATP-აზური რეაქციის აქტივაციას. მრუდები რთული ფორმით ხასიათდებიან. თითოეულ შემთხვევაში აღინიშნება ერთი ან მეტი ამოზნექილობა ან ჩაზნექილობა, აღინიშნება გადაღუნვისა და მოტრიალების წერტილები (ერთზე მეტი). მრუდებს საკმაოდ რთული გრაფიკული გამოსახულება აქვთ, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ ანიონური ATPაზები ხასიათდებიან ურთიერთსაწინააღმდეგო ეფექტით.

4. 3. Mg-დამოკიდებული HCO_3-ATPაზა, ექსპერიმენტული შედეგები



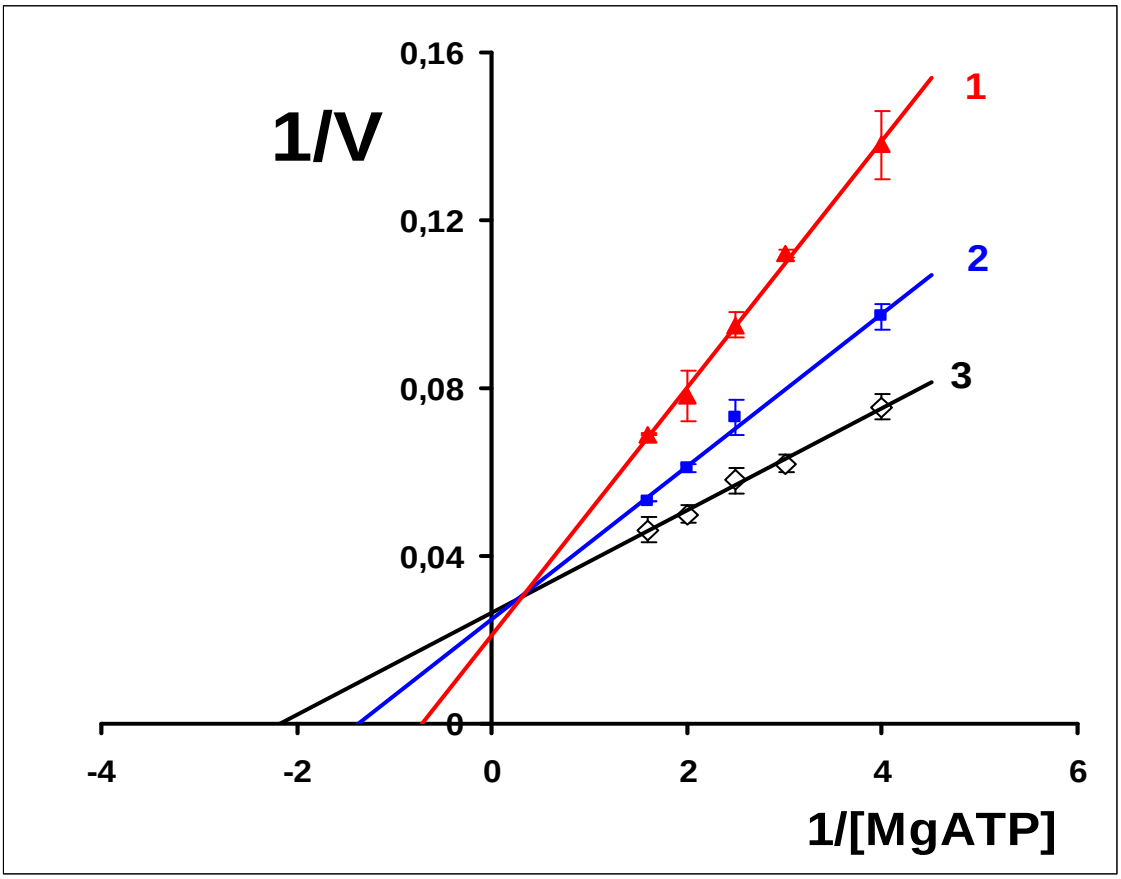
სურათი 8. Mg-დამოკიდებული ATP-ის ჰიდროლიზი HCO_3-იონების კონცენტრაციიდან pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობისას. Tris-მალატის ბუფერი, სინაპსური მემბრანის ფრაქცია, ცილა-0.016მგ/მლ.

სურათზე 8 წარმოდგენილია Mg-დამოკიდებული ATP-ის ჰიდროლიზი HCO_3-იონების კონცენტრაციიდან სინაფსური მემბრანების ფრაქციაში. მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზით ნათლად ვლინდება ზარისებური ფორმა აღმავალი და დაღმავალი ფაზით HCO_3-იონების კონცენტრაციიდან დამოკიდებულებით. ეს გეომეტრიული ფორმა დამახასიათებელია ყველა ტრანსპორტული (Tr) ATP-აზისათვის და არის მათთვის აუცილებელი, მაგრამ არასაკმარისი პირობა.



სურათი 9. HCO_3^-ATPაზის დამოკიდებულება სუბსტრატის (MgATP) კონცენტრაციაზე (mM) ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეებში, როცა [Mg]=[ATP].

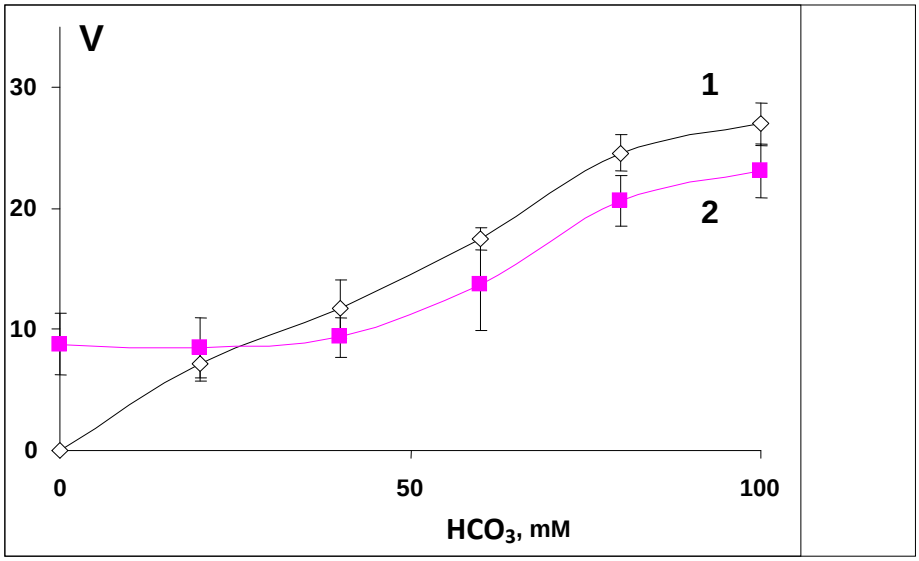
როგორც სურათიდან ჩანს MgATPაზას დაბალი კონცენტრაციებისას მრუდს აქვს მარტივი ჩაზნექილი ფორმა, ხოლო MgATP-ის მაღალი კონცენტრაციისას რთული გეომეტრიული ფორმა. MgATP-ის დაბალი კონცენტრაციისას გვაქვს ფერმენტის აქტივაცია, ხოლო კონცენტრაციის ზრდა იწვევს ინჰიბიციას.



სურათი 10. HCO_3-ATPაზის აქტივობის დამოკიდებულება სუბსტრატის კონცენტრაციაზე ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეებში HCO_3-იონების სხვადასხვა კონცენტრაციებისას: 1 – 25mM; 2 – 5. mM; 3 – 100mM.

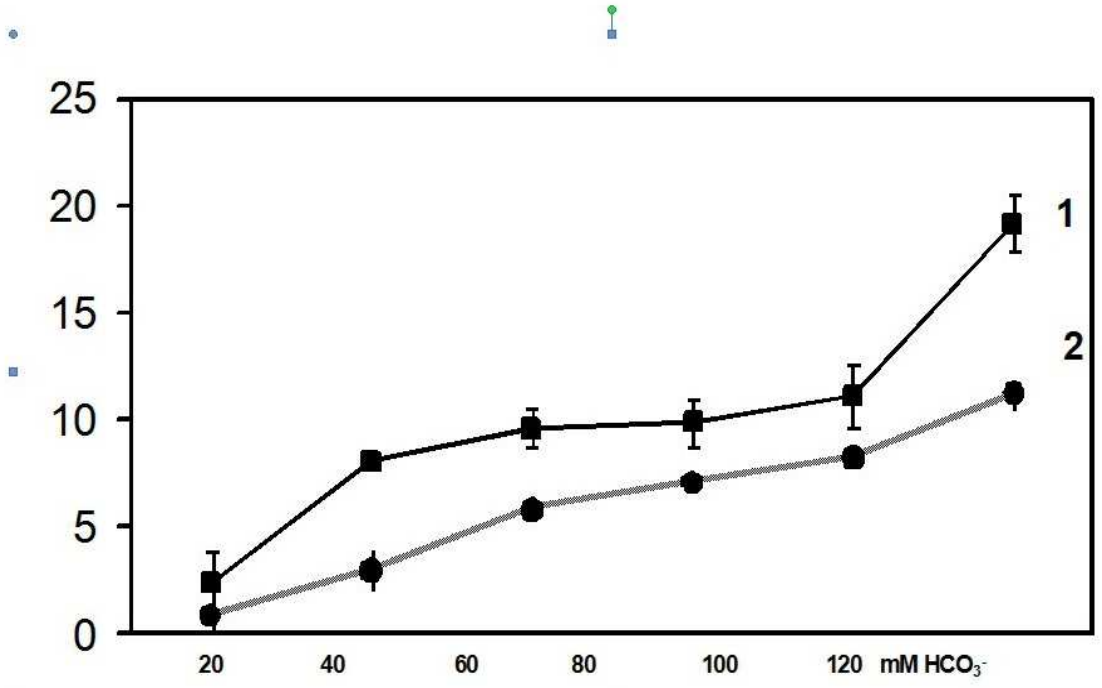
ასიმპტოტების გრადიენტის შეფასება გვიჩვენებს, რომ ისინი სუბსტრატის სხვადასხვა კონცენტრაციისას არ არიან მსგავსნი. მრუდები არ კვეთენ აბსცისათა ღერძს ერთ წერტილში, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ ენზიმის თვისობა სუბსტრატის მიმართ იცვლება HCO_3-იონების კონცენტრაციის ცვლილებასთან ერთად.

4. 4. Mg-არადამოკიდებული HCO_3^-ATPაზა, ექსპერიმენტული შედეგები



სურათი 11. Mg-არადამოკიდებული (2) და Mg-დამოკიდებული (1) ATPაზური აქტიობები. 1. Mg=0 ; 2. Mg≠0

HCO_3^--ATP-აზის მაგნიუმით აქტივაციის პრობლემის გასარკვევად, HCO_3^- იონებისაგან დამოკიდებული ფერმენტული კატალიზი განისაზღვრა ორი განსხვავებულ სიტუაციაში: Mg^{++}=0 (სურათზე 11 - მრუდი 1) და Mg^{++}≠0 (სურათზე 11 - მრუდი 2). ექსპერიმენტული მონაცემებიდან გამომდინარე აღმოჩნდა, რომ ATP-ის ჰიდროლიზი მიმდინარეობს ორივე შემთხვევაში. ორივე შემთხვევაში მრუდები დაახლოებით ერთნაირი ფორმისაა. განსხვავება აღინიშნება სიტუაციაში, როდესაც $[HCO_3^-]$=0 და Mg^{++}=0 ამ დროს HCO_3-ATP-აზა არ მუშაობს, ხოლო როდესაც Mg^{++}≠0, ჰიდროლიზს განაპირობებს Mg-ATP-აზა. როგორც ჩანს, მაგნიუმის იონები HCO_3^--ით გამოწვეულ სტიმულაციაზე სერიოზულ ცვლილებებს ვერ ახდენს, ე.ი არსებობს Mg^{++}-არადამოკიდებული HCO_3-ATP-აზა, ხოლო Mg-ATP-აზა ფუნქციონირებს მისგან დამოუკიდებლად. ამდენად საქმე გვაქვს ძუძუმწოვართა თავის ტვინის სინაფსურ მემბრანაში ადრე აღმოჩენილ Mg^{++}-არადამოკიდებულ Ca-ATP-აზის მსგავს HCO_3^- აქტივირებულ ATP-ის ჰიდროლიზის მექანიზმთან. ლიტერატურაში ასევე არის მინიშნება, რომ არსებობს სტრუქტურული კავშირი CaMg-ATPაზასა და HCO_3–ATPაზას შორის, გასუფთავებით მათი დაცილება პრაქტიკულად ვერ ხერხდება, თუმცა ისინი დამოუკიდებელ სისტემებს წარმოადგენენ. ზემოთ აღნიშნული გვიქმნის გარკვეულ წარმოდგენას Mg^{++}-არადამოკიდებული HCO_3-ATPაზის არსებობის შესაძლებლობაზე.

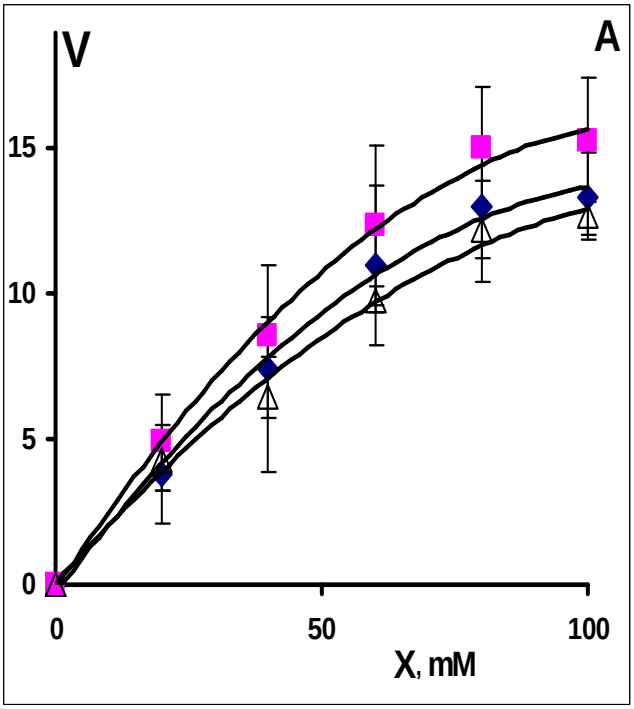


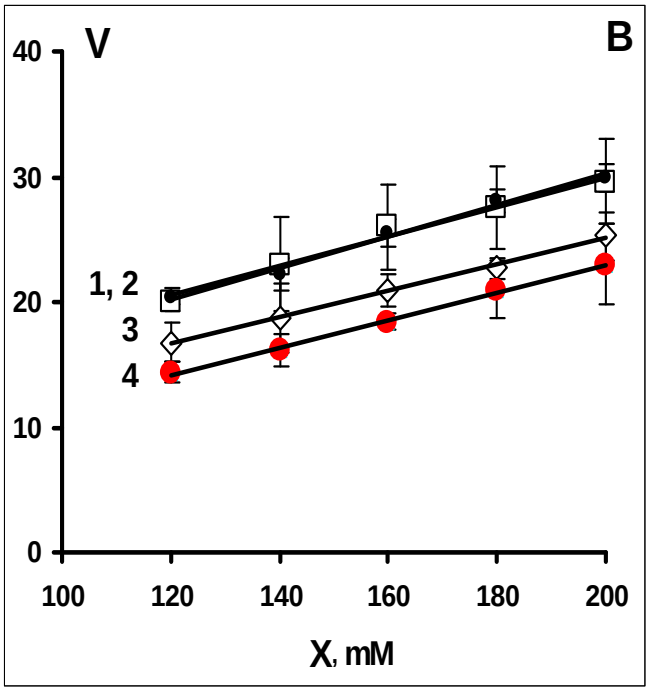
სურათი 12. HCO_3-ATPაზას დამოკიდებულება HCO_3იონებისა კონცენტრაციიდან სინაფსურ (1) და მიკროსომული (2) მემბრანების ფრაქციაში. ცილა-0.022მგ/მლ.

სურათზე 12 წარმოდგენილია ATPაზური რეაქციის ამსახველი მრუდები(სუბსტრატი თავისუფალი ATP-ია). HCO_3^- იონების კონცენტრაციიდან ($V=f[HCO_3^-]$) სინაფსურ (1) და მიკროსომულ (2) მემბრანულ ფრაქციაში. ორივე შემთხვევაში მრუდის გეომეტრიული ფორმის ანალიზით მრუდი სამფაზოვანია: HCO_3^- იონების დაბალ კონცენტრაციულ ფარგალში (10-50mM) ადგილი აქვს სისტემის აქტივაციას; კონცენტრაციის ზრდით აღინიშნება უმნიშვნელო პლატო, ხოლო კონცენტრაციის შემდგომი მატებით მოსალოდნელი ინჰიბიციის ნაცვლად კვლავ აქტივაცია ფიქსირდება (ჰიპერბოლის მსგავსი მრუდი). მიღებული შედეგი ეჭვქვეშ აყენებს ფერმენტის სატრანსპორტო ფუნქციას.ისმება კითხვა, HCO_3^--ATPაზური სისტემა ხომ არ წარმოადგენს ე.წ.„Ecto”ATPაზას.

ლიტერატურაში წარმოდგენილი მონაცემების საფუძველზე ჩამოყალიბდა ტრანსპორტული ATPაზების ზოგიერთი კინეტიკური თავისებურება: 1. ყველა ტრანსპორტული P-ტიპის ATPაზისათვის ტრანსპორტირებადი იონის კონცენტრაციაზე ფერმენტული რეაქციის სიჩქარის დამოკიდებულების ამსახველ მრუდს აქვს ზარისებური ფორმა, 2. P ტიპის ყველა ტრანსპორტულ ATPაზას ჭეშმარიტ სუბსტრატს წარმოადგენს MgATPკომპლექსი. ეს ორი პირობა აუცილებელია, თუმცა არასაკმარისი, მაგრამ მათი შეუსრულებლობის შემთხვევაში დანარჩენი არ განიხილება.

ზემოთ მოყვანილი შედეგების მიხედვით აღნიშნული პირობები არ შესრულდა, რამაც ეჭვქვეშ დააყენა HCO_3^--ATPაზას ტრანსპორტული ATPაზებისადმი მიკუთვნება.



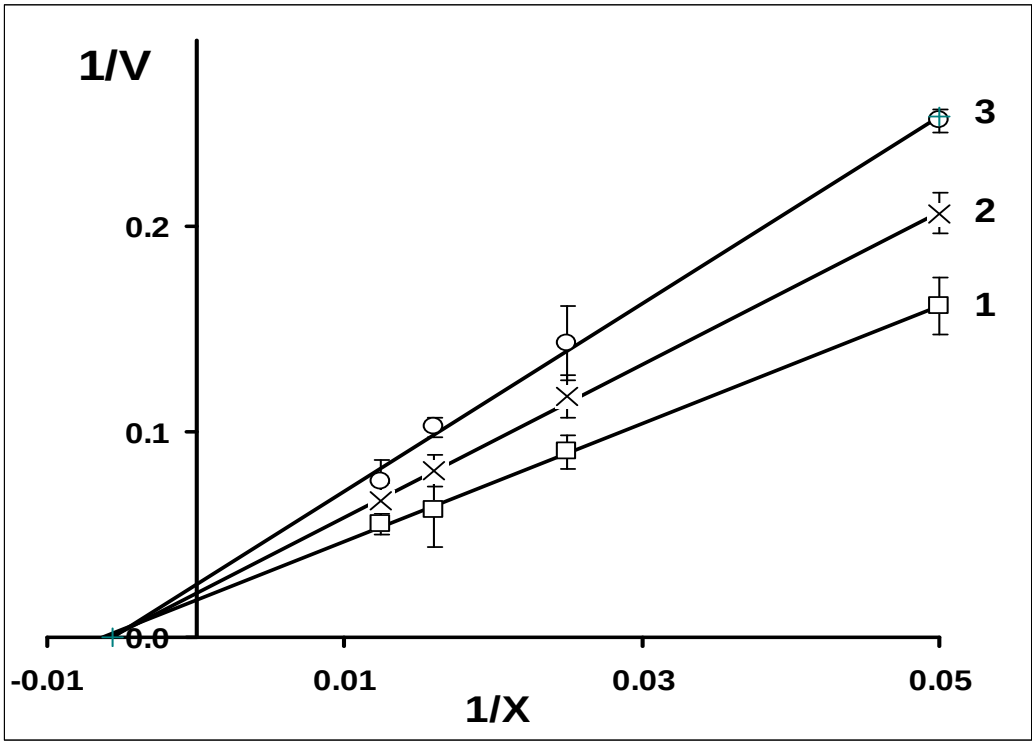


სურათი 13. HCO_3-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება HCO_3^-(X)-იონების სხვადასხვა კონცენტრაციიდან ATP-ის სხვადასხვა ფიქსირებული მნიშვნელობისას:

1,2-0,5-1mM; 3-1,5mM; 4-2mM.

Mg^{++}-არადამოკიდებული, HCO_3^--ით გამოწვეული ATP-ის ჰიდროლიზის არსებობა მიუთითებს იმაზე, რომ Mg^{++}-დამოკიდებული ATPაზებიდან განსხვავებით, HCO_3-ATPაზას სუბსტრატს უნდა წარმოადგენდეს თავისუფალი ATP და არა MgATP კომპლექსი. ამდენად შემდგომი კვლევა მოლეკულური მექანიზმის შესწავლისათვის ჩატარდა აღნიშნულის გათვალისწინებით.

სურათზე 13 მოყვანილია HCO_3-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება [HCO_3^-] იონების (X) კონცენტრაციიდან, ფიქსირებული ATP-ის სხვადასხვა მნიშვნელობისას. X<100 mM კონცენტრაციის პირობებში V=f(x) მზარდია და გადადის პლატოში (სურათზე 13, A). მაგრამ X>100 mM კონცენტრაციისას პლატოს შემდგომ ადგილი აქვს აქტიობის კვლავ მკვეთრ აწევას და დამოკიდებულება სარწმუნოდ სწორხაზოვანია (სურათზე 13, B), რაც კინეტიკურად გაუმართლებელია. V=f(x) ფუნქციის ანალიზი არგუმენტის მაღალი კონცენტრაციისას გვაფიქრებინებს HCO_3^--იონების მოქმედების არტეფაქტულ ბუნებაზე, არ მიიღება ზარის ფორმის მრუდი. ამდენად ეჭქვეშ დგება HCO_3-ATPაზის ტრანსპორტული ფუნქცია. აქტიური ტრანსპორტის შემთხვევაში HCO_3^- გამოწვეულ აქტივაციას, მაღალ კონცენტაციებზე უნდა მოსდევდეს ინჰიბიციის ფაზა (პერიოდი).

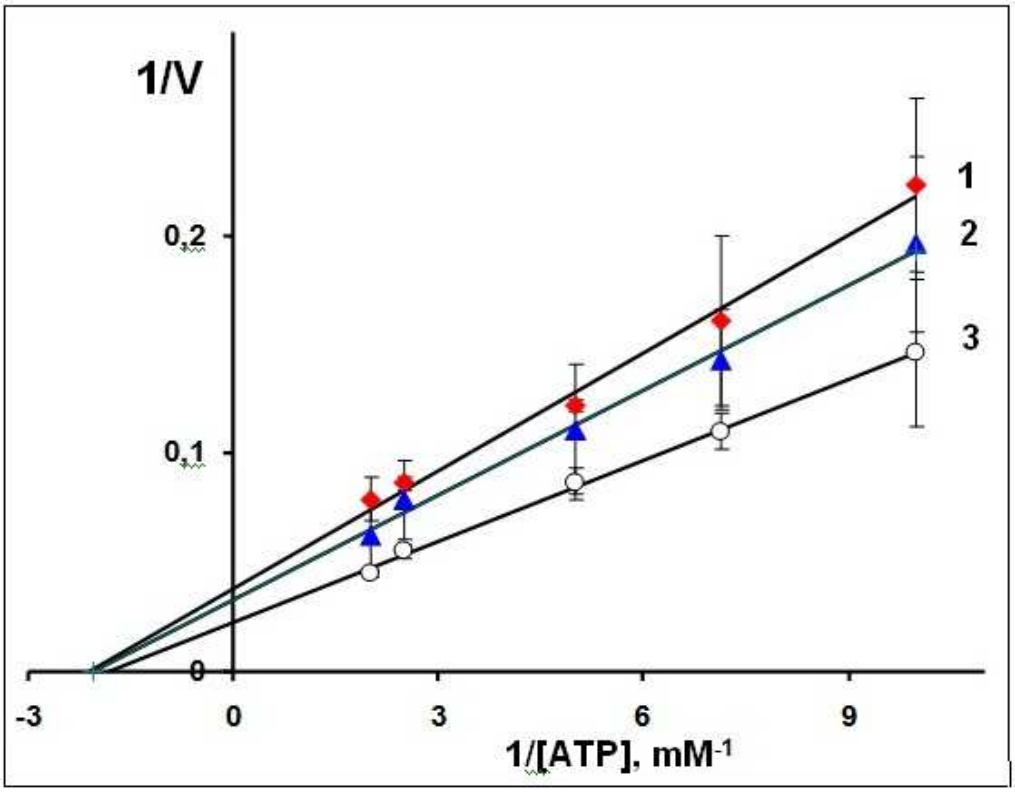


სურათი 14. HCO_3-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება HCO_3-ის კონცენტრაციიდან (x) ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეებში ATP-ის სხვადასხვა ფიქსირებულ მნიშვნელობისას: 1. 0,5 mM, 2. 1 mM, 3. 1,5 mM

სურათზე 14 ნაჩვენებია HCO_3-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება HCO_3^- იონების კონცენტრაციიდან (X) ATP-ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის დროს ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეებში. სურათიდან ჩანს, რომ $1/V=f(1/X)$ ფუნქცია $0{,}01 \leq X \leq 100$ mM წრფივია, რაც იმის მაჩვენებელია, რომ ბიკარბონატის ანიონები HCO_3-ATPაზისათვის აუცილებელი აქტივატორია და მისთვის განკუთვნილია ერთი დაკავშირების უბანი. რეგრესიის კოეფიციენტის გამოთვლით და წრფეების ურთიერთ გადაკვეთის წერტილის განსაზღვრით შესაძლებელია ფერმენტული სისტემის მოდიფიკატორის (ამ შემთხვევაში HCO_3^- იონების) მოქმედების ხასიათის გარკვევა (ცხრილი 4). თუ გავანალიზებთ ცხრილში წარმოდგენილ რეგრესიის კოეფიციენტებს (a, b, a/b). დავრწმუნდებით, რომ ამ შემთხვევისათვის –a/b პარამეტრი სარწმუნოდ ერთაირია ATP-ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის დროს, ე.ი წრფივი ფუნქციების გადაკვეთა ხდება აბცისათა ღერძზე ერთ წერტილში. ეს კი იმის მაჩვენებელია, რომ ფერმენტის თვისობა HCO_3^- იონების მიმართ არ იცვლება [ATP]-ის ცვლილებისას.

ცხრილი 4:

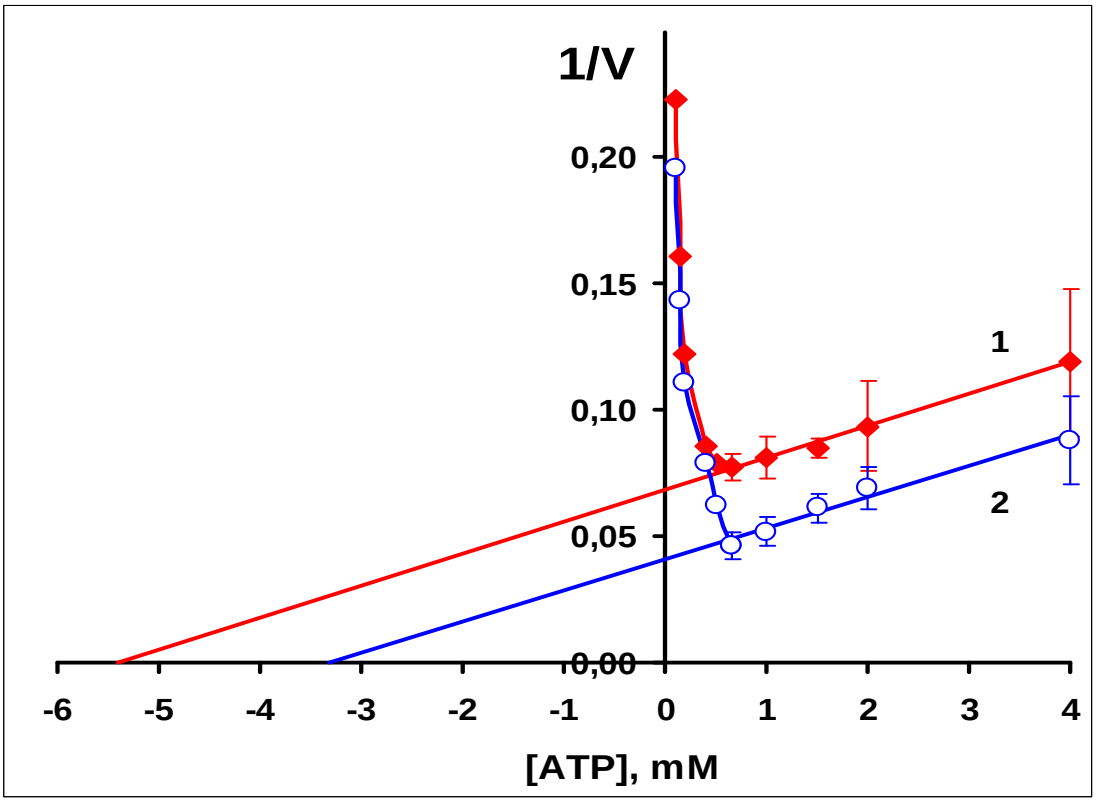
	ფიქსირებული ლიგანდის კონცენტრაცია	1/V=a + bx რეგრესიის კოეფიციენტები		
		A	**b**	**-a/b**
სურ. 14	[ATP]=0.5 mM	0.0180 ± 0.0016	2.860 ± 0.055	0.0063 ± 0.0006
1/V=f(X)	[ATP]=1 mM	0.0216 ± 0.0025	3.707 ± 0.084	0.0058 ± 0.0007
[ATP]=const	[ATP]=1.5 mM	0.0254 ± 0.0061	4.547 ± 0.006	0.0056 ± 0.0014
სურ. 15	[HCO_3^-]=50 mM	0.0379 ± 0.0057	0.018 ± 0.001	2.106 ± 0.334
1/V=f(1/ATP)	[HCO_3^-]=75 mM	0.0327 ± 0.0044	0.016 ± 0.001	2.043 ± 0.289
[HCO_3^-]=const	[HCO_3^-]=100 mM	0.0225 ± 0.0018	0.0124 ± 0.0003	1.815 ± 0.15
სურ. 16	[HCO_3^-]=50 mM	0.0628 ± 0.0010	0.0126 ± 0.0005	5.413 ± 0.229
1/V=f(ATP) [HCO_3^-]=const	[HCO_3^-]=100 mM	0.0407 ± 0.0027	0.0123 ± 0.0012	3.309 ± 0.39



სურათი 15. HCO_3-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება ATP-ის კონცენტრაციიდან ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეებში HCO_3-იონების სხვადასხვა ფიქსირებული მნიშვნელობისას:

1. 50 mM, 2. 75 mM, 3. 100 mM.

HCO_3-ATP-აზის დამოკიდებულებას [ATP]-დან, HCO_3^- იონების სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის დროს (X= 50, 75, 100 mM) რთული ხასიათი აქვს. სურათიდან 9 არგუმენტის (S=[ATP]) დაბალი მნიშვნელობისას (S<**0,8** mM) ადგილი აქვს რეაქციის აქტივაციას, მაღალი მნიშვნელობისას (S >**0,8** mM) აქტივაცია გადადის ინჰიბიციაში. მრუდის გეომეტრიული ფორმის ზუსტი ანალიზისათვის სუბსტრატიდან დამოკიდებულება (აქტივაციური ფაზა) წარმოდგენილია ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეებში (1/V=f(1/S), (სურათი 15). სურათისა და ცხრილის მიხედვით –a/b სიდიდეს შორის HCO_3^- იონების სხვადასხვა კონცენტრაციის დროს სარწმუნო სხვაობა არ აღინიშნება და სწორები იკვეთებიან აბცისათა ღერძის ერთ წერტილში. სუბსტრატული დამოკიდებულების ანალიზის საფუძველზე კეთდება დასკვნა, რომ ATP-ის მიმართ HCO_3-ATP-აზის თვისობა უცვლელი რჩება. სიდიდეები – დახრის კუთხე (b) და ორდინატაზე გადაკვეთა (a) მცირდება HCO_3-ის კონცენტრაციის ზრდისას. აქედან გამომდინარე შეიძლება ითქვას, რომ მოდიფიკატორი (ამ შემთხვევაში HCO_3^-) აქტივატორია მოცემულ კონცენტრაციულ ფარგალში.



სურათი 16. HCO_3-ATPაზური აქტიობის დამოკიდებულება ATP-ის კონცენტრაციიდან ორმაგ შებრუნებულ სიდიდეებში HCO_3-იონების სხვადასხვა ფიქსირებული მნიშვნელობისას:

1. 50 mM, 2. 100 mM.

ATP-ის მაღალი მნიშვნელობისას (S > 1 mM) სიტუაცია იცვლება (სურათზე 16); აღინიშნება მოტრიალების წერტილი და ATP-ის კონცენტრაციის ზრდა იწვევს რეაქციის ინჰიბიციას, HCO_3^- იონების ფიქსირებული კონცენტრაციის პირობებში. ATP-ის ზრდით გამოწვეული ფერმენტული რეაქციის ინჰიბიცია წარმოადგენს სუბსტრატულ ინჰიბიციას. რეგრესიის კოეფიციენტების გამოთვლით გამოჩნდა, რომ HCO_3-ის სხვადსახვა ფიქსირებული კონცენტრაციისას b-სიდიდე ერთნაირია, ე.ი. მრუდები პარალელურია. ეს ნიშნავს, რომ არ იცვლება მრუდების დახრა და იცვლება აბცისათა და ორდინატთა ღერძთან გადაკვეთის წერტილი. აქედან გამომდინარე ATP-ის მაღალი (S > 1 mM) კონცენტრაციისას HCO_3^- იწვევს რა აქტივაციას, ცვლის კატალიზურ კონსტანტას და არ მოქმედებს სპეციფიკურ კონსტანტაზე. ამდენად, HCO_3-ATP-აზური რეაქციის სიჩქარის სუბსტრატიდან დამოკიდებულების შესწავლით გამოვლინდა ATP-ის ორმაგი ეფექტი აქტივაცია და ინჰიბიცია, ე.ი ATP ფერმენტისათვის ერთდროულად არის აქტივატორი და ინჰიბიტორი, რაც განპირობებულია ფერმენტის მოლეკულაზე სუბსტრატის დამაკავშირებელი ორი შესატყვისი უბნის არსებობით.

4. 5. Mg^{2+}-არადამოკიდებული HCO_3^--ანიონებით აქტივირებული ATPაზა- „Ecto” ATPაზაა

Mg^{++}-არადამოკიდებული HCO_3-ATPაზას მუშაობს მთელი დატვირთვით მსგავსად ტრანსპორტული ATPაზებისა, მაგრამ საჭიროა გარკვევა ATPაზების რომელ კლასს მივაკუთვნოთ ის. ლიტერატურული მონაცემების თანახმად არსებობენ ე.წ. „Ecto” ATPაზები, რომლებიც ფუნქციონირებენ პლაზმური მემბრანის გარეთა მხრიდან და ინჰიბირდებიან სპეციფიური ინჰიბიტორით-ARL67156-ით [100, 101].

ჩვენი მონაცემებით სხვადასხვა მემბრანულ ფრაქციებში (მიკროსომები, სინაპტოსომები, მიტოქონდრიები) დაფიქსირდა HCO_3^--იონებით ATPაზური რეაქციის აქტივაცია. ლიტერატურაში ცნობილია HCO_3^--ATPაზა, რომლის სუბსტრატია MgATP კომპლექსი. გარდა სეკრეტორული ორგანოებისა, ფერმენტული აქტიობა გამოვლინდა პლაზმურ მემბრანებშიც. ჩვენ მიერ აღმოჩენილია მეორე ტიპის HCO_3^--ATPაზა, რომელიც ATP-ის ჰიდროლიზურ რეაქციას ახორციელებს Mg-ის იონების გარეშე. თუ პირველი სისტემა შეიძლება მივაკუთვნოთ ,,P”-ტიპის ტრანსპორტული ATPაზების სისტემას, გაურკვეველია Mg-არადამოკიდებული ATPაზას ადგილი ATPაზების თანამედროვე კლასიფიკაციაში.

შემდგომი ექსპერიმენტები ჩატარებულია „Ecto” ATPაზების სპეციფიური ინჰიბიტორის-ARL67156-ის გამოყენებით (ცხრილი) ინჰიბიტორის ეფექტი, შედარების მიზნით, შევისწავლეთ ორივე ტიპის HCO_3^--ATPაზაზე. როდესაც ATP-ის ჰიდროლიზის HCO_3^--ით აქტივაცია მიმდინარეობს მაგნიუმის ფონზე, ARL-ის შეტანა საინკუბაციო არეში არ იძლევა ეფექტს (ფერმენტული აქტიობა უცვლელია). სუბსტრატად თავისუფალი ATP-ის გამოყენების შემთხვევაში კი ვღებულობთ სარწმუნო ინჰიბიციას, ანუ Mg-არადამოკიდებული HCO_3^--ATPაზა ARL-ისადმი მგრძნობიარეა.

ARL67156-ის ეფექტი Mg^{++}-დამოკიდებულ და Mg^{++}-არადამოკიდებულ HCO_3^-–იონით აქტივირებულ ATPაზაზე

ცხრილი 5.

$MgCl_2$ mM	ARL67156, μM				
	0	5	10	20	40
$[Mg^{++}]=2^*$	16.50±1.46	15.25±0.90	14.25±1.25	14.75±1.03	14.50±1.75
$[Mg^{++}]=0^{**}$	15.0±2.06	9.05±2.02	10.25±2.36	8.50±2.69	7.25±1.25

$^*P>0.05$ $^{**}P<0.05$

ისმება კითხვა, ATPაზების ზოგადი კლასიფიკაციიდან რომელი ჯგუფის თვისებების მატარებელია HCO_3^--ATPაზა. ცნობილია, რომ ტრანსპორტული ATPაზების ზემოთ აღნიშნულ თავისებურებების საპირისპირო ეფექტით

ხასიათდებიან „Ecto” ATPაზები. ეს ენზიმები მდებარეობენ მემბრანის გარეთა მხარეს, ATP-ის ჰიდროლიზისათვის არ იყენებენ MgATP-ის კომპლექსს(შესაბამისად არ ხდება იონათა ტრანსპორტი) და ინჰიბირდებიან ARL-ით.

ჩვენს მიერ შესწავლილი ATPაზებიდან ყველა ამ თვისებებით ხასიათდება მხოლოდ Mg-არადამოკიდებული HCO_3^--ATPაზა.

ამდენად, მიღებული მანაცემების საფუძველზე, რომ HCO_3^--ATPაზა, რომელიც აკმაყოფილებს „Ecto” ATPაზებისადმი წაყენებულ მოთხოვნებს, შეიძლება მივაკუთვნოთ ენზიმთა ამ ჯგუფს.

5. მიღებული შედეგების განხილვა

5. 1. Cl-ATPაზას მოლეკულური მექანიზმის შედეგების განხილვა

სადღეისოდ ცნობილი P-ტიპის კათიონური ATPაზები მრავალუბნიან, რთულ ფერმენტულ სისტემებს წარმოადგენენ. ნაკლებად ცნობილია ანიონური ATPაზების (კერძოდ Cl-ATPაზას) როლი და ადგილი ATPაზების ზოგად კლასიფიკაციაში. აღნიშნულის დასადგენად აუცილებელ პირობას წარმოადგენს მისი მოქმედების მოლეკულური მექანიზმის შესწავლა. უპირველეს ყოვლისა, ისმება კითვვა, Cl-ATPაზა მიეკუთვნება თუ არა ტრანსპორტული ATPაზების სისტემას. ლიტერატურიდან ცნობილია [23] ის ძირითადი მოთხოვნები, რომლებიც წაყენებულია ტრანსპორტული ATPაზებისადმი. მათ შორის უმთავრესია ტრანსპორტირებადი იონებიდან სიჩქარის დამოკიდებულების ზარისებური ფორმა ($V=f(Cl^-)$) და Mg·ATP-ის კომპლექსის, როგორც ჭეშმარიტი სუბსტრატის არსებობის დადგენა.

ყველა ტრანსპორტული ATPაზისათვის ტრანსპორტირებადი იონის კონცენტრაციიდან ფერმენტული რეაქციის სიჩქარის დამოკიდებულების ამსახველ მრუდს აქვს ზარისებური ფორმა, სადაც აღმავალი ფაზა შეესაბამება იონის დაკავშირებისა პროცესს, ხოლო დაღმავალი - მის გამონთავისუფლებას. ჩვენი მონაცემებით Cl^--ATPაზისათვის ეს პირობა სრულდება მხოლოდ იმ შემთხვევაში, როდესაც რეაქცია მიმდინარეობს მაგნიუმის იონების ფონზე.

მიღებული შედეგიდან გამომდინარე შეიძლება დავასკვნათ, რომ Cl^--იონებით აქტივირებული Mg-დამოკიდებული ATPაზა აკმაყოფილებს ტრანსპორტული ATPაზების აუცილებელ კინეტიკურ თავისებურებებს:

1. $V=f[Cl^-]$ დამოკიდებულების ამსახველი მრუდი ზარისებური ფორმისაა;

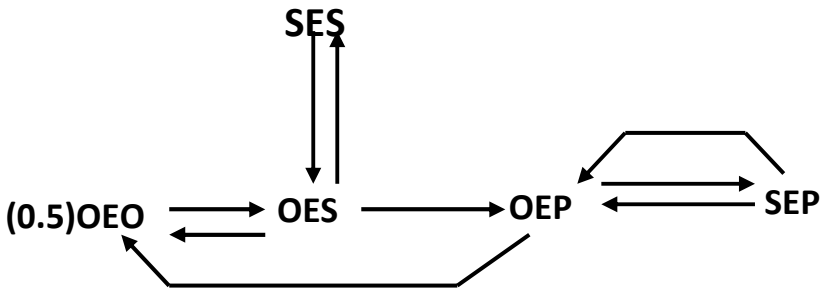
2. სისტემის მუშაობის ოპტიმალური რეჟიმი საჭიროებს [Mg·ATP] კომპლექსის არსებობის აუცილებლობას;

3. კატალიზური რეაქციის მსვლელობის პროცესში წარმოიქმნება ფოსფორილირებული ინტერემედიატი [102].

Mg·ATP-ის მცირე კონცენტრაციებისას $1/V=f(1/MgATP)$ ფუნქციის სწორხაზოვნება (სურათი 2) მიუთითებს, რომ Mg·ATP-ის, როგორც აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი $n=1$. თუ გავითვალისწინებთ, რომ Cl^--ATPაზური აქტივობა ვლინდება მხოლოდ Mg-თანაობისას და Mg·ATP წარმოადგენს ფერმენტული სისტემის აუცილებელ აქტივატორს, შეიძლება ითქვას, რომ Mg·ATP წარმოადგენს Cl^--ATPაზური სისტემის სუბსტრატს. უნდა აღინიშნოს, რომ Mg·ATP-ის მაღალი კონცენტრაციებისას, მისი, როგორც სრული ინჰიბიტორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვი $m=1$. ამ პირობებში $1/V=f(1/MgATP)$ მრუდზე არგუმენტის საშუალო მნიშვნელობისას მოტრიალებისა და გადაუნვის წერტილების არსებობა მიუთითებს, რომ Mg·ATP-ისათვის, როგორც ნაწილობრივი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორებისათვის განკუთვნილი უბნების მინიმალური რიცხვი $p\geq1$ [95]. რადგანაც სხვა P-ტიპის ATPაზების, კერძოდ NaK-ATPაზაზას შემთხვევაში ცნობილია [28], რომ ფერმენტის ერთ α სუბერთეულს გააჩნია სუბსტრატის დაკავშირების ერთი უბანი, ამიტომ Cl^--ATPაზას შემთხვევაშიც,

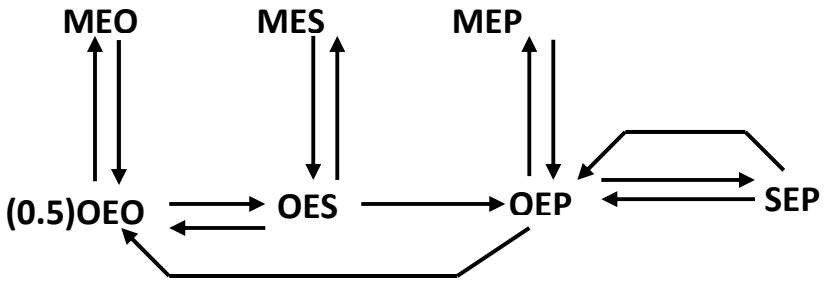
შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ მის ფუნქციურ ერთეულს წარმოადგენს მინიმუმ დიმერი, ორი იდენტური სუბერთეულით.

რადგანაც დაბალი კონცენტრაციებისას MgATP (S) არის ფერმენტული სისტემისთვის აქტივატორი, ხოლო მაღალი კონცენტრაციებისას – ინჰიბიტორი, კინეტიკურ სქემაში აუცილებლად შევა OES აქტივატორული და SES ინჰიბიტორული ფორმა. რადგანაც P-ტიპის ATPაზების შემთხვევაში წარმოიქმნება ფოსფორილებული ინტერმედიატი, სქემაში აუცილებლად იქნება OEP ფორმა, ხოლო ნაწილობრივი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორული უბნის არსებობას ხსნის კატალიზურად აქტიური SEP ფორმა. რადგან ფერმენტი მინიმუმ დიმერია, ამიტომ სქემის წინ მიწერილი (0,5) აღნიშნავს მის ერთ ნახევარზე მიმდინარე რეაქციას, რაც გულისხმობს იგივე რეაქციის მსვლელობის ალბათობას მეორე ნახევარზეც. ამდენად, წარმოდგენილი სქემები შეიძლება ჩაითვალოს ფერმენტის მუშაობის სარკულ გამოსახულებად.



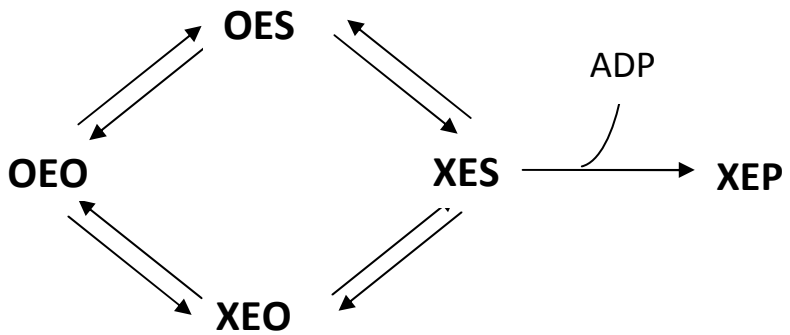
არგუმენტის მცირე მნიშვნელობისას ფუნქცია ასიმპტოტურად უახლოვდება ორდინატთა ღერძს, ე. ი. Mg·ATP ამავდროულად წარმოადგენს სრულ ინჰიბიტორს (ე. წ. სუბსტრატული ინჰიბიცია).

Mg-სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციების დროს V=f(1/S), ანალიზით გამოვლინდა მისი, როგორც ენზიმური სისტემის მაინჰიბირებელი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორის ბუნება. სურათზე 4 წარმოდგენელი შედეგი, ზემოთ აღნიშნულთან ერთად შეიძლება ჩაითვალოს იმის დადასტურებად, რომ მაგნიუმი Cl^--ATPაზას სუბსტრატის შემადგენელი კომპონენტია, თუმცა Mg^{2+}-ს ეფექტს უფრო რთული ხასიათი აქვს. შესაძლებელია Mg^{2+}-ისათვის Cl^--ATPაზის მოლეკულის ფუნქციურ ერთეულზე არსებობდეს სპეციალური დამაკავშირებელი უბანი, სადაც Mg^{2+}-ს შეუძლია გამოამჟღავნოს თავისი ძლიერი მოდიფიკატორული ბუნება. წრფეების აბსცისათა ღერძზე ურთიერთგადაკვეთა (სურათი 4) მიუთითებს, რომ *MgATP*-ისათვის Mg^{2+} წარმოადგენს ინჰიბიტორს უცვლელი თვისობით [95] და ფერმენტის Mg^{2+}-დაკავშირებულ ფორმებს არ გააჩნიათ კატალიზის უნარი. ამრიგად, ფერმენტის MEO, MES და MEP ფორმები მოგვცემენ „ჩიხურ განშტოებებს.”



წრფეების ურთიერთგანლაგების ანალიზით (სურათი 5), რომელიც ასახავს Cl^--ATPაზას დამოკიდებულებას სუბსტრატის კონცენტრაციიდან ორმაგშებრუნებულ კოორდინატებში Cl^--ის სხვადასხვა ფიქსირებული კონცენტრაციის დროს, კეთდება დასკვნა, რომ Cl^--ის იონები ფერმენტული სისტემის აქტივატორია, რომელიც სტიმულირებს ნაწილობრივი ეფექტის მქონე უბნების უპირატეს მოქმედებას. Cl^- ამავე დროს სისტემის მოდიფიკატორია. მისი კონცენტრაციის გაზრდით აქტივაცია გადადის ინჰიბიციაში. ასეთი განლაგება მხოლოდ მრავალუბნიანი ფერმენტული სისტემის შემთხვევაშია შესაძლებელი და დამოკიდებულია მრავალუბნიანობით განპირობებული პარამეტრებისაგან.

ამდენად, Cl^--ის იონები უნდა განეკუთვნებოდეს მოდიფიკატორთა იმ ჯგუფს, რომელთა მოქმედებით მცირდება შესაბამისი წრფივი ფუნქციის დახრა, მაგრამ უცვლელია ორდინატთა ღერძთან გადაკვეთის წერტილი, რაც აუცილებელი პირობაა სპეციფიური მოდიფიკატორისთვის. ეს ნიშნავს, რომ Cl^--ის იონები სპეციფიური ეფექტის მქონე აქტივატორია. თუ Cl^--ს აღვნიშნავთ X-ით, მაშინ ფერმენტულ სისტემასთან Cl^--ისა და სუბსტრატის (S) დაკავშირება-გამონთავისუფლება შეიძლება წარმოვადგინოთ შემდეგი სქემის სახით:



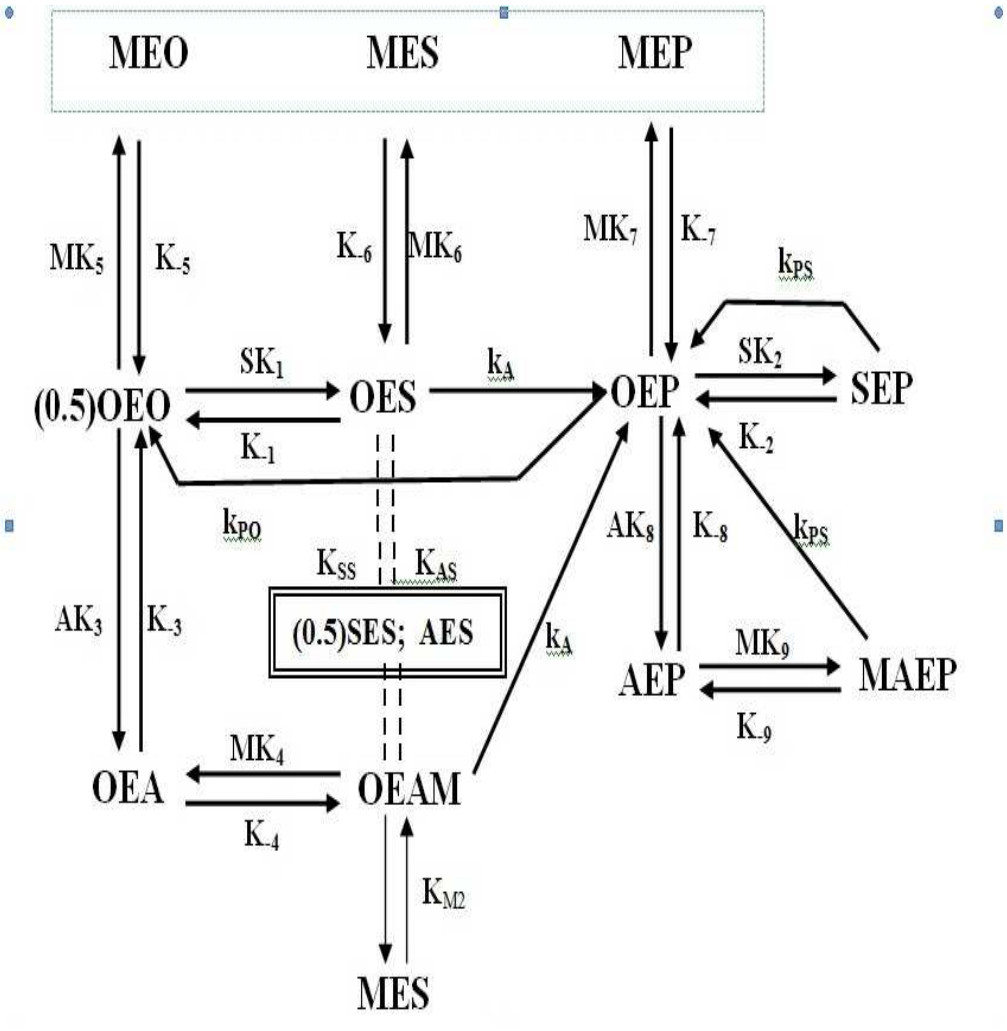
მემბრანაში Cl^--ATPაზას სხვა ATPაზებთან ურთიერთკავშირის შესწავლა გარკვეულ წილად დაგვეხმარება მისი მოქმედების მექანიზმისა და ფუნქციის გაშიფვრაში. აღნიშნულის გარკვევის მიზნით ნანახია ანიონების ურთიერთზეგავლენა მემბრანაში მათ მიერ ATP-ის ჰიდროლიზური რეაქციის განხორციელების პროცესში. ცოცხალ უჯრედში ანიონების ჭარბი რაოდენობა

დაფიქსირებულია მემბრანის გარეთა ზედაპირზე, შიგნითა ზედაპირთან შედარებით [85]. ეს ფაქტი განსაზღვრავს მათ მოძრაობას კონცენტრაციული გრადიენტით გარედან შიგნით. ლიტერატურაში არის მითითება Cl^--ისა და სხვა ანიონების კოტრანსპორტის შესაძლო არსებობაც ATP-ის ჰიდროლიზური ენერგიის გამოყენების ხარჯზე (კერძოდ, Cl/HCO_3^- -კოტრანსპორტი) [46]. Cl^- მიმართულია უჯრედის შიგნიდან გარეთ, HCO_3^--ის საპირისპიროდ. აღნიშნული პროცესი შესაძლებელია განპირობებული იყოს Mg^{2+}- არადამოკიდებული HCO_3^--ATP-აზას არსებობით პლაზმურ მემბრანაში [Tsakadze, at al., 2007], რომლის სუბსტრატს (განსხვავებით Mg-დამოკიდებული HCO_3-ATPაზისაგან) წარმოადგენს მხოლოდ თავისუფალი ATP. ეს ATPაზა შესაძლებელია განეკუთვნებოდეს ე. წ. Ecto-ATPაზების ჯგუფს, რომლებიც ფუნქციონირებენ მემბრანის გარეთა მხარეზე და არ საჭიროებენ Mg-ის იონებს.

Cl^--ისა და HCO_3^--ით გამოწვეული ATP-აზური რეაქციის ერთობლივი შესწავლით საინკუბაციო არეში (Mg-ის თანდასწრებით) ანიონების შეფარდებისას (ჯამური კონცენტრაცია მუდმივია), გამოვლინდა რთული ურთიერთდამოკიდებულება (სურათი 7). ერთი ანიონით გამოწვეული აქტივაციური ფაზა ემთხვევა მეორე ანიონით გამოწვეულ ინჰიბიციურ ფაზას და პირიქით. როგორც ჩანს Cl-ATPაზა და HCO_3^--ATPაზა ურთიერთსაპირისპიროდ მოქმედებენ.

ასევე რთული დამოკიდებულება აღIნიშნა Cl/NO_3-ის, Cl/SO_4-ის შეფარდებით მიღებულ გრაფიკულ გამოსახულებაზე (სურათი 6). $V=f(Cl/N^-)$ რთულია, მრუდები ხასიათდებიან გადაღუნვისა და მოტრიალების რამდენიმე წერტილით. უნდა ვივარაუდოთ, რომ უჯრედში ფერმენტის მოლეკულა განსხვავებულ თვისობას იჩენს თითოეული ანიონის მიმართ მათი ერთდროული არსებობის პირობებში. დასკვნის სახით შეიძლება ითქვას, რომ Cl-ATPაზას შესწავლით გამოვლინდა საინტერესო ანალოგია ტრანსპორტული ATPაზების ზოგად კინეტიკურ თავისებურებებთან. Cl-ATPაზა, P-ტიპის ATPაზების მსგავსად, წარმოადგენს ტრანსპორტულ სისტემას, რომელიც ახორციელებს ქლორის ანიონების აქტიურ გადანაცვლებას პლაზმური მემბრანის შიგა მხარედან გარეთ. Cl-ATPაზას ჭეშმარიტი სუბსტრატი Mg·ATP კომპლექსია.

თავისუფალი ლიგანდები (Mg_f და ATP_f) სისტემის მოდიფიკატორებია აქტივატორული და ინჰიბიტორული ეფექტით, სუბსტრატის მიმართ უცვლელი თვისობით; Cl^--ის იონები კი სპეციფიური ტიპის მოდიფიკატორია სუბსტრატის მიმართ უცვლელი თვისობით.



სქემაში S წარმოადგენს MgATP-ის კომპლექსს, P-არაორგანულ ფოსფატს, M-თავისუფალი მაგნიუმის იონებს. OEO აღნიშნავს ფერმენტის ფორმას, როდესაც არც ერთი ნუკლეოტიდდამაკავშირებელი უბანი არ არის დაკავებული (E-ში იგულისხმება ფერმენტის ფუნქციონალური ერთეული); OES-ფერმენტის კატალიზურ უბანთან სუბსტრატდაკავშირებული ფორმაა, (OES-აუცილებელი აქტივატორული ფორმა), OEP-ფერმენტის ფოსფორილირებული ინტერმედიატია. ფერმენტის MEO, MES და MEP ფორმები იძლევიან „ჩიხურ განშტოებებს" და ფერმენტთან MgATP-ისა და მოდიფიკატორების დაკავშირება-გამონთავისუფლება ხდება რანდომული მექანიზმით.

სუბსტრატეს მაღალი კონცენტრაციის (S>1mM) შესაძლებელია ფერმენტის ჩიხური განშტოების ფორმების ორი ვარიანტი: 1) SES, როდესაც ფერმენტის მოლეკულას უერთდება მეორე S მხოლოდ იმ შემთხვევაში, თუ მასთან უკვე დაკავშირებულია პირველი S (SES-სრული ინჰიბიტორული ფორმა, რომლის არსებობაზე მიუთითებს 1/V=f(1/S), როდესაც S>1, სურათი 2); 2) AES, როდესაც სუბსტრატდაკავშირებულ ფერმენტს უკავშირდება მეორე ATP (დასტურდება 1/V=f(Mg_f^{2+}), როდესაც S=const, სურათი 3).

ფერმენტის SES და AES ფორმები ჩიხურ განშტოებებს წარმოადგენენ. ჩიხურ განშტოებებს მიეკუთვნება M-დაკავშირებული ფორმებიც (MEO, MES, MEP), რომელთა არსებობას განსაზღვრავს ექსპერიმენტალური მონაცემები. მიღებული $1/V=f(Mg_f^{2+})$-ის შესწავლით, ჩანს, რომ Mg-ის მაღალ კონცენტრაციაზე Mg^{2+}>1,5mM ადგილი აქვს ინჰიბიციას (სურათი 3, მრუდი 1); SEP ფორმა კატალიზურად აქტიური ფორმაა, რომელშიც MgATP კომპლექსი ავლენს ნაწილობრივი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორის როლს. (ამას ამტკიცებს 1/V=f(1/V) მრუდზე გადაღუნვის წაერტილის არსებობა, სურათი 2).

ჩიხური განშტოებების წარმოქმნის მექანიზმი შესწავლილა NaKATPაზურ რეაქციაზე [103, 104]. ATPაზური რეაქციის დროს ჰიდროლიზდება არა მარტო ხსნარში წარმოქმნილი MgATP კომპლექსი, არამედ ფერმენტის მოლეკულაზე აწყობილიც. ამ უკანასკნელის განსახორციელებლად აუცილებელ პირობას წარმოადგენს ენზიმის აქტიურ ცენტრში ჯერ ATP-ის, შემდეგ კი Mg^{2+}-ისმიერთება. თუ პროცესი წარიმართა საპირისპიროდ (ჯერ Mg^{2+},შემდეგ ATP), წარმოიქმნება „ჩიხური" კომპლექსი.

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად [28, 105] NaK-ATPაზური სისტემისათვის დამტკიცებულია ერთ α სუბერთეულზე მხოლოდ ერთი კატალიზური უბნის არსებობა. აღნიშნულიდან გამომდინარე SEP და SES ფორმების გამოვლენა მიუთითებს მოლეკულის დიმერულ ბუნებაზე, ორი იდენტური სუბერთეულით $(\alpha\beta)_2$, რაც უნივერსალური სისტემა უნდა იყოს ყველა "P-ტიპის" ტრანსპორტული ATPაზისათვის.

ამდენად, შესაძლებელია, რომ ყველა ''P-ტიპის ტრანსპორტული ATPაზები, როგორც კათიონური, ასევე ანიონური, ხასიათდებიან მსგავსი მოლეკულური მექანიზმით.

5. 2. Cl-ანიონით აქტივირებული ATPაზას ექსპერიმენტული შესწავლის შედეგები

Cl-ATPაზა აკმაყოფილებს ტრანსპორტული ATPაზების აუცილებელ კინეტიკურ თავისებურებებს:

1. ფერმენტული რეაქციის სუბსტრატს წარმოადგენს [MgATP] კომპლექსი;

2. V=f(Cl) დამოკიდებულების ამსახველი მრუდი ზარის ფორმისაა;

3. სუბსტრატიდან დამოკიდებულების [V=f(S)] ამსახველი მრუდები, თავისუფალი ლიგანდების (Mg_f, ATP_f, Cl_f) მუდმივი კონცენტრაციისას ტრანსპორტული ATPაზებისთვის დამახასიათებელი ფორმისაა;

4. რეაქციის მსვლელობისას წარმოიქმნება ფოსფორილირებლი ინტერმედიატი.

5. 3. Mg-დამოკიდებული HCO_3-ATPაზა, შედეგების განხილვა

რეაქციის სიჩქარის HCO_3-ანიონებიდან დამოკიდებულების ამსახველი მრუდი ზარისებური ფორმისაა P-ტიპის ტრანსპორტული ATPაზების მსგავსად. ზარისებური ფორმის აღმავალი და დაღმავალი ფორმა მიუთითებს HCO_3-ანიონის ტრანსპორტზე კონცენტრაციული გრადიენტის საწინააღმდეგო მიმართულებით (სურათი 8). აღნიშნული ფორმა არის აუცილებელი და არასაკმარისი პირობა ტრანსპორტისათვის.

ორმაგშებრუნებულ სიდიდეებში რეაქციის სიჩქარის დამოკიდებულება სუბსტრატის კონცენტრაციაზე [MgATP] შემდეგ სურათს გვაძლევს: ფუნქციას გააჩნია ასიმპტოტა არგუმენტის მაღალი მნიშვნელობისას, საშუალო მნიშვნელობისას კი მოტრიალების წერტილი (სურათი 9), არგუმენტის მცირე მნიშვნელობისას კი ადგილი აქვს ფერმენტული სისტემის ინჰიბიციას, არგუმენტის დიდი მნიშვნელობისას (ექსტრემალურად მცირე MgATP-ის დროს) 1/V= f(1/MgATP) ფუნქციის სწორხაზოვნებაა უცილებელი და საკმარისი პირობაა იმისათვის, რომ [MgATP] კომპლექსი ჩაითვალოს ფერმენტული სისტემის ჭეშმარიტ სუბსტრატად, მსგავსად ტრანსპორტული ATPაზებისა.

HCO_3 ანიონი ორმაგი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორია სუბსტრატის მიმართ. სურათზე 10 ჩანს, რომ ასიმპტოტები სუბსტრატის სხვადასხვა მნიშვნელობისას არ არიან მსგავსნი. მრუდები არ კვეთენ აბსცისთა ღერძს ერთ წერტილში, თუმცა იკვეთება პირველ მეოთხედში. აქედან გამომდინარე შეიძლება დავასკვნათ, რომ HCO_3 იონების კონცენტრაციის ცვლასთან ერთად იცვლება ენზიმის თვისობა სუბსტრატის მიმართ.

დასკვნის სახით შეიძლება ითქვას, რომ Mg-დამოკიდებული HCO_3-ATPაზა მსგავსად კათიონგადამტანი ATPაზებისა, წარმოადგენენ P ტიპის აქტიური ტრანსპორტისათვის დამახასიათებელი მექანიზმის მქონე ენზიმებს, რომელთა სუბსტრატია MgATP-ის კომპლექსი, ხოლო HCO_3 იონები სისტემისათვის არიან ორმაგი ეფექტის მქონე მოდიფიკატორები.

5. 4. Mg-დამოკიდებული HCO_3-ATPაზას ექსპერიმენტული შესწავლის შედეგები

1. HCO_3^-ანიონებიდან რეაქციის სიჩქარის ამსახველი მრუდი ზარისებური ფორმისაა, P-ტიპის ტრანსპორტული ATPაზების მსგავსად.

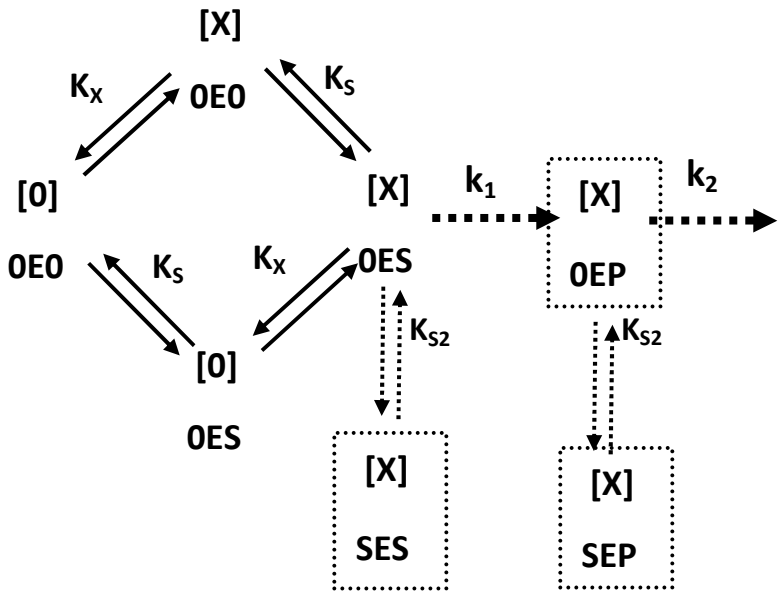
2. არგუმენტის დიდი მნიშვნელობისას 1/V=f(1/MgATP) ფუნქციის სწორხაზოვნება აუცილებელი და საკმარისი პირობაა იმისათვის, რომ [Mg-ATP] კომპლექსი ჩაითვალოს ფერმენტული სისტემის ჭეშმარიტ სუბსტრატად, მსგავსად ტრანსპორტული ATP-აზებისა.

3. Mg^{++}-დამოკიდებული HCO_3-ATPაზა მსგავსად კათიონგადამტან სისტემებისა, წარმოადგენს P ტიპის აქტიური ტრანსპორტისათვის დამახასიათებელი მექანიზმის მქონე ენზიმს.

5. 5. Mg-არადამოკიდებული HCO_3^-ATPაზას მიღებული სამეცნიერო შედეგების განხილვა

ზემოთ მოყვანილი ექსპერიმენტული კვლევის შედეგად კეთდება დასკვნა, რომ თავის ტვინის მემბრანულ ფრაქციებში (მიკროსომები, სინაპტოსომალური მემბრანები) მიმდინარეობს Mg^{++}-არადამოკიდებული HCO_3-ით სტიმულირებული ATP-ის ჰიდროლიზი. HCO_3-ATPაზას სუბსტრატს წარმოადგენს თავისუფალი ATP, HCO_3^- იონები კი ფერმენტული რეაქციის აქტივატორებია (სურათი 11 და სურათი 15). ფერმენტის მოლეკულური მექანიზმის დადგენაში პრინციპულ როლს თამაშობს სუბსტრატის კონცენტრაციის ვარირება. სუბსტრატის დაბალი კონცენტრაციისათვის (S < 1 mM) (სურ. 16) რეაქციის სიჩქარის $1/V=f(1/S)$ დამოკიდებულება სწორხაზოვანია, მაღალი (S > 1 mM) კონცენტრაციების ფარგალში $1/V=f(S)$ დამოკიდებულებაა სწორხაზოვანი. HCO_3-ATPაზას ფუნქციურ ერთეულს ორი სუბსტრატდამაკავშირებელი უბნი გააჩნია — ერთი კატალიზური, მეორე ინჰიბიტორული. ეს, შესაძლებელია, არის იმის მინიშნება, რომ ის დიმერია, P-ტიპის ტრანსპორტული ATPაზების მსგავსად. ცხადია, რომ HCO_3^- შერეული ტიპის მოდიფიატორია (აქტივატორია) სუბსტრატის მიმართ უცლელი თვისობით (სურ 15).

აღნიშნული მონაცემებისა და თეორიული გათვლების საფუძველზე შეიძლება წარმოვიდგინოთ HCO_3-ATPაზის მუშაობის პრინციპიალური (კინეტიკური) სქემა (ე.წ. მინიმალური მოდელი, რომელიც გულისხმობს ფერმენტის ფორმებისა და მათ შორის რეაქციების საფეხურების მინიმალური რაოდენობის შერჩევას, რომლებიც გარკვეული წესით არიან დაკავშირებული და ლიგანდის ნებისმიერ კონცენტრაციაზე უზრუნველყოფენ თეორიული და ექსპერიმენტული მრუდების გეომეტრიული მრუდების თანხვედრას):



სქემაში S წარმოადგენს ATP-ს, X – HCO_3^- იონებს, P – არაორგანულ ფოსფატს. OEO აღნიშნავს ფერმენტის ფორმას, როდესაც არც ერთი ნუკლეოტიდ-დამაკავშირებელი უბანი არ არის დაკავებული (E-ში იგულისხმება ფერმენტის ფუნქციონალური ერთეული); OES – ფერმენტის კატალიზურ უბანთან სუბსტრატდაკავშირებული ფორმაა (S<1 mM), რომელსაც უერთდება მოდიფიკატორი (X); OEP-ფერმენტის ფოსფორილებული ინტერმედიატია. სქემაზე, სუბსტრატის მაღალი კონცენტრაციისას შესაძლებელია ფერმენტის ჩიხური განშტოების ფორმების ორი ვარიანტი: 1) SES, როდესაც ფერმენტის მოლეკულას უერთდება მეორე S მხოლოდ იმ შემთხვევაში, თუ მასთან უკვე დაკავშირებულია X და პირველი S (V-ტიპის ATPაზა); 2) SEP, რომელიც წარმოადგენს ფოსფორილებულ ინტერმედიატს, რომელსაც მხოლოდ ასეთ მდგომარეობაში უკავშირდება მეორე ATP. ფერმენტის SES და SEP ფორმები ჩიხურ განშტოებებს წარმოადგენენ.

ამდენად, ექსპერიმენალური მონაცემების საფუძველზე შესწავლილია სინაფსური მემბრანის Mg^{++}-არადამოკიდებული HCO_3-ATPაზას მოლეკულური მექანიზამი.

5. 6. Mg^{2+}-არადამოკიდებული HCO_3^-ATPაზა და Mg^{2+}-დამოკიდებული HCO_3^-ATPაზას შედარებითი ანალიზი

გავაკეთოთ შედარებითი ანალიზი ტრანსპორტულ ანუ Mg^{2+}-დამოკიდებულ და Mg^{2+}-არადამოკიდებულ HCO_3^-ATPაზებს შორის. ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა გვიჩვენა, რომ ტრანსპორტული ATPაზების დამახასიათებელ კრიტერიუმებს აკმაყოფილებს Mg^{2+}-დამოკიდებული HCO_3^-ATPაზა:

1. Mg^{2+}-დამოკიდებული HCO_3^-ATPაზას 1/V=f (1/ HCO_3) მრუდს აქვს ზარის ფორმა, რომელიც არ გააჩნია Mg^{2+}-არადამოკიდებულ HCO_3^-ATPაზას;

2. MgATP კომპლექსი არის Mg^{2+}-დამოკიდებული HCO_3^-ATPაზას სუბსტრატი, მაშინ, როდესაც Mg^{2+}-არადამოკიდებულ HCO_3^-ATPაზა მუშაობს Mg^{2+}-ის გარეშე;

3. ცნობილია, რომ „Ecto" ATPაზების სპეციფიური ინჰიბიტორი არის ARL67156-ის. ჩატარებულმა ცდებმა ორივე ტიპის ATPაზაზე აჩვენა, რომ ARL67156 ინჰიბირებს მხოლოდ Mg^{2+}-არადამოკიდებულ HCO_3^-ATPაზას, ხოლო Mg^{2+}-დამოკიდებულ HCO_3^- ATPაზაზე ეფექტი არასარწმუნოა.

ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, Mg^{2+}-არადამოკიდებულ HCO_3^-ATPაზა ვერ აკმაყოფილებს იმ პირობებს, რომლებიც აუცილებელია ტრანსპორტული ATPაზებისათვის და ის შეიძლება მიეკუთვნებოდეს „Ecto" ATPაზების ჯგუფს, მაშინ, როცა Mg^{2+}-დამოკიდებულ HCO_3^-ATPაზა ტრანსპორტული P ტიპის ATPაზაა.

6. დასკვნა

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე შეიძლება დავასკვნათ, რომ ქლორის ანიონით აქტივირებულმა ATPაზამ გამოავლინა საინტერესო ანალოგია სხვა ტრანსპორტული ATPაზების ძირითად კინეტიკურ თავისებურებებთან. Cl-ATPაზა წარმოადგენს P ტიპის ATPაზას, რომელის ანხორციელებს ქლორის აქტიურ ტრანსპორტს კონცენტრაციული გრადიენტის საწინააღმდეგო მიმართულებით სინაპსური და მიკროსომული მემბრანის შიგნითა ზედაპირიდან გარეთა ზედაპირზე. ორივე მემბრანის კინეტიკური პარამეტრები მსგავსია.

თეორიული და ექსპერიმენტული მრუდების ანალიზმა შესაძლებელი გახადა Cl^--ით აქტივირებული ATPაზური სისტემის მოქმედების მექანიზმის შესწავლა და მისი პრინციპიალური სქემის ანუ "მინიმალური მოდელის" შემუშავება.

ვირთაგვას თავის ტვინის პლაზმურ მემბრანაში (სინაფსური და მიკროსომული) დაფიქსირებული და შესწავლილია HCO_3^--ით აქტივირებული Mg^{2+} დამოკიდებული ATPაზური აქტიობა. Mg-HCO_3-ATPაზა აკმაყოფილებს ტრანსპორტული ATPაზების აუცილებელ კინეტიკურ თავისებურებებს, ამდენად, იგი შეიძლება მივაკუთვნოთ P ტიპის ტრანსპორტული ATPაზების ჯგუფს.

ჩვენს მიერ აღმოჩენილი და შესწავლილი იქნა სრულიად ახალი ფერმენტული სისტემა: Mg^{2+}-არადამოკიდებული HCO_3-ანიონებით აქტივირებული ATPაზური რეაქცია. აღმოჩნდა, რომ Mg^{2+}-არადამოკიდებული HCO_3-ATPაზური სისტემა ვერ აკმაყოფილებს იმ პირობებს, რომლებიც აუცილებელია ტრანსპორტული ATPაზებისათვის. ის სავარაუდოდ უნდა მიეკუთვნებოდეს ე. წ. "Ecto" ATPაზების ჯგუფს.

ნაშრომის თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა

ნაშრომი მიეკუთვნება ფუნდამენტური კვლევის ტიპს.

ჩატარებული ექსპერიმენტული კვლევის საფუძველზე მიღებული შედეგები და დასკვნები აღრმავებენ ცოდნას ანიონური ATP-აზური სისტემების როლზე თავის ტვინის მემბრანულ სტრუქტურაში მიმდინარე სასიცოცხლო პროცესებზე.

მიღებული შედეგების გარკვეულ წილად გამოყენება შესაძლებელია მედიცინაში, კერძოდ ნერვოლოგიური დაავადებების შემთხვევაში, ვინაიდან ეს დაავადებები დაკავშირებულია მემბრანულ სტრუქტურებში მიმდინარე ბიოქიმიური პროცესების დარღვევასთან და მათი რეგულაციის შესაძლებლობას იძლევა.

ნაშრომში გამოყენებული მრავალუბნიანი ფერმენტული სისტემების კინეტიკური ანალიზის მეთოდები შეიძლება წარმატებით იყოს მისადაგებული რთული გეომეტრული ფორმის მრუდის მქონე სხვა ფერმენტული სისტემების კინეტიკური კვლევისათვის.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე

შესწავლილია ვირთაგვას თავის ტვინის მემბრანულ ფრაქციებში (სინაპტოსომები, მიკროსომები) ანიონებით, კერძოდ Cl^- და HCO_3^--ით გამოწვეული Mg-ATPაზური აქტიობის მექანიზმები თანამედროვე მეთოდის გამოყენებით, რომელიც რთული, მრავალუბნიანი ფერმენტული სისტემების კინეტიკური მრუდების ანალიზის საშუალებას იძლევა [Kometiani, 2007].

დავადგინეთ, რომ ფერმენტული სისტემებისათვის (Cl^--ATPაზა და HCO_3-ATPაზა) ჭეშმარიტ სუბსტრატს წარმოადგენს Mg-ATP კომპლექსი, თავისუფალი ლიგანდები (Mg^{2+}_f და ATP_f) არიან სისტემის მოდიფიკატორები ორგვარი ეფექტით, Cl^--ისა და HCO_3^--ის ანიონები კი სისტემის აქტივატორებია.

დადგენილია ხარისხობრივი პარამეტრების n და m რიცხობრივი მნიშვნელობა (n წარმოადგენს აუცილებელი აქტივატორებისათვის განკუთვნილი უბნების რიცხვს, m – სრული ინჰიბიტორებისათვის განკუთვნილ უბნების რიცხვს). ორივე ფერმენტული სისტემისათვის მათი რიცხვობრივი მნიშვნელობები ერთის ტოლია.

მიღებული ექსპერიმენტული შედეგების საფუძველზე შემოთავაზებულია ანიონური ATPაზური სისტემების მუშაობის ამსახველი კინეტიკური სქემები ანუ მინიმალური მოდელი, რაც გულისხმობს ფერმენტის ფორმებისა და მათ შორის რეაქციების საფეხურების მინიმალური რაოდენობის შერჩევას, რომლებიც გარკვეული წესით არიან დაკავშირებული და ლიგანდის ნებისმიერ კონცენტრაციაზე უზრუნველყოფენ თეორიული და ექსპერიმენტული მრუდების თანხვედრას.

ძალზე მნიშვნელოვანია ის, რომ განისაზღვრა მოცემული ანიონური ATPაზების ადგილი ტრანსპორტული სისტემების ზოგად კლასიფიკაციაში. Cl^--ATPაზა და HCO_3-ATPაზა უნდა მიეკუთვნებოდეს P ტიპის ტრანსპორტულ ATPაზებს.

ამასთანავე აღსანიშნავია, რომ აღმოჩენილია სრულიად ახალი, Mg^{2+}-არადამოკიდებული HCO_3-ATPაზა, შესწავლილია მისი მოქმედების მექანიზმი და შესაძლო ადგილი კლასიფიკაციაში. აღნიშნული ფერმენტული სისტემა სავარაუდოდ უნდა მიეკუთვნებოდეს ე. წ. “ექტო-ATPაზების” ჯგუფს.

შრომების სია:

1. NO_3^- და SO_4^{2-} - ანიონებით აქტივირებული Mg–დამოკიდებული ATP-აზა. ლ. წაქაძე, მ. ლელაძე, ს. ძნელაძე, გ. ჭკადუა. საქ. მეცნ. ეროვნ. აკად. მაცნე, ბიომედ. სერია, ტ. 39, №1-2, გვ. 69-73, 2013.

2. The Study of Anion-Activated ATPases Relation. M. Leladze, S. Dzneladze, L. Tsakadze, T. JariaSvili. Proc. Geogian Nat. Acad. Sci., Biomed. Series, vol. 38, No 5-6, pp. 305-308, 2012.

3. Mg-dependent HCO_3 –ATPase is a P-type transporting ATPase. L. Tsakadze, M. Leladze, S. Dzneladze, Z. Kometiani. Journal of Biological Physics and Chemistry 12, No3, 113-115, 2012.

4. Cl anion-dependent Mg-ATPase. Sopio Dzneladze, Leila Tsakadze, Marina Leladze, Zurab Kometiani. The Journal of Membrane Biology. 245:0 151-156. 2012.

5. ARL67156*-ის გავლენა Mg-არადამოკიდებულ HCO_3-ანიონებით აქტივირებულ ATPაზურ რეაქციაზე. ლ. წაქაძე, მ. ლელაძე, ს. ძნელაძე, ზ. ქომეთიანი. საქ. მეცნ. აკად. მაცნე, სერ. ბოილ. ტ. 37. №1-2. ვ.113-117. 2011.

6. HCO_3-იონებით აქტივირებული Mg-დამოკიდებული ATPაზა. ლ. წაქაძე, მ. ლელაძე, ს. ძნელაძე. საქ. მეცნ. აკად. მაცნე, სერ. ბოილ. ტ. 35. №1-2, გვ.121-124. 2009.

7. Cl-ATPაზა: ვირთაგვას თავის ტვინის პლაზმური მემბრანის ტრანსპორტული ATPაზა. ს. ძნელაძე, მ. ლელაძე, ლ. წაქაძე. საქ. მეცნ. აკად. მაცნე, სერ. ბიოლ. ტ. 35, №1-2. ვ.117-120. 2009.

8. Mg-independent HCO_3-ATPase. L. Tsakadze, S. Dzneladze, Z. Kometiani. Proc. Georgian Acad. Sci., Biol. Ser. B. Vol. 5. No 2, p. 9-13, 2007.

9. Molecular mechanisms of Mg-independent HCO_3- ATPase. L. Tsakadze, S. Dzneladze, Z. Kometiani. Proc. Georgian Acad. Sci., Biol. Ser. B. Vol. 5. No 3-4, p. 5-7, 2007.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. შიოშვილი ლ., კვიწინაძე ნ., ჭკადუა გ., ჯარიაშვილი თ. “Zn^{2+} დამოკიდებული Mg-ATPაზური აქტიურობა” საქ. მეცნ. ეროვნ. აკად. მაცნე, ბიომედ. სერია, 2012, ტ. 38 №5-6, გვ. 335-340.

2. “The biological role of trace elements in animals and men”. Nozdrukina L. Moscow, Publ. House “Science”, 2001, 230.

3. Kane P.M. ”Vacuolar ATPase: structure, function, assembly and biosynthesis.” J. Bioenerg. Biomembr., 1999, 31, pp. 1-83.

4. Gruber G., Wieczorek H., Harvey W. R., Muller V. ,,Structure – function relationships of A-, F- and V-ATPases.” The Jour. of Exper. Biol., 2001, 204, pp. 2597-2605.

5. Pisa K. Y., Weidner C., Maischak H., Kavermann H., Muller V. ,,The coupling ion in the methanoarchaeal ATP synthases: H^+ vs. Na^+ in the A(1)A(0) ATP synthase from the archaeon Mathanosarcina mazei GÖ1.” FEMS Microbiol. Lett., 2007, 277, pp. 56-63.

6. Ferguson S. A., Kiens S., Cook G. M. ,,Biochemical and Molecular Characterization of a Na^+-Translocating F_1F_0-ATPase from the Thermoalkaliphilic Bacterium paradoxum.” J. Bacteriol., 2006, 188 (14), pp.5045-5054.

7. Mulkidjanian A. Y., Makarova K.S., Galperin M. Y., Koonin E. V. ,,Inventing the dynamo machine: the evolution of the F-type and V-type ATPases.” Nat. Rev. Microbiol., 2007, 5, pp. 892-899.

8. Katz S., Blostein R. “Ca-stimulated membrane phosphorilation and ATPase activity of the human erythrocyte”. Biochem. et bBiophys. Acta, 1975, v 389, p. 314-324.

9. Knauf P.A., Proverbio F., Hoffman J.F. “Electrophoretic separation of different phophosproteins associated with Ca-ATPase and Na, K-ATPase in human red cell ghosts”. J. Gen. Physiol., 1974, 63 (3), pp. 324-336.

10. Axelsen K.B., PaLmgren M.G., “Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily”. J. of Molecular Evolution, 1998, 46, pp. 84 -101.

11. Leladze M., Nozadze E., Kometiani Z. “On the molecular mechanism of Na,K-ATPase isoforms”. J. of Biol. Physics and Chemistry, 2001, 1, pp.19-20.

12. შიოშვილი ლ., ქომეთიანი ზ. „მიკროსომული Na,K-ATPაზას მოქმედების მოლეკულური მექანიზმი.” საქ. მეც. აკად მაცნე, ბიოლოგიის სერია, 2006, ტ. 32, №4, გვ. 871-878.

13. Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H. ,,Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmoc reticulum at 2,6 A resolution.” Nature, 2002, 405, pp. 647-655.

14. Scarborough G. A. “Crystallization, structure and dynamics of the proton-transporting P-type ATPase”. J. Exp. biol., 2000 ,203, pp.147-154

15. Fatemi N., Sarkar B. “Molecular mechanism of copper transport in Wilson diseas”. Enviromental Health Perspectives Supplements, 2002, v110, 5, pp.695-598.

16. ”ATPases, ion-motive”. In: eLS. Guillain F., Mintz E. Chichester, Nature Publishin Group, 2001, 1038.

17. Didonato M., Zhung I., Que L., Sarker B. “Zinc binding to the N-terminal domain of the Wilson disease copper-transporting ATPase: implications for in vivo metal ion mediated regulation of ATPase activity”. J. Biochemistry, 2002, 177, pp. 13 409-13 414.

18. Didonato M., Hsu H.F., Narindrasorasak S., Que L., Sarker B. “Copper-induced conformational chang in the N-terminal domain if the Wilson disease copper-transporting ATPase”. Biochemistry, 2000, 39, pp 1890-1896.

19. Lutsenko S., Petrukhin K. “N-terminal domain of human cooper-transporting adenosine triphosphatases”. J. Biol. Chem. 1997, 272, 18939-18944.

20. Nozadze E., Chkadua G., Kometiani Z. “Bivalent cation-activated ATPases”.J. of Neurosciences. 2005, 1, 4, 49-53.

21. Rensing G., Ghosh M., Rosen B. “Families of soft-metal-ion transporting ATPase”. J. Bacteriol. 1999, 181, 5891-5898.

22. Tsai K., Lin F. “Membrane topology of the p1258 CadA Cd/Pb/Zn-transporting P-type ATPase.”J. Bioenerg. Biomembr. 2002, 34, 147-156.

23. Kometiani Z., Nozadze E. “Kinetic singularities of Transport ATPases” Bull. Georg. Acad. Sci. 2007, Vol. 175, No 4, 106-109.

24. “Methods for Kinetic Analysis of multi-sted enzyme systems”. Kometiani Z. ”Tbilisi”, 2005, 189.

25. “Kinetic Analysis of Multisite enzyme Systems”. Kometiani Z, Tbilisi, Sakartvelos Matsne, 2007, 110.

26. Chkadua G., Nozadze E., Kometiani Z. ”Na and K activation Mechanism of NaK-ATPase system at the excess of MgATP”. Proc. Georg. Acad. Sci., Biol. Ser. A. 2003, 29, 1-2, 193-202.

27. Nozadze E., Chkadua G., Kometiani Z. “Na and K activation Mechanism of NaK-ATPase system at the excess of ATP_f.” Proc. Georg. Acad. Sci., Biol. Ser. A. 2003, 29, 1-2, 121-129.

28. Robinson J. D., Flashner M. S. “The (Na+K)-activated ATPase. Biochim. And Biophys. Acta. 1979, 549, 145-176.

29. Post R. L., Morrit G. R., Kirosolving C. R., Allright C. D. “Membrane ATPase as a participant in the active transport of Na and K in human erythrocytes”. J. Biol. Chem., 1960, 235, 1797-1809.

30. Albers R.U., Koval G.Y., Siegel G.Y. “Studies of interaction of ouabain and other carelioactive steroids with sodium-potassium activated adenosine triphosphatase”. Mol. Pharmacol., 1968, 4, 324-343.

31. Glynn I.M., Karlish S.J.D. Different approaches of the mechanism of the sodium pump. Energy transformation in Biological systems, Amsterdam, 1975, 205-223.

32. Karlish S. J. D. Organizations of the membrane domain of the Na,K-pump. In: Na,K-ATPase and related transport ATPases. Ed: L. A. Beague, P. J. Gradsby, N. Y., 1987, 30-44.

33. Stein et al. A model for the active transport of sodium and potassium ions as mediated by a tetrametic enzyme. Proc. Natt. Acad. Sci., USA, 1973, 70, 275-278.

34. Repke K. Ditrich F. Subunit interaction: determination of reactivity and cooperativity of Na,K-ATPase. Na,K-ATPase Struct. and Kinet. L., 1979, 487-502.

35. Levit D.C. The mechanism of the sodium pump. Biochem. Biophys. Acta, 1980, 604, 321-345.

36. Karlish S. J. D. Characterization of conformation changes in Na,K-ATPase labeled with fluorescein in the active site. J. Bioenerg. Biomemb., 1980, 12, 111-136.

37. Karlish S. J. D., Kempner E.S. Minimal functional unit for transport and enzyme activaties of (Na+, K+)-ATPase as determined by radiation inactivation. Biochem et Biophys. Acta, 1984, 776, 288-289.

38. Plesner L., Plesner I., Norby I., Klodos J. The study state kinetic mechaniosm of ATP hydrolysis catalyzed by membrane bound Na,K-ATPase from ox brain (minimal model). Biochem. Byophys. Acta, 1981, 643, 483-494.

39. Кометиани З. П. Молекулярный механизм Na,K-АТРазной системы. Биологические науки, 1987, 10, 89-99.

40. Knowles A. F., Li C. "Molecular Cloning and Characterization of Expressed Human Ecto-Nucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 8 (E-NTPDase 8) and Its Soluble Extracellular Domain," Biochemistry, 2006, 45, 7323-7333.

41. Meyer-Fernandes J. R., Lanz-Mendoza H., Gondim K. C., Willott E., Wells M. A. “Ectonucleotide diphosphohydrolase activities in hemocytes of larval *Manduca sexta”*. Arch Biochem Biophys, 2000, 382*:* 152–159.

42. Berrêdo-Pinho M., Peres-Sampaio C. E., Chrispim P. P., Belmont-Firpo R., Lemos A. P., Martiny A., Vannier-Santos M. A., Meyer-Fernandes J. R. “A Mg-dependent ecto-ATPase in Leishmania amazonensis and its possible role in adenosine acquisition and virulence”. Arch Biochem Biophys. 2001, 1;391(1):16-24.

43. Melani A., Corti F., Stephan H., Müller C. E., Donati C., Bruni P., Vannucchi M. G., Pedata F. “Ecto-ATPase inhibition: ATP and adenosine release under physiological and ischemic in vivo conditions in the rat striatum”. Exp Neurol. 2012, 233(1):193-204.

44. http://www.microelements.ru/elements/Cl.pdf

45. Gerencser G. A., Lee S. H. “Cl-stimulated adenosine triphosphatase: existence, location and function” J. of Exp. Biol. 1983, v. 106 (1), 143-161.

46. Gerencser G. A., Purushotham K. R., Meng H. B. “An electrogenic chloride pump in a zoological membrane”. J. Exp. Zool. 1996, 275 (4), 256-61.

47. Gerencser G. A., Zhang J. “Cl-ATPases: Novel primary active transporters in Biology”. J. Exp. Zool. 2001, 289 (4), 215-23.

48. Gerencser G. A. “Electrogenic ATP-dependent Cl-transport by plasma membrane vesicles from Aplysia intestine”. AJP-Regu Physiol. 1988, V. 254, 1, R127-R133.

49. Gerencser G. A., Zelezna B. “ ReactionSequence and Molecular mass of a Cl-translocating P-type ATPase” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993, 90, 7970-7974.

50. Willumsen N. J., Amstrup J., Jensen L. J., Larsen E. H. “ Proton pump driven cutaneous chloride uptake in anuran amphibian”. Comparative Biochemistry and Physiology, 2003, Part A, 134, S1-S237.

51. Bormancin M., Renzis G. De, Maetz J. “Brachial Cl-transport, anion stimulated ATPase and acid-base balance in Anguilla adapted to fresh water: effects of hyperoxid”. J of Comparative physiology B., 1977, 177, 313-322.

52. Gerencser G. A. “The Chloride Pump: a Cl-translocating P-type ATPase” Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1996, 31, 303-337.

53. Shiroya T., Fukunaga R., Akashi K., Shimada N., Takagi Y., Nishino T., Hara M., Inagaki C. “An ATP-driven Cl-pump in the Brain”. J. of Biological Chemistry 1989, 264, #29, 17416-17431.

54. Inagaki C., Hattori N., Katagawa K., Zeng X., Yagyu K. “Cl-ATPase in rat brain and kidney” J Exp Zool. 2001, 289 (4):224-31.

55. Rose C. R., Ransom B. R. “ An ATP-driven Cl-pump in the brain”. J. Biol. Chem. 1989, 264 (29): 17416-17421.

56. Zeng XT., Hara M., Inagaki C. “Electrogenic and phosphatidylinozitol-4-monophosphate stimulated Cl-transport by Cl-pump in the rat brain” Brain Res. 1994, 641(1):167-70.

57. Inagaki C., Hara M., Zeng XT. “Cl-pump in rat brain neurons” J Exp Zool. 1996, 275(4), 262-8.

58. Inoue M., Hara M., Zeng XT., Hirose T., Ohnishi S., Yasukura T., Uriu T., Omori K., minato A., Inagaki C. “An ATP-driven Cl-pump regulates Cl-concentrations in rat hippocampal neurons”. Neurosci. Let. 1991, 134 (1), 75-78.

59. Zeng XT., Mikami-Uriu T., Higashida T., Yagyu K., Kitagawa K., Hattori N., Otani H., Omori K., Inagaki C. “Developmental changes in Cl-ATPase activity in rat brains” Neurosci. L. 2001, 302(2-3), 101-104.

60. Gerencser G. A., Zhang J. “Existence and nature of the chloride pump”, Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, 2003, 134 S1-S237.

61. Kunugi Y., Hashimoto Y., Tamura A., Fujii T., Inagaki C. “Effects of phospholipases on Cl-ATPase in the rat brain”. Neurosci Lett. 1988, 92(3), 315-20.

62. Hara M., Inoue M., Yasukura T., Ohnishi S., Mikami Y., Inagaki C. “Uneven distribution of intracellular Cl- in rat hippocampal neurons”. Neurosci Lett. 1992, 143(1-2), 135-8.

63. Mitsunaga K., Makihara R., Fujino Y., Yasumasu I. “Inhibitory effects of ethacrynic acid, Furosemide and nifedipine on the calcification of spicules in cultures of micromeres isolated from sea-urchin eggs”. Differentation ISSN 0301-4681. 1986, v. 30, 3, 197-204.

64. Hattori N., Kitagawa K., Higashida T., Yagyu K., Shimohama S., Wataya T., Perry G., Smith MA., Inagaki C. “Cl-ATPase and Na, K-ATPaseactivities in Alzheimer’s disease brains” Neurosci. L. 1998, V. 254 (3), 141-144.

65. Yagyu K., Kitagawa K., Irie T., Wu B., Zeng XT., Hattori N., Inagaki C. “Amyloid beta proteins inhibit Cl(-)-ATPase activity in cultured rat hippocampal neurons”. J Neurochem. 2001, 78(3), 569-76.

66. Ohhashi T., Katsu T., Ikeda M. “ Improvement of reconstruction of the Ch-translocating ATPase isolated from *Actabularia acetabulum* into liposomes and several anion pump characteristics”. Biochem. Biophys. Acta. 1992, 1106 (10, 165-70.

67. Gerencser G. A., Purushotham K. R.”Reconstituted Cl-pump protein: a novel ion Cl-motive ATPase”. J. Bioenerg. Biomembr. 1996, 28 (6), 459-69.

68. http://www.answers.com/topic/bicarbonate#ixzz1leIMN9K0

69. http://www.answers.com/topic/bicarbonate#ixzz1leI9bX9X

70. http://en.wikipedia.org/wiki/ATPase

71. Kaysen G.A., Chou L.Y., Humphrey M.H. “Requirement of Zn to demonstrate HCO_3-ATPase activity of rat small intestinal brush border”. Cell. Biology. 1979, V.82, 780-782.

72. Simon B, Thomas L, “HCO_3 stimulated ATPase from mammalian pancreas. Properties and its arrangement with the enzyme activities”. Biochem. Biophys. Acta, 1972, 288, 434-442.

73. Izutsu K. T., Siegel J. A., “Microsomal HCO_3 – stimulated ATPase from the gog submandibular gland”. Biochem. Biophys. Acta 1972, 284, 478-484.

74. Izutsu K. T., Siegel J. A. “Bicarbonate ion ATPases in rat lives cell fractions” Biochem. Biophys. Acta 1975, 382, 193-203.

75. Slenney J. G., Biochim. Biophys. Acta, 1973, 311, 545 (Цит. по: Иващенко А. Биохимия 40, 1975, 1091).

76. Kerstetter T. H., Kirschner L. “HCO_3-dependent ATPase activity in the gills of rainbow trout” Comp. Biochim. Physiol. 1974, 48, 581-586.

77. Цакадзе Л. Г., Кошоридзе Н. И. “HCO_3-стимулируемая АТФ-аза головного мозга крыс”. Сообщ. Акад. Наук. 1976, 84, 3.

78. Иващенко А. И. Жубанова А. А. Балмуханов Б. С. “HCO_3-стимулируемая АТРаза гомогенатов крысы. Биохимия 40, 1975, 1091-1095.

79. Koshoridze N., Kuchukashvili Z. “Investigation of the Mg-HCO_3-ATPase activity of throyd tissue cells under various pathologies”. 2012, V. 72, 5. Pp. 363-368.

80. Koshoridze N., Kuchukashvili Z. “Human Thyroid Gland HCO_3-ATPase Activity”. Bull. Of Geo. Nat. Acad of Sci. 2008, V. 2, 4, 104-108.

81. Кошоридзе Н. И., Менабде К. О., Сургуладзе Н. Б., Вардиашвили Т. М., Соломония Р. Е., Алексидзе Н. Е. Влияние Эндогенных Лектинов на HCO_3- АТФ-азную активность в клетках глии головного мозга. Укр. Биохим. Журн. 2007, т. 79б 3б 12-18.

82. “მემბრანოლოგია” ქომეთიანი ზ. თბილისის უნივერსიტეტის გამომცემლობა, 2008, 236.

83. Qu H., Criss H. “Bestophin Cl-chanels are highly permeable to HCO_3”. J. Physiol. Cell. Physol. 2008,294, 6, C1371-C1377.

84. ”Основы Биохимии” (в 3-х томах т. 3.). Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., Хилл Р., Леман И. Москва, “Мир” 1981, стр. 1878.

85. ”Современная Биохимия в схемах”. Мусил Я., Новакова О., Кунц К., Москва, изд. ”Мир” 1981, (перевод с ческого, Czechoslovak medical press. Prague), 155.

86. De Robertis E and Podrigues d Lores Amoug G. “Structural component of the Synaptic region”. In Hand book of Neurochemistry. 1969, 2, 327-364.

87. Whittaker R. R. “Classification of natural communities”. 1969. The Botanical Review 28: 1-239.

88. Skow J. Ch. “Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na^+ and K^+”. Biochim. Biophys Acta, 1962, 58, 314-340.

89. Skow J. Ch. “Enzymatic basisfor active transport of Na^+ and K^+ across all membrane”. Physio, Rew, 1965, 45, 596-617.

90. Lowry O. H., Rosenbrough N. Y., Randall R. Y. “Protein measurement with the folin phenol reagent”. J. Biol. Chem. 1951, 193, 263-275.

91. Казанов А. М. Маслова А. И. “Особенности активации детергентами Na,K-аденозинтрифосфатазы головного мозга позвоночных”. Журнал эволюционной физиологии. 1980, N5, T. XVII, 430.

92. Plesner I., Plesner L. “The Steady state kinetic mechanism of ATP hydrolysis catalysed by membrane bound (Na^+, K^+)-ATPase from brain I substate identity, Biochim. Biophys, Acta 1981, 643, 449-462.

93. Izutsu K.T., Siegel I. A., “ A microsomal HCO_3-stimulated ATPase in the rat liver plasmamembrane cells.” Biochimiya, 1980 45, 424-429.

94."Практическое руководство по энзимологии”. Кочетов Г. А. Москва, “Наука” 1971, ст. 310.

95. Kometiani Z. ”Regulation of Na,K-ATPase Activity By Neurotransmitters”.Bulletin of the Georg. Nat. Acad. Of Sci. 2007, 175, 1, 81-84.

96. Chkadua G., Kometiani Z. ‘The definitation of number of essential activators by means of kinetic curve form analysis”. Bull of the Georgian Academy of Scinces, 1997, 155, 125-128.

97. "Основы теории ошибок”. Агекян Т. А. Москва, “Наука”, 1968, 148.

98. Chkadua G., Kometiani Z. ‘The definitation of number of essential activators by means of kinetic curve form analysis”. Bull of the Georgian Academy of Scinces, 1997, 155, 125-128.

99. Kometiani Z. P., Tsakadze L. G., Jariashvili T. Y. “Functional significance of the effects of neirotransmitters on the Na,K-ATPase system”. J. of Neurochemistry, 1984, V. 42, n.5. p. 1246-1250

100. Drakulich D. A., Spellmon C., Terry D. H. “Effect of the ecto-ATPase inhibitor, ARL 67156, on the bovine chromaffin cell response to ATP” Eur J. Pharmacology, 2004, 485, 137-140.

101. Levesque S. A, Lavoie E. G, Lecka J, Bigonnesse F, Sevigny J. “Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases. Br J Pharmacol. 2007, 152: 141–150.

102. Gerencser G.A., Zhang J. D., “Existance and nature of the chloride pump”. Comparative Biochem., Physiology Part A., 2003, 137, S1-S237.

103. Plesner I., Plesner L. “The Steady state kinetic mechanism of ATP hydrolysis catalysed by membrane bound (Na^+, K^+)-ATPase from brain I substate identity, Biochim. Biophys, Acta 1981, 643, 449-462.

104. “The kinetics of membranes of transport enzyme”. Kometiani Z., Vekua M. Moscow, “Visshaya Shkola” 1988, 109.

105. Kometiani Z. Chkadua G. “Power parameters for the rate equations of enzymes with multiple ligand-binding sites”, The J. of Biol. Phys and chemistry, 2003 V. 3, No ¾, pp78-81.