

ელეფთერ ანდრონიკაშვილის ფიზიკის ინსტიტუტი

მაია ჩხაიძე

გარემო ფაქტორების გავლენა ჰემოგლობინის, დნმ-სა და
ქრომატინის თერმოსტაბილურობაზე

03.00.02. - ბიოფიზიკა

დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა

ფიზ.-მათ. მეცნიერებათა კანდიდატის
სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელი

ფიზ.-მათ. მეც. დოქტორი

ჯ. მონასელიძე

თბილისი

2006

შინაარსი

შესავალი

3

I. თავი. ლიტერატურის მიმოხილვა

- 1.1. ჰემოგლობინის აგებულება და ფუნქციები 7
- 1.2. ცილების კონფორმაციული სტაბილურობის ენერგეტიკული ასპექტები 17
- 1.3. დნმ-ის ურთიერთქმედება ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებებთან 18
- 1.4. დნმ-ის ურთიერთქმედება მეტალების იონებთან 22
- 1.5. მეტალების კომპლექსები პორფირინებთან და პორფირინისმაგვარ ნივთიერებებთან 27
- 1.6. პორფირინების გამოყენება მედიცინაში 29
- 1.7. ქრომატინის სტრუქტურა და ფიზიკო-ქიმიური თვისებები 37
- 1.8. ტოლუოლი, მისი მეტაბოლიზმი და მოქმედების მექანიზმები 49
- 1.9. ტოლუოლის ზეგავლენა მემბრანული სტრუქტურების, ცილების, ცხიმებისა და ქრომატინის სტაბილურობაზე 53

II. თავი. კვლევის მასალები და მეთოდები

- 2.1. სისხლის ნიმუშების, ერითროციტებისა და ჰემოგლობინის მიღების მეთოდები 58
- 2.2. დნმ-პორფირინის კომპლექსების მომზადება 60
- 2.3. თეთრი ვირთაგვების თავის ტვინზე ტოლუოლით ზემოქმედება 61
- 2.4. დიფერენციული სკანირებადი მიკროკალორიმეტრი ბიომაკრომოლეკულების დენატურაციის თერმოდინამიკური პარამეტრების განსასაზღვრავად 63

III. თავი. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

- 3.1. ჰემოგლობინის სითბური დენატურაციის პარამეტრების დადგენის მნიშვნელობა ადამიანის სისხლისა და ერითროციტების მიკროკალორიმეტრული შესწავლისას 70

3.1.1.	ჰემოგლობინის ხსნარების თერმული თვისებების შესწავლა:	
	a) ჰემოგლობინის თერმული თვისებების დამოკიდებულება მის კონცენტრაციასა და ბუფერის იონურ ძალაზე	
	b) ჰემოგლობინის თერმული თვისებების დამოკიდებულება ხსნარების pH-ზე	75
3.2.	დნმ-პორფირინების კომპლექსების მიკროკალორიმეტრული შესწავლა	91
3.3.	ქრომატინის თერმოსტაბილურობაზე ტოლუოლის ზეგავლენის მიკროკალორიმეტრული შესწავლა	101
	დასკვნები	109
	გამოყენებული ლიტერატურა	112

შ ე ს ა გ ა ლ ი

ცოცხალი ორგანიზმი, დაწყებული უმარტივესებიდან და დამთავრებული ადამიანით, არ წარმოადგენს იზოლირებულ სისტემას, არამედ ღია სისტემაა, რომელიც აწარმოებს გარემოსთან ნივთიერების, ენერჯისა და ინფორმაციის მიმოცვლას. ცნობილი ბიოლოგის ნ. ფონ ბერტალანფის აზრით ორგანიზმი ცალკეული ელემენტების კონგლომერატი კი არ არის, არამედ არის მაღალორგანიზებული, ერთიანი სისტემა, რომელიც მუდმივ ცვლილებებს განიცდის. ამავე დროს ცოცხალი ორგანიზმი თვითსტრუქტურირებადი და თვითორგანიზებადი სისტემაა.

თუ დავუშვებთ, რომ ცოცხალ ორგანიზმს გააჩნია ყველა აუცილებელი სუბსტრატი სრული რეგენერაციისა და სრულფასოვანი კომპენსაციისათვის, მაშინ ხანში შესვლის პროცესების, ქრონიკული პათოლოგიური მდგომარეობებისა და დაავადებების მიზეზი უნდა იყოს ორგანიზმის მიერ იმ ინფორმაციის დაკარგვა, რომელიც აუცილებელია აღდგენითი პროცესების მართვისათვის. აქედან გამომდინარე, ცოცხალ ორგანიზმებში თვითრეგულაციის საფუძველს ინფორმაციული მიმოცვლა ანუ გარემოსთან მჭიდრო ურთიერთობა წარმოადგენს. სწორედ გარემო ფაქტორების ცვლილება იწვევს ბიომაკრომოლეკულების ქიმიური სტრუქტურების ფუნქციურ სტრუქტურებად გარდაქმნას, რომელთაც თვითრეგულაციის მნიშვნელოვანი შესაძლებლობანი გააჩნიათ.

ცნობილია, რომ გარემო ფაქტორების ზემოქმედება ორგანიზმზე უჯრედულ დონეზე მიმდინარეობს. უჯრედი კი ცოცხალი ორგანიზმის ძირითადი სტრუქტურულ-ფუნქციური ერთეულია, რომელშიც მიმდინარეობს ყველა ბიოლოგიური პროცესის რეალიზაციის საწყისი და დამასრულებელი ეტაპი. სწორედ უჯრედის კომპონენტებში - ბიომაკრომოლეკულებში წარმოქმნილი თითქოსდა უმნიშვნელო ცვლილებები იწვევენ ორგანიზმში მიმდინარე შემდგომ პათოლოგიურ ცვლილებებს. ამრიგად, გასაგები ხდება მეცნიერების დიდი ინტერესი უჯრედულ დონეზე წარმოქმნილი ცვლილებების შესწავლისადმი, რომელიც გარემოს უკიდურესი დაბინძურებისა და ეკოლოგიური პირობების მკვეთრი გაუარესების ფონზე სულ უფრო აქტუალური ხდება.

მოლეკულებში მიმდინარე ფიზიკო-ქიმიური ცვლილებები კი უშუალოდ აისახება მათ თერმოსტაბილურობაზე, რაც საშუალებას გვაძლევს შევისწავლოთ გარემო ფაქტორების მოქმედების მექანიზმები შესაბამის ობიექტებზე.

ბიომაკრომოლეკულების თერმოსტაბილურობის შესწავლის მეთოდებს შორის მნიშვნელოვანი ადგილი უკავია დიფერენციულ სკანირებად მიკროკალორიმეტრიას (დსმ), რომელიც საშუალებას გვაძლევს მივიღოთ საჭირო ინფორმაცია მათი ნატიური კონფორმაციის სტაბილიზაციის ენერგეტიკულ საფუძვლებზე. დსმ აგრეთვე ეფექტური მეთოდია რათა შევისწავლოთ სხვადასხვა გარე ფაქტორების –

ტემპერატურის, pH-ის, წნევის, იონური ძალის, ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების ზემოქმედება ბიომოლეკულებზე და შევსებასთან ერთად მიერ გამოწვეული დესტაბილიზაციის ან სტაბილიზაციის ხარისხი. ბიოპოლიმერების სტრუქტურების შესასწავლად ისეთ რთულ სისტემებში, როგორებიცაა უჯრედები და ქსოვილები, დსმ-ის მეთოდი პრაქტიკულად შეუცვლელია.

ქვემოთმოყვანილ ნაშრომს საფუძვლად დაედო გარემო ფაქტორების გავლენა უჯრედის ისეთ მნიშვნელოვან კომპონენტებზე, როგორებიცაა ცილები, ნუკლეინის მუცელები და ქრომატინი.

კერძოდ, ჩვენ შევისწავლეთ ჰემოგლობინის თერმული თვისებების დამოკიდებულება მის კონცენტრაციაზე, ბუფერის იონური ძალასა და ხსნარების pH-ზე.

გლობულარული ცილების დენატურაცია და რენატურაცია *in vitro* სამეცნიერო კვლევების განსაკუთრებულ ობიექტს წარმოადგენს, რადგან ეს პროცესები მჭიდროდაა დაკავშირებული ცილოვანი მოლეკულების თვითორგანიზაციასთან, რომლის მექანიზმის მოშლა ორგანიზმში პათოლოგიური ცვლილებების გამომწვევია. ცნობილია, რომ ბუფერის იონური ძალის, ხსნარების კონცენტრაციისა და pH-ის ცვლილება ჰემოგლობინის ნატიური კონფორმაციის დარღვევას იწვევს. ამ პროცესებზე დაკვირვება და მათი ანალიზი კი შეიძლება სისხლის სხვადასხვა დაავადებების დიაგნოსტიკის საფუძველი გახდეს.

გარემოს მნიშვნელოვანმა დაბინძურებამ მძიმე მეტალების მარილებით და აგრეთვე იმ ფაქტმა, რომ მეტალებს ძლიერი ზეგავლენა აქვს ნუკლეინის მუაგებზე, გამოიწვია ჩვენი დაინტერესება რათა შეგვესწავლა დნმ-ის მეტალებთან კომპლექსის თერმოდინამიკური თვისებები. ცნობილია, რომ მიკროელემენტების მეტაბოლიზმის დარღვევა ორგანიზმში მუტაგენეზისა და კანცეროგენეზის გამომწვევი ფაქტორია, მაგრამ ამავე დროს ზოგიერთ მეტალსა და მათ კომპლექსებს ანტიკანცეროგენული თვისებებიც ახასიათებთ. აქედან გამომდინარე მნიშვნელოვანი ყურადღება მივაქციეთ ნუკლეინის მუაგების კომპლექსს კათიონურ პორფირინებთან.

გარემოს ქსენობიოტიკებით, კერძოდ ტოლუოლით დაბინძურების მაღალმა ხარისხმა გვიბიძგა შეგვესწავლა მისი ზემოქმედების შედეგები ცოცხალ ორგანიზმებზე. ტოლუოლი აღიარებული პოლუტანტია. იგი დიდი რაოდენობით გამოიყოფა ატმოსფეროში მსუბუქი საწვავის (ბენზინი, ნავთი) ან ტოლუოლის შემცველი გამსხნელების აორთქლებისა და ტრანსპორტის გამონაბილქვით ჰაერის დაბინძურების დროს. იგი აგრეთვე ხვდება ნიადაგში და გამდინარე წყლებში საწვავისა და ზეთების ტრანსპორტირების და მიწისქვეშა კონტეინერებიდან გაჟონვის შედეგად და გარემოს მნიშვნელოვან დაბინძურებას იწვევს. აქედან გამომდინარე გაგვიჩნდა ინტერესი შეგვესწავლა ტოლუოლის ზეგავლენა ქრომატინის თერმოსტაბილურობაზე.

I. თავი.

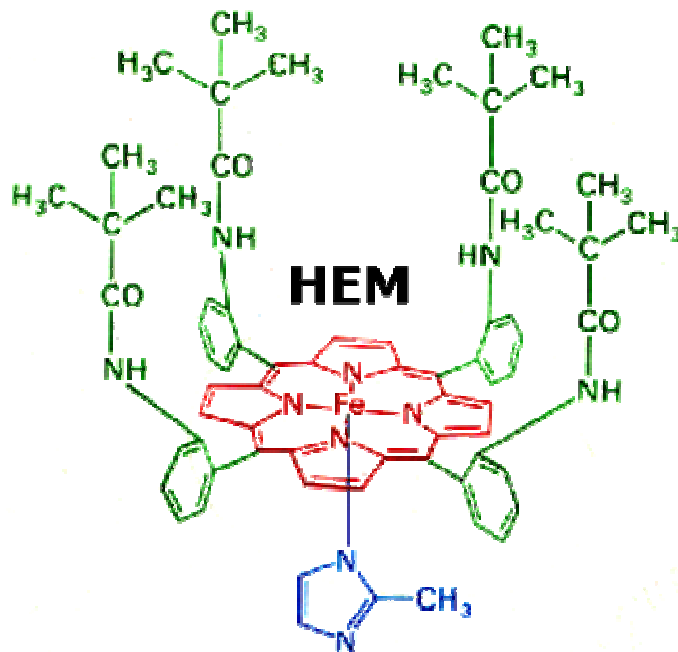
ლიტერატურის მიმოხილვა

1.1. ჰემოგლობინის აგებულება და ფუნქციები

ჰემოგლობინი ძირითადი სასუნთქი პიგმენტი და ერთროციტების მთავარი კომპონენტია. იგი ადამიანის ორგანიზმში მნიშვნელოვან ფუნქციას ასრულებს: გადააქვს ჟანგბადი ფილტვებიდან ქსოვილებში და ნახშირორჟანგი კი ქსოვილებიდან ფილტვებში. ცნობილია, რომ მოლეკულური ჟანგბადი სისხლში ცუდად იხსნება: 1 ლიტრ პლაზმაში იხსნება მხოლოდ 3,2 მლ O_2 . ერთროციტებში შემავალი ცილა ჰემოგლობინი კი იერთებს 70 –ჯერ მეტს – 220 მლ/ლ-ზე. იგი აგრეთვე განაპირობებს სისხლის ფუძე-მჟავურ წონასწორობას, ქმნის ბუფერულ სისტემას, რითაც ხელს უწყობს სისხლის ნორმალური pH –ის შენარჩუნებას.

ჰემოგლობინი ადამიანისა და ცხოველის სისხლის წითელი პიგმენტია. გამოთვლილია, რომ ერთ ერთროციტში დაახლოებით ~ 300000000 ჰემოგლობინის მოლეკულაა და თითოეული 10^3 ატომს შეიცავს. ადამიანის სისხლში ჰემოგლობინის შემცველობა ~ 14,5%-ია, მისი საერთო რაოდენობა კი ~ 750გ. მამაკაცებში მისი კონცენტრაციაა 130-160 გ/ლ, ქალის სისხლში კი – 120-140გ/ლ. ჰემოგლობინი ჰემოპროტეიდების ოჯახში შემავალი რთული ცილაა, რომლის

ცილოვანი ნაწილი გლობინია და არაცილოვანი კი პროსტეტიული ჯგუფი. ეს უკანასკნელი წარმოდგენილია 4 ერთნაირი რკინა-პორფირინის შენაერთით, რომელსაც ჰემი ეწოდება. ჰემის მოლეკულა შედგება პორფირინ IX-გან, რომელიც აზოტის ორი ატომით კოვალენტურად და აზოტის კიდევ ორი ატომით კოორდინაციული ბმით უერთდება რკინას. რკინის ორველნტიანი ატომი მდებარეობს ჰემის ცენტრში და განსაზღვრავს სისხლის წითელ ფერს.



სურ. 1. ჰემოგლობინის სტრუქტურული ფორმულა

ჰემოგლობინის სახეობრივი განსხვავებანი განპირობებულია მისი ქიმიური შემადგენლობითა და გლობინის აგებულებით. იგი ტეტრამერული ცილაა, რომლის მოლეკულებიც პოლიპეპტიდური ჯაჭვის განსხვავებული ტიპებითაა წარმოდგენილი - α, β, γ, δ. ერთი მოლეკულის შემადგენლობაში ორ-ორი ერთნაირი პოლიპეპტიდური

ჯაჭვია, რომელთაგანაც თითოეული დახვეულია ჰემოგლობინის ერთ ჰემზე. სხვადასხვა სახეობაში არსებულ ჰემოგლობინს განსხვავებული პირველადი, მეორეული და მესამეული სტრუქტურა გააჩნია, რაც მის ინდივიდუალურ თვისებებს განაპირობებს [1].

ცნობილია, რომ ადამიანის ჰემოგლობინი ორი ერთნაირი ნაწილისაგან შედგება და თითოეული მათგანი წარმოდგენილია ორი იდენტური პოლიპეპტიდული ჯაჭვით. ადამიანს ერთმანეთისაგან ქიმიური აგებულებით განსხვავებული ტიპის ჰემოგლობინის მოლეკულები გააჩნია. ზრდასრული ადამიანის სისხლში აღმოჩენილია HbA ჰემოგლობინი, რომელიც შედგება $\alpha_2\beta_2$ ჯაჭვებისაგან. თითოეული ჯაჭვი დაახლოებით 141-146 ამინომჟავური ნაშთისაგან შედგება. გარდა ამისა, ადამიანს გააჩნია HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) ჰემოგლობინი, რომლის შემცველობა სისხლში მთელი ჰემოგლობინის რაოდენობის ~ 2,5% -ია. ამას გარდა ცნობილია ახალდაბადებულთა ჰემოგლობინი - F (HbF), რომელიც შედგება $\alpha_2\gamma_2$ ჯაჭვებისაგან. ახალდაბადებულის სისხლის შემადგენლობა ერთი წლის ასაკისათვის თითქმის მთლიანად ჩაინაცვლება HbA ჰემოგლობინით და ზრდასრულის სისხლში HbF ჰემოგლობინის პროცენტული შემცველობა მხოლოდ ~ 1,5% - ია. გლობინის ამინომჟავური შემადგენლობის უმნიშვნელო ცვლილებაც კი ჰემოგლობინის თვისებების სრულ შეცვლას იწვევს. მაგალითად, VI პოზიციაში გლუტამინის მჟავა ჩანაცვლდება ვალინით HbA-ს გადააქცევს HbS -ად, რაც თავის მხრივ იწვევს ფატალური დაავადების

– ნამგლისებური ანემიის განვითარებას. ეს პათოლოგიური ჰემოგლობინი კრისტალირდება ერითროციტებში, იწვევს მათ დეფორმაციას და აქედან გამომდინარე სისხლძარღვების დაზიანებას [2].

არსებობს კიდევ ერთი პათოლოგია, ე.წ. ჰემოლიტიკური ანემია, რომელსაც იწვევს HbC–ს არსებობა ადამიანის სისხლში. ეს აუტოსომალური რეცესიული დაავადება ნამგლისებურ ანემიასთან შედარებით ნაკლებად საზიანოა ორგანიზმისათვის. ჰემოგლობინის ეს ფორმა შედგება ორი ნორმალური ალელა ჯაჭვისაგან და ორ ბეტა ჯაჭვში კი VI პოზიციაში გლუტამინის მუავა ლიზინითაა ჩანაცვლებული. თავის მხრივ კი ეს მუტაცია იწვევს ჰემოგლობინის კრისტალიზაციას და ზრდის სისხლის სიბლანტეს [3].

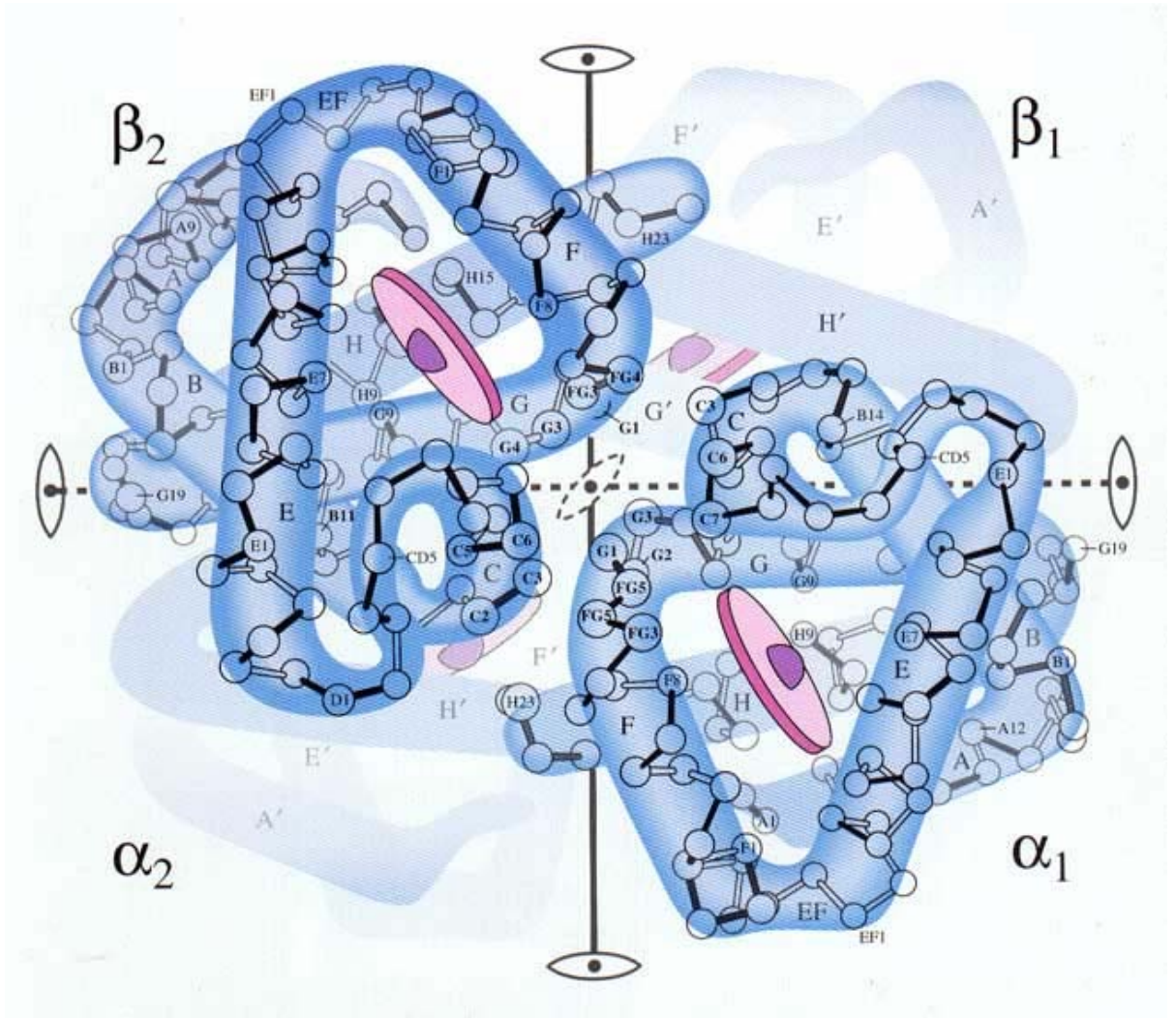
ჰემოგლობინი კრისტალური ნივთიერებაა, კარგად იხსნება წყალში და არ იხსნება სპირტში, ეთერსა და ქლოროფორმში. მიუხედავად იმისა, რომ ერითროციტებში ჰემოგლობინი 30%-ზე მეტია, იგი გახსნილ მდგომარეობაშია. მისი ამინომუავური შემადგენლობის შეცვლით იცვლება მისი ხსნადობის ხარისხი.

ჰემოგლობინის ხსნარი მუქი წითელი ფერისაა და სინათლის ულტრაიისფერ და ხილულ სპექტრში დამახასიათებელი შთანთქმის სპექტრი გააჩნია. მისი იზოელექტრული წერტილი 7 – ის ტოლია. ადვილად დენატურირდება მჟავე და ტუტე არეში. მჟავე არეში ჰემსა და გლობინს შორის კავშირი ადვილად წყდება. თავისუფალი ჰემი კი ადვილად იჟანგება ჰემატინამდე, რომელშიც რკინა სამვალენტია.

ჰემოგლობინის ძირითადი დამახასიათებელი თვისებაა ჟანგბადის და ნახშირორჟანგის შექცევადი მიერთება. მიღებულ ნაერთებს შესაბამისად ეწოდებათ ოქსიჰემოგლობინი და კარბოქსიჰემოგლობინი.

მოლეკულური ჟანგბადის ჰემოგლობინთან მიერთებას ვერ ვუწოდებთ ჭეშმარიტ ჟანგვას, რადგან რკინის ვალენტობა ჰემში არ იცვლება და ამ რეაქციას მართებელია ვუწოდოთ ოქსიგენაცია. ჰემოგლობინის ჭეშმარიტი ჟანგვა ხდება მაშინ, როდესაც რკინა სამვალენტო ფორმაში გადადის.

სისხლში ჰემოგლობინს ოთხნაირი ფორმით ვხვდებით: ოქსიჰემოგლობინი, დეჰოქსიჰემოგლობინი, კარბოქსიჰემოგლობინი და მეტჰემოგლობინი. ეს ფორმები ურთიერთშექცევადია და მათი შეფარდება ორგანიზმის ინდივიდუალურ თვისებებზეა დამოკიდებული. დეჰოქსიჰემოგლობინი ეს არის ჰემოგლობინი, რომელიც შეიცავს ლიგანდებთან დაუკავშირებელ, დაუჟანგავ რკინას (Fe^{2+}) და აღინიშნება Hb-თი. მთლიანად დაჟანგული ტეტრამერი, რომელიც ჟანგბადის 4 მოლეკულას შეიცავს – ოქსიჰემოგლობინი (HbO_2). ნახშირორჟანგის 4 მოლეკულის შემცველია კარბოქსიჰემოგლობინი ($HbCO$), ხოლო მეტჰემოგლობინში რკინა სამვალენტო ფორმაშია, რის გამოც მას არ გააჩნია ჟანგბადის ტრანსპორტირების უნარი და ცისფრადაა შეფერილი. ადამიანის სისხლში მეტჰემოგლობინის შემცველობა ნორმაში 1-2% -ია.



სურ. 2. ჰემოგლობინის სივრცული აგებულება

ჰემოგლობინის ფიზიოლოგიური ფუნქცია – მიიერთოს და გამოანთავისუფლოს უანგბადი, განპირობებულია მისი კოოპერატიული თვისებებით. ამ თვისებების მატარებელი კი სწორედ ოლიგომერული ცილები არიან. ჰემოგლობინის ტეტრამერული კონფორმაცია ხსნარებში სტაბილიზირდება ძირითადად ამინომჟავების ნაშთებს შორის ჰიდროფობური ურთიერთქმედებით. ჰემოგლობინის სუბერთეულების გარე ზედაპირები ერთმანეთს არაპოლარული კონტაქტებითაც უკავშირდებიან, რითაც შეიძლება ავსსნათ მისი პირველადი სტრუქტურის მცირედ დამუხტულობა და დიდი ჰიდროფობურობა.

ჰემოგლობინის წონა დაახლოებით 64 000 დალტონია, ხოლო თითოეული სუბერთეულისა კი 16 000 დალტონი. ტეტრამერებში სუბერთეულებს შორის კავშირები არაერთგვაროვანია. განსაკუთრებით მჭიდროა ეს კავშირები ალფა და ბეტა სუბერთეულებს შორის წყვილ-წყვილად, რის შედეგადაც წარმოიქმნება დიმერები $\alpha_1\beta_1$ და $\alpha_2\beta_2$. ერთნაირ სუბერთეულებს, როგორც წესი არ გააჩნიათ კავშირები ერთმანეთს შორის. ჰემოგლობინის ტეტრამერს თითქმის სფეროს ფორმა აქვს, რომლის დიამეტრიც დაახლოებით – 55 Å-ია. მის ჰიდროფობურ ჯიბეებში ჩალაგებულია 15 Å-ის დიამეტრის და 3.7 Å –ის სისქის მქონე დისკების ფორმის ჰემები. იდენტური სუბერთეულები თითქმის პარალელურია ერთმანეთის მიმართ, ხოლო ალფა და ბეტა ჯაჭვები კი თითქმის – პერპენდიკულარული. ასეთი ურთიერთგანლაგების შედეგად წარმოიქმნება მართკუთხედის ფორმის შინაგანი სივრცე, რომლის

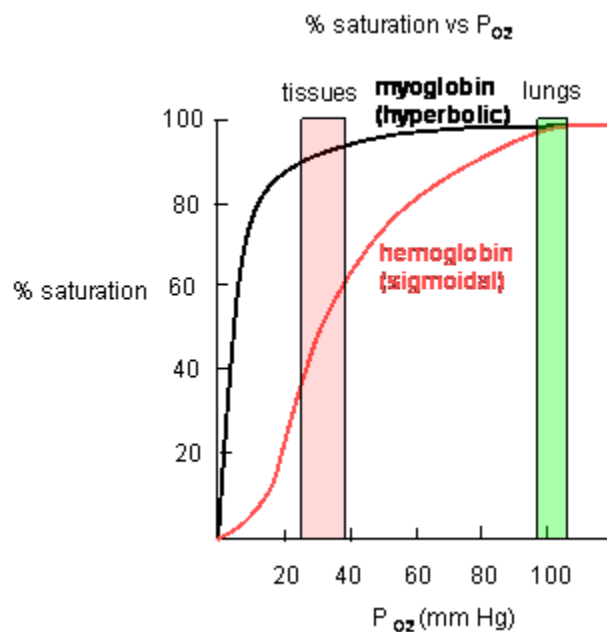
ზომებია – 20 – 25 Å. მართკუთხედის შიგა მხარეს მიმართული ამინომჟავური ნაშთების უმეტესობა არაპოლარულია, რაც მოლეკულას წყალხსნარებში ანიჭებს სტაბილურობას ვან დერ ვაალსის ძალების მეშვეობით [4].

გარდა ჰემოგლობინისა, ხერხემლიანებში და მათ შორის ადამიანებში, ვხვდებით ცილა მიოგლობინს (Mb), რომელსაც აგრეთვე აქვს უნარი მიიერთოს ჟანგბადი. იგი კუნთის ქსოვილში გვხვდება და წარმოადგენს ჰემის შემცველ პროტეინს. იგი ერთჯაჭვიანი, 153 ამინომჟავური ნაშთის შემცველი ცილაა, რომლის ცენტრშიც განლაგებულია ჰემის ჯგუფი და მისი წონა 16 700 დალტონია.

ხანგრძლივი ევოლუციის პეიოდში ჰემოგლობინი ჩამოყალიბდა ცილად, რომელიც შესაბამისად რეაგირებს გარემოდან შემოსულ ინფორმაციაზე. განსაზღვრული ცვლილებები მოქმედებს მოლეკულის აქტიურ უბნებზე, განაპირობებს ალოსტერულ ურთიერთქმედებებს, რაც თავის მხრივ იწვევს სუბერთეულების მესამეული სტრუქტურის და ტეტრამერის მეოთხეული სტრუქტურის ცვლილებებს. Hb-ის სუბერთეულებს გააჩნიათ ორი კონფორმაციული მდგომარეობა – T და R. T ფორმას R ფორმასთან შედარებით ჟანგბადთან ნაკლები მიერთების უნარი ახასიათებს. ჟანგბადის მიერთება T ფორმის სუბერთეულთან იწვევს ლოკალურ კონფორმაციულ ცვლილებებს, რასაც მოსდევს სუბერთეულებს შორის კავშირების შესუსტება. ჟანგბადის

კონცენტრაციის გაზრდასთან ერთად იმატებს R ფორმის სუბერთეულების მქონე ჰემოგლობინის წილი [5].

კოოპერატიული ურთიერთქმედებების შედეგად ჟანგბადის კონცენტრაციის ზრდისას იზრდება ჰემოგლობინის ჟანგბადთან დაკავშირების უნარი. T და R. T ფორმას შორის წონასწორობაზე მოქმედებს ალოსტერული ეფექტორები, რომელთა შორის გამოირჩევა CO_2 და H^+ . ისინი უერთდებიან ცილას მისი აქტიური ცენტრების გარეთ და იწვევენ მასში კონფორმაციულ ცვლილებებს, რის შედეგადაც იცვლება მათი აქტივობა. ჰემოგლობინის ასეთი რთული რეაქციები დაკავშირებულია ცილის მიერ ჟანგბადის შექცევად დაკავშირებასთან. სურ.3-ზე ნაჩვენებია ჟანგბადის ჰემოგლობინთან და მიოგლობინთან დაკავშირების მრუდები.

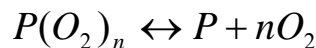


სურ. 3. ჰემოგლობინისა და მიოგლობინის ოქსიგენაციის მრუდები.

ამ მრუდებზე თვალნათლივ ჩანს დამოკიდებულება სრულად ოქსიგენირებული მოლეკულების წილის და ოქსიგენაციის ფარდობითი სიდიდისა (Y) ჟანგბადის პარციალურ წნევაზე (pO_2). ამ დამოკიდებულების ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი მახასიათებელია ჟანგბადის პარციალური წნევის სიდიდე (P_{50}), რომლის დროსაც ოქსიგენაცია მაქსიმალური მნიშვნელობის ნახევრის ტოლია. ჟანგბადის მიერთების სქემატური პროცესები შეიძლება შემდეგნაირად ჩაიწეროს:



თუ ცილა (P) ურთიერთქმედებაში შედის ჟანგბადის n მოლეკულასთან –



და კონცენტრაციის მუდმივა $K = \frac{[P] * [O_2]^n}{[P(O_2)_n]}$

$$\text{მაშინ ოქსიგენაცია } Y = \frac{[P(O_2)_n]}{[P(O_2)_n] + [P]} = \frac{(O_2)^n}{(O_2)^n + K} = \frac{(pO_2)^n}{(pO_2)^n + (P_{50})^n}$$

მიოგლობინის შემთხვევაში, როდესაც $n = 1$. გრაფიკს ჰიპერბოლის ფორმა აქვს, მაშინ როდესაც ჰემოგლობინისათვის $n = 4$ და გრაფიკი სიგმოიდურია, რაც შეესაბამება ჟანგბადის კოოპერატიული მიერთების იდეალურ შემთხვევას.

ჰემოგლობინში რთული ალოსტერული ურთიერთქმედებების გამო, მოლეკულის თვისებებზე პირველადი სტრუქტურის სულ მცირე ცვლილებებიც კი მოქმედებს [6].

12. ცილების კონფორმაციული სტაბილურობის ენერგეტიკული ასპექტები

ცილების სტრუქტურის შესწავლის მეთოდებს შორის მნიშვნელოვანი ადგილი უკავია დიფერენციულ სკანირებად მიკროკალორიმეტრიას (დსმ). იგი საშუალებას გვაძლევს მივიღოთ საჭირო ინფორმაცია მათი ნატიური კონფორმაციის სტაბილიზაციის ენერგეტიკულ ასპექტებზე. დსმ აგრეთვე ეფექტური მეთოდია, რათა შევისწავლოთ სხვადასხვა გარე ფაქტორების – pH -ის, წნევის, იონური ძალისა და ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების ზემოქმედება ცილაზე და შევაფასოთ მათ მიერ გამოწვეული დესტაბილიზაციის ან სტაბილიზაციის ხარისხი. ქვემოთ განხილული იქნება გლობულარული ცილების გამოკვლევასთან დაკავშირებული ზოგიერთი მეთოდოლოგიური ასპექტი.

დღესდღეობით კარგად არის შესწავლილი გლობულარული ცილების კონფორმაციული გადასვლების თერმოდინამიკა და მიღებულია საინტერესო შედეგები [7-10] ამასთან დაკავშირებით. ამ ცილების მიერ გამოვლენილი თვისებები შესაბამისობაშია ე.წ. “ორი

მდგომარეობის მოდელთან”, რომელიც დაფუძნებულია იმ შეხედულებაზე, რომ დენატურაციული ზემოქმედების შედეგად ცილა კოოპერატიულად გადადის ნატიური მდგომარეობიდან მთლიანად დენატურირებულ მდგომარეობაში. ეს პროცესი ფაზური გადასვლის მსგავსია [11].

იმისათვის, რომ შევისწავლოთ ცილების წყალხსნარების გახურებისას მიმდინარე შიგამოლეკულური პროცესები, კალორიმეტრში იტვირთება მისი დაბალკონცენტრაციული ხსნარები, რომლის pH ძლიერაა დაშორებული ნორმას. ეს განაპირობებს იმას, რომ მოლეკულებს შორის ურთიერთქმედება მინიმუმამდეა შემცირებული, და ამავე დროს შემცირებულია მათი აგრეგაცია.

1.3. დნმ-ის ურთიერთქმედება ბიოლოგიურად აქტიურ

ნივთიერებებთან

როგორც ცნობილია, დნმ-ის მოლეკულური სტრუქტურა სტაბილიზირდება წყლის მოლეკულებითა და მეტალების იონებით და აგრეთვე იცვლება სხვადასხვა ფაქტორების გავლენითაც: ტემპერატურის მომატებით, გამხსნელის შემადგენლობის შეცვლით, იონური ძალების ცვლილებით და სხვ. ორმაგი სპირალის რამოდენიმე სტრუქტურული ფორმა (კონფორმაცია) არსებობს: A, B, Z – ფორმები, რომლებიც ერთმანეთისაგან განსხვავდება სპირალის დახვევის ხარისხით, ფუძეების სიბრტყეების ორიენტაციით ღერძთან მიმართებით

და ბიოლოგიური ფუნქციებით. გარდა ამისა დნმ შეიძლება არსებობდეს ხსნარებში მოუწესრიგებელი გორგალის ფორმით. ამ ფორმების ურთიერთგადასვლა ხდება გარემო პირობების ზემოქმედებით და მას გააჩნია კოოპერატიული ხასიათი.

ნუკლეინის მჟავების (ნმ) ბიოლოგიურად აქტიური ფორმების ჩამოყალიბებაში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს დაბალმოლეკულური ნივთიერებები – მეტალების იონები, სხვადასხვა ბუნების მქონე ქიმიური ნივთიერებები, რომელთაც ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებებს უწოდებენ (ბან). ამათგან ზოგიერთი მათგანი უჯრედში არსებობს მეტად უმნიშვნელო რაოდენობით, მაგრამ უნარი აქვს მავნე ზეგავლენა იქონიოს ნმ-ის სტრუქტურაზე და შეუძლია გამოიწვიოს გენეტიკური ინფორმაციის (რეპლიკაცია, ტრანსკრიპცია და ტრანსლაცია) გადაცემის პროცესების დარღვევა, დნმ-ში ერთ- ან ორჯაჭვიანი გახლეჩვა, ცილის სინთეზის ბლოკირება და სხვა გენეტიკური ანომალიები [12].

ამრიგად, ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებებს შორის ბევრია ტოქსიკური, მუტაგენური და კანცეროგენული ნაერთები, რომელსაც შეუძლია როგორც უშუალოდ იმოქმედოს ბიოლოგიურ მაკრომოლეკულებზე, ასევე გააძლიეროს (ან პირიქით შეამციროს) მათზე სხვა გარემო ფაქტორების ზემოქმედება, ისეთების როგორცაა ულტრაიისფერი და მაიონიზირებელი გამოსხივება, სითბური

ზემოქმედება (ბიოსისტემების გახურება ან გაყინვა), სხვადასხვა ქიმიური აგენტების მოქმედება [13].

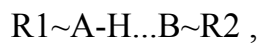
ბან-ის უმრავლესობა ნორმალურ პირობებში წყალხსნარებში კათიონურ ფორმაში იმყოფება (ეს შეიძლება იყოს ერთ-, ორ- ან მრავალმუხტიანი მეტალის იონი), ნმ-ს მოლეკულები კი პოლიანიონებს წარმოადგენს, რომელსაც პოლიმერული ჯაჭვის ყოველ რგოლში უარყოფითი მუხტი გააჩნია, რაც განაპირობებს მათ შორის ძლიერ ელექტროსტატიკურ (კულონურ) ურთიერთმიზიდულობას.

მოლეკულათაშორის ურთიერთქმედებას განაპირობებს აგრეთვე ვან დერ ვაალსის ძალები, რომლებიც შედარებით ახლო მანძილებზე მოქმედებს, გააჩნია ელექტრო-მაგნიტური ბუნება და განპირობებულია მოლეკულების ელექტრული დიპოლების ურთიერთქმედებით. ეს ძალები მნიშვნელოვან როლს თამაშობს თხევადი და მყარი კონდენსირებული მდგომარეობების წარმოქმნაში. ვან დერ ვაალსის ძალები განაპირობებს გაზების ურთიერთქმედებას და აგრეთვე გადახრას კანონიდან იდეალური გაზებისათვის. ეს გადახრები ექვემდებარება ვან დერ ვაალსის განტოლებას გაზებისათვის: $(P + \frac{a}{V^2}) \cdot (V - b) = nRT$, სადაც a და b მიზიდულობის კონსტანტებია, V – მოცულობა.

ბიომაკრომოლეკულები შეიძლება განხილულ იქნან, როგორც ერთგვარი კონდენსირებული სისტემები, რომელთა მდგომარეობაც განისაზღვრება შედარებით სუსტი არავალენტური

ურთიერთქმედებებით. სწორედ ასეთი ტიპის ურთიერთქმედებები განაპირობებს მაკრომოლეკულების სტაბილიზაციას და მის ცვლილებას მოლეკულის ფუნქციონირებისას. ვან დერ ვაალსის ძალების ენერგია არის 4,8 კჯ/მოლ, ოთახის ტემპერატურაზე – 2,5 კჯ/მოლი, საერთო იონური ბმების – 150-600 კჯ/მოლ.

ბიომოლეკულების დამაკავშირებელი და მათი სივრცული სტრუქტურის მნიშვნელოვანი განმსაზღვრელია წყალბადური ბმები. მათი ზოგადი ფორმულა შეიძლება ასე გამოისახოს:



სადაც A და B აღნიშნავენ წყალბადური კავშირების დონორ და აქცეპტორ ატომებს, როგორცაა O, N, S, F, Cl და სხვა ელემენტები, რომელთაც ზედა ორბიტებზე თავისუფალი ელექტრონული წყვილები აქვთ. წყალბადური ბმის დამახასიათებელი თავისებურებაა ის, რომ მისი პოტენციალი A, H და B ატომებს ერთ ხაზზე განალაგებს, რაც განაპირობებს მოწესრიგებული ბიოლოგიური სისტემების შექმნას, როგორც არის მაგალითად დნმ-ის ორმაგი სპირალი, ცილების α და β სპირალები და ნმ-ისა და ცილების მესამეული სტრუქტურები.

ბიომოლეკულების დაკავშირების კიდევ ერთი ტიპია ჰიდროფობური ურთიერთქმედება, რომელიც განპირობებულია სისტემის თავისუფალი ენერგიის მომატებით წყალში გახსნის დროს და გააჩნია ენტროპიული ხასიათი. მრავალ ორგანულ ნივთიერებას გააჩნია გრძელი ნახშირწყლოვანი (ჰიდროფობური) დაჯგუფება – $-CH_3$, $-CH_2$, $-CH$,

რომელსაც არ შეუძლია წარმოქმნას წყალთან წყალბადური კავშირი და აქედან გამომდინარე არ იხსნება წყალში [14].

ჰიდროფობურ ურთიერთქმედებებს ადგილი აქვს ნმ-ის კომპაქტზაციისას, ზემოლექულური სტრუქტურების ჩამოყალიბებისას (მაგ. ქრომატინი), ბიომოლეკულების ბიოლოგიურად აქტიურ ნივთიერებებთან დაკავშირებისას და სხვ. ამრიგად, ბიოპოლიმერების სტრუქტურასა და ფუნქციას განაპირობებს მოლეკულათაშორისი ძალები, რომლის საფუძველია ელექტროსტატიკური და ელექტროდინამიკური ურთიერთქმედება [15].

1.4. დნმ-ის ურთიერთქმედება მეტალების იონებთან

მეტალების იონები განეკუთვნება განსაკუთრებით გავრცელებულ და აქტიურ ნივთიერებებს, რომლებიც ზემოქმედებენ ნმ-ის სტრუქტურაზე და ფუნქციაზე [16].

უნდა აღვნიშნოთ, რომ ნმ-ის მოლეკულები, როგორც უჯვრედებში, ასევე წყალხსნარებში პოლიანიონის სახითაა წარმოდგენილი და მისი ორჯაჭვიანი სპირალის ნატიური სტრუქტურის შენარჩუნება მხოლოდ კათიონების განსაზღვრული კონცენტრაციის თანაობისას ხდება. წინააღმდეგ შემთხვევაში სპირალის ჯაჭვები ერთმანეთს სცილდება და მიმდინარეობს ე.წ. გადასვლა – სპირალ-გორგალი. როგორც წესი სპირალიზებული და გორგლისებური უბნები მონაცვლეობენ. ასეთი

გადასვლა შეინიშნება ტემპერატურის მომატებისას, მჟავისა და ტუტის დამატებისას და აგრეთვე სხვა დენატურაციის გამომწვევი აგენტების მოქმედებისას. ეს გადასვლა ფაგურ და ბაქტერიულ დნმ-ში ხდება ტემპერატურულ ინტერვალში – 3-5⁰C, უმაღლესებში 10-15⁰C-ის ინტერვალში, ჰომოპოლინუკლეოტიდებში კი კიდევ უფრო მცირე ინტერვალში. რაც უფრო მაღალია დნმ-ს ჰეტეროგენულობა, მით უფრო ფართოა ტემპერატურული გადასვლის ინტერვალი და დაბალია დნმ-ის მოლეკულის რენატურაციის ხარისხი. პოლიმერების სივრცობრივი კონფორმაცია და კოოპერატიული გადასვლები დამოკიდებულია როგორც მოლეკულის იონიზაციის ხარისხზე, ასევე ხსნარებში იონების კონცენტრაციაზე, რასაც თავის მხრივ გავლენა აქვს მოლეკულის ცალკეული ნაწილებისა და მოლეკულისა და გამხსნელის ელექტროსტატიკურ ურთიერთქმედებებზე.

მეტალების იონები მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ნუკლეინის მჟავებთან დაკავშირებულ ფერმენტულ რეაქციებში. ამ რეაქციების ოპტიმალური სიჩქარე დამოკიდებულია თითოეული იონის განსაზღვრულ საშუალო კონცენტრაციაზე, რომლის შემცირება ან მომატება იწვევს რეაქციის სიჩქარის შემცირებას.

ზოგიერთი მეტალის იონები ძლიერ მუტაგენებსა და კანცეროგენებს წარმოადგენს. მაგალითად, მანგანუმისა და სპილენძის იონების ჭარბი რაოდენობისას მუტაციური ბაქტერიებისა და ბაქტერიოფაგების რაოდენობა ასეულობით იმატებს. როგორც ნახევნები

იყო მეცნიერთა ჯგუფის მიერ, რომელსაც ელფეთერ ანდრონიკაშვილი ხელმძღვანელობდა, ავთვისებიანი სიმსივნეების წარმოქმნას ორგანიზმში თან სდევს მეტალების შემცველობის მომატება არა მოხლოდ ცილებში, არამედ სიმსივნური უჯრედის დნმ-შიც. დადგენილია ფართოდ გავრცელებული მეტალების, მაგ. ქრომისა და ნიკელის მაღალი კანცეროგენურობა [17].

უდავოა, რომ ზემოთხამოთვლილი ფაქტები იწვევენ დნმ-მეტალების კომპლექსების შესწავლის ინტერესს განსაკუთრებით, გარემოს მძიმე მეტალებით დაბინძურების ფონზე. დადგენილია, რომ ზოგიერთი მეტალის იონებსა და მათ კომპლექსებს გააჩნია ანტიკანცეროგენული მოქმედება. კერძოდ ძლიერი თერაპიული აქტურობა ახასიათებს პლატინას, მნიშვნელოვან ციტოსტატიკურ ეფექტს ახდენს სპილენძი [18].

ბოლო წლებში მიღებული მონაცემები მიუთითებს ცხოველებისა და მცენარეების დნმ-ზე მაიონიზირებელი გამოსხივების უარყოფით ეფექტზე. ცნობილია, რომ Cu-ის იონები უკავშირდებიან დნმ-ს და იწვევს ერთ-ან ორჯაჭვიან გახლეჩვებს. მაიონიზირებელი გამოსხივების მოქმედების შემთხვევაში, კი შეინიშნება სინერგიზმის ეფექტი, ანუ მეტალისა და გამოსხივების მოქმედებების ეფექტები ერთმანეთს აძლიერებენ [19].

მეტალის იონების დნმ-თან ურთიერთკავშირის შესწავლისას მთავარია გამოვიკვლიოთ ამ კომპლექსის სტრუქტურა. დნმ-ის

მოლეკულას გააჩნია აქტიური ცენტრის რამოდენიმე ტიპი, რომელიც კოორდინირებას უკეთებს მეტალის იონებს. პირველ რიგში ეს არის ფოსფატურ ჯგუფებში შემავალი უარყოფითი მუხტის მქონე ქანგბადის იონები, ფუძეების ზოგიერთი ატომი (გუანინისა და ადენინის N7, ციტოზინის N3, გუანინის, თიმინისა და ციტოზინის ქანგბადების ეგზოციკლური ატომები). მეტალების იონების დაკავშირება დნმ-ის სხვადასხვა ცენტრებთან სპეციფიურია და მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული იონის ბუნებაზე. ტუტე მეტალების (Na^+ , K^+) და ტუტემიწათა მეტალების (Mg^{2+} , Ca^{2+}) იონები უკავშირდება უპირატესად დნმ-ის ფოსფატურ ჯგუფებს, ხოლო გარდამავალი მეტალების (Mn , Zn , Co , Ni , Cd , Cu , Ag , Hg) იონები აქტიურად ებმება აგრეთვე ფუძეებსაც [20].

ამ კომპლექსების ჩამოყალიბებაში წყლის მოლეკულები მნიშვნელოვან როლს თამაშობს, წარმოქმნის ჰიდრატულ გარსს იონსა და მის კოპლექსზე. ამ დროს შესაძლებელია იონსა და მის მაკოორდინებელ ატომს შორის უშუალო კავშირის წარმოქმნა და კავშირი წყლის საშუალებით. განსხვავება შეინიშნება იონების დაკავშირებაში ნატიურ, ანუ ორჯაჭვიან დნმ-თან და მის დენატურირებულ, ერთჯაჭვიან (გორგლისებურ) ფორმასთან. ზოგიერთ შემთხვევაში დნმ-ის ორმაგი სპირალი იშლება და გორგლისებური ხდება და წარმოიქმნება ორი გორგალი.

ორჯაჭვიან დნმ-ში მოლეკულის ზედაპირზე უარყოფითი მუხტების სიმკვრივე გაცილებით მეტია. ამას გარდა, ამ მდგომარეობაში ფუძეების

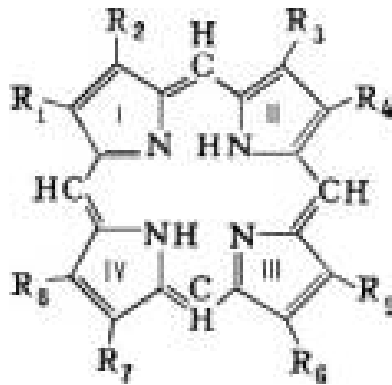
ზოგიერთი აქტიური ცენტრი მოლეკულის შიგა ნაწილშია მოთავსებული და მონაწილეობას იღებს წყალბადური ბმების წარმოქმნაში. ამასთან დაკავშირებით ნატიური დნმ-ის ფოსფატის იონებისადმი “ნათესაობა” უფრო მაღალია ვიდრე ფუძეებისა, რაც განაპირობებს სისტემის კოოპერატიულობის შემცირებას, შეკავშირებული იონების ძლიერი კულონური განზიდვის ხარჯზე. კომპლექსების ჩამოყალიბებას ფუძეებთან კი ახასიათებს მოლეკულის სტრუქტურის გარდაქმნით განპირობებული კოოპერატიულობის ზრდა. ეს განსხვავებანი განსაზღვრავს აგრეთვე იონების ზემოქმედებას დნმ-ის მოლეკულის სტრუქტურის სტაბილურობაზე: სპირალ-გორგალის გადასვლის პარამეტრები დამოკიდებულია ხსნარში იონების კონცენტრაციაზე. იონების მიერთება ფოსფატურ ჯგუფებთან ზრდის დნმ-ს სტაბილურობას, ფუძეებთან დაკავშირება კი დაბლა სწევს სპირალ-გორგალის გადასვლის ტემპერატურას.

ზოგიერთი იონის მეტალი, როგორცაა სპილენძი, კადმიუმი, ვერცხლისწყალი, მცირე კონცენტრაციის დროსაც კი იწვევს დნმ-ის ლოკალურ დაზიანებებს, მისი ფორმის ცვლილებებს და ფუძეების 180⁰-ით შემობრუნებას. ზოგჯერ მეტალების იონები იწვევს ნუკლეინის მუავეების ჯაჭვებში ქიმიური კავშირების არაფერმენტულ გახლეჩვებს, რაც თავის მხრივ ქრომოსომული აბერაციების, მუტაციებისა და გენეტიკურ აპარატში მიმდინარე სხვა დარღვევების მიზეზი ხდება [21].

1.5. მეტალების კომპლექსები პორფირინებთან და

პორფირინისმაგვარ ნივთიერებებთან

მეტალის იონების შეკავშირების ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი საშუალებაა კომპლექსების წარმოქმნა მაკროციკლურ ლიგანდებთან – პორფირინებთან. ციკლური არომატული შენაერთების ეს წარმომადგენლები ცოცხალ ბუნებაში ფართოდ გავრცელებული პიგმენტებია, რომელთა მოლეკულების ძირითად ნაწილს წარმოადგენს პორფინი – პიროლის ოთხი რგოლისაგან შემდგარი სტრუქტურა (სურ.4).



სურ. 4 პორფირინი

ბუნებრივი პორფირინების რადიკალებს ძირიადად წარმოადგენს მეთილის(CH_3), ეთილის(C_2H_5), ვინილის ($\text{CH}=\text{CH}$) ჯგუფები და ძმრის მჟავისა (CH_2COOH) და პროპინის ($\text{C}_2\text{H}_4\text{COOH}$) მჟავის ნაშთები. ბიოლოგიური თვალსაზრისით განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია პორფირინების კომპლექსი რკინასთან (უანგბადის გადამტანი სისხლის

წითელი პიგმენტი) და მაგნიუმთან (მცენარეების მწვანე პიგმენტი – ქლოროფილი). მეტალებთან ანალოგიურ კომპლექსებს წარმოქმნის ციტოქრომები, ფერმენტები – კატალაზები და პეროქსიდაზები [22].

პორფირინი: $R_1=R_2=R_3=R_4=R_5=R_6=R_7=R_8=H$

პროტოპორფირინი: $R_1=R_3=R_5=R_8=CH_3$
 $R_2=R_4=—CH=CH_2$
 $R_6=R_7=C_2H_4COO H$

უროპორფირინი: $R_1=R_3=R_5=R_8=CH_2COOH$
 $R_2=R_4= R_6=R_7=C_2H_4COOH$

პორფირინები ერთმანეთისაგან განსხვავდება ჩამნაცვლებელი რადიკალებით, რომლებიც მოლეკულის პერიფერიებზე არიან განლაგებული. მეტალოპორფირინებში მოლეკულის შიგნით განლაგებული წყალბადები ჩანაცვლებულია მეტალის იონებით, რომლებიც კოორდინაციული კავშირებით კიდევ ორი პიროლის რგოლის აზოტის ატომებს უკავშირდება. პორფირინების განსაკუთრებული ნიშან-თვისებაა კოორდინაციული სიბრტყის არსებობა, რომელიც აზოტის ატომებითაა (N₄) შემოსაზღვრული, გააჩნია 2Å –ის ტოლი რადიუსი და კოორდინირებას უკეთებს მეტალის იონებს – M²⁺ M³⁺ M⁴⁺, და კიდევ უფრო მაღალი ჟანგვითი რიცხვით. მეტალი ან სიბრტყის ცენტრშია განლაგებული და ბრტყელ

კოორდინაციულ მარყუჟს წარმოქმნის – MN^{2+} ან წამოწეულია N_4 ატომებისაგან შემდგარი სიბრტყიდან და განსხვავებული გეომეტრიული ფორმის სტრუქტურებს წარმოქმნის, როგორცაა ტეტრაგონალური პირამიდა, ოქტაედრი და კიდევ უფრო რთული გეომეტრიული ფორმები.

პორფირინებისა და მათი კომპლექსების განსაკუთრებული აგებულება და ფუნქციები, მათი სტრუქტურული მრავალფეროვნება განაპირობებს მათ მნიშვნელოვან როლს ბიოლოგიურ პროცესებში.

1.6. პორფირინების გამოყენება მედიცინაში

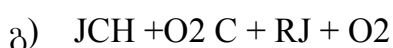
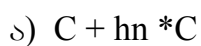
როგორც ცნობილია, ონკოლოგიური დაავადებები ძლიერ მრავალფეროვანია და უჯრედის ცხოველმოქმედების ძირეულ მექანიზმებთანაა დაკავშირებული. დღესდღეობით დადგენილია, რომ ავთვისებიანი სიმსივნე ერთი მუტაციური უჯრედით იწყება. დიაგნოზის დადგენის მომენტში კი სიმსივნურ წარმონაქმნში პათოლოგიური უჯრედების რაოდენობა დაახლოებით 1000-მდე აღწევს. ამავე დროს მასში უჯრედების ნახევარზე მეტი ნორმალურია. ამის გამო სიმსივნის მკურნალობისას სასურველია შეირჩეს მეთოდები, რომელიც სელექციურად გაანადგურებს პათოლოგიურ უჯრედებს. სამწუხაროდ, ფართოდ გამოყენებულ მეთოდებს, როგორებიცაა რადიოიზოტოპური მკურნალობა, ქიმიოთერაპია, ოპერაციები ლაზერებით და სხვ. არ გააჩნია ასეთი სელექციურობა.

აქედან გამომდინარე საჭირო გახდა ეფექტური მეთოდების ძიება, რომელთა შორის მნიშვნელოვანი ადგილი დაიკვიდრა სიმსივნის ფოტოდინამიურმა თერაპიამ. ჯერ კიდევ წინა საუკუნის დასაწყისში აღმოჩენილი იყო, რომ სიმსივნურ უჯრედებს გააჩნია მნიშვნელოვანი თვისება – მათ შეუძლიათ სელექციურად დააგროვონ პიგმენტური ნივთიერებანი – ორგანიზმში არსებული, ენდოგენური და გარედან შეყვანილი, ეგზოგენური პორფირინები. გაჩნდა იდეა ამ უბნებზე ემოქმედათ განსაზღვრული სიგრძის სინათლის სხივით, ისე რომ არ დაეზიანებიათ გარშემომყოფი ნორმალური უჯრედები. ამ იდეის რეალიზება მოხდა 1978 წელს, პროფესორ თ. დოგერტის მიერ, რომლის პირველივე ცდები წარმატებით დამთავრდა: 25 პაციენტი გამოჯანმრთელდა [23]. შემდგომში ამ მეთოდით ბევრი მეცნიერი დაინტერესდა და დღესდღეობით იგი საკმაოდ დაიხვეწა.

ფოტოდინამიური თერაპია ოთხ ეტაპს მოიცავს. პირველ ეტაპზე პაციენტის ორგანიზმში შეჰყავთ სენსიბილიზატორის ხსნარი. მეორე ეტაპი რამოდენიმე დღეს მოიცავს, რომლის განმავლობაში სიმსივნურ წარმონაქმნში სენსიბილიზატორის დაგროვება ხდება. ამის შემდეგ ხდება დაზიანებული ადგილის დასხივება 15-20 წთ-ის განმავლობაში. სინათლის წყაროდ გამოიყენება ლაზერის სხივები, რომლის ტალღის სიგრძეა 632,8 ნმ (წითელი სინათლე). ლაზერის დასხივების წყაროდ გამოყენების მიზეზი იყო ის ფაქტი, რომ თვით პორფირინებს ახასიათებს წითელი გამოსხივება. ამას გარდა ეს სხივები ნაკლებად საზიანოა ნორმალური უჯრედებისათვის. დასხივების შემდეგ

სენსიბილიზატორის შემცველ სიმსივნურ უბნებში ადგილი აქვს ფოტოქიმიურ გარდაქმნებს, რის შედეგადაც სიმსივნური უჯრედები იღუპება. მათ გარშემო მყოფი ნორმალური უჯრედები კი არ ზიანდება. მეოთხე ეტაპი ითვალისწინებს სიმსივნური წარმონაქმნის დაშლას [24].

სენსიბილიზატორის ტრანსპორტი უჯრედში სისხლის სხვადასხვა კომპონენტების ხარჯზე ხდება, რომელთა შორის მნიშვნელოვანია ლიპიდების კომპლექსი ცილებთან, როგორც არის დაბალი სიმკვრივის მქონე ლიპოპროტეიდები. ფლუორესცენტული მიკროსკოპიის საშუალებით ნაჩვენებია იყო, რომ სენსიბილიზატორი თავდაპირველად ადსორბირებს უჯრედის გარე მემბრანაზე, შემდეგ კი აღწევს უჯრედის შიგნით და მისი ორგანოიდების მემბრანებს ებმება. დასხივების შედეგად უჯრედში იწყება ფოტოქიმიური პროცესები, რომელსაც საფუძვლად ორი ტიპის მექანიზმი უდევს. პირველი ტიპის რეაქციები მოიცავს პროცესებს, რომლის მიმდინარეობისას სენსიბილიზატორის აქტიური ფორმა უშუალოდ ურთიერთქმედებს სუბსტრატის მოლეკულასთან. საერთო მექანიზმი წარმოდგენილია რეაქციებით (ა) – (ბ):



პირველ ეტაპზე (ა) სენსიბილიზატორის მოლეკულა – C სინათლის საშუალებით გადადის აგზნებულ მდგომარეობაში –*C, რომელიც უჯრედის სუბსტრატთან ურთიერთქმედებისას ორ რადიკალს იძლევა (ბ). სენსიბილიზატორის ჰიდრირებული ფორმა (ბ) ჰაერის ჟანგბადით იჟანგება საწყის სტრუქტურამდე. სუბსტრატის რადიკალს – RJ-ს შეუძლია დაჟანგოს სხვა სუბსტრატები ან მიიერთოს ჟანგბადი და წარმოქმნას რადიკალები ზეჟანგის ფორმით (გ).

მეორე მექანიზმის მიხედვით სენსიბილიზატორის აგზნებული მოლეკულა ურთიერთქმედებაში შედის ჟანგბადთან, რის შედეგადაც მიიღება ჟანგბადის აქტიური სინგლეტური ფორმა 1O_2 . იგი *C ფორმასთან შედარებით უფრო მოძრავია და უფრო აქტიურად ჟანგავს უჯრედშიგა ელემენტებს. ფოტოდინამიური მეთოდის გამოყენებისას ძირითადად მომდინარეობს რეაქციების მეორე ტიპი [24].

ფდთ-ის განვითარება მჭიდროდაა დაკავშირებული პორფირინების საფუძველზე შექმნილ სენსიბილიზატორებთან. მათი მრავალფეროვანი წარმომადგენლებიდან ყველაზე პერსპექტიული აღმოჩნდა ჰემატოპორფირინი IX, რომლის საფუძველზეც ლიპსონმა და მისმა თანამშრომლებმა 1961 წელს შექმნეს ე.წ. “ჰემატოპორფირინის წარმოებულნი” [25] და რომელიც დოგერტმა თავის პირველ ექსპერიმენტებში გამოიყენა. მას დღესაც ფართო გამოყენება აქვს. ნაჩვენებია, რომ ლიპსონის მიერ მიღებული პორფირინი შედგება მონომერული პორფირინებისგან, დიმერებისა და მაღალმოლეკულური

ოლიგომერებისაგან. შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ოლიგომერები უჯრედში მოხვედრისას მონომერებად იშლება, რამაც ფდთ-ის გამოყენებისას შეიძლება გამოიწიოს ფლუორესცენციის მომატება სიმსივნურ წარმონაქმნში. აქედან გამომდინარე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ოლიგომერები ასრულებს მონომერული პორფირინების გადამტანების როლს უჯრედში [26]. მოგვიანებით ჰემატოპორფირინების საფუძველზე შეიქმნა გაუმჯობესებული პრეპარატები – ფოტოფრინი 2 და ფოტოგემი.

ფდთ-ის განვითარებისა და სენსიბილიზატორების ქიმიური ბუნებისა და მოქმედებების მექანიზმის უკეთ შეწავლის შედეგად წარმოიშვა მათი შემდგომი დახვეწის აუცილებლობა. შეიქმნა მეორე თაობის პრეპარატი, რომელიც გაცილებით ეფექტურია და აკმაყოფილებს მკურნალობისათვის აუცილებელ ძირითად მოთხოვნებს:

- 1) მას უნდა ჰქონდეს კიბოს უჯრედებისადმი მაღალი სელექციურობა და არ უნდა აზიანებდეს ნორმალურ უჯრედებს;
- 2) უნდა იყოს ნაკლებად ტოქსიკური.
- 3) არ უნდა გროვდებოდეს კანის უჯრედებში დიდი რაოდენობით.
- 4) უნდა გააჩნდეს მაღალი ლუმინენსცენცია კიბოს დიაგნოსტიკის სიზუსტისათვის.
- 5) ჰქონდეს მაღალი კვანტური გამოსავალი არანაკლები ენერგიით ვიდრე 94კჯ/მოლ.
- 6) უნდა გააჩნდეს შთანთქმის ინტენსიური მაქსიმუმი 600–900 ნმ-ის დიაპაზონში.

ამ მონაცემების გათვალისწინებით პორფირინების საფუძველზე წარმატებით შეიქმნა სინთეზური სენსიბილიზატორები – დი- და ტეტრაჰიდროპორფირინები [27-28].

ინგლისელმა მეცნიერმა ბენეტმა შექმნა ახალი ტიპის სენსიბილიზატორი – ტეტრაჰიდროქსიფენილქლორინი, რომელიც ეფექტურად გენერირებს სინგლეტურ ჟანგბადს, გააჩნია ინტენსიური მაქსიმუმი 650-735ნმ-ზე და დაბალი ფოტოტოქსიურობა [29].

ტეტრააზოპორფირინებს მეზო-ნახშირბადოვანი ხიდაკების მაგივრად გააჩნია აზოტის ოთხი ატომი. ამ ნაერთებიდან ყველაზე უკეთ შესწავლილია ფლატოციანინები და ნაფტალოციანინები.

ფლატოციანინებს გააჩნია მაკროციკლთან დაკავშირებული ოთხი ბენზოლის რგოლი და შთანთქმის მაქსიმუმი 670ნმ-ზე. ცნობილია ფლატოციანინების სხვადასხვა წარმომადგენელი, რომელსაც მაკროციკლში გააჩნია განსხვავებული ჩამნაცვლებლები (R) მეტალის იონები. მათ შორის შედარებით მაღალ ბიოლოგიურ აქტივობას იჩენს კომპლექსები ცინკთან, ალუმინთან და სილიციუმთან [30].

განსაკუთრებით საინტერესო შედეგებია მიღებული თუთიის შენაერთთან. მას გააჩნია ოთხი ჰიდროქსილის ჯგუფი ($13, M = Zn, R = OH$) და ქოლესტერინი, როგორც ცენტრალური მეტალის ლიგანდი. განსაზღვრული სირთულეები, რომელიც წარმოიშვა ფლატოციანინებთან მუშაობისას დაკავშირებული იყო მათ მაღალ

ჰიდროფობურობასთან. ხსნადობის გასაუმჯობესებლად იღებენ ფლატოციანინების სულფინირებულ მეტალოკომპლექსებს ($13, R = SO_3H, M = Al$). დადგენილია, რომ სულფინირების ხარისხი ძლიერ მოქმედებს პრეპარატის ბიოლოგიურ აქტივობაზე. ფლატოციანინის ალუმინთან კომპლექსებში აქტიურობა იზრდება მაკროციკლში სულფოჯგუფების რაოდენობის მომატებით – $Al_2(SO_3)_4, Al_2(SO_3)_3, Al_2(SO_3)_2$, სადაც $S^2 - S^4$ სულფოჯგუფების რაოდენობას აღნიშნავს [31].

ნაფტალოციანინებს გააჩნია შთანთქმის მაქსიმუმი 750-780ნმ-ზე, მდგრადი ტრიპლეტური მდგომარეობა და სინგლეტური ქანგბადის ეფექტური გენერირების უნარი. ამ ნივთიერების ერთ-ერთი დადებითი მხარეა ის, რომ მასთან მუშაობისას გამოიყენება შედარებით იაფი და კომპაქტური დიოდური ლაზერები.

ახალი ტიპის სენსიბილიზატორების ძიებისას შეიქმნა პორფირინების ანალოგები, რომელთაც პიროლური რგოლების დაკავშირების განსხვავებული სტილი გააჩნია. მათში მეზო-ხიდაკები შეცვლილია სამი ნახშირბადის ატომისაგან შემდგარი ჯაჭვისაგან, რის შედეგადაც შთანთქმის მაქსიმუმი წანაცვლებულია 783 ნმ-მდე. მეორეს მხრივ, ამ შემთხვევაში დაბალი აღმოჩნდა სინგლეტური ქანგბადის გამოსავალი. პორფირინის მაკროციკლის შემდგომმა გაზრდამ ნახშირბადის ხუთ ატომამდე და სამი ორმაგი კავშირის წარმოქმნამდე გამოიწვია შთანთქმის მაქსიმუმის წანაცვლება 997ნმ-მდე, მაგრამ ამავე

დროს შენაერთმა საერთოდ დაკარგა სინგლეტური ქანგბადის წარმოქმნის უნარი.

პორფირინებთან უფრო დიდი მსგავსება გააჩნია პორფიცენებს. სპექტრალური თვისებებით ისინი სენსიბილიზატორების პირველი და მეორე თაობის შორის არის მოქცეული. შთანთქმის მაქსიმუმი გააჩნიათ 630-630ნმ-ზე და მისი ინტენსივობა 15-ჯერ აღემატება ანალოგიური უბნის ინტენსივობას პორფირინებში. პორფიცენებისთვის დამახასიათებელია სიმსივნურ წარმონაქმნში ეფექტურად დაგროვების უნარი და დაბალი ფოტოტოქსიურობა [32].

ახლო მომავალში ფდთ შეიძლება შეიცვალოს კიდევ უფრო გაუმჯობესებული მეთოდით – მიზანმიმართული ფოტოდინამიური თერაპიით. ამ მეთოდის საშუალებით შესაძლებელი გახდება სენსიბილიზატორის ზუსტი, მიზანმიმართული ტრანსპორტირება დანიშნულების ადგილზე. ამ მიზნისათვის გამოიყენება მონოკლონური ანტისხეულები, ლიპოპროტეიდები, ცილები და სხვა გადამტანები. ამ დროს გამოყენებული სენსიბილიზატორის რაოდენობა მნიშვნელოვნად დაიკლებს. მიუხედავად ამ ახალი მეთოდის დიდი უპირატესობისა მისი გამოყენება კლინიკაში ჯერ-ჯერობით შეუძლებელია მეთოდის რეალიზაციასთან დაკავშირებული განსაზღვრული სიძნეელების გამო.

დაბოლოს, გვინდა აღვნიშნოთ, რომ მიუხედავად იმისა რომ ფდთ-ის მეთოდი მხოლოდ 15 წელია არსებობს, ჩატარებულია უდიდესი მოცულობის კლინიკური სამუშაოები და ათასობით ადამიანმა

წარმატებით გაიარა ეს კურსი. ინტენსიური პროგრესი ამ მიმართულებით კი მეტყველებს ამ მეთოდისადმი დღითი დღე მზარდ ინტერესზე.

1.7. ქრომატინის სტრუქტურა და ფიზიკო-ქიმიური თვისებები

როგორც ცნობილია, ადამიანის თითოეულ უჯრედში არსებული ქრომოსომული დნმ-ის საერთო სიგრძეა 2 მეტრი. მაგრამ ამავე დროს იგი მაქსიმალურად მჭიდროდაა მოთავსებული ბირთვში და მისი კომპაქტიზაციის ხარისხი 10^4 –ის ტოლია.

დნმ-ის მოლეკულა წარმოადგენს 2ნმ-იანი დიამეტრის მქონე მარცხნივდახვეულ სპირალს, რომელიც თავის მხრივ დახვეულია 11 ნმ-ის დიამეტრის მქონე ნუკლეოსომაზე (სურ.5). რენტგენოსტრუქტურული ანალიზის საშუალებით, რომელიც გვაძლევს მონაცემებს კრისტალში ატომების სივრცობრივ განლაგებაზე, დადგინდა, რომ ნუკლეოსომის შემადგენლობაში არსებული დნმ-ის ორმაგი სპირალის კონფორმაცია B ფორმის დნმ-ს წარმოადგენს [33].

დნმ-ის მონაკვეთს, რომელიც ერთ ნუკლეოსომაში მდებარეობს ნუკლეოსომურ განმეორებას უწოდებენ. ეს სიდიდე წარმოადგენს მოცემული ტიპის ქრომოსომის მახასითებელს. ნუკლეოსომა შედგება ოთხი ტიპის ცილისაგან – ჰისტონებისაგან და მათ შორის განლაგებულია ლინკერული ჰისტონი, რომელიც არ შედის ნუკლეოსომის შემადგენლობაში [34]. თავის მხრივ ნუკლეოსომებიც

განიცდის კომპაქტიზაციას და ლაგდება უფრო მჭიდრო – 306მ-ის დიამეტრის მქონე სტრუქტურებად. კომპაქტიზაციის საბოლოო დონეა მეტაფაზური ქრომატინი, რომელშიც კომპაქტიზაციის ხარისხი 10 000-ია [35].

90-იანი წლების ბოლოს თ. რინმონდის ლაბორატორიაში მიიღეს მაღალი გარჩევადობის ნუკლეოსომის სტრუქტურული გამოსახულება და ამის საფუძველზე შეიქმნა იმ მექანიზმების დადგენის საშუალება, რომელიც განაპირობებს ნუკლეოსომების გაველენას დნმ-ის კომპაქტიზაციაზე და გენების აქტივობის რეგულაციაზე [36].

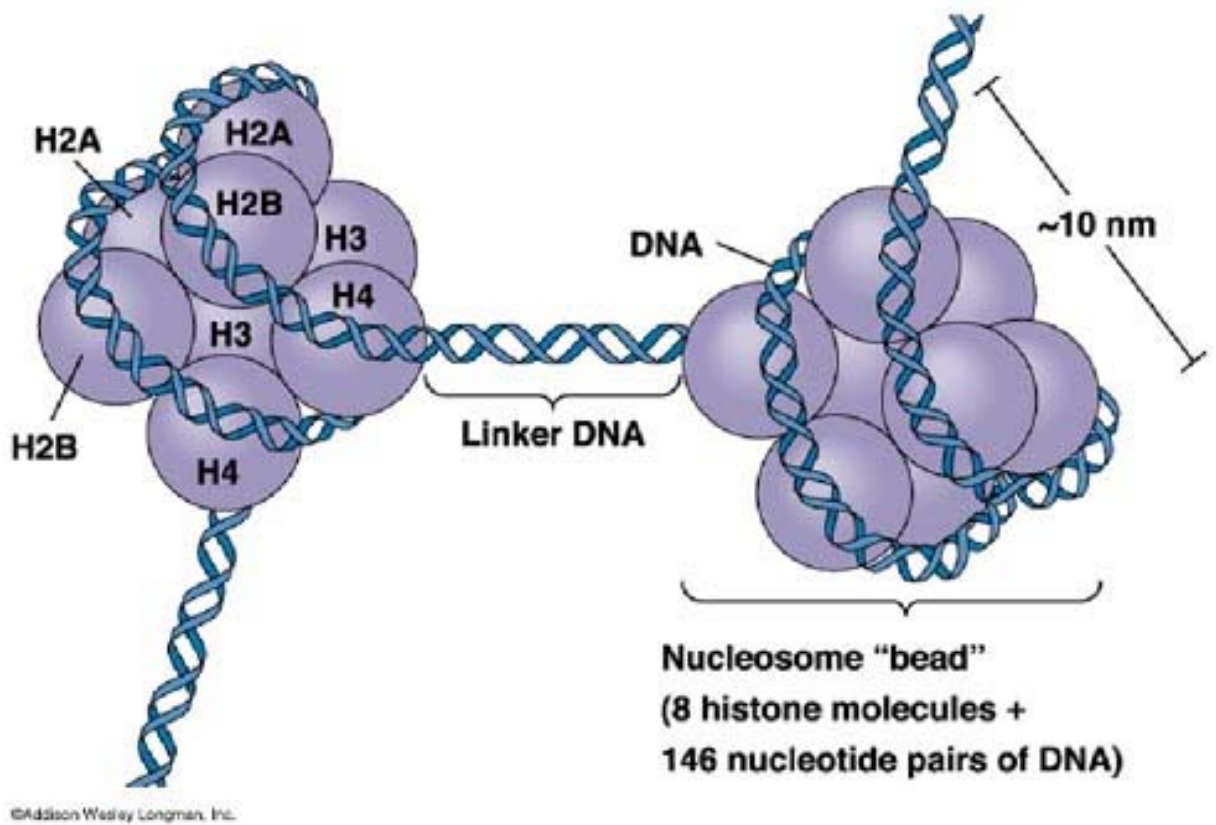
დღეისათვის ნუკლეოსომის კორის (ბირთვის) სტრუქტურა კარგადაა შესწავლილი ელექტრონული მიკროსკოპის, რენტგენოსტრუქტურული ანალიზისა და ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსის საშუალებით [37]. შემოთავაზებულია ნუკლეოსომების კომპაქტიზაციის რამოდენიმე მოდელი:

1. სოლენოიდის მოდელი: მარცხნივდახვეული ჯაჭვი, რომლის ერთ ხვეულზე ექვსი ნუკლეოსომაა განლაგებული. H1 ჰისტონი 306მ-იანი სტრუქტურის შიგნითაა მოთავსებული.
2. სუპერსპირალის მოდელი: სოლენოიდის მსგავსია, მაგრამ H1 ჰისტონი ლოკალიზებულია პერიფერიაზე ან ნუკლეოსომებს შორის სპირალის მთელ სიგრძეზე.

3. კროს-ლინკერული სტრუქტურა: 10 ნმ-იანი ფილამენტები იხვევა ზიგზაგისებურად, რომლის გასწვრივ განლაგებულია ლინკერული მონაკვეთები.
4. ზონარისებური მოდელი: 10ნმ-იანი ზონარის ფორმის სუპერსპირალი.

ნუკლეოსომები შედგება ჰისტონების ოთხი წყვილისაგან, რომლებიც მის ბირთვის – კორს – წარმოქმნის. მასში მოთავსებულია ლიზინით მდიდარი H2A-H2B და არგინინით მდიდარი H3 - H4 ოქტამერების ორ-ორი წყვილი. ნუკლეოსომის გარშემო დნმ აკეთებს 1.75 ბრუნს და თითოეულ ამ მონაკვეთში მას 146 ბაზისური წყვილი გააჩნია. ამას გარდა ნუკლეოსომის ორგანიზებაში მონაწილეობას იღებს H1 ჰისტონი, რომელიც დაკავშირებული არის ლინკერულ დნმ-თან [38].

ფუძე ცილები – ჰისტონები განაპირობებს ნუკლეოსომის სტრუქტურაში დნმ-ის კომპაქტურად ჩალაგებას და ჰისტონ – დნმ-ის ურთიერთდამაკავშირებელ ძალებს ელექტროსტატიკური ხასიათი გააჩნია. დნმ-ის შემადგენლობაში შემავალი უარყოფითად დამუხტული ფოსფატური ჯგუფები ურთიერთქმედებაში შედის როგორც კორის ჰისტონების, ასევე H1 ჰისტონის ლიზინისა და არგინინის დადებითად დამუხტულ ამინომჟავურ ნაშთებთან. აქედან გამომდინარე ქრომატინის დნმ-ის ფოსფატების 40-60% დაფარულია ჰისტონური ცილებით [39].



სურ. 5 ნუკლეოსომა

უახლესი მონაცემების საფუძველზე დადგინდა, რომ ადამიანს გააჩნია H2A ჰისტონის მინიმუმ ხუთი ვარიანტი. მათ შორის ყველაზე კარგადაა შესწავლილი H2AZ. ეს ძლიერ კონსერვატიული ჰისტონია და აღმოჩენილია ყველა ეუკარიოტში – საფუარებიდან ადამიანამდე. მას გააჩნია ჩვენთვის ცნობილი H2A ჰისტონისაგან განსხვავებული ამინომჟავური თანმიმდევრობა იმ დომენში, რომელიც განაპირობებს H2A-H2B დიმერის ურთიერთქმედებას H3-H4 ტეტრამერთან და აგრეთვე შეცვლილია მისი პოლიპეპტიდური ჯაჭვის N-ბოლო, რის გამოც ჯამური მუხტი H2A-ს ბოლოზე განსხვავდება H2AZ ბოლოს ჯამური მუხტისაგან. აქედან გამომდინარე იცვლება Z-ვარიანტის შემცველი ნუკლეოსომის ზედაპირის თვისებები, ირღვევა ქრომატინის კონდენსაციის ხარისხი. იგი გადადის ნაკლებად კონდენსირებულ მდგომარეობაში, რაც აუცილებელია გენების აქტივაციისათვის. აღმოჩნდა, რომ Z-ვარიანტის გარეშე უჯრედი იღუპება, რადგან შესაბამისი გენის მუტაცია ლეტალურ შედეგს იწვევს [40].

მირზაბეკოვისა და თანაავტორების მიერ დადგინდა კორის და აგრეთვე მთელ ნუკლეოსომურ დნმ-თან ჰისტონების ლიზინის ნაშთების კონტაქტის ადგილი [41,42].

ნაშრომში [41] მოცემულია ნუკლეოსომური კორის პირველადი ორგანიზაცია, რომელსაც ახასიათებს დნმ-ის ჯაჭვის გასწვრივ ჰისტონების რეგულარული განლაგება. ჰისტონები ლიზინის ნაშთებით უკავშირდება დნმ-ის დისკრეტულ უბნებს, რომელთა სირძეა ~ 6

ნუკლეოტიდი და რომლებიც ერთმანეთისაგან გამოყოფილია დნმ-ს ჰისტონებისაგან თავისუფალი 4-ნუკლეოტიდიანი სეგმენტებით. დნმ-ის ორივე ჯაჭვზე ჰისტონები განლაგებულია სიმეტრიულად.

ნუკლეოსომური კორის საერთო მორფოლოგია წარმოადგენს 11ნმ-ის დიამეტრის, 5,7ნმ სიმაღლის ბრტყელ დისკს, რომლის ზედაპირის გარშემო დნმ დახვეულია 1,75-ჯერ [43]. ნუკლეოსომურ კორში ჰისტონური ცილების ზუსტი განლაგება და ორმაგი სპირალის მის გარშემო დახვევის ხასიათი დეტალურად აღწერილია ნაშრომებში [35,41].

ლიზინით მდიდარი H1 და H5 ჰისტონები ლოკალიზებულია მხოლოდ ნუკლეოსომის კორის ზედაპირზე და ერთმანეთს უკავშირდება ლინკერული დნმ-ით. ნაჩვენებია, რომ H1 ჰისტონი უკავშირდება დნმ-ს ნუკლეოსომაში მისი შესვლისა და გამოსვლის ადგილას, რითაც თითქოსდა კეტავს ნუკლეოსომას და მნიშვნელოვნად განაპირობებს ქრომატინის *in vitro* მდგომარეობას.

კორული ჰისტონების დომენური სტრუქტურა შემდეგნაირია: არასტრუქტურირებული C-ბოლო, ცენტრალური გლობულარული ნაწილი, დადებითად დამუხტული N-ბოლო. N-ბოლოზე დაახლოებით ყოველი მეოთხე ნაშთი – ლიზინი ან არგინინი. მათთან ურთიერთქმედებისას უარყოფითად დამუხტული დნმ ნუკლეოსომაზე ფიქსირდება. არსებობს აცეტილირებული, მეთილირებული და ადფ-რიბოზილირებული ჰისტონები.

ქრომატინი დნმ-ისა და ცილების დაახლოებით ერთნაირი მასისაგან შედგება. ცილების დაახლოებით ნახევარს არაჰისტონური ცილები შეადგენს, მაგ. HMG (High Mobility Group)- ცილები, რომელთა კონკრეტული ფუნქცია ჯერ-ჯერობით უცნობია.

პირველად ქრომატინის სითბური დენატურაციის პროცესი შესწავლილი იყო ნაშრომში – [44]. ნახვენები იყო, რომ დენატურაციის პროცესი ორ საფეხურად მიმდინარეობს. პირველი სტადია მიმდინარეობს ტემპერატურულ ინტერვალში – $68-75^{\circ}\text{C}$, მაქსიმუმით $T_d = 69.5^{\circ}\text{C}$; მეორე სტადია – $78-92^{\circ}\text{C}$, $T_d = 84^{\circ}\text{C}$. (დენატურაციის ტემპერატურად მიხნეულია ის ტემპერატურა, რომლის დროსაც ჰიპერქრომული ეფექტი 50%-ს აღწევს) [45].

გამოითქვა მოსაზრება, რომ დნმ-ის ის ნაწილი, რომელიც განიცდის დენატურაციას ტემპერატურულ ინტერვალში - $78-92^{\circ}\text{C}$, მთლიანადაა დაკავშირებული ჰისტონებთან და არ აქვს უნარი მონაწილეობა მიიღოს *in vivo* ტრანსკრიპციაში. დნმ-ის მეორე ნაწილი, რომელიც განიცდის დენატურაციას შედარებით დაბალ ტემპერატურაზე - $T_d = 69.5^{\circ}\text{C}$, იონურ მდგომარეობაშია და შეუძლია მონაწილეობა მიიღოს რნმ-ის სინთეზში.

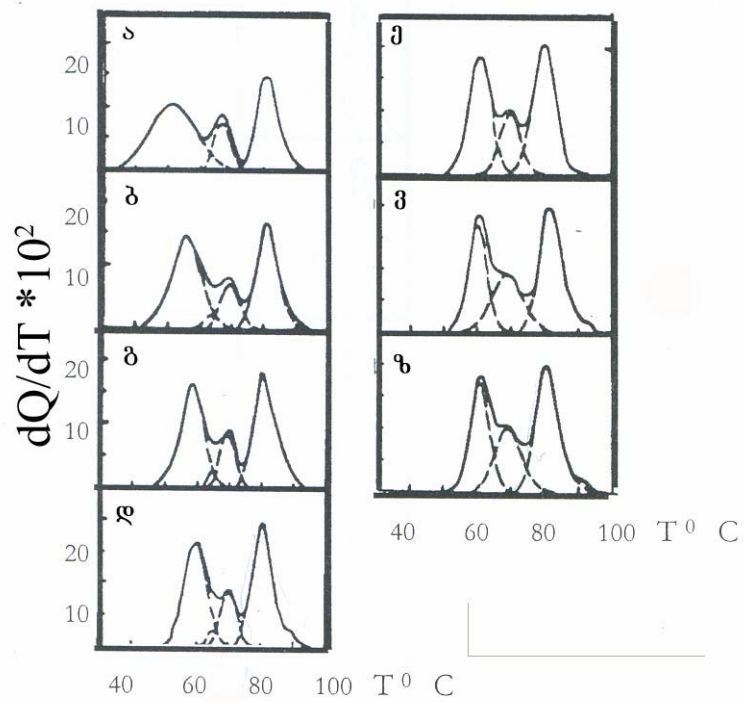
ფულმერმა და ფასმანმა [46] გამოიკვლიეს ქათმის მაღალმოლეკულური ქრომატინი, სუსტად დამუშავებული მიკროკოკური ნუკლეაზით, (ნატიური ქრომატინი) და ქრომატინი, რომელსაც არ გააჩნდა არაჰისტონური ცილები და ლიზინით გამდიდრებული H1, H5 ჰისტონები (კორ-ქრომატინი) მცირე იონური ძალის მქონე $0.25 \mu\text{M Na-}$

EDTA –ს ხსნარში. შედეგებმა მოგვცეს დამატებითი ინფორმაცია დნმ-ის კომპაქტიზაციაზე ქრომატინში, რომელიც განპირობებული იყო ლიზინით მდიდარი ჰისტონებისა და კორ-ნაწილაკების ურთიერთქმედებით.

სურ.6-ზე მოყვანილია ფოსფატის ბუფერის სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში ხბოს ქრომატინის სითბური დენატურაციის მრუდები (dh/dT).

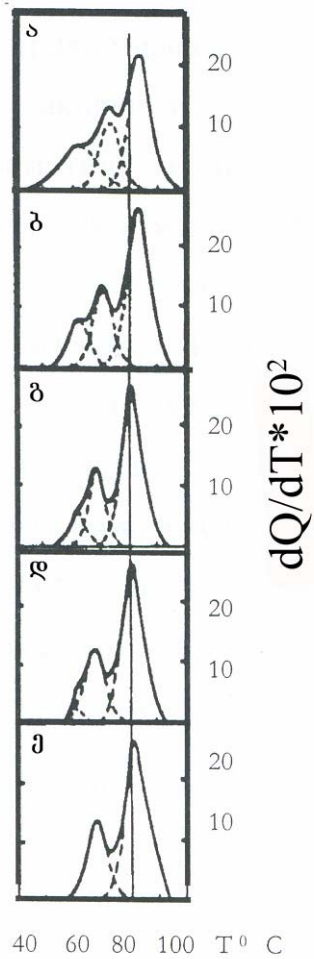
ჰიპერქრომული ეფექტის მრუდების ანალიზმა (სურ.7) გვიჩვენა, რომ მთლიანი ქრომატინის გადასვლის II საფეხური მოიცავს ნუკლეოსომათაშორისი დნმ-ის დნობას, რომელიც დნება კორის ქრომატინის I საფეხურზე, III საფეხური კი მოიცავს კორის ნაწილის დნმ-ის 140 ფ.წ.-ის დნობას, ანუ დნმ-ს იმ ნაწილის დნობას, რომელიც კორის ქრომატინში დნება I და II საფეხურზე.

მიღებული შედეგები ნათლად აჩვენებს, რომ მთლიან ქრომატინში პრაქტიკულად არ არის თავისუფალი დნმ. ის ყოველთვის ჰისტონების მოქმედების ქვეშაა და მთლიანი ქრომატინის დენატურაციის პროცესი მიმდინარეობს უფრო კოოპერატიულად, ვიდრე კორის ქრომატინის შემთხვევაში. კორის ქრომატინთან შედარებით მთლიანი ქრომატინის კოოპერატიულობისა და თერმოსტაბილურობის მომატება განპირობებულია მთლიან ქრომატინში ლიზინით გამდიდრებული H1, H5 ჰისტონების არსებობით.



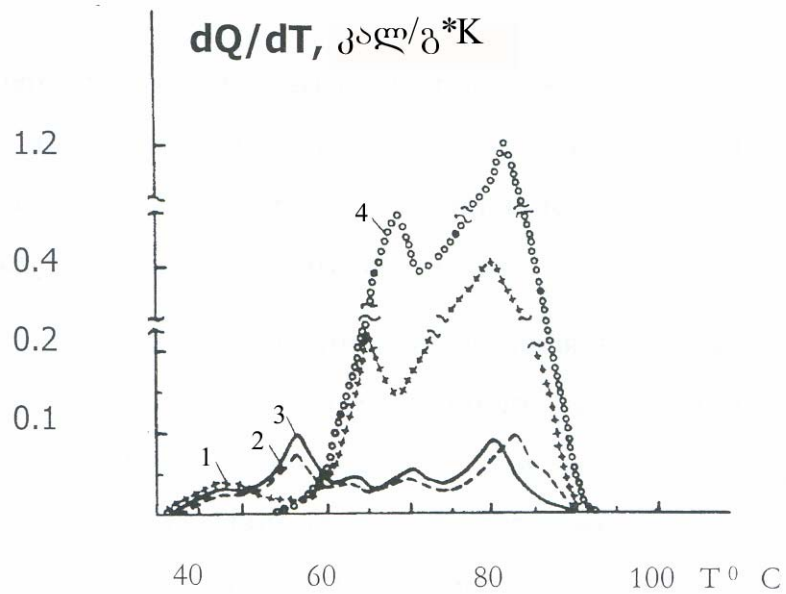
სურ. 6

ხბოს ქრომატინის სითბური დენატურაციის (dh/dT) მრუდები: ა – Na-ფოსფატის გარეშე; ბ – Na-ფოსფატის დამატებით– $1.0 \cdot 10^{-3}$ მოლ; გ – $2.0 \cdot 10^{-3}$ მოლ; დ – $3.0 \cdot 10^{-3}$ მოლ; ე – $4.0 \cdot 10^{-3}$ მოლ; ვ – $5.0 \cdot 10^{-3}$ მოლ; ზ – $6.0 \cdot 10^{-3}$ მოლ; ხსნარები შეიცავს $0.25 \cdot 10^{-3}$ მოლ Na_2EDTA , pH 7.0.



სურ. 7

მთლიანი ქრომატინის სიბუური დენატურაციის (dh/dT) მრუდები: ა – Na-ფოსფატის გარეშე; ბ – Na-ფოსფატის დამატებით– $1.0 \cdot 10^{-3}$ მოლ; გ – $2.0 \cdot 10^{-3}$ მოლ; დ – $3.0 \cdot 10^{-3}$ მოლ; ე – $4.0 \cdot 10^{-3}$ მოლ; ხსნარები შეიცავს $0.25 \cdot 10^{-3}$ მოლ Na_2EDTA , pH 7.0.



სურ. 8. ქსოვილების (1), უჯრედების (2), ბირთვების (3) და C3HA ხაზის თაგვების ღვიძლის ქრომატინის (4) სითბოს შთანთქმის მრუდები. (pH 7.6, 0.2 მოლ საქაროზა, 10 მ.მოლ Tris, 1 მ.მოლ MgCl_2).

ამრიგად, ქრომატინის მიღების პირობები მნიშვნელოვნად განაპირობებს დენატურაციის მრუდის ფორმას. მართლაც, დნმ-ის გიგანტური ზომებისა და მისი ქრომატინში რთული კომპაქტიზაციის გამო, დაუზიანებელი ქრომატინის მიღება დიდ სირთულეს წარმოადგენს. ჯ. მონასელიძემ და სხვ. მიკროკალორიმეტრიული გაზომვების ჩატარების საფუძველზე აღწერეს ეუკარიოტების უჯრედებში შემაჯავალი ნატიური ქრომატინის დნობის პროცესი [47].

სურ.8-ზე მოყვანილია C3HA თაგვების ღვიძლის ქსოვილის, ბირთვების, უჯრედებისა და თავისუფალი ქრომატინის სითბოს შთანთქმის მრუდები. სურათზე ნათლად ჩანს, რომ უჯრედების ბირთვებში შემაჯავალი ქრომატინული კომპლექსის თავისუფალი ქრომატინის დენატურაცია მიმდინარეობს ორ საფეხურად. ტემპერატურულ ინტერვალში $60-92^{\circ}\text{C}$, გადასვლის პარამეტრებით $T_d = 68^{\circ}\text{C}$, $\Delta T_d = 5.0^{\circ}\text{C}$, $Q_d = 48\text{ჯ/გრ დნმ}$; $T_d = 78^{\circ}\text{C}$, $T_d = 6.2^{\circ}\text{C}$, $T_d = 52.8\text{ჯ/გრ დნმ}$. უჯრედისა და ქსოვილების შემადგენლობაში კი ეს პროცესი მიმდინარეობს ერთსაფეხურად და შემდეგი პარამეტრებით ხასიათდება: $T_d = 82 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $\Delta T_d = 7 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $Q_d = 96 \pm 12\text{ჯ/გრ დნმ}$. უჯრედების, ბირთვების და აგრეთვე თავისუფალ მდგომარეობაში მყოფ ქრომატინთან შედარებით ქსოვილის ქრომატინის T_d -ს წანაცვლება მაღალი ტემპერატურებისაკენ გამოწვეულია იმ ფაქტით, რომ პირველად ჩამოთვლილი ქრომატინები არ არის სუსპენზირებული ბუფერულ ხსნარებში. ძლიერ მნიშვნელოვანია ის, რომ უჯრედის ქრომატინის დენატურაცია, განსხვავებით ბირთვისა და თავისუფალი ქრომატინისაგან

მიმდინარეობს ერთსაფეხურებრივად. რაც მიუთითებს ქრომატინული კომპლექსის დაშლაზე მისი გამოყოფის პროცესში.

1.8. ტოლუოლი, მისი მეტაბოლიზმი და მოქმედების მექანიზმები

ქსენობიოტიკი ტოლუოლი ფართოდ არის გავრცელებული გარემოში. იგი ბუნებრივად დიდი რაოდენობით მოიპოვება გადამუშავებულ ნავთობში, საიდანაც მისი მიღების შემდეგ გამოიყენება ისეთ სამომხმარებლო პროდუქციის წარმოებაში, როგორც არის საღებავები და მათი გამსხნელები, სხვადასხვა სახის ლაქები, ადჰეზიური ნივთიერებები. იგი მოიხმარება საწვავის ოქტანობის გასძლიერებლად და როგორც გამსხნელი გამოიყენება ქიმიური რეაქტივების, ფარმაცევტული პროდუქტების, რეზინის, კაუჩუკის, პლასტმასის ბოთლების, კოსმეტიკური საშუალებების, ტყავის, სადეზინფექციო საშუალებების, ფენოლისა და ტრინიტროტოლუოლის (ტოლი, ტროტილი) წარმოებაში.

ტოლუოლი ამავე დროს აღიარებული პოლუტანტია. იგი დიდი რაოდენობით გამოიყოფა ატმოსფეროში მსუბუქი საწვავის (ბენზინი, ნავთი) ან ტოლუოლის შემცველი გამსხნელების აორთქლებისა და ტრანსპორტის გამონაბილქვით ჰაერის დაბინძურების დროს. იგი აგრეთვე ხვდება ნიადაგში და გამდინარე წყლებში საწვავისა და

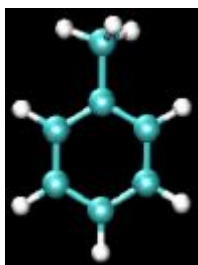
ზეთების ტრანსპორტირების და მიწისქვეშა კონტეინერებიდან გაჟონვის შედეგად და გარემოს მნიშვნელოვან დაბინძურებას იწვევს. აშშ-ს გარემოს დაცვის სააგენტოს (Environmental Protection Agency-EPA) მონაცემების მიხედვით წყალში ტოლუოლის დასაშვები ზღვრული კონცენტრაცია 1მგ/ლ შეადგენს, ხოლო 1987-1993 წლებში ნიადაგისა და წყლის დაბინძურების დონე მხოლოდ ბენზინის წარმოებიდან მნიშვნელოვნად აღემატებოდა დასაშვებ ნორმას.

აშშ-ს სამოქალაქო უსაფრთხოებისა და ჯანმრთელობის ადმინისტრაციამ (The Occupational Safety and Health Administration -OSHA) განსაზღვრა ტოლუოლის მისაღები დონე წარმოებებში. 100 ppm (part per million) განიხილება როგორც უსაფრთხო დოზა იქ მომუშავე ადამიანებისათვის. 150 ppm მისაღებია ხანმოკლე პერიოდისათვის (< 8სთ), 2000 ppm და მასზე მეტი საშიშია ჯანმრთელობისა და სიცოცხლისათვის. ტოლუოლის დამაზიანებელი ეფექტი დამოკიდებულია მის კონცენტრაციაზე, ინტოქსიკაციის ხანგრძლივობაზე. აშშ-ს გარემოს დაცვის დეპარტამენტის (Department of Environmental Protection) პროექტის – Breathing Easier Through Air Monitoring (BEAM) – ის, აშშ-ს გარემოს დაცვის სააგენტოს (Environmental Protection Agency-EPA) –ს, აშშ-ს სამოქალაქო უსაფრთხოებისა და ჯანმრთელობის ადმინისტრაციის (The Occupational Safety and Health Administration –OSHA)–სა და ტოქსიკური ნივთიერებებისა და დაავადებების რეგისტრაციის სააგენტოს (Agency of Toxic Substances and Disease Registration) 2001 წლის მონაცემების მიხედვით, ტოლუოლით

მწვავე ინტოქსიკაცია (< 14 დღე) პირველ რიგში ზეგავლენას ახდენს ცენტრალურ ნერვულ სისტემაზე (ცნს) და იწვევს სხვადასხვა პათოლოგიას – დეპრესიას, ჰალუცინაციებს, კრუნჩხვებსა და ნეიროპათიებს. აღამიანებს, რომლებიც 5 წლის მანძილზე იმყოფებოდნენ ტოლუოლის გავლენის ქვეშ მათი შრომითი საქმიანობის გამო, აღენიშნებოდათ შიზოფრენიული ფსიქოზი [48]. 31 წლის ქალს, რომელიც 14 წლის მანძილზე განიცდიდა დაბალი კონცენტრაციის ტოლუოლის ზეგავლენას, აღენიშნებოდა პროგრესული ატაქსია და ნევრასთენიული სიმპტომები [49]. ტოლუოლის სამრეწველო დოზა ზეგავლენას ახდენს აგრეთვე აცეტილქოლინისა და გაემ-ის ტრანსმისიაზე და მათ ინჰიბირებას იწვევს [50].

გარდა იმისა, რომ ტოლუოლი წარმოადგენს აღიარებულ პოლუტანტს, იგი ფართოდ მოიხმარება სხვა აქროლად ორგანულ გამსხნელებთან ერთად მენოსველი ტოქსიკომანების მიერ ნარკოლოგიური თრობის მისაღწევად. სტატისტიკური მონაცემების მიხედვით ამ ნივთიერებების არადანიშნულებით მოხმარებას განსაკუთრებით ფართო ხასიათი აქვს განვითარებად ქვეყნებში და მათ მთავარ მომხმარებლებს მოზარდები წარმოადგენენ [51]. ამის მთავარი მიზეზებია ტოლუოლის განსაკუთრებული ეფექტი ცენტრალურ ნერვულ სისტემაზე, რაც ინჰალაციისთანავე მიიღწევა და მისი შემცველობა სამომხმარებლო პროდუქციაში, რომლის მოპოვება ადვილია და იაფი. ტოქსიკომანების მიერ ტოლუოლის შესუნთქვის დროს მისი კონცენტრაცია აღწევს 10000 ppm-ს ან მეტს [52].

ქსენობიოტიკი ტოლუოლი (მეთილბენზინი, ფენილმეთანი) არის არომატული ნახშირწყალბადი, ($C_6H_5CH_3$, მოლეკულური მასა – 92,06; სიმკვრივე – 0,867გ/სმ³; ღლიობის ტემპერატურა – $-95^{\circ}C$; დუღილის – $111^{\circ}C$. წყალში არ იხსნება, სპირტში ძნელად იხსნება, ეთერში ხსნადია) რომელიც ოთახის ტემპერატურაზე უფერო, მოტკბო სუნის მქონე, აქროლადი სითხეა.



სურ. 9. ტოლუოლის მოლეკულის აგებულება

ადამიანებში ტოლუოლის ტოქსიკოკინეტიკის შესწავლას მრავალი კვლევა მიეძღვნა [53] და ამჟამად დადგენილია, რომ ორგანიზმში მოხვედრილი ტოლუოლის მეტაბოლიზმი ორ ფაზად მიმდინარეობს. ეს პროცესები ღვიძლის უჯრედების გლუვ ენდოპლაზმურ ბადეში ხდება. I ფაზის მთავარ რეაქციას ჰიდროქსილირება წარმოადგენს. ჰიდროქსილირებით ლიპოფილური ნაერთები უფრო პოლარულ, ჰიდროფილურ ნაერთებად გარდაიქმნებიან. ეს რეაქცია კატალიზდება ფერმენტთა ჯგუფით, რომლებსაც მონოოქსიგენაზებად ან P450 ციტოქრომებად მოიხსენიებენ. ტოლუოლის მეთილის ჯგუფის დაუანგვის შედეგად წარმოიქმნება ბენზონის მჟავა. ამ გარდაქმნის შუალედური პროდუქტებია ბენზილის სპირტი და ალდეჰიდი. გარდა

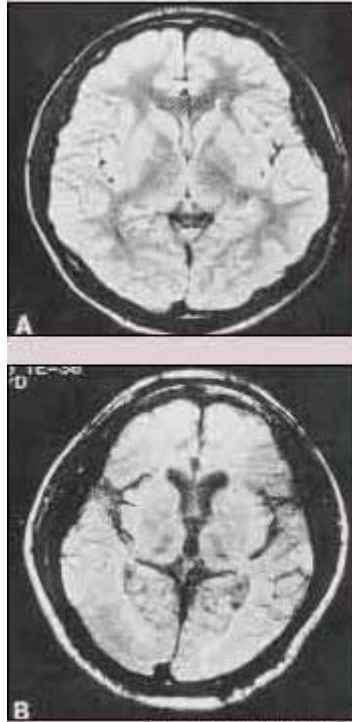
ამისა, ტოლუოლის დაჟანგვა შეიძლება მოხდეს არომატული ბოლოს მხრიდან კრეზოლების წარმოქმნით (მეთილოქსიბენზოლები, მეტილფენოლები – $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$).

მიღებული მეტაბოლიტები დეტოქსიკაციის II ეტაპზე განიცდის კონიუგაციას, რის შედეგადაც ისინი უფრო წყალში ხსნადი ხდება და ორგანიზმიდან ადვილად გამოიღვენება. ბენზონის მჟავის გლიცინთან კონიუგაციით წარმოიქმნება ჰიპურის მჟავა. მისი მცირე რაოდენობა შეიძლება შეუერთდეს გლუკურონის მჟავას და ორგანიზმიდან გამოიყოს ბენზოილგლუკურონის მჟავის სახით. მეტაბოლიზმის საბოლოო პროდუქტები ორგანიზმიდან გამოიყოფა ძირითადად თირკმელების საშუალებით. მცირე რაოდენობის სუფთა სახის ტოლუოლი გამოიყოფა ფილტვებით. დადგენილია, რომ ადამიანებს, რომლებიც წარმოებებში ტოლუოლის ზემოქმედების ქვეშ იმყოფებიან, შარდით გამოეყოფათ ძირითადად ჰიპურის მჟავა და კრეზოლები [54-55].

19. ტოლუოლის ზეგავლენა მემბრანული სტრუქტურების, ცილების, ცხიმებისა და ქრომატინის სტაბილურობაზე.

ლიტერატურაში არსებული მონაცემების მიხედვით ტოლუოლი ხასიათდება ლიპოფილური თვისებებით და აზიანებს უჯრედის მემბრანებს, ცვლის ცილების, ცხიმებისა და ქრომატინის სტაბილურობას. ასე მაგალითად, ტოქსიკომანებში მაგნიტურ-

რეზონანსური სპექტროსკოპიით ნაჩვენებია ბაზალურ განვლებში ქოლინ/კრეატინინი + ფოსფოკრეატინინის, როგორც მემბრანების მეტაბოლიზმის მარკერის მნიშვნელოვანი ზრდა, რაც მემბრანების დაზიანების მაჩვენებელია [56].



სურ. 10. ტოლუოლის გავლენა თავის ტვინიზე

სურ. 10-ზე ნაჩვენებია ჯანმრთელი ადამიანისა (A) და ტოლუოლის მომხმარებლის თავის ტვინი (B), რომლის მოცულობა შემცირებულია, ცარიელი (შავად შეფერილი) სივრცე კი მომატებული. (ტვინის ქსოვილის გარშემო გარეთა თეთრი წრე თავის ქალაა).

ვირთაგვების თავის ტვინში ტოლუოლის ზემოქმედების შედეგად აღინიშნება მემბრანების ლიპიდური შემადგენლობის ცვლილება [57], წინა ტვინში მემბრანული პროტეინების ფოსფორილირების ზრდა,

პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავების თანაფარდობის დარღვევა და ფოსფოლიპიდების მეთილაციის ინჰიბირება [58].

ტოქსიკომან მოზარდებში ოქსიდაციური დაზიანებისა და ლიპიდების პეროქსიდაციის მარკერების შესწავლამ გამოავლინა, რომ აქროლადი ნივთიერებების ქრონიკული ინჰალაცია ცვლის ანტიოქსიდანტი ენზიმების, მათ შორის სუპეროქსიდდისმუტაზისა და გლუტათიონპეროქსიდაზის რაოდენობას და ზრდის ლიპიდების პეროქსიდაციას მოზარდებში [59]. მიღებული შედეგების მიხედვით მენოსველებში ერთროციტალური სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობა და ერთროციტებში და პლაზმაში მალონდიალდეჰიდის დონე შესამჩნევად მაღალი იყო, ხოლო გლუტათიონპეროქსიდაზის აქტივობა შესამჩნევად დაბალი, ვიდრე საკონტროლო ჯგუფის ბავშვებში.

მკვლევარების მიერ შესწავლილი იქნა ტოლუოლით ინტოქსიკაციის პირობებში მემბრანების თვისებები ვირთაგვების თავის ტვინის ღეროს მედიალური ვესტიბულური ბირთვის ნეირონების მაგალითზე *in vitro* ანათლებზე. გამოვლინდა ტოლუოლის ზემოქმედების ინჰიბიტორული ეფექტი, რომელიც გამყარდა სინაფსური ტრანსმისიის ბლოკადის შემდეგ. დადგინდა, რომ ტოლუოლი იწვევს ჰიპერპოლარიზაციას, რომელიც ასოცირდება მემბრანების გამტარობის ზრდასთან. მიღებული შედეგები გვიჩვენებს, რომ ტოლუოლი ხელს უშლის უჯრედის მემბრანის სპეციფიური იონური არხებისა და რეცეპტორების რეგულაციას [60].

ვირთაგვების თავის ტვინის სინაპტოსომურ კომპლექსზე ტოლუოლის ზემოქმედება ზრდის მემბრანების გამტარობას და ინტრაცელულარული Ca^{2+} -ის დონეს. მიღებული ეფექტი ფერხდება განგლიოზიდ GM1-ით [61].

შესწავლილი იქნა ტოლუოლის ზემოქმედების ეფექტი ვირთაგვების თავის ტვინში სეროტონინსა (5-HT), $Na^+ - K^+$ ატფ-აზასა და ლიპიდების პეროქსიდაციაზე. 200 გრამიან ვირთაგვებში ინტრაპერიტონალურად შეყვანილი იქნა ტოლუოლი 35მგ/კგ-ზე. მიღებული შედეგების თანახმად საცდელ ცხოველებში მნიშვნელოვნად გაიზარდა (5-HT), $Na^+ - K^+$, ატფ-აზის შემცველობა და ლიპიდების პეროქსიდაცია. ამ მონაცემებზე დაყრდნობით მკვლევარები ასკვნიან, რომ ტოლუოლი იწვევს ლიპიდების პეროქსიდაციის ზრდას, რაც ხელს უწყობს მემბრანების გამტარობის მომატებას [62].

ცხოველური უჯრედების კულტურაში ტოლუოლის შეყვანა იწვევს ბირთვში ჰეტეროქრომატინის კონდენსაციას, რიბოსომების დაკარგვას და ორგანელების დეგრადაციას. აღნიშნული ცვლილებები შეუქცევადია და განაპირობებს უჯრედების სიკვდილს [63].

ტოლუოლით ინტოქსიკაციის შემდეგ წარმოქმნილი თავისუფალი რადიკალები ურთიერთქმედებს ცილებთან, ცხიმებთან, გლიკოპროტეინებთან, იწვევს დნმ-ის სპირალების გახლეჩვას [64] და მათ ოქსიდაციურ დაზიანებას [65].

ამრიგად, ზემოთმოყვანილი შედეგები ადასტურებს შეხედულებას, რომ ტოლუოლის ერთ-ერთ მთავარ სამიზნეს უჯრედების მემბრანულ

სტრუქტურებთან ერთად ცილებისა და ცხიმების სტრუქტურები წარმოადგენს.

ამის გამო ჩვენ მიზანშეწონილად ჩავთვალეთ თავის ტვინის იმ უბნების მიკროკალორიმეტრული შესწავლა, სადაც მეტად იქნებოდა გამოსატული ციტოტოქსიური ეფექტი.

II. თავი

კვლევის მასალები და მეთოდები

2.1. სისხლის ნიმუშების, ერითროციტებისა და ჰემოგლობინის მიღების მეთოდები

ამ ცდებისათვის გამოყენებული იყო ადამიანის ვენური სისხლი, რომელსაც არ ჰქონდა ან ჰქონდა დამატებული ანტიკოაგულიანტი, სისხლის კონსერვაციის სამედიცინი სტანდარტების შესაბამისად. ამ მიზნისათვის ვიყენებდით ნატრიუმის ციტრატს, ჰეპარინსა და EDTA-ს (ეთილენ-დიამინ-ტეტრააცეტილის მუავა).

ერითროციტების მისაღებად სისხლის აღებისას [66,67] ანტიკოაგულიანტები გამოიყენებოდა ან სტანდარტების შესაბამისად ანდა შედარებით მცირე რაოდენობით, რაც უზრუნველყოფდა შედეგების პროცესის მსოლოდ შენელებას. ერითროციტებს ვლექავდით სისხლის ცენტრიფუგირებით 30წთ-ის განმავლობაში 1000g -ზე NaCl-ის 0.9%-იან ხსნარში.

ოქსიჰემოგლობინის მისაღებად ერითროციტები ილექებოდა 12 000 გ-ზე. ლიზისი მიიღწეოდა ნიმუშზე დისტილირებული წყლის სამმაგი მოცულობის დამატებით. ამ მდგომარეობაში ვტოვებდით ერთი დღე-ღამის განმავლობაში და ვაკონტროლებდით მიკროსკოპით.

ერითროციტებს ვლექავდით ხსნარის მეათედი მოცულობის 1 მოლ Na-ფოსფატის ბუფერით (pH 7.0) და ვაცენტრიფუგირებდით 30წთ-ის

განმავლობაში 4 000 გ-ზე. შემდგომ ნიმუშს ვდგამდით დიალიზზე მისი სამმაგი მოცულობის 2.8 მოლ. K-ფოსფატის ბუფერში (pH 6.8) 6 საათის განმავლობაში. მის შემდეგ სადიალიზო ხსნარი განახლდებოდა იმავე მოცულობის ახალი ბუფერით და დიალიზი მიმდინარეობდა 12-24 სთ-ის განმავლობაში. მიღებულ ნიმუშს ჰქონდა სქელი კონსისტენცია. ყოველი ამ პროცედურის დროს ტემპერატურა $+4^{\circ}$ -ის ტოლი იყო. ამის შემდეგ ნიმუში მზადდებოდა ქრომატოგრაფის სვეტში ჩასასხმელად. მიღებულ მასას ვხსნიდით 0.05 მოლარობის Tris-ბუფერში (pH 7.9) და ვდგამდით დიალიზზე ამავე ბუფერში. გასუფთავებას ვაწარმოებდით კარბოქსილ-სეფადექსზე - C-50. ნიმუში სვეტიდან გამოდიოდა pH 7.8-ზე (მეორე ფრაქცია). სისუფთავის ხარისხს ვაკონტროლებდით ელექტროფორეზით პოლიაკრილამიდის გელში. გასუფთავების შემდეგ დიალიზის საშუალებით ცილის კონცენტრაცია დაგვეადა 7.5-9%-მდე [68].

ოქსიჰემოგლობინს ვინახავდით ღია ჭურჭელში $+4^{\circ}\text{C}$ -ზე. მეტ ფორმაში მისი გადაყვანა კი ხდებოდა მჭიდროდ დახურულ ჭურჭელში. ხსნარის კონცენტრაციას ვზრდიდით დიალიზით გამოკრისტალდებად.



სურ.11 ჰემოგლობინის კრისტალები მათი 20-ჯერ გადიდებისას

ხსნარების pH-ს ვცვლიდით დიალიზის საშუალებით ერთი დღე-ღამის განმავლობაში შესაბამისი ბუფერის 30-ჯერ მეტი მოცულობის დამატებით, რომელსაც ვცვლიდით ყოველ 8 საათში. გამოყენებული გქონდა Na-ფოსფატის ბუფერი, რომელსაც გააჩნია pH-ის ფართო დიაპაზონი (4.9-9.2).

ერთროციტების მისაღებად ვიყენებდით Na-ფოსფატის ბუფერს შესაბამისი მეთოდის მიხედვით [69]. 20 წთ-ის განმავლობაში 1 000გ-ზე დაცენტრიფუგირებულ ერთროციტებს ვაშორებდით დანარჩენ მასას და ვამატებდით ბუფერის ტოლ რაოდენობას. მათი ჰემოლიზი ხდებოდა ჰიპოტონური ბუფერის 14-ჯერ მეტი რაოდენობის დამატებით. მის შემდეგ მიმდინარეობდა ცენტრიფუგირება 20წთ-ის განმავლობაში 20 000 გ –ზე.

მუშაობისას Na-ფოსფატის ბუფერსა და NaCl-ის ხსნარს ვამზადებდით “ქიმიურად სუფთა” ნივთიერებების გამოყენებით, დანარჩენი პრეპარატები კი “Serva Chemicals”-ის ფირმის იყო.

2.2. დნმ-პორფირინის კომპლექსების მომზადება

ჩვენი ექსპერიმენტებისათვის საჭირო, ხბოს თიმუსიდან გამოყოფილი დნმ მოგვაწოდა პროფესორმა დ. ლანდომ (ბიოორგანული ქიმიის ინსტიტუტი, მინსკი), რომელიც მის ლაბორატორიაში იყო მიღებული. დნმ-ის მოლეკულური წონა იყო 1.9 კილოდალტონი,

ცილების შემცველობა ~0.5%, ჰიპერქრომული ეფექტი ~ 39%. დნმ გახსნილი იყო Na-ფოსფატის ბუფერში – pH 7.02, $[Na^+] = 10^{-2}M$. გაზომვები ჩატარებული იყო დსმ-ზე, მგრძობიარობით $10^{-7}W$. გასაზომი ამპულის მოცულობა – 0.30 სმ³, გახურების სიჩქარე – $0.55^{\circ}C/წთ$, გაზომვის ტემპერატურული დიაპაზონი – 25-140 $^{\circ}C$, სიზუსტით ~ 0.05 $^{\circ}C$ დნობის ენთალპიის (ΔH_{melt}) ცდომილება – არა უმეტეს 6% [70]. 0.5 გრ. დნმ-ის კონცენტრაცია იყო – 0.18%. 0.5 გრ. პორფირინი მეტალის გარეშე და თუთიის შემცველი პორფირინი გახსნილი იყო 0.1 მლ. Na-ფოსფატის ბუფერში (pH 7.02).

2.3. თეთრი ვირთაგვების თავის ტვინზე ტოლუოლით ზემოქმედება

უჯრედული სტრუქტურების სტაბილურობაზე ტოლუოლის გავლენის შესასწავლად ჩვენ გამოვიყენეთ თეთრი ვირთაგვების ჰიპოკამპისა და ყნოსვის ბოლქვების ქსოვილები. მასალა მოწოდებული იყო ი.ბერიტაშვილის სახელობის ფიზიოლოგიის ინსტიტუტის კვლევითი ლაბორატორიიდან. ექსპერიმენტისათვის გამოყენებული იქნა ცხოველების ორი ჯგუფი: ერთი და ორი თვის ვირთაგვები (I და II ჯგუფი). დეკაპიტაციამდე ცხოველები იმყოფებოდნენ დესიკატორში 40 დღის განმავლობაში, სადაც მათ ასუნთქებდნენ ტოლუოლს დღეში 3-4 წთ-ის განმავლობაში, ტოლუოლის კონცენტრაცია 600 ppm-ის ტოლი

იყო. ტოლუოლით ზემოქმედების შემდეგ ცხოველებს უტარებდნენ დეკაპიტაციას და ახდენდნენ ჰიპოკამპისა და ყნოსვის ბოლქვების ექსტრაქციას.

ჩვენი ექსპერიმენტი მდგომარეობდა ტვინის ზემოაღნიშნული ნაწილების ქსოვილების მიკროკალორიმეტრულ შესწავლაში. გაზომვები ჩატარდა დიფერენციული სკანირებადი მიკროკალორიმეტრული (დსმ) მეთოდით [71]. სამუშაო პარამეტრები იყო: კალორიმეტრის მგრძობიარობა – $0.42 \mu\text{W}$; ტემპერატურული ინტერვალი – $5\text{-}150^{\circ}\text{C}$; გამზომი ამპულის მოცულობა – 0.3მლ ; სითბოტევადობის ცვლილებების მიხედვით კალორიმეტრის გარჩევადობის უნარი (ბაზისური ხაზიდან მინიმალური გადახრა) იყო $10^{-5} \text{ჯ}^{\circ}\text{C}$; აბსოლუტური ტემპერატურის გაზომვის სიზუსტე იყო არანაკლებ 0.05°C . ქსოვილებში ნუკლეინის მჟავების შემცველობა განსაზღვრული იყო [72] მეთოდით და ბიოპოლიმერების რაოდენობა გადათვლილი მშრალ წონაზე გამოთვლილი იყო [73] მეთოდით.

სითბური პარამეტრები – დენატურაციის სითბოს შთანთქმის სიდიდე (Q_d), დენატურაციის პიკის მაქსიმუმი (T_m), პიკის ნახევარსიმაღლეზე სიგანე (ΔT_m) გამოვთვალეთ ჩვენს განყოფილებაში შემუშავებული პროგრამით, ხოლო მრუდების დეკონვოლუცია – Origin 6.0 - პროგრამული პაკეტის საშუალებით. ჰიპოკამპისა და ყნოსვის ბოლქვების Q_d -ს ცდომილება არ აღემატებოდა 10%-ს. T_m განისაზღვრებოდა $\pm 1^{\circ}\text{C}$ და $\Delta T_m \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ცდომილებით.

2.4. დიფერენციული სკანირებადი მიკროკალორიმეტრი ბიომაკრომოლეკულების დენატურაციის პარამეტრების განსახილვერად

ცილების და ნუკლეინის მუკვების შიდამოლეკულური დნობის პროცესის თერმოდინამიკური სიდიდეების ექსპერიმენტული განსახილვერის ამოცანა, გადაწყვეტილ იქნა 1964-1970 წლებში საქ. მეც. აკადემიის ფიზიკის ინსტიტუტში შექმნილი ახალი სკანირებადი მიკროკალორიმეტრის საშუალებით, რომლის მგრძობიარობა 3 რიგით აღემატებოდა სხვა იმ დროს არსებული დანადგარების მგრძობიარობას [74]. აღნიშნული მეთოდის ბაზაზე შემდგომში შეიქმნა მთელი რიგი მსგავსი დანადგარებისა [75], რომლებიც წარმატებით გამოიყენება მოლეკულური ბიოფიზიკის სფეროში [76-82]. უკანასკნელ წლებში მიკროკალორიმეტრიის მეთოდი დახვეწილ იქნა [83] ჯ. მონასელიძისა და ნ. ბაქრაძის მიერ, რამაც შესაძლებელი გახდა ბიოპოლიმერების, როგორც განზავებული და კონცენტრირებული ხსნარების, ასევე რთული ბიოლოგიური სისტემების სითბური თვისებების განსახილვერა ფართო ტემპერატურულ ინტერვალში.

წარმოდგენილი მოდელი, ადრეული მოდელისაგან განსხვავებით, საშუალებას გვაძლევს კალორიმეტრში ნიმუშის ჩატვირთვა მოვახდინოთ სპეციალური გარე არხებით (თხელკედლიანი უჟანგავი ფოლადის მილები), რაც ადრეული მოდელისაგან განსხვავებით

გაცილებით აადვილებს მკვლევარის კალორიმეტრთან მუშაობას (ჟ. მონასელიძე, ნ. ბაქრაძე 1971, 1973. გ. მაჯაგალაძე, ჟ. მონასელიძე 1986).

საკვლევი ნიმუშისა და ეტალონის უწყვეტი და თანაბარი გახურებისას ხორციელდება ორ იდენტურ კონტეინერს შორის წარმოქმნილი თერმო ე.მ.ძ.-ის რეგისტრაცია. იგი ტემპერატურული სხვაობის პროპორციულია, ხოლო ეს უკანასკნელი კი პროპორციულია ნიმუშის სითბოტევადობის ცვლილებისა. ამჟღავნებს შორის სითბური უკუკავშირი ხორციელდება კონტეინერებს შორის გაწებებული დიფერენციულ თერმობატარეაში გამავალი სითბური ნაკადით.

შთანთქმული (გამოყოფილი) სითბოს რაოდენობის განსაზღვრისათვის, ხდება ხელსაწყოთა დაკალიბრება. თუ ერთ-ერთ კონტეინერს მივაწოდებთ ეტალონურ ენერგიას, მაშინ მათ შორის წარმოიქმნება ტემპერატურული სხვაობა. წარმოქმნილი ტემპერატურული სხვაობა განაგრძობს მატებას იქამდე, ვიდრე თერმობატარეაში გამავალი სითბური ნაკადი არ დააკომპენსირებს კონტეინერების გახურების სიჩქარეების სხვაობას. ამის გამო, კონტეინერებს შორის მყარდება ახალი მუდმივი ტემპერატურული სხვაობა, რომელიც პირდაპირ პროპორციულია გადაცემული ენერგიისა $\Delta T \sim \Delta W$, რომელიც განსაზღვრავს თვითმწერის კალმის გადახრას h ბაზისური ხაზიდან. ΔW ითვლება შემდეგნაირად:

$$\Delta W = U^2 R_a \left[\frac{1}{(R_a + R_g)^2} - \frac{1}{(R_a + R_g + \Delta R)^2} \right] \quad [36]$$

სადაც: U – დენის წყაროს ძაბვა.

R_a – ამპულის გამახურებლის წინაღობა.

R_g – გარე ცვლადი წინაღობა, რომლის მნიშვნელობა განსაზღვრავს სკანირების სიჩქარეს (იგი ჩართულია მიმდევრობით ამპულის წრედში).

ΔR – კალიბრებისას გარე წრედის წინაღობის ცვლილება.

თუ ვიცით ΔW , h და თვითმწერის დიაგრამის მოძრაობის სიჩქარე, შეიძლება გამოვთვალოთ ფართობის ერთეულზე მოსული სითბოს რაოდენობა ფორმულით:

$$q = \frac{\Delta W}{h} \frac{\Delta t}{\Delta l} \quad (\text{ჯ/მმ}^2)$$

დიფერენციულ მრუდზე ტემპერატურული ნიშნულების დასმის შემდეგ საშუალება გვქვია (ΔT ; t) კოორდინატებიდან გადავიდეთ (ΔT ; T) კოორდინატებში. $(\frac{dQ}{dT}, T)$ კოორდინატებში გადასასვლელად

აუცილებელი პირობაა $dT/dt = \text{const}$ და მივიღებთ: $\frac{dQ}{dT} = \frac{1}{dT/dt} \frac{dQ}{dt}$. ამის

შემდეგ უკვე მარტივია დენატურაციის კუთრი სითბოს განსაზღვრა ფორმულით: $Q = qS/M$, სადაც Q – სითბოს რაოდენობაა, რომელიც მოდის S ფართობზე (სითბოს შთანთქმის მრუდითა და ბაზისური საზით შემოსაზღვრული), M – საკვლევი ნიმუშის მასა.

გარემოსთან სითბოცვლის გამოსარიცხად, დიფერენციული კონტეინერები გარშემორტყმულია ადიაბატური ეკრანების სისტემით, რომელიც შედგება ინერტული და რეგულირებადი ეკრანებისაგან. კალორიმეტრულ კონტეინერებში ჩარჩილულია თხელკედლიანი, უჟანგავი ფოლადის მილები, რომლებიც განკუთვნილია გამზომი და ეტალონური ამპულის ჩასატვირთად. კალორიმეტრული ამპულები მოთავსებულია ინერტულ სითბურ ეკრანში, რომელიც განკუთვნილია რეგულირებადი ეკრანისაგან წარმოქმნილი სითბური ველის გრადიენტის შესამცირებლად. გარემოს გავლენა ეკრანზე გამოირიცხება რეგულირებად ეკრანებს შორის მუდმივი და მცირე ტემპერატურული გრადიენტის შენარჩუნებით გაზომვის მთელ ტემპერატურულ ინტერვალში. კალორიმეტრი მოთავსებულია სპეციალურ სქელკედლიან სითბოგაუმტარ ცილინდრში, იგი ემსახურება ექსპერიმენტის დროს კალორიმეტრზე გარემოს მიერ სითბური შეშფოთებების შემცირებას. სისტემის მაღალი ადიაბატურობა მიღწეულია სითბური ეკრანების ტემპერატურის ზუსტი რეგულირებით. ორ ეკრანს შორის ტემპერატურული სხვაობის გასაზომად გამოიყენება მანგანინ-კონსტანტანის თერმოპატარეა, რომელიც მიერთებულია მაღალმგრძნობიარე ხელსაწყოსთან (მიკროვოლტმეტრთან F-136). ტემპერატურის რეგულაცია წარმოებს ელექტრული ავტომატური სისტემით, რომელიც ინარჩუნებს ეკრანებს შორის ტემპერატურულ სხვაობას 5×10^{-4} სიზუსტით ტემპერატურის მთელ ინტერვალში. მე-12 სურათზე მოყვანილია ეკრანის ტემპერატურის რეგულაციის ბლოკ-

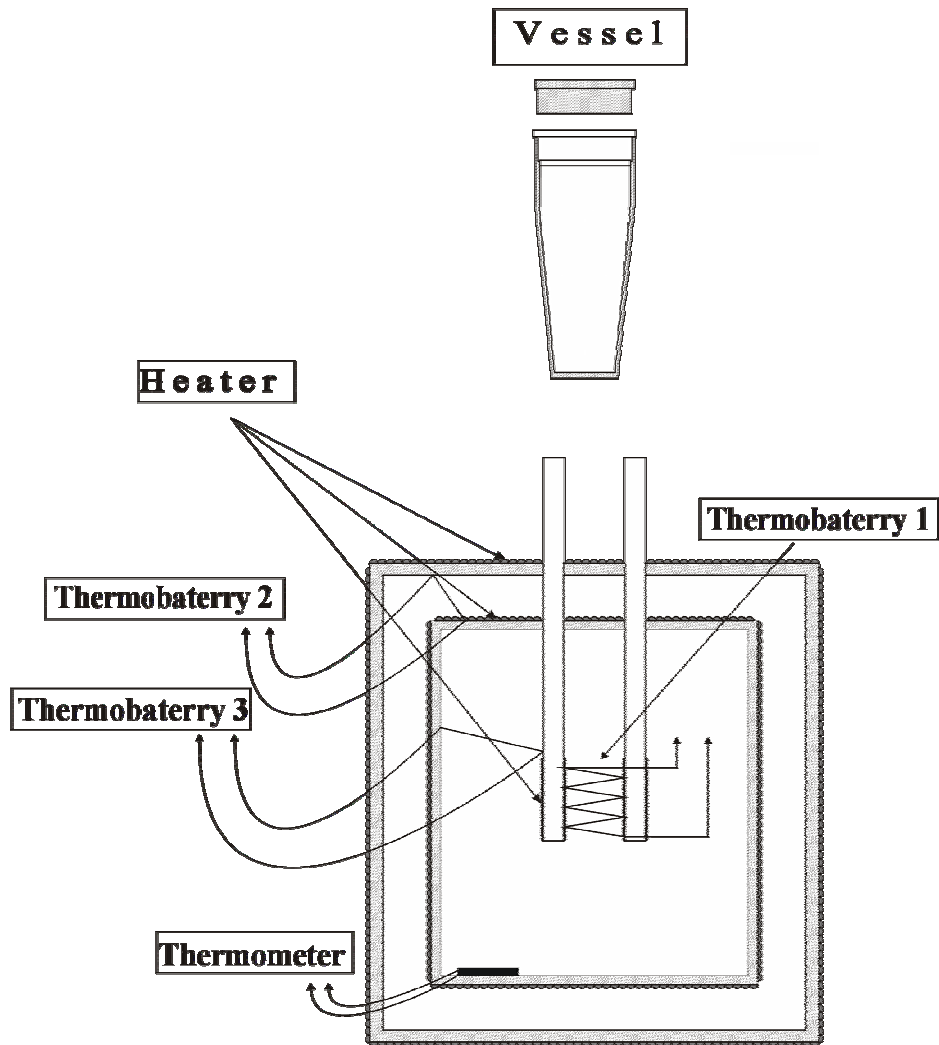
სქემა. ეკრანსა და ამპულებს შორის ტემპერატურული სხვაობის წარმოქმნისას თერმობატარიის ბოლოებზე აღიძვრება სიგნალი, რომელიც ძლიერდება ელექტრონული (F-136) გამაძლიერებლით და მიეწოდება პროპორციულ ინტეგრალურ რეგულატორს. ხოლო რეგულატორი მიაწვდის გამახურებელს სიგნალის პროპორციულ დენს.

მიკროკალორიმეტრის მთავარი ბლოკი, კონტეინერი წარმოადგენს ორ ღრუ სპილენძის ცილინდრს, რომელთა შორის გაწებებულია ქრომელ-კონსტანტანის თერმობატარეა (100 წყვ.) ცილინდრების სიღრუეს აქვს წაკვეთილი კონუსის ფორმა, იგი აუმჯობესებს ცილინდრსა და მასში მოთავსებულ ამპულას შორის სითბურ კონტაქტს. ცილინდრზე გარედან დახვეულია გამახურებელი რომლის წინააღობაა 760 ომი.

კონტეინერები ერთმანეთთან დაშორებულია 8მმ-ით. კონტეინერში ჩარჩილული უჟანგავი ფოლადის მილები (რომლებიც განკუთვნილია ამპულების ჩასატვირთად). ეს მილები გამოდიან გარეთ სითბური ეკრანების გავლით. მილები თავის მხრივ მირჩილულია ეკრანებთან, რათა შემცირდეს ტემპერატურული გრადიენტი მილების გასწვრივ, კონტეინერების მუდმივი სიჩქარით გახურებისას. უჟანგავი მილებიდან კონტეინერში იტვირთება საზომი ამპულები, რომლებიც დამზადებულია ტიტანისაგან და აქვთ წაკვეთილი კონუსის ფორმა, დიამეტრი-7.8 მმ. მოცულობა 0.3 სმ³ (სურ. 12).

გამზომი ბლოკი მიერთებულია PC კომპიუტერთან (Pentium 3). რეგისტრაციის მაქსიმალური სიჩქარე შეადგენს 4 წერტ. წმ.-ში,

გაზომვები ტარდებოდა წაკითხვის სიჩქარით - 2 წერტ.წმ-ში, სკანირების სიჩქარე შეგვიძლია ვცვალოთ 0.003 – 2⁰C/წთ-ში შუალედში. გაზომვის ტემპერატურული ინტერვალი – 0 – 150⁰C-ია. ბაზისური ხაზიდან მინიმალური გადახრა სკანირების რეჟიმში 5 – 150⁰C ინტერვალში არა უმეტეს 10⁻⁵ ჯ/K. მრუდის პიველადი დამუშავება (ბაზისური ხაზის აპროქსიმაცია, მრუდის კალიბრება და ნორმირება) წარმოებს სპეციალურად შედგენილი პროგრამის საშუალებით, ხოლო დამუშავება (რთული მრუდის შემადგენელ კომპონენტებად დაყოფა, ცალკეული მაქსიმუმების გამოყოფა, მრუდის ინტეგრირება და გრაფიკის აგება) წარმოებს Origin 6.0 პროგრამის პაკეტის საშუალებით.



სურ. 12. დიფერენციული სკანირებადი მიკროკალორიმეტრის ბლოკ-სქემა.

III. თავი

მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

3.1. ჰემოგლობინის სითბური დენატურაციის პარამეტრების დადგენის მნიშვნელობა ადამიანის სისხლისა და ერთოროციტების მიკროკალორიმეტრული შესწავლისას

სისხლის (ერთოროციტების, ჰემოგლობინის ხსნარის) გახურებისას მიღებულ მრუდებზე პირობითად შეგვიძლია მოვნიშნოთ სამი ტემპერატურული უბანი. პირველ უბანში ($40-55^{\circ}\text{C}$) მიმდინარეობს სისხლში არსებული ლიპიდებისა და უჯრედის მემბრანების სითბური დაშლა. მეორე – ($55-80^{\circ}\text{C}$) სისხლის გლობულარული ცილების მიერ სითბოს შთანთქმის ძირითადი უბანია. მესამე უბანი ($70-90^{\circ}\text{C}$) ასახავს სისხლის ბირთვიანი უჯრედების ქრომატინული კომპლექსის სითბურ დენატურაციას და ჰემოგლობინის სითბოს შთანთქმის მაღალტემპერატურულ მონაკვეთს.

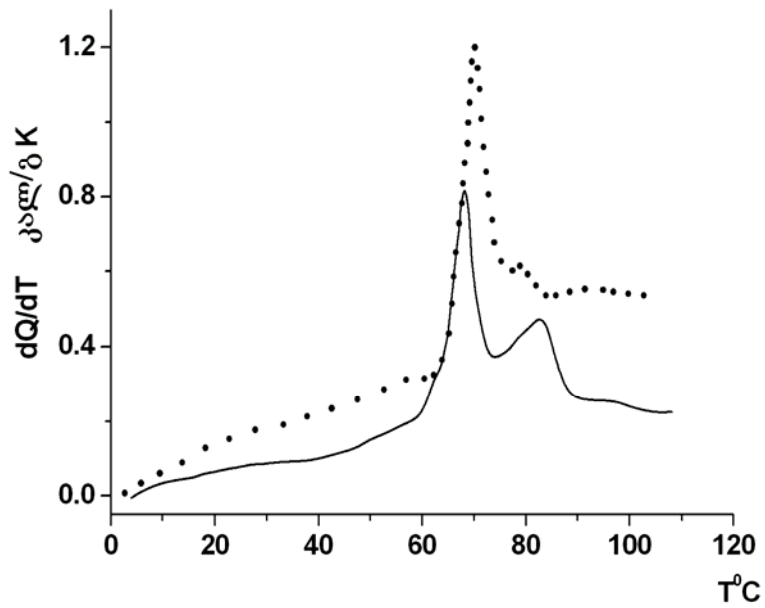
კალორიმეტრში მთლიანი სისხლის ნიმუშების გახურებისას, სითბოს შთანთქმის სრულ სურათში (ამ სამი უბნიდან თითოეულში) ჰემოგლობინის სითბოს შთანთქმის წილი ბევრად აღემატება ყველა სხვა კომპონენტის წილს. ამ წილის მიხედვით მეორე ადგილზეა პლაზმის გლობულინები, რაც გამოისახება ჰემოგლობინის ძირითად პიკზე არსებული მხრით 61°C –ზე (სურ.13,14).

იმის დასადგენად, რომ კალორიმეტრულ ჩანაწერებში ჰემოგლობინის სითბოს შთანთქმის წილი ჭარბობს სხვა კომპონენტების

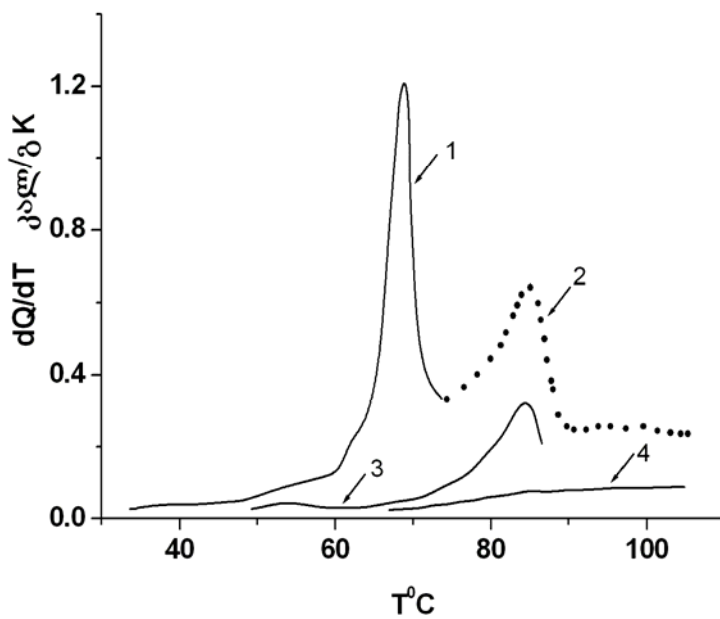
წილს, ჩავატარეთ ექსპერიმენტების სერია, რომლის დროსაც ხდებოდა სისხლის ნიმუშის მეორადი გახურება (სურ.14). კალორიმეტრში გახურების შემდეგ ნიმუშებს ვაცივებდით 5 სთ-ის განმავლობაში 15°C-მდე და ვტოვებდით ასეთ მდგომარეობაში 24 სთ-ის განმავლობაში. შემდგომი გახურების შედეგად ამ სამი ტემპერატურული უბნიდან არც ერთში არ ჩანდა შესამჩნევი სითბური ეფექტი. პირველ ტემპერატურულ უბანში შეიმჩნეოდა სუსტი ეფექტი, რომელიც დაკავშირებული უნდა იყოს სისხლის გლობულარული ცილების უმნიშვნელო აღდგენასთან. ის ფაქტი, რომ რენატურაცია არ ხდებოდა, გამოწვეულია სისხლის ცილოვანი შემადგენლობის აგრეგაციული ეფექტებით, რაც თავის მხრივ მეტყველებს კალორიმეტრული ჩანაწერების “ცილოვან ბუნებაზე”.

კალორიმეტრულ ჩანაწერებში ჰემოგლობინის თერმული წვლილის მნიშვნელოვანი მახასიათებელი განპირობებულია სისხლის სხვა კომპონენტებზე ერთროციტების რაოდენობრივი დომინირებით (დაახლოებით ორჯერ). გავითვალისწინეთ აგრეთვე ადამიანის ერთროციტების აგებულების თავისებურება: ისინი წარმოადგენენ უჯრედებს, რომლებშიც ჰემოგლობინის რაოდენობა დაახლოებით 33-36%-ია. ამრიგად ჩვენთვის საინტერესო იყო, თუ როგორ შეიცვლებოდა გახურებისას ერთროციტების მემბრანების დაშლის შედეგად მთლიანი სისხლის სითბოს შთანთქმის სურათი.

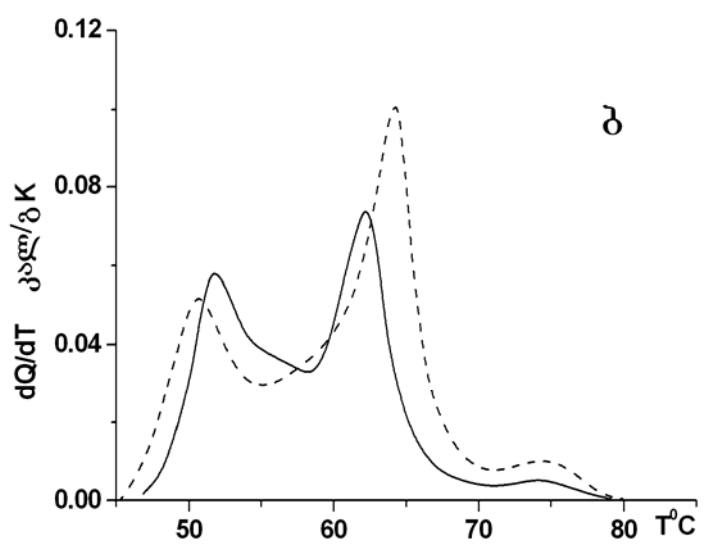
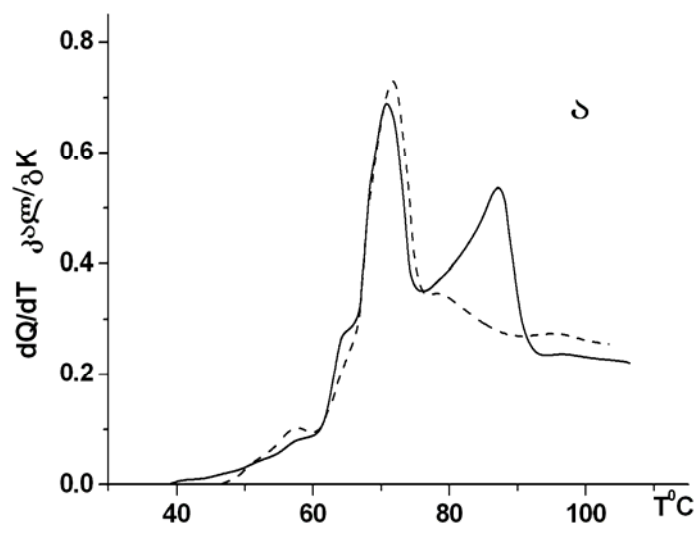
სურ. 15 (ა, ბ) -ზე მოცემულია მთლიანი სისხლისა და მისგან გამოყოფილი ერთროციტების სითბური თვისებების მიკროკალორიმეტრული გამოკვლევების შედეგები. მთლიანი სისხლის



სურ. 13. მთლიანი სისხლისა (უწყვეტი ხაზი) და ამ სისხლიდან მიღებული ერთოროციტების სუსპენზიის (წყვეტილი ხაზი) სითბოს შთანთქმის მრუდები.



სურ. 14. ადამიანის სისხლის სითბოს შთანთქმის მრუდი. ნიმუში გახურებული იყო 71°C-მდე (1), ხელმეორედ გახურებული 83°C-მდე (3) და 100°C -მდე (4). (2) – სისხლის იგივე ნიმუში უწყვეტი გახურებით.



სურ. 15. სითბოს შთანთქმის მრუდები ჯანმრთელი დონორის კენური სისხლის (ა) და ერითროციტების მემბრანების [უწყვეტი ხაზი – (ბ)] და ერითრემიით დაავადებული პაციენტისა (წყვეტილი ხაზი)

სურათში (სურ. 15, ა) მემბრანული კომპონენტების წვლილის დადგენა შესაძლებელი გახდებოდა განსხვავებული თვისებების მქონე ნიშნების შესწავლის საშუალებით. ამ მიზნით, ნორმასთან ერთად, გამოვიკვლიეთ დაავადებული სისხლი. პათოლოგია დაკავშირებული იყო ძვლის ტვინში ერითროციტების ჭარბი რაოდენობით გამომუშავებასთან – ერითრემია. სურათიდან ჩანს, რომ განსხვავება ნორმასა და პათოლოგიას შორის შეინიშნება, როგორც სისხლის, ასევე მემბრანების (სურ.15, ბ) დონეზე. ყურადღება უნდა მივაქციოთ იმ გარემოებას, რომ სისხლის გაზომვისას მემბრანების ტემპერატურულ უბანში მიღებული სითბური ეფექტი, აღემატება მემბრანების დაშლისას აღრიცხულ სითბოს რაოდენობას. თუ ამავე დროს მხედველობაში მივიღებთ იმ ფაქტს, რომ სურ.15,ა-ზე მიღებული მონაცემები გადათვლილია მთლიანი სისხლის მშრალ წონაზე, ხოლო 15,ბ-ზე – მხოლოდ მემბრანების მასაზე, დაერწმუნდებით, რომ მემბრანული კომპონენტების წვლილი მთლიანი სისხლის სითბური შთანთქმის ფონზე შეიძლება მხედველობაში არ იქნას მიღებული.

რაოდენობრივი ანალიზი, რომელიც გაკეთდა ექსპერიმენტების მონაცემების ბაზაზე და აგრეთვე სისხლის შემადგენლობიდან გამომდინარე, საშუალებას გვაძლევს დავასკვნათ, რომ სისხლის გახურებისას აღრიცხული სითბური ეფექტის 85% შეიცავს ინფორმაციას ჰემოგლობინის კონფორმაციულ მდგომარეობაზე მის ბუნებრივ გარემოში. აქედან გამომდინარე, ვთვლით, რომ ერითროციტების სითბური თვისებების შესწავლას არ აქვს პირველადი

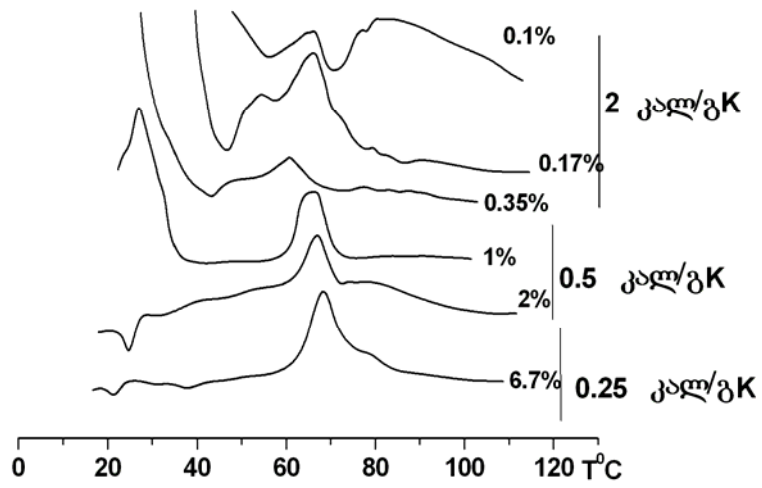
მნიშვნელობა და აქცენტს ვაკეთებთ ჰემოგლობინის შესწავლაზე სისხლსა და ხსნარებში.

3.1.1. ჰემოგლობინის ხსნარების თერმული თვისებების შესწავლა

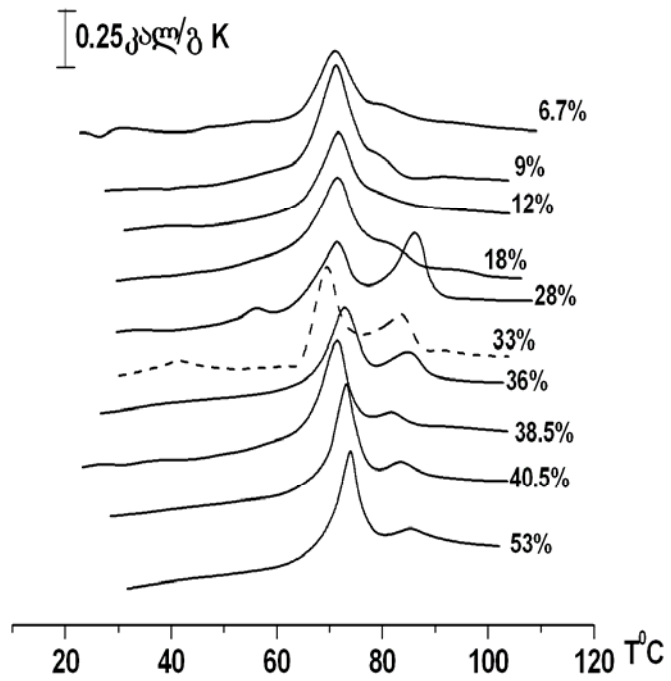
ა. ჰემოგლობინის თერმული თვისებების დამოკიდებულება მის კონცენტრაციასა და ბუფერის იონური ძალაზე

როგორც ცნობილია, ხსნარში ჰემოგლობინის დაბალი კონცენტრაციისას ცილის ტეტრამერი იშლება. ცალკეული სუბერთეულები ვერ ინარჩუნებენ მესამეულ სტრუქტურას. ამასთან დაკავშირებით საინტერესო იყო ცილის სხვადასხვა კონცენტრაციის ხსნარების მიკროკალორიმეტრული შესწავლა.

მე-16 და მე-17 სურათებზე ნაჩვენებია ოქსიჰემოგლობინის ერთი და იმავე ნიმუშის განსხვავებული კონცენტრაციის (საწყისი კონცენტრაცია იყო 6.7% 0.1 მოლ. Na-ფოსფატის ბუფერში, pH 6.8) ხსნარების სითბოს შთანთქმის მრუდები. კონცენტრირებას ვახდენდით სქელი მასის წარმოქმნამდე, რომელშიც გამოიკვეთებოდა კრისტალების ჩანასახები (40.5%) და სრულყოფილი კრისტალები (53%). წყვეტილი ხაზით ნაჩვენებია სითბოს შთანთქმა ნატიური სისხლისა, რომელსაც დამატებული აქვს ანტიკოაგულანტი (EDTA), გადათვლილი ჰემოგლობინის მასაზე (კონცენტრაცია ერთროციტებში – 33%).

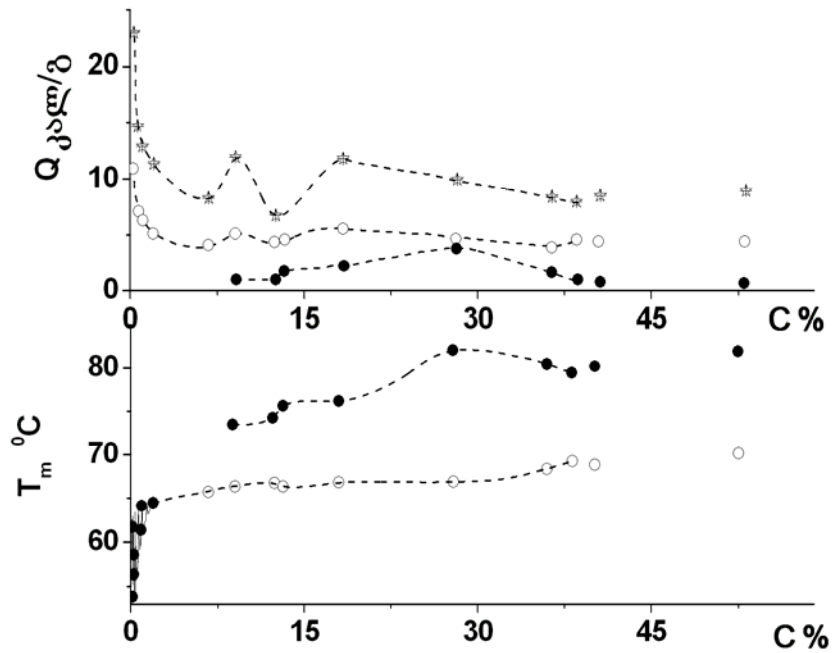


სურ. 16 (განხილულია ტექსტში)



სურ. 17 (განხილულია ტექსტში)

სურ.18-ზე მოცემულია სრული სითბოს შთანთქმის (★) დამოკიდებულება ცილის კონცენტრაციაზე, და ძირითადი (O) და მაღალტემპერატურული (●) პიკების შესაბამისი სითბოს შთანთქმა და ტემპერატურული მაქსიმუმები (T_m).

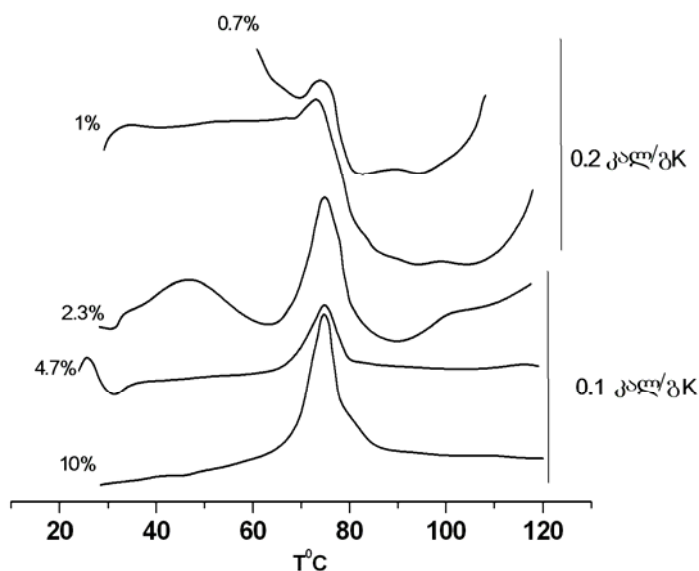


სურ. 18 ოქსიჰემოგლობინის სითბოს შთანთქმის პარამეტრების დამოკიდებულება ხსნარებში მის კონცენტრაციაზე: ★ – სრული სითბოს შთანთქმა, O – სითბოს შთანთქმის ძირითადი პიკის მახასიათებლები, ● - სითბოს შთანთქმის მაღალტემპერატურული პიკის მახასიათებლები.

ამ გამოკვლევების საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ HbO_2 –ის კონცენტრაციის შემცირება 5%-ზე ქვემოთ იწვევს სითბოს შთანთქმის ძირითადი პიკის ტემპერატურული მაქსიმუმის (T_m) შემცირებას და გახურებისას წარმოქმნილი თერმული ეფექტების მომატებას. მცირდება აგრეთვე დენატურირებულ მდგომარეობაში

გადასვლის კოოპერატიულობა. კონცენტრაციის შემდგომი შემცირება (0.5%-ზე ქვემოთ) იწვევს კალორიმეტრული მრუდების შესამჩნევ ცვლილებებს და “დაშლას” სითბოს შთანთქმის მრუდის ძირითადი პიკისა, რომელიც სითბური ეფექტების ფონზე სულ უფრო გაურკვეველი ხდება. ექსპერიმენტების მრავალჯერადი განმეორებისას გამოიკვეთა კალორიმეტრული ჩანაწერების ზოგადი სურათი და არა მისი კერძო შემთხვევები, რაც მეტყველებს გახურებით გამოწვეული პროცესების რთულ სტატისტიკურ ხასიათზე. სავარაუდოდ, ეს დაკავშირებული უნდა იყოს გახურებისას ცილის სტრუქტურის დესტაბილიზაციასთან, მასზე წყლისა და აგრეგაციული ფაქტორების ზეგავლენასთან, რომელიც იზრდება ჰემოგლობინის ჯაჭვების მაღალი ჰიდროფობურობის ფონზე. აგრეთვე უნდა აღვნიშნოთ, რომ HbO_2 -ის ხსნარების pH-ის იზოწერტილიდან ± 0.5 ერთეულით გადახრა ზრდის ტეტრამერის მედეგობას განზავებისადმი. მასზე მასტაბილიზირებელი მოქმედება აქვს აგრეთვე იონური ძალის მომატებას, რასაც ნათლად დავინახავთ სურ.16-ის და სურ.19-ის შედარებისას. HbO_2 -ის კონცენტრაციის გაზრდა 10%-დან 38%-მდე და კრისტალურ მდგომარეობამდე (42%) არ იწვევს სითბოს შთანთქმის მრუდების მნიშვნელოვან ცვლილებებს (სურ.17). აქ შეიძლება მხოლოდ აღვნიშნოთ სითბოს შთანთქმის მცირედი მომატება 80°C -ზე კონცენტრაციის 28%-მდე მომატებისას, რომელიც კონცენტრაციის შემდგომი მომატებისას იკლებს, მაგრამ იგივე რჩება კრისტალური მდგომარეობისათვის. ის ფაქტი, რომ ცილის კონცენტრირებული ხსნარებისა და კრისტალების სითბოს შთანთქმის

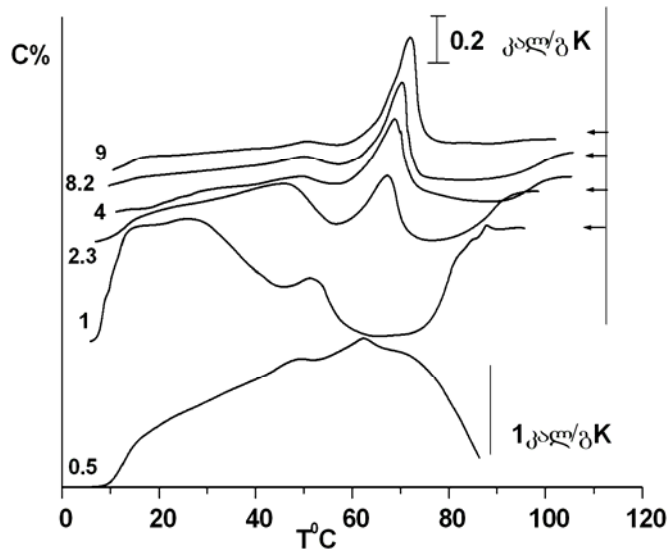
მრუდები მნიშვნელოვნად არ განსხვავდება ერთმანეთისაგან, მიუთითებს იმაზე, რომ ცილის აგრეგაცია გახურებისას შემთხვევით ხასიათს კი არ ატარებს, არამედ კრისტალების წარმოქმნის პროცესის მსგავსად მიმდინარეობს.



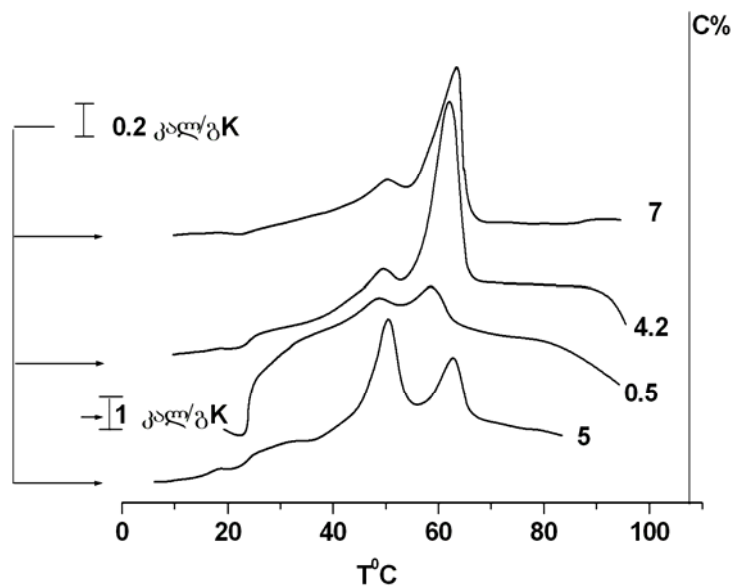
სურ. 19. ჰემოგლობინის განსხვავებული კონცენტრაციის ხსნარების სითბოს შთანთქმა (0.01 მოლ. Na-ფოსფატის ბუფერი, pH 6.8)

იგივე მოვლენები შეინიშნება მეტ-ჰემოგლობინის ხსნარების შემთხვევაშიც, იმ განსხვავებით, რომ ტეტრამერის დესტაბილიზაციასთან დაკავშირებული ცვილებები (წინა ექსპერიმენტის პირობების დაცვით) აღინიშნება უფრო მაღალ კონცენტრაციაზე, რაც მიუთითებს ამ ფორმის ცილის განზავებისადმი შედარებით მაღალ მგრძობიარობაზე (სურ.20, 21) (pI მეტ-Hb=6.8). საინტერესოა იონური ძალის გაზრდით გამოწვეული მეტ-ჰემოგლობინის ტეტრამერის სტრუქტურის სტაბილიზაციისას (სურ.21) სითბოს შთანთქმის ძირითადი

პიკის ზრდა და მაღალტემპერატურული პიკის შემცირება. (როგორც წესი ცილის მეტ-ფორმაში გადასვლა შეუქცევადი პროცესია).



სურ. 20 მეტ-Hb-ის ხსნარების სითბოს შთანთქმა. (0.01 მოლ. Na-ფოსფატის ბუფერი, pH 7.0)



სურ. 21 მეტ-Hb-ის ხსნარების სითბოს შთანთქმა. (0.1 მოლ. Na-ფოსფატის ბუფერი, pH 7.0; 1 მოლ. Na-ფოსფატის ბუფერი, pH 7.0, სურათზე 5%-იანი განზავება)

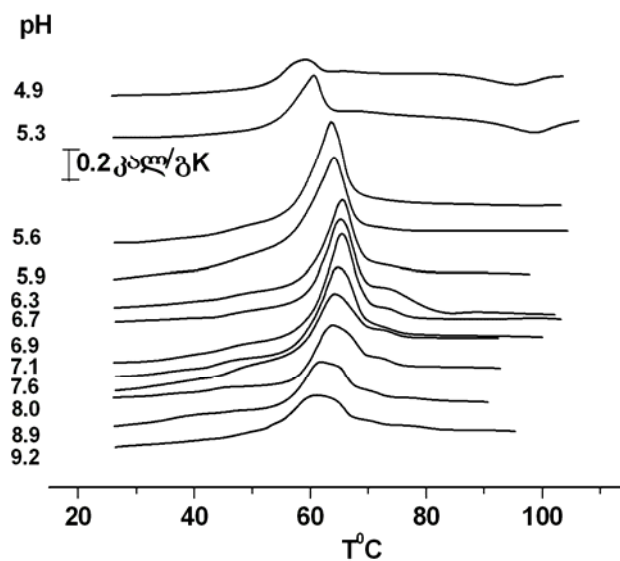
როგორც გამოკვლევებმა გვიჩვენა, ტეტრამერის კონფორმაციაზე ხსნარების იონური ძალის გაზრდით გამოწვეული ცვლილებები ძლიერ უმნიშვნელოა და დაიყვანება მაღალი იონური ძალების გავლენით გამოწვეულ ცილის ჩვეულ სტაბილიზაციამდე. ზემოთ აღნიშნული მეტ-ჰემოგლობინის სითბოს შთანთქმის ზრდა ძირითადი მაქსიმუმის ზონაში – ერთადერთი “ანომალიაა” და განპირობებულია ხსნარის pH-ის იზოწერტილთან მიახლოებით.

ბ. ჰემოგლობინის თერმული თვისებების დამოკიდებულება

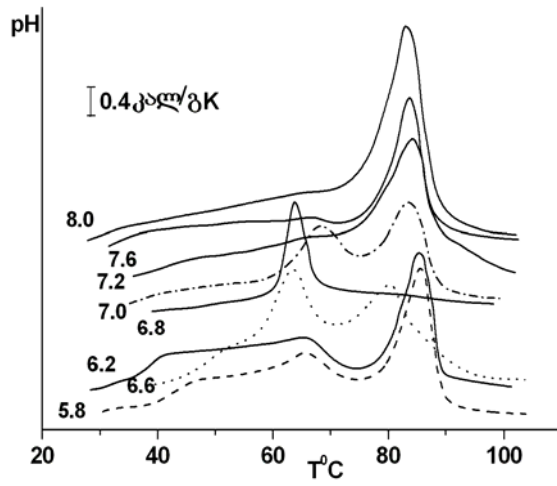
ხსნარების pH-ზე

როგორც ცნობილია, ცილის სტრუქტურა საკმაოდ მგრძობიარეა pH-ის ცვლილებისადმი. ექსპერიმენტების თანაბარ პირობებში ჩატარების მიზნით ვიყენებდით მხოლოდ Na-ფოსფატის ბუფერს, რომელიც აგრეთვე საშუალებას იძლევა ვცვალოთ pH-ის მნიშვნელობა 4.9-დან – 9.1-მდე. Hb-ის საწყისი ნიმუშები ინახებოდა ნეიტრალურ pH-ის ხსნარებში და უშუალოდ კალორიმეტრული გაზომვების წინ სასურველ pH-ს ვაღწევდით 24 საათიანი დიალიზის საშუალებით (დროის ეს მონაკვეთი აუცილებელია, როგორც საჭირო pH-ის მისაღებად, აგრეთვე ცილის სტრუქტურის სტაბილიზაციისათვის ამ პირობებში). უნდა აღვნიშნოთ, რომ მოცემული ბუფერის pH-ის უკიდურესი მნიშვნელობების დროს შეინიშნება ცილის მოლეკულაზე მკაფიო და

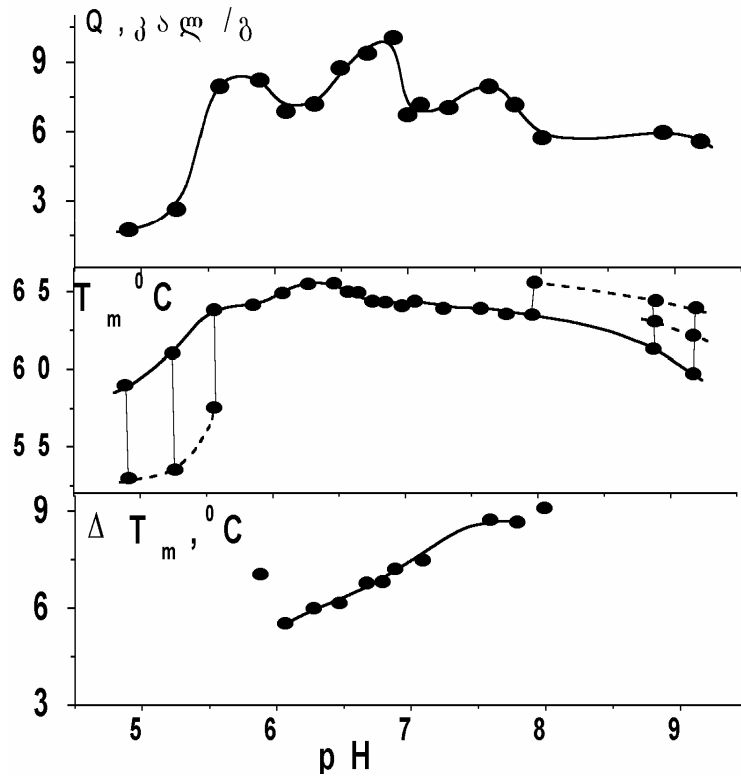
ტუტე არის დენატურაციული ზემოქმედება. ეს გარემოება მიღებულ მონაცემებს დამოკიდებულს ხდის საინკუბაციო დროზე. ბუფერის ზემოთმოყვანილი დიაპაზონიდან (4.9 – 9.1) 0.3 ერთეულით გადახრა 24 საათიანი დიალიზის პირობებში იწვევს ცილის თითქმის მთლიან დენატურაციას. ამრიგად მოცემული ბუფერი საშუალებას გვაძლევს გამოვიკვლიოთ Hb-ის თერმული თვისებები ხსნარების pH-ის სასურველ დიაპაზონში. სურ. 22-ზე მოცემულია HbO₂-ის განსხვავებული pH-ის მქონე ხსნარების სითბოს შთანთქმის რამოდენიმე მრუდი.



სურ. 22. განსხვავებული pH-ის მქონე ოქსიჰემოგლობინის ხსნარების სითბოს შთანთქმის მრუდები.



სურ. 23. განსხვავებული pH-ის მქონე მეტ-ჰემოგლობინის ხსნარების სითბოს შთანთქმის მრუდები.

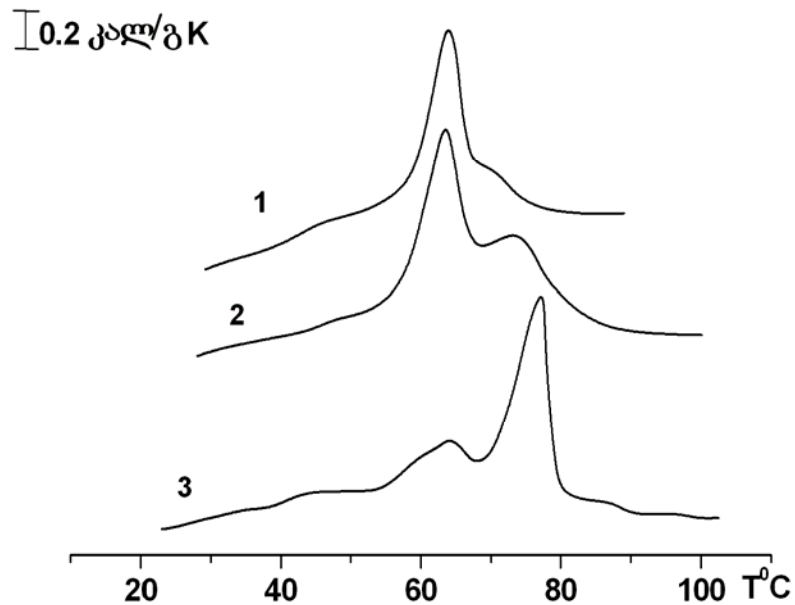


სურ. 24. (განხილულია ტექსტში)

სითბოს შთანთქმის შესაბამისი (სურ.22) პარამეტრების დამოკიდებულება pH-ზე მოყვანილია სურ. 24-ზე ($C = 10\%$, 0.1 M ბუფერი). ამ შედეგების მიმოხილვა ქვემოთ გვექნება მოყვანილი. აქ კი გვინდა აღვნიშნოთ, რომ pH-ის მუავე და ტუტე მნიშვნელობებთან მიახლოებისას შეინიშნებოდა სითბოს შთანთქმის ძირითადი მაქსიმუმის “გახლეჩვა”, რაც აისახება T_m -ის დამოკიდებულებით pH-ის სიდიდეზე (სურ. 24). ცვალებადი pH-ის პირობებში მეტ-Hb-ის სითბოს შთანთქმის მრუდები მოყვანილია სურ.23-ზე (11). გვინდა აღვნიშნოთ, რომ pH-ის მნიშვნელობების დიაპაზონი ექსპერიმენტების ამ სერიისათვის შედარებით ვიწრო იყო ($C = 10\%$, 0.1 M ბუფერი). ეს დაკავშირებულია იმასთან, რომ ამ დიაპაზონის გაფართოება ორივე მიმართულებით (24 საათიანი დიალიზის შემდეგ) იწვევს ცილის დენატურაციას, რაც გამოწვეულია ცილის მეტ-ფორმის შედარებით დაბალი სტაბილურობით მუავე და ტუტე არეში. ეს მონაცემები შეესაბამება [84,85] შრომებს. როგორც HbO_2 -ის, ასევე მეტ-Hb-ის შემთხვევაში დენატურაცია ხსნარების pH-ის უკიდურესი მნიშვნელობების დროს განსხვავდება დაბალკონცენტრაციული დენატურაციისაგან იმით, რომ თერმული ეფექტები სააერთოდ არ შეიმჩნევა (კალორიმეტრული ჩანაწერი სწორ ხაზს წარმოადგენს).

სურ. 25-ზე ($C = 9\%$, 0.001 M ბუფერი) მოყვანილია HbO_2 -ის ხსნარების (წინასწარი 24 საათიანი დიალიზის ჩატარების შემდეგ) სითბოს შთანთქმის მრუდები (1 – pH-6.1, 2 – pH-5.0). შესაბამის

ბუფერებში 24-საათიანი დიალიზის შემდეგ დავინახავთ, რომ pH-ის კლებასთან ერთად იკლებს ძირითადი მაქსიმუმის ტემპერატურაც.



სურ. 25. (განხილულია ტექსტში)

უფრო მაღალ ტემპერატურებზე კი იზრდება ანალოგიური მახასიათებლის სიდიდე. pH 5.0-ის მქონე ნიმუში ინკუბირებული იყო დამატებით 6 სთ-ის განმავლობაში (+4°C-ზე, ღია ჭურჭელში). მიღებული ნიმუშის კალორიმეტრული გაზომვები ნაჩვენებია სურ. 25-ზე (3). ცილის შემდგომი ინკუბაცია ამავე pH-ზე კიდევ 24 საათის განმავლობაში იწვევს მის მჟავურ დენატურაციას. ეს მონაცემები ერთის მხრივ მეტყველებს იმაზე, რომ ოქსიჰემოგლობინი წარმოადგენს ცილის ყველაზე სტაბილურ ფორმას, რაც თანხვედბა ლიტერატურულ მონაცემებს. მეორეს მხრივ კი გამოიკვეთა შემდეგი თავისებურება:

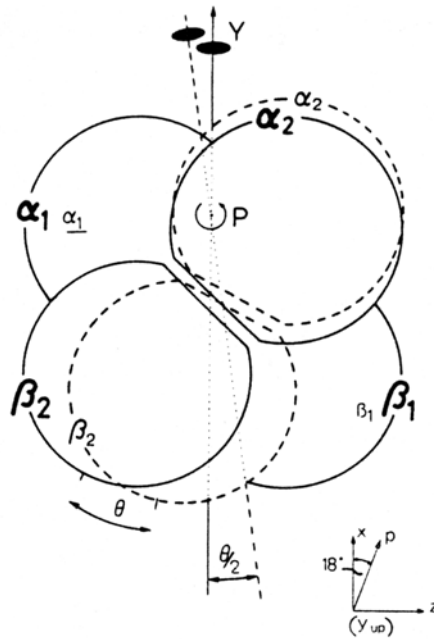
მეორე (მაღალტემპერატურული) სითბოს შთანთქმის პიკის წარმოქმნა ცილის სტრუქტურის დესტაბილიზაციის მაჩვენებელია. ასეთი ნიმუშები ნაკლებად მდგრადია დაბალი კონცენტრაციისა და ნეიტრალურისაგან მნიშვნელოვნად გადახრილი pH-ის შემთხვევაში.

HbO₂-ის სითბოს შთანთქმის პარამეტრები ხსნარების pH-ზე შემდეგ დამოკიდებულებაშია: pH-ის 5.5-ზე ნაკლები და 8.5-ზე მეტი მნიშვნელობის დროს Q_d და T_m სიდიდეების დამოკიდებულება pH-ზე შეესაბამება ერთდომენიანი გლობულარული ცილების დამახასიათებელ თვისებებს. HbO₂-ის და მეტ-Hb-ის ხსნარების სითბოს შთანთქმის მახასიათებლების შედარება აგრეთვე გვიჩვენებს, რომ ოქსიფორმის იზოწერტილში Q_d სიდიდე მაქსიმალურია და ტოლია 10 კალ/გრ. pH-ის ვიწრო ინტერვალში, მეტ-Hb-ის იზოწერტილთან ახლოს მეტ-Hb-ის სითბოს შთანთქმის მრუდის პროფილი განიცდის მნიშვნელოვან ცვლილებებს და იზოწერტილში ემსგავსება HbO₂-ის სითბოს შთანთქმის მრუდს. ამასთან Q_d (სურ. 25, 1) მინიმუმში აღწევს იმავე მნიშვნელობას – 10კალ/გრ. ექსპერიმენტის მონაცემების განხილვა შესაძლებლობას გვაძლევს ვივარაუდოთ, რომ HbO₂-ის ხსნარების pH-ის იზოწერტილთან მიახლოებისას სუბერთეულების სტაბილიზაციისაკენ სწრაფვის ტენდენციასთან ერთად, როგორც ეს ხდება ერთდომენიანი ცილების შემთხვევაში, ადგილი აქვს ტეტრამერის დესტაბილიზაციას. Q_d და T_m სიდიდეების ცვლილებების ხასიათი საშუალებას გვაძლევს დავასკვნათ, რომ ასეთ დესტაბილიზაციას მკვეთრად გამოხატული

ენტროპიული ხასიათი გააჩნია და დაკავშირებულია HbO_2 -ის მოლეკულებში პროტონების გადანაწილებასთან.

იზოწერტილთან ახლოს HbO_2 -ის ხსნარების თავისებურება იმგვარია, რომ შეგვიძლია ვივარაუდოთ: მუხტის კომპენსაცია (“+” და “-” მუხტების წონასწორობა) მოლეკულაში იწვევს მის დესტაბილიზაციას. იზოწერტილიდან გარკვეული ხარისხით დაშორების შემთხვევაში კი ერთი და იმავე ნიშნის მუხტების რაოდენობის სიჭარბე პირიქით – იწვევს ტეტრამერის სტაბილიზაციას. ჩვენი მონაცემების ლიტერატურულ წყაროებთან შედარება შემდეგი დასკვნების გაკეთების საშუალებას იძლევა: ნეიტრალურ pH-ზე HbO_2 -ის სტრუქტურის დესტაბილიზაცია აადვილებს მოლეკულაში სტრუქტურულ გარდაქმნებს, რასაც დიდი მნიშვნელობა აქვს მისი ნორმალური ფუნქციონირებისათვის. ამასთან, ადვილი შესამჩნევია, რომ T და R სტრუქტურებს შორის ტრიგერული ტიპის გადართვისას, როგორც წესი მოქმედებს ერთნაირი ნიშნის მუხტები (სურ. 26). ამრიგად, ასეთი მუხტების ველების გაძლიერება თითქოს “კეტავს” სტრუქტურას მიუხედავად, ერთი შეხედვით, მოლეკულაზე მოქმედი “გახლეჩვითი” ეფექტისა.

მეტ-Hb-ის არაფუნქციურობის მიუხედავად, ძირითადი პიკის სიბოლო შთანთქმის მაქსიმუმის შესაბამისი Q_d და T_m სიდიდეების ცვლილების მიხედვით ადვილი შესამჩნევია, რომ ამდაგვარი მექანიზმი აქაც მუშაობს (სურ. 25, 2).



სურ. 26. ჰემოგლობის T და R ფორმებში α და β ჯაჭვების კონტაქტების ტრიგერული გარდაქმნის მექანიზმი.

სითბოს შთანთქმის კალორიმეტრული მრუდების ორსტადიურობის ანალიზი გვიჩვენებს, რომ ერთი ან ორი პიკის არსებობა არ გვაძლევს წარმოდგენას თუ რომელი ფორმის ჰემოგლობინთან გვაქვს საქმე. იგი გვიჩვენებს მხოლოდ ცილის კონფორმაციულ მდგომარეობას. განსაზღვრულ პირობებში სხვადასხვა ფორმებს შეუძლია მიიღოს ერთნაირი კონფორმაციული მდგომარეობა. მაგალითად, ცილის კონფორმაცია, რომელიც დამახასიათებელია სტაბილური HbO₂-თვის, ყველაზე ნაკლებად სტაბილურია მეტ-ფორმისათვის. მეტ-Hb-ის მოქმედება იზოწერტილთან ახლოს ფაქტიურად მიუთითებს იზოწერტილის გადაადგილებაზე pH-ის მეზობელ უბანებზე, თვით იზოწერტილში კი მეტ-Hb ენტროპიულად არასტაბილურია და მუხტების უმნიშვნელო ცვლილებებსაც კი შეუძლია გამოიწვიოს შესამჩნევი კონფორმაციული ცვლილებები.

სისხლში ჰემოგლობინი მონაწილეობს მრავალ ურთიერთდაკავშირებულ რეაქციებში: არა მხოლოდ სუნთქვის პროდუქტების ტრანსპორტში, არამედ pH-ის ბალანსირებაშიც. ამასთან ერთად Hb-ს შეუძლია დაუკავშირდეს სისხლისა და ერითროციტების სხვა დაბალმოლეკულურ კომპონენტებს როგორც უშუალოდ, ასევე დისტანციურად, ბორის პროტონების მიმოცვლის საშუალებით. ამავე დროს ერთმანეთთან ამდაგვარ ურთიეთობაში თვით Hb-ის მოლეკულებიც შედიან. სწორედ აქედან გამომდინარე, ხსნარებში ცილის კონცენტრაციის შემცირებისას ვლინდება Hb-ის სტრუქტურის ენტროპიული დესტაბილიზაცია, კერძოდ Q_d და T_m სიდიდეების სხვადასხვა მხარეს მიმართული ცვლილებები და დენატურირებულ მდგომარეობაში კოოპერატიული გადასვლის შემცირება. ეს გარემოება (მონაწილეობა პროტონების მიმოცვლაში) აგრეთვე იწვევს ცილის ერთგარ დესტაბილიზაციას მისი მაღალი კონცენტრაციისას, რაზეც მეტყველებს სითბოს შთანთქმის მეორე პიკის გარკვეული ზრდა. ეს შეიძლება დაკავშირებული იყოს არა მხოლოდ ცილის კონცენტრირებულ ხსნარში პროტონების მიმოცვლის გართულებასთან, არამედ მოლეკულის გარშემო pH-ის ცვლილებებთანაც. მოლეკულის სტრუქტურის ამგვარ დესტაბილიზაციას შეიძლება იგივე ბიოლოგიური როლი ჰქონდეს, როგორც დესტაბილიზაციას pH-ის ნეიტრალური მნიშვნელობებისას.

სითბოს შთანთქმის ორი ეტაპის არსებობა დამახასიათებელია Hb-ის ნიმუშებისათვის, რომლებიც ნაკლებად მდგრადნი არიან

დესტაბილიზაციის ფაქტორების მიმართ (მათ შორის ტემპერატურის მომატებისადმი). შესაძლებელია, რომ ცილის სტრუქტურის სტაბილურობის შემცირება ხელს უწყობს სითბური დენატურაციის დაწყებისთანავე აგრეგაციული შეერთებების წარმოქმნას, რაც “კონსერვაციას” უკეთებს ნატიური სტრუქტურის ელემენტებს შედარებით მაღალი ტემპერატურის ზემოქმედებამდე. Hb-ის შედარებით სტაბილური სტრუქტურა მეტი კოოპერატიულობით დენატურირდება და ამ შემთხვევაში აგრეგაციული შეერთებები წარმოიქმნება დენატურირებული სტრუქტურების ხარჯზე.

ჰემოგლობინის სითბური თვისებების შესწავლისას ჩვენ განვიხილავდით შედარებით მარტივ სისტემებს. სისტემა, რომელშიც ჰემოგლობინი თავის ფუნქციას სრულად ასრულებს გაცილებით რთულია. ალბათ ამ მიზეზის გამო ჩვენ ვერ დავინახეთ დიდი ცვლილებები გამსხნელის მახასიათებლების ცვლისას, თუმცა სისხლის შემადგენლობისა და თვისებების სულ მცირე ფლუქტუაციების დროსაც კი ჰემოგლობინის სითბური შთანთქმის პროფილი მნიშვნელოვნად იცვლება.

3.2. დნმ-პორფირინების კომპლექსების მიკროკალორიმეტრული

შესწავლა

გარემოს მნიშვნელოვანმა დაბინძურებამ მძიმე მეტალების მარილებით და აგრეთვე იმ ფაქტმა, რომ მეტალებს ძლიერი ზეგავლენა აქვთ ნუკლეინის მუცელებზე, გამოიწვია ჩვენი დაინტერესება, რათა შეგვესწავლა დნმ-ის მეტალებთან კომპლექსების თერმოდინამიკური თვისებები. ცნობილია, რომ მიკროელემენტების მეტაბოლიზმის დარღვევა ორგანიზმში მუტაგენეზისა და კანცეროგენეზის გამომწვევი ფაქტორია, მაგრამ ამავე დროს ზოგიერთ მეტალსა და მის კომპლექსს ანტიკანცეროგენული თვისებები ახასიათებს (86). აქედან გამომდინარე ჩვენი კვლევის საგანი იყო კათიონური პორფირინებისა და მეტალშემცველი პორფირინების დნმ-ის ორმაგ სპირალთან ურთიერთქმედების ფიზიკო-ქიმიური მექანიზმების გამოკვლევა, რასაც დიდი მნიშვნელობა აქვს უჯრედის რადიაციული დასხივებისას დნმ-ში მიმდინარე გარდაქმნების შესწავლისას [87].

მრავალი კვლევის საფუძველზე დადგენილია, რომ დნმ-პორფირინის კომპლექსში მოლეკულების დაკავშირების სამი ფორმა არსებობს, სახელდობრ: ინტერკალაცია ფუძე წყვილებს შორის, გარე სტეკინგი მცირე ღარებში და გარე მოუწესრიგებელი მიერთება [88]. მათ შესასწავლად გამოიყენებოდა სხვადასხვა ფიზიკური მეთოდი:

ბირთვულ-მაგნიტური რეზონანსი, წონასწორული დიალიზი, ვისკოზიმეტრია, ნიმუშებად კი ოლიგო და პოლინუკლეოტიდები [89].

დადგენილი იყო, რომ პორფირინები ინტერკალირებს GC-მდიდარ უბნებში და AT საიტებს გარეთა მხრიდან ებმება [90]. მოლეკულების ურთიერთდაკავშირების ტიპი იცვლება მეტალის იონის ცვლითა და პორფირინის პერიფერიაზე ჩამნაცვლებელი ჯგუფების ზომისა და ლოკაციის მიხედვით [87]. როგორც წესი, კომპლექსები ორგანოენტიან მეტალებთან, როგორებიცაა Cu(II) და Zn(II) ინტერკალირებს GC ბაზისურ წყვილებს შორის. Co^{3+} , Mn^{3+} , and Fe^{3+} კი გარეთა მხრიდან ებმება მოლეკულის ზედაპირს. როდესაც პორფირინის პირიდილის რგოლში ტრიმეთილ ჯგუფია ჩანაცვლებული, იგი უერთდება დნმ-ს სტეკინგის წესით.

მიუხედავად დნმ-ის ორმაგ სპირალზე ჩატარებული კვლევების სიმრავლისა, არ არის მონაცემები კათიონური პორფირინ-დნმ-ის და მეტალოკათიონური პორფირინ-დნმ-ის კომპლექსების თერმოდინამიკური სტაბილურობის შესახებ. განსაკუთრებით საინტერესოა ფდთ-ში (ფოტოდინამიური თერაპია) ფართოდ გამოყენებული მეტალოკათიონური პორფირინ-დნმ-ის კომპლექსების ამ კუთხით გამოკვლევა. ნაჩვენებია, რომ Ni იონების შემცველი პორფირინი არ ინტერკალირებს ბაზისურ წყვილებში, როგორც მოსალოდნელი იყო, არამედ უერთდება დნმ-ის მცირე ღარს და აგრეთვე მისი მთავარი ღერძის C1' და O3' ატომებს, რაც

განაპირობებს ამ ადგილებში დნმ-ს ჯაჭვის გახლეჩვას ნიმუშის შემდგომი დასხივებისას [91]. მსგავსი ეფექტი შეინიშნება Cu (II)-TMPy და Zn (II) TMPy (Tetrakis-Methyl pyridyl-porphyrin)-ის დნმ კომპლექსების შემთხვევაში. ამ კომპლექსების თერმოდინამიკური პარამეტრების შესწავლას განსაკუთრებული მნიშვნელობა აქვს, რადგან როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, ისინი სელექციურად გროვდებიან სიმსივნურ უჯრედებზე, ებმებიან გენომურ დნმ-ს და იწვევენ მისი ჯაჭვების გახლეჩვას [92], რაც შეიძლება გახდეს სიმსივნური უჯრედების აპოპტოზის საწყისი სტადია.

დიფერენციული სკანირებადი მიკროკალორიმეტრიის მეთოდით ჩვენ შევისწავლეთ ხბოს თიმუსიდან გამოყოფილი ნატიური დნმ-ის დნობის თერმოდინამიკური პარამეტრები და ეს სიდიდეები შევადარეთ დნმ-TOEPyP-(Tetra-Oxyethylpyridyl-Porphyrin)-სა და დნმ-ZnTOEPyP-(ZnTetra-Oxyethylpyridyl-Porphyrin)-ის კომპლექსების დნობის შესაბამის პარამეტრებს.

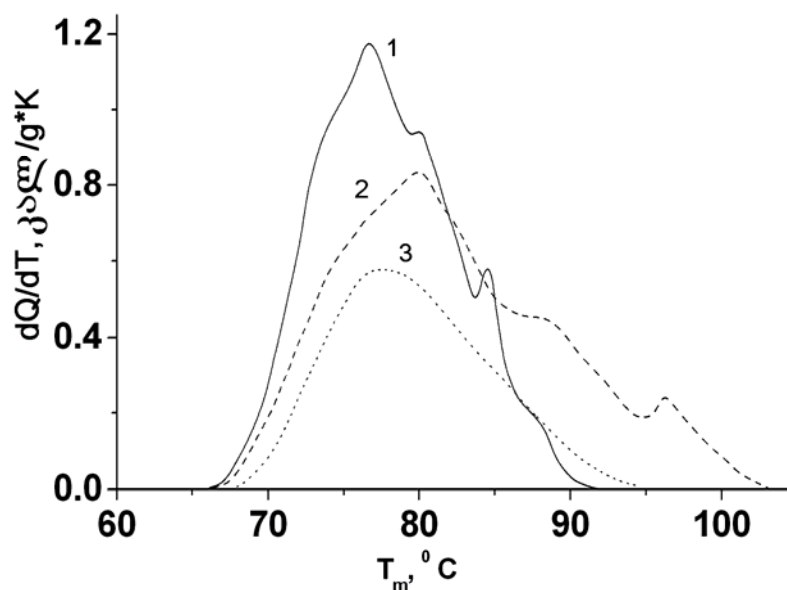
დენატურაციული მრუდის ტემპერატურული მაქსიმუმი მიჩნეულია გადასვლის ტემპერატურად. დნობის ენტალპია გამოთვლილი იყო სითბოს შთანთმის მრუდის ქვეშ აღებული ფართობიდან.

უნდა აღვნიშნოთ, რომ ლიგანდებისაგან თავისუფალი, ნატიური დნმ-ის დნობის პროფილის (სურ.27,1) რთული ხასიათი დაკავშირებულია ხბოს თიმუსის დნმ-ის “ბლოკურ” აგებულებასთან. ნაჩვენები იყო, რომ ეუკარიოტულ დნმ-ში სპირალ-გორგალის

გადასვლა ნეიტრალური მარილების დაბალი კონცენტრაციის თანაობისას, მიმდინარეობს GC ბაზისური წყვილების რაოდენობის განსხვავებული შემცველობის დნმ-ის საიტების თანმიმდევრული დნობით და რაც უფრო მაღალია GC ბაზისური წყვილების პროცენტული შემცველობა, მით უფრო მაღალია ამ “ბლოკის” დნობის ტემპერატურა – T_m .

ცნობილია, რომ დნმ-ის დნობის გადასვლის ტემპერატურა, როდესაც მისი ფრაქციები AT წყვილების 35-36%-ს შეიცავს არის 76.5°C . GC ბაზისური წყვილების შემცველი დნმ-ის დნობის გადასვლის ტემპერატურა, როდესაც მათი პროცენტული შემცველობა 40 და 42%-ია, $T_m=80^{\circ}\text{C}$ და 84°C შესაბამისად.

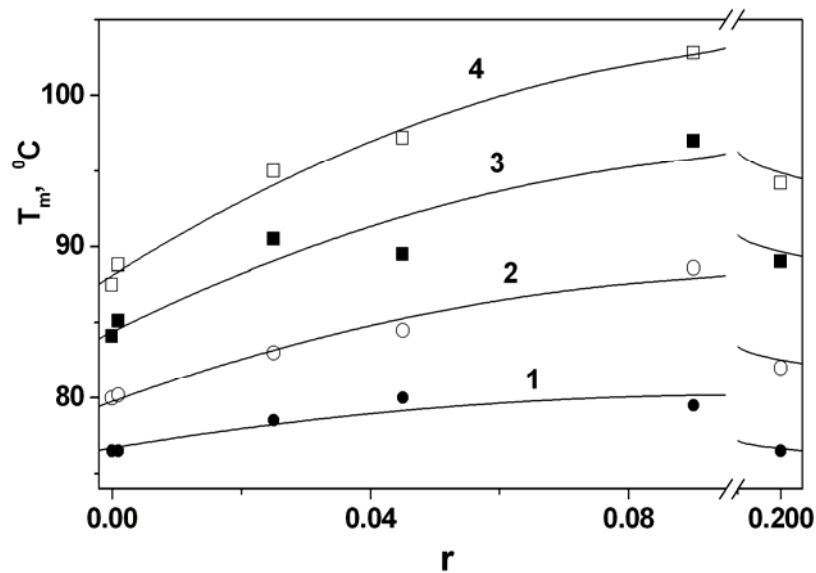
ამრიგად, პორფირინისა და მეტალოპორფირინის მიერთება GC წყვილების განსხვავებული შემადგენლობის მქონე დნმ-ის მოლეკულასთან გვაძლევს კომპლექსებს, რომელთა კალორიმეტრული შესწავლით შეგვიძლია დავადგინოთ: ეს ლიგანდები უფრო ეფექტურად ებმება დნმ-ის AT თუ GC წყვილებით მდიდარ საიტებს; იწვევს თუ არა ცვლილებებს კოოპერატიულ პარამეტრებში – ΔT_m და ΔH_m ; ახდენს დნმ-ის სტაბილიზაციას, თუ პირიქით, იწვევს მის დესტაბილიზაციას.



სურ. 27. ხბოს თიმუსის დნმ-ს ხსნარის ტემპერატურული დნობის მრუდი, გადათვლილი მშრალ მასაზე. 1 – ნატიური დნმ, 2 – დნმ-TOEPyP-ის კომპლექსი ($r = 0.09$), 3 – დნმ-TOEPyP-ის კომპლექსი ($r = 0.2$).

სურ. 27-დან ჩანს, რომ ხსნარში TOEPyP-ის დაბალი კონცენტრაციის თანობისას ($r=0.01-0.09$), სადაც r არის მოლი პორფირინის შეფარდება დნმ_{ფ.წ}-ზე, იწვევს სითბოს შთანთქმის მრუდის გადაწევას მაღალი ტემპერატურებისკენ. ნაჩვენებია, რომ მთავარი პიკის მაქსიმალური წანაცვლება ტემპერატურული შკალის გასწვრივ, როცა $r = 0.09$ შეადგენს 3.0°C (სურ. 28 მრუდი 1,2), ხოლო სატელიტური დნმ-თვის (სურ.28 3,4) შეადგენს 12°C და 15°C შესაბამისად. ამავე დროს დნობის ინტეგრალური სითბო – ΔH იზრდება 10.7 ± 1 კალ/გრ-დან 12.2 ± 1 კალ/გრად-მდე. ასევე იზრდება როგორც მთავარი ასევე სატელიტური ფრაქციის ΔT_m . პიკი,

რომელიც ასახავს დნმ-ის იმ უბნის (ბლოკის) დნობას, რომლის GC წყვილების პროცენტული შემადგენლობა მაღალია, განთავსებულია ტერიტორიულად შედარებით მაღალ ტემპერატურულ უბანში, ვიდრე პიკი, რომელიც შეესაბამება დნმ-ის მოლეკულაში იმ ბლოკის დნობას, რომლის GC წყვილების პროცენტული რაოდენობაც შედარებით დაბალია.



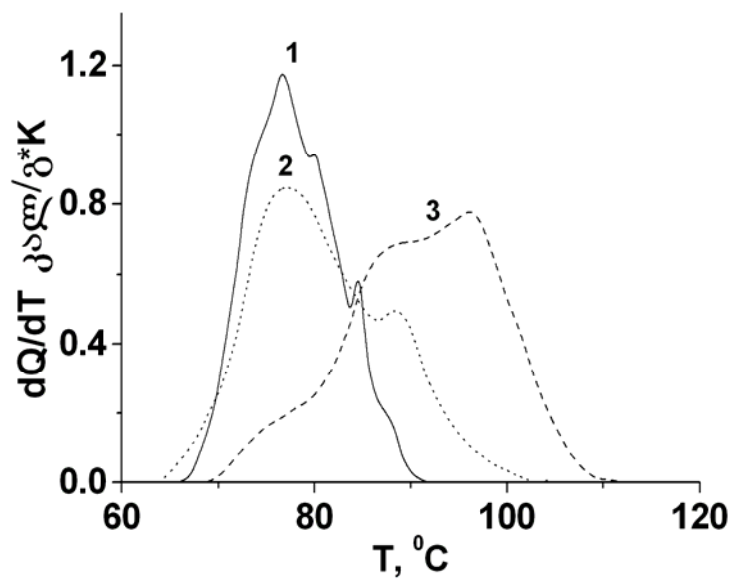
სურ. 28. დნმ-TOEPyP-ის კომპლექსის ხსნარის დნობის ტემპერატურის დამოკიდებულება r -ზე

TOEPyP-ს მაღალი კონცენტრაციის შემთხვევაში თიმუსის დნმ-ის დნობის დამახასიათებელი კალორიმეტრული მრუდი იცვლება (სურ. 27. 3) სამი გამოკვეთილი მხარი ($T_m = 73, 80, 87^{\circ}\text{C}$) და ორი პიკი 76.5°C და 84.5°C პრაქტიკულად ქრება და დაიმზირება ერთი დიფუზური (გაშლილი) სიბოხს შთანთქმის მრუდი, რომელზეც მხოლოდ მათი

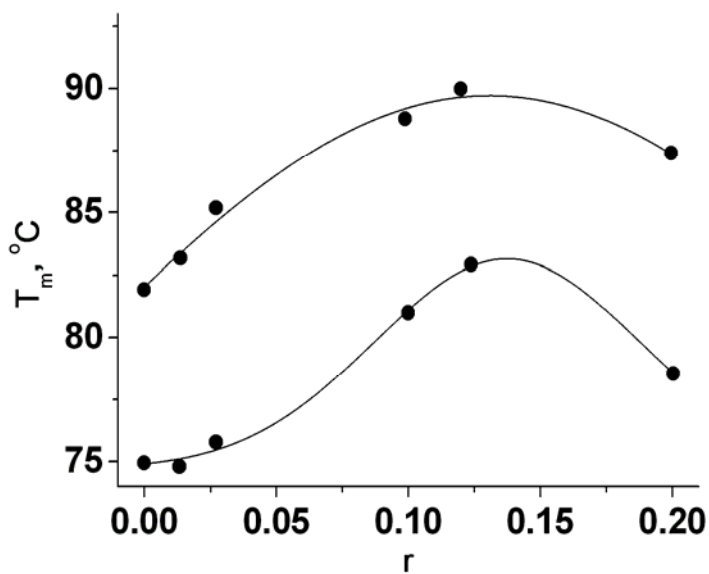
კვალი ჩანს. ამის გარდა დაიმზირება (სურ. 27,28) მთავარი პიკის T_m -ს წანაცვლება დაბალი ტემპერატურებისაკენ და ინტეგრალური სითბოს - ΔH -ის შემცირება 35%-მდე. ეს სიდიდე, როდესაც $r=0.2$ შეადგენს 7.5 კალ/გრ.

მიღებული მონაცემები მოწმობს, რომ პორფირინის დაბალი კონცენტრაციების დროს ($r=0.01-0.09$) როცა დნმ-ის დაახლოებით 80 ÷16 ფუძე წყვილზე მოდის პორფირინის მხოლოდ ერთი მოლეკულა, დნმ-ის ჯაჭვი სტაბილიზირდება, ხოლო იმ შემთხვევაში როცა 4-5 ფუძე წყვილზე მოდის TOEPyP-ის ერთი მოლეკულა ($r=0.2$) ორმაგი სპირალი დესტაბილიზაციას განიცდის.

Zn-TOEPyP-ის დამატება დაბალი კონცენტრაციით (სურ. 29,30) ასევე იწვევს დნმ-ს ორმაგი სპირალის სტაბილიზაციას. განსხვავება მდგომარეობს იმაში, რომ უკვე $r=0.0135$ დროს დნმ-ის კალორიმეტრულ მრუდზე ქრება თიმუსის დნმ-თვის დამახასიათებელი თავისებურებანი (მხრები და პიკები) და დაიმზირება სითბოს შთანთქმის ორი პიკი. ეს კი იმას ნიშნავს, რომ Zn-TOEPyP-ს გააჩნია უფრო მაღალი სპეციფიურობა AT და GC წყვილებთან, ვიდრე პორფირინს თუთიის გარეშე.



სურ. 29. ხბოს თიმუსის ღნმ-ს ხსნარის ტემპერატურული ღნობის მრუდი. 1 – ნატიური ღნმ, 2 – ღნმ-ZnTOEPyP-ის კომპლექსი ($r = 0.0135$), 3 – ღნმ-ZnTOEPyP-ის კომპლექსი ($r = 0.12$).



სურ. 30. ღნმ-ZnTOEPyP-ის კომპლექსის ხსნარის ღნობის ტემპერატურის დამოკიდებულება r –ზე.

მაღალი კონცენტრაციის თანაობისას ($r=0.2$) მცირდება როგორც T_m ასევე ΔH სიდიდეები (სურ.30). ამრიგად, ჩვენ ვასკვნით, რომ TOEPyP და Zn-TOEPyP დაბალი კონცენტრაციისას იწვევს დნმ-ის სტაბილიზაციას, ხოლო მაღალი კონცენტრაციისას ახდენს დნმ-ის ორმაგი სპირალის დესტაბილიზაციას. Zn-TOEPyP ამჟღავნებს მიერთების მაღალ ხარისხს AT და GC ბაზისურ წყვილებთან, ხოლო TOEPyP მხოლოდ GC წყვილებთან.

სურ. 27 და 28-ზე მიღებული პარამეტრების თერმოდინამიკური ანალიზი ასევე გვიჩვენებს, რომ პორფირინის დაბალი კონცენტრაცია არ იწვევს AT და GC წყვილების თერმოსტაბილურობის დაახლოებას, რადგან კოოპერატიულობის პარამეტრი $-\Delta T_m \sim T_{GC} - T_{AT}$ კი არ მცირდება, როგორც ეს დაიმზირება მეტალის იონების ან ნეიტრალური მარილების დამატებისას, არამედ იზრდება პორფირინის კონცენტრაციასთან დამოკიდებულებაში. იზრდება როგორც მთავარი ასევე სატელიტური ფრაქციის დნობის სიგანე $-\Delta T_m$.

ჩვენი მონაცემები სრულად ემთხვევა დნმ-ლიგანდების ურთიერთქმედებაზე თანამედროვე შეხედულებას [88] და გვიჩვენებს, რომ პორფირინი უკავშირდება დნმ-ის როგორც AT ისე GC ფუძე წყვილებს, მაგრამ მიერთების ხარისხი გაცილებით დიდია GC წყვილებთან, რის შედეგადაც დნმ-ში შემავალი GC წყვილებით მდიდარი ფრაქციის სტაბილურობა შედარებით მეტად იზრდება, ვიდრე GC წყვილებით ნაკლებად მდიდარი ფრაქციისა, რაც იწვევს დნმ-

პოროფირინის კომპლექსის დნობის ინტერვალის მნიშვნელოვან გაფართოებას.

აგრეთვე ჩვენ შევისწავლეთ ბიორეგულატორი პეპტიდის – პროსტომაქსის დნმ-ზე ზემოქმედების მექანიზმი. კვლევის მთავარი მიზანი იყო პეპტიტ პროსტომაქსის ენერგეტიკული წვლილის დადგენა poly[d(A-T)d(A-T)-ს ღლობის ენტალპიაში და მოლეკულათშორის კავშირებზე. ამ შემთხვევაშიც დნობის პროფილის შეცვლა დამოკიდებული იყო პეპტიდის კონცენტრაციაზე [93].

პროსტომაქსის კონცენტრაციის გაზრდამ გამოიწვია დნობის მრუდის გადახრა უფრო მაღალი ტემპერატურისკენ. ΔT_m გაიზარდა 2.4⁰C-დან 5.6⁰C-დე დნობის მრუდის უმნიშვნელო ცვლილებით. აქედან გამომდინარე poly[d(A-T)d(A-T)-ს დნობის ინტერვალის გაფართოება 100%-ით ზრდის T_m -ს 6⁰C-ით, ΔH_m -ის მნიშვნელოვანი ცვლილების გარეშე. მიღებული შედეგები შეინიშნება კონცენტრაციის მნიშვნელობის შუალედში 2.4×10^{-3} -დან 7.2×10^{-3} მოლ პეპტიდამდე ერთ მოლ A-T ფუძეთა წყვილზე გაანგარიშებით. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ პროსტომაქსი უკავშირდება poly[d(A-T)d(A-T)-ს მოლეკულას ბოლოებში და წარმოქმნის წრიულ მოლეკულას, რომელიც დნება უფრო მაღალ ტემპერატურაზე და ფართო ტემპერატურულ ინტერვალში, ვიდრე თავისუფალი poly[d(A-T)d(A-T). ეს მოსაზრება ეთანხმება ოპტიკური მეთოდებით მიღებულ შედეგებს წრიულ დნმ-ზე მისი ღლობისას ფიზიოლოგიურ პირობებში.

3.3. ქრომატინის თერმოსტაბილურობაზე ტოლუოლის

ზეგავლენის მიკროკალორიმეტრული შესწავლა

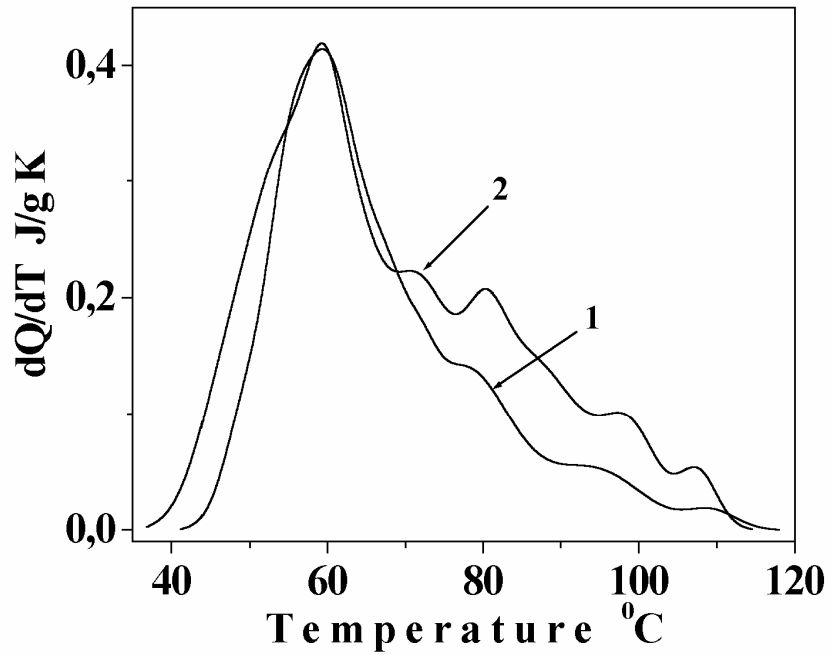
მაკრომოლეკულების, ცილებისა და ნუკლეინის მუკავების დნობის პროცესი ხსნარებში სითბოს შთანთქმით მიმდინარეობს [94].

გამოკვლევების შედეგად დადგენილია, რომ მემბრანები და ბირთვული მატრიქსი დენატურირდება 40-55⁰C [95-97] ტემპერატურულ ინტერვალში, ციტოპლაზმური სტრუქტურები – 50-85⁰C, ხოლო გენეტიკური მასალა – 85-120⁰C ტემპერატურულ ინტერვალში [98].

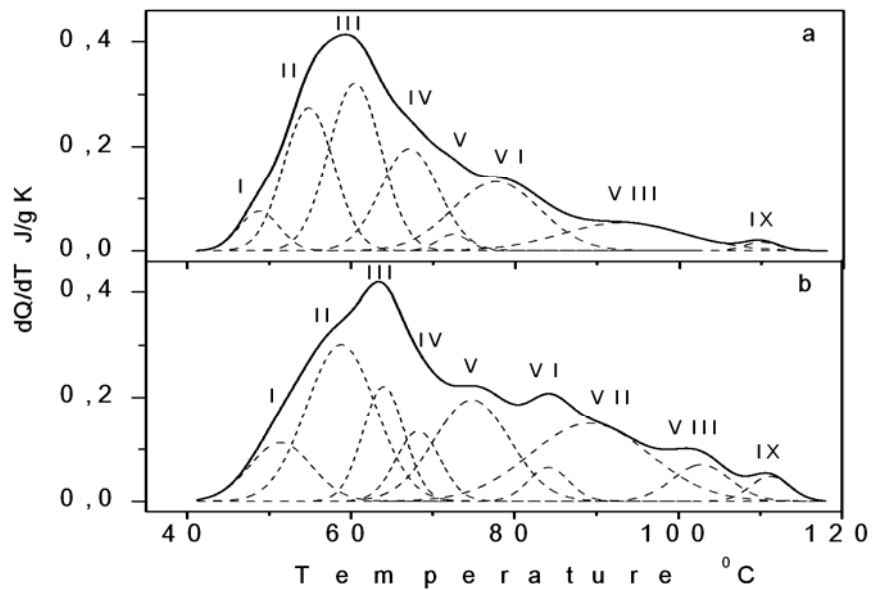
როგორც ლიტერატურიდან არის ცნობილი, ტოლუოლის ციტოტოქსიური ეფექტი იწვევს ნერვული უჯრედების რაოდენობის შემცირებას თავის ტვინის როგორც ქერქულ, ასევე ქერქქვეშა სტრუქტურებში. ტოლუოლის დამაზიანებელი ეფექტი უკავშირდება მისი მეტაბოლიტების, თავისუფალი რადიკალების უნარს ზემოქმედება მოახდინონ მემბრანის ცხიმოვან შრეზე [99], უჯრედულ ცილებსა და დნმ-ზე და გამოიწვიონ მათი ოქსიდაციური დაზიანება [100].

აქედან გამომდინარე, მიზანშეწონილად ჩავთვალეთ შეგვესწავლა ტოლუოლით ინტოქსიკაციის ზეგავლენა ნერვული უჯრედების ქრომატინის სტაბილურობაზე.

სურ. 29-ზე წარმოდგენილია საკონტროლო ჯგუფის ვირთაგვების ჰიპოკამპისა და ყნოსვის ბოლქვების ქსოვილების სითბოს შთანთქმის მრუდები, რომელთა პროფილებს რთული სახე აქვს და განსხვავდება ერთმანეთისაგან. ორივე შემთხვევაში შეინიშნება 6 ენდოთერმა, თუმცა



სურ. 31. საკონტროლო ცხოველების ჰიპოკამპისა (1) და ყნოსვის ბოლქვების (2) ქსოვილების სითბოს შთანთქმის კალორიმეტრული მრუდები.

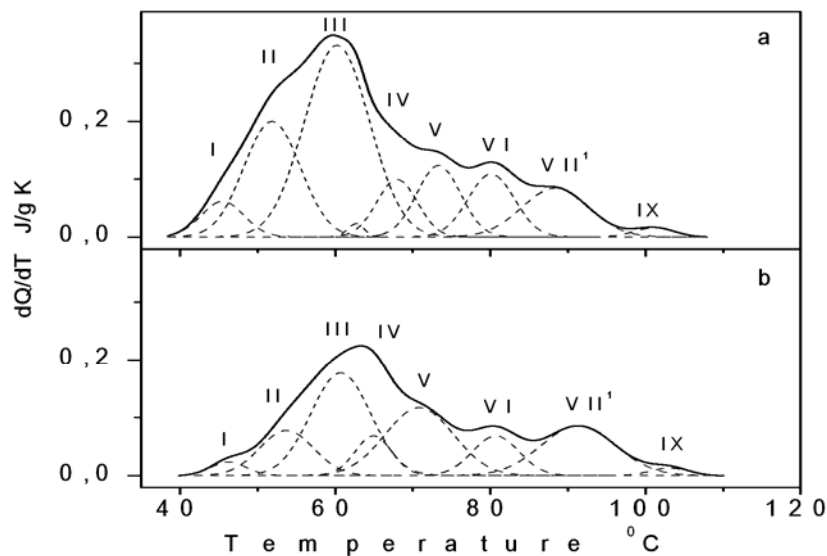


სურ. 32. საკონტროლო ცხოველების ჰიპოკამპისა (a) და ყნოსვის ბოლქვების (b) ქსოვილების სითბოს შთანთქმის დეკონვოლუციური მრუდები 1 გრამ მშრალ ბიომასაზე გადაანგარიშებით. 1 – 20.3 მგ მშრალი ბიომასა, 2 – 22.0 მგ მშრალი ბიომასა. სკანირების სიჩქარე $0.56^{\circ}\text{C}/\text{წთ}$.

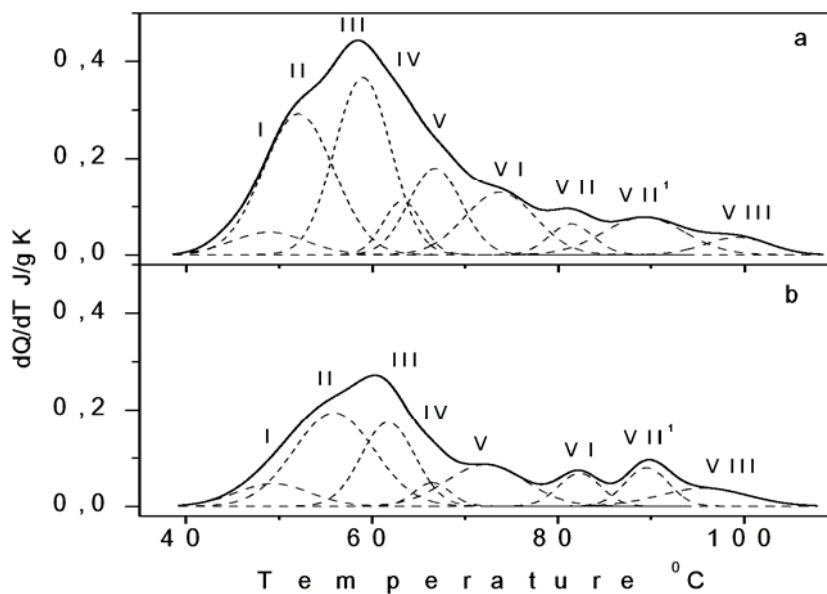
ენოსვის ბოლქვების შემთხვევაში ენდოთერმები უფრო მკვეთრადაა გამოხატული.

არსებული მონაცემების მიხედვით [101] დადგენილია, რომ დსმ გაზომვების საფუძველზე ბიოქიმიურ, ელექტრონულ-მიკროსკოპულ და ელექტროფორეზულ მონაცემებთან ერთად H1 ჰისტონებით გაღარიბებული ხსნადი ქრომატინი დენატურირდება სამ სტადიად: $T_d = 57, 68$ და 80°C , უხსნადი ქრომატინი – ორ სტადიად: 68 და 80°C , ნორმალური ბირთვებისა და უჯრედების ქრომატინი სამ სტადიად: $T_d = 73, 88$ და 105°C , ხოლო ტრანსფორმირებული უჯრედების ქრომატინი ორ სტადიად: $T_d = 90$ და 100°C [102].

იმისათვის, რომ გამოგვეკვლია, თუ რომელი ენდოთერმა შეესაბამება ქრომატინის დენატურაციას, მოვახდინეთ ჩვენს მიერ მიღებული სითბოს შთანთქმის მრუდების დეკონვოლუცია ელემენტარულ გაუსის შემადგენლებად (სურ.30 ა, ბ) და ორივე შემთხვევაში მივიღეთ გადასვლის (ენდოთერმის) 8-9 სტადია. ვიცოდით რა დნმ-ის რაოდენობა 1 გრამ მშრალ ბიომასაზე, ბიომასის რაოდენობა გამზომ ამპულაში და სითბოს რაოდენობა, რომელიც მოდის VII, VIII და IX დეკონვოლუციურ ენდოთერმებზე, ჩვენ გამოვთვალეთ ამ ენდოთერმების სითბოები (Q_d). ეს სიდიდე უნდა ყოფილიყო *in vivo* ქრომატინის ტოლი, მაგრამ Q_d -ს მიღებული მონაცემები – 240 ჯ/გ, 300%-ით აღემატებოდა წინა შრომებში მიღებულ Q_d -ს (89,93) თუმცა VIII და IX ენდოთერმების მიხედვით გამოთვლილი Q_d გვაძლევს 90.5 ჯ/გ დნმ-ს, რაც ემთხვევა ლიტერატურაში არსებულ მონაცემებს.



სურ. 33. **a** - 2 თვიდან მცნოსველი ვირთაგვების ყნოსვის ბოლქვების სითბოს შთანთქმის კალორიმეტრული მრუდები.
b - 1 თვიდან მცნოსველი ვირთაგვების ყნოსვის ბოლქვების სითბოს შთანთქმის კალორიმეტრული მრუდები.



სურ. 34. **a** - 2 თვიდან მცნოსველი ვირთაგვების ჰიპოკამპის სითბოს შთანთქმის კალორიმეტრული მრუდები.
b - 1 თვიდან მცნოსველი ვირთაგვების ჰიპოკამპის სითბოს შთანთქმის კალორიმეტრული მრუდები.

ამ გადასვლების დენატურაციული პარამეტრებია:

$$T_d(\text{VIII}) = 99.4 \text{ }^{\circ}\text{C}, \quad \Delta T_d = 5.3 \text{ }^{\circ}\text{C}, \quad Q_d = 62.3 \pm 0.6 \text{ } \text{ჯ/გ}$$

$$T_d(\text{IX}) = 106 \text{ }^{\circ}\text{C}, \quad \Delta T_d = 5.2 \text{ }^{\circ}\text{C}, \quad Q_d = 28.8 \pm 0.3 \text{ } \text{ჯ/გ}$$

I – IX ენდოთერმებიდან გამოთვლილი ინტეგრალური სითბო ენოსვის ბოლქვების შემთხვევაში შეადგენს მშრალი ბიომასის 13.03 ჯ/გ-ს, ხოლო ჰიპოკამპის შემთხვევაში – 9.91 ჯ/გ-ს. (ცხრილი 1)

ცხრილი 1. 1 (I ჯგუფი) და 2 (II ჯგუფი) თვიდან მენოსველი ვირთაგვების ჰიპოკამპისა და ენოსვის ბოლქვების უჯრედების დენატურაციის სითბოტევალობები (ა) გრამ მშრალ ბიომასაზე გადაანგარიშებით (ჯ/გ) და დეკონვოლუციური პიკების ტემპერატურული მაქსიმუმები (ბ).

ა) $Q_1 - Q_9$ –შეესაბამება I-IX ენდოთერმებს. Q_d -ს გაზომვის ცდომილება – $Q_d \sim 10\%$.

ენოსვის ბოლქვები	Q_1	Q_2	Q_3	Q_4	Q_5	Q_6	Q_7	Q_7^1	Q_8	Q_9	Q_{int}
კონტროლი	1.07	3.24	1.42	2.29	0.92	0.4	2.76	-	0.64	0.2	12.94
I ჯგუფი - ცლა	0.46	2.09	-	1,26	0,24	0.92	0.39	0.43	0.43	-	6.22
II ჯგუფი - ცლა	0.14	2.8	2.79	0.58	1.28	1.23	0.38	0.64	0.32	-	10.39
ჰიპოკამპი											
კონტროლი	0,33	2,37	1,68	2,53	0,29	1,76	-	-	0.81	0.1 4	9,91
I ჯგუფი - ცლა	0.15	0.48	2.32	0.37	0.83	0.89	-	0.84	-	0,1	5.98
II ჯგუფი - ცლა	0.43	1.82	3.84	0,65	0,84	0.82	-	0.80	-	0,1	9.3

ენოსვის ბოლქვები	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇	T ₇ ¹	T ₈	T ₉
კონტროლი	47	53	59	64	70	80	84.5	-	100	107
I ჯგუფი - ცდა	49	54	-	62	67	73	83	90	97	-
II ჯგუფი - ცდა	48	51.5	58	63	68	74	82	90	100	-
ჰიპოკამპი										
კონტროლი	48	53	60	65	70	80	-	-	95	108
I ჯგუფი - ცდა	46	51	60	67	73	80	-	89	-	102
II ჯგუფი - ცდა	46	53	61	64	72	81	-	92	-	104

ბ) T₁ – T₉ – შეესაბამება ენდოთერმების მაქსიმუმებს. ექსპერიმენტის ცდომილება – T_d±1.5 °C

31 ა,ბ და 32 ა,ბ სურათებზე წარმოდგენილია 1 და 2 თვიდან მენოსველი ვირთაგვების ჰიპოკამპისა და ენოსვის ბოლქვების ქსოვილების სითბოს შთანთქმის მრუდები ტოლუოლით ინტოქსიკაციის შემდეგ.

ენდოთერმების განლაგება და ინტენსივობა კალორიმეტრულ მრუდებზე გვიჩვენებს, რომ ტოლუოლის *in vivo* ზემოქმედება გამოსაკვლავი სუბუჯრედული სტრუქტურების სტაბილურობაზე განსხვავებულია და ეს განსხვავება ძირითადად შეინიშნება 95-115°C ტემპერატურულ ინტერვალში, სადაც მიმდინარეობს ქრომატინის დენატურაცია. არის მსგავსებაც: Q_{d int} ორივე შემთხვევაში ერთნაირად მცირდება. ზემოაღწერილი მონაცემები (სურ.28-30 და ცხრილი 1) გვიჩვენებს, რომ Q_{d int} შემცირება ხდება 40-80°C ინტერვალში მემბრანების, ცილოვანი კომპლექსებისა და რიბონულეოპროტეინების

დენატურაციის ხარჯზე. ქრომატინის ენერგეტიკული წვლილი (85-120°C ინტერვალში) საერთო Q_d -ში მცირეა და შეადგენს $Q_{d \text{ int}}$ -ის 8%-ს. სურ.29 და სურ.30-ის შედარება გვიჩვენებს, რომ ტოლუოლმა გამოიწვია არა მარტო $Q_{d \text{ int}}$ -ის შემცირება, არამედ სითბოს გადანაწილებაც IX და VIII ენდოთერმებს შორის. გარდა ამისა, სითბოტევადობის მრუდებზე (სურ.31 ა,ბ და სურ.32 ა,ბ) 85-100°C ინტერვალში $T_d = 89 \pm 1^\circ\text{C}$ და $Q_d = 0.46$ ჯ/გ შეინიშნება ახალი ენდოთერმა – VII¹. VII¹-VIII ენდოთერმებზე გამოთვლილი სითბოს რაოდენობა 1 გრამ დნმ-ზე შეადგენს 90.5 ± 9.0 ჯ/გ ეს სიდიდე დიდი სიზუსტით ემთხვევა *in situ* ქრომატინის Q_d -ს (94,97). ჩვენს მიერ მიღებული Q_{int} -ის შემცირება 35-50%-ით საცდელ ცხოველებში იგივე ნატიურ ქსოვილებთან შედარებით მოწმობს, რომ ტოლუოლი პირდაპირ ან არაპირდაპირ აზიანებს ციტოპლაზმურ სტრუქტურებს. ციტოპლაზმური სტრუქტურების პარალელურად ზიანდება ბირთვული მატრიქსიც და ამის შედეგად ქრომატინის მარყუქების მატრიქსთან მიმაგრების ადგილებიც, რამაც უნდა გამოიწვიოს მარყუქების გახსნა, რაც გამოიხატება IX ენდოთერმის მთლიანად გაქრობაში. რაც შეეხება საცდელი ცხოველებიდან აღებული ქსოვილების VII-VIII ენდოთერმების მსგავსებას საკონტროლო ცხოველების VIII-IX ენდოთერმებთან, ეს შედეგი მიუთითებს, რომ ბირთვულ მატრიქსზე მიმაგრებული ქრომატინის მარყუქების გახსნის პროცესი არ მიმდინარეობს მნიშვნელოვანი სითბური ეფექტების თანხლებით.

ამრიგად ჩვენ მივდივართ დასკვნამდე, რომ ტოლუოლი იწვევს სუბუჯრედული ცილოვანი სტრუქტურების ნაწილობრივ დენატურაციას და სითბოს გადანაწილებას ქრომატინის სტრუქტურულ დომენებს შორის (IX, VIII და VII¹ ენდოთერმები). გაჩნდა მოსაზრება, რომ ციტოპლაზმური სტრუქტურების დენატურაციის პარალელურად ზიანდება ბირთვული მატრიქსიც, რაც იწვევს ქრომატინის მარყუქების გახსნას. ტოლუოლის ინჰალაციით გამოწვეული დამაზიანებელი ეფექტი ვლინდება ყნოსვის ბოლქვებისა და ჰიპოკამპის კალორიმეტრული მეთოდით შესწავლის შედეგად. ვინაიდან ეს მეთოდი ქსოვილის ჯამური სითბოტევადობის ცვლილების განსაზღვრის საშუალებას გვაძლევს, შეუძლებელია ცალკე გამოვყოთ ნეირონებში მიმდინარე პროცესები. მიუხედავად ამისა, კალორიმეტრული მეთოდით მიღებული შედეგები საშუალებას გვაძლევს დავასკვნათ, რომ ყნოსვის ბოლქვების შემთხვევაში ნეირონების დაკარგვასთან ერთად ჯამური სითბოტევადობა მცირდება ორივე ასაკობრივ ჯგუფში, ხოლო ჰიპოკამპში – მხოლოდ ახალგაზრდა ცხოველებში [103].

თუ მხედველობაში მივიღებთ იმას, რომ ჩვენს მიერ მიღებული ჯამური სითბოტევადობის შემცირება 35-50%-ით ნატიურ ქსოვილებთან შედარებით მიუთითებს ინტოქსიკაციის შედეგად სუბუჯრედული ცილოვანი სტრუქტურების ნაწილობრივ დენატურაციასა და ბირთვული მატრიქსის დაზიანებაზე, აშკარა ხდება ტოლუოლით ინტოქსიკაციის პირობებში მიმდინარეობს უჯრედების დაკარგვის ან დაღუპვის ხელშემწყობი პროცესები.

დასკვნები

მიღებული შედეგების სფუქველზე შეიძლება გავაკეთოთ შემდეგი დასკვნები:

1. მიკროკალორიმეტრული გაზომვების საფუძველზე ნაჩვენებია, რომ ჰემოგლობინი სისხლის შემადგენლობაში დნება ორ სტადიად. დენატურაციის პარამეტრებია: მთავარი პიკის: $T_m = 65^{\circ}\text{C}$, $\Delta T_d = 5.0^{\circ}\text{C}$ და $\Delta H = 7.8$ ჯ/გ, მაღალტემპერატურული პიკის: $T_m = 79^{\circ}\text{C}$, $\Delta T_d = 8.2^{\circ}\text{C}$, $\Delta H = 3.4$ ჯ/გ.
2. ჰემოგლობინის მოლეკულის მაქსიმალური სტაბილურობა და კოოპერატიულობა ხსნარებში აღინიშნებოდა pH 6.35-ზე, ხოლო კონცენტრაციის მიხედვით – 38%-ის დროს.
3. შესწავლილია დნმ-TOEPyP-ის და დნმ-ZnTOEPyP-ის სპირალ-გორგალის გადასვლის თერმოდინამიკური პარამეტრები. ნაჩვენებია, რომ პორფირინი წარმოადგებს დნმ-ის მასტაბილიზებელ აგენტს. მაქსიმალური თერმოსტაბილურობა შეინიშნება წონითი შეფარდებისას – $r = 0.09$. ამ შემთხვევაში მთავარი პიკის წანაცვლება მაღალ ტემპერატურებისაკენ შეადგენს 3.0°C , ხოლო სატელიტური ფრაქციებისათვის – 12°C . ΔH_m – ინტეგრალური სითბო იზრდება 44.7 ± 4.2 ჯ/გრ-დან 51 ± 5 ჯ/გრ-მდე.
4. პორფირინი ებმება დნმ-ს AT და GC წყვილებთან, მაგრამ მიერთების ხარისხი გაცილებით დიდია GC წყვილებთან, რის შედეგადაც შეინიშნება დნმ-პორფირინის კომპლექსის დნობის ინტერვალის მნიშვნელოვანი გაფართოება.
5. განსაზღვრულია ყნოსვის ბოლქვებისა და ჰიპოკამპის ქსოვილის სითბური დენატურაციის პარამეტრები. დადგენილია, რომ ამ ქსოვილებში ქრომატინის დენატურაცია მიმდინარეობს ორ ეტაპად და მისი პარამეტრებია: ყნოსვის ბოლქვებისათვის: $T_m(\text{VIII}) = 99.4^{\circ}\text{C}$, $Q_d(\text{VIII}) = 62.3 \pm 5.8$ ჯ/გრ დნმ, $T_m(\text{IX}) = 106^{\circ}\text{C}$, $Q_d(\text{VIII}) = 28.8 \pm 0.4$ ჯ/გრ

დნმ; ჰიპოკამპისათვის: $T_m(\text{VIII}) = 95^{\circ}\text{C}$, $Q_d(\text{VIII}) = 62.0 \pm 9$ ჯ/გრ დნმ, $T_m(\text{IX}) = 107^{\circ}\text{C}$, $Q_d(\text{VIII}) = 29 \pm 4.5$ ჯ/გრ დნმ.

6. ნაჩვენებია, რომ ტოლუოლი იწვევს ცვლილებებს ციტოპლაზმურ სტრუქტურებში, არაჰისტონურ ბირთულ ცილებსა და ბირთულ მატრიქსში, რასაც თან ახლავს ქრომატინის მარყუქების 30 ნმ-იანი ფიბრილების გაშლა.

დაბოლოს, დიდი მადლობა მინდა გადავუხადო ჩემს სამეცნიერო ხელმძღვანელს, ფიზ.-მათ. მეცნიერებათა დოქორს, ბატონ ჯ. მონასელიძეს ჩემს მიმართ გამოჩენილი დიდი ყურადღებისათვის, აგრეთვე ბიოლოგიური სისტემების ფიზიკის განყოფილების ყველა თანამშრომელს, საინტერესო რჩევებისა და დახმარებისათვის.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. Friedman JM. Structure, Dynamics, and Reactivity in Hemoglobin. *Science.*, vol.228, 1260-1333. (1985)
2. Dare F., Makinde O., Faasuba O. The Obstetric Performance of Sickle Cell Disease Patients and Homozygous Hemoglobin C Disease Patients. *Int J Gynaecol Obstet.*, 37(3), 163-8. (1992)
3. Fairhurst R., Casella J. Homozygous Hemoglobin C Disease. *N Engl J Med.*, 24, 350-354. (2004)
4. Perutz M. Regulation of Oxygen Affinity of Hemoglobin: Influence of Structure of the Globin on the Heme Iron. *Annual Review of Biochemistry.*, v.48, 327. (1979)
5. Srinivasan R., Rose G. The T-to-R Transformation in Hemoglobin: a Reevaluation. *Proc Natl Acad Sci.*, v. 91(23), 11113–11117. (1994)
6. Martin K., Safo N., Carmen M., James C., Burnett J. High-resolution Crystal Structure of Deoxy Hemoglobin Complexed with a Potent Allosteric Effector. *Protein Science.*, 10, 951-957. (2001)
7. Privalov P.L. Small Globular Proteins. *Advances in protein Chemistry.*, vol.33, 167. (1979)
8. Khechinashvili N.N. Thermodynamic Properties of Globular Proteins and the Principle of Stabilization of their Native Structure. *Institute of Biological Physics, Pre-print.*, vol. 74. (1989)
9. Fail V., Privalov P. Conformational Changes of Proteins. In Book. *Biokhimicheskaya Termodinamika.* Moscow, Mir., 103. (1982)

10. Wadso I. New techniques in Biophysics and Cell Biology. R.H.Pain & B.J. Smith edition. 85. (1975)
11. Chikvashvili R.I., Monaselidze J.R., Chkhaidze M. et al. Microcalorimetric Study of Hemoglobin in the Wide Range of PH and Polymer Concentration. XIX Yugoslav Symposium on Biophysics and Satellite Symposium “Medical Bioacoustics”, p. 65, Sarajevo – Igman. (1983).
12. Eichhorn G., Marzilli L., Marzilli P. Metal Ions in Genetic Information Transfer. In Book. Pub: New York : Elsevier/North-Holland, (1981)
13. Duguid J., Bloomfield V., Benevides J., Thomas G. Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd. *Biophysical Journal*, Vol 65, 1916-1928. (1992)
14. Volkenshtein M.V. Structure and Physical Properties of Molecules. In Book. - *Molekuliarnaya Biofizika*. Publishing House: “Nauka”, Moscow, 113-123. (1975)
15. Setlow R., Pollard E. Intermolecular Interactions. In Book, *Molecular Biophysics*. New York: Macmillan, 245-266. (1962)
16. Horton N., Etzkorn C. Ca²⁺ Binding in the Active Site of HincII: Implications for the Catalytic Mechanism. *Biochemistry*, vol. 43, 13256-1327. (2004)
17. Andronikashvili E. Malignation and Changes of Physical and Chemical Properties of Biomacromolecules and Supermolecular Structures. *Biofizika*., vol.5, 782-799. (1987)

18. Monaselidze J., Kalandadze Ia., Chanchalashvili Z., Majagaladze G. Thermal Properties of Chromatin in vivo Interaction with $\text{cis}[\text{Pt}(\text{CuO})_2(\text{CuOH})_2]$. *Biofizika*, vol. 37, 43-47. (1992)
19. Sutherland B., Sutherland J. Probes of DNA Structure and Interactions Effects of Copper II on Ultraviolet-Induced Pyrimidine Dimer Formation. *Biophys J.* vol. 9(11), 1329–1336. (1969)
20. Duguid J., Bloomfield V. Electrostatic effects on the stability of condensed DNA in the presence of divalent cations. *Biophys J.* vol. 70(6), 2838–2846. (1996)
21. Zenger V. Principles of the Structural Organization of Nucleinic Acids. In Book, Lehninger A. Principles of Biochemistry. Publishing House: Mir., 257-264. (1974)
22. Mironov A. Structure of Porphyrin. In Book, Encyclopedia of Chemistry., Publishing House: Mir., vol.4, 144-149. (1995)
23. Dougherty T., Kaufman J., Goldfarb A., Weishaupt K. Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors., *Cancer Research*, Vol 38(8) 2628-2635. (1978)
24. Shimanovich R., Groves1 J. Mechanisms of Peroxynitrite Decomposition Catalyzed by FeTMPS, a Bioactive Sulfonated Iron Porphyrin. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, Vol. 387 (2), 307–317. (2001)
25. Lipson R., Baldes E., Olsen A. The Use of a Derivative of Hematoporphyrin in Tumor Detection. *J Natl Cancer Inst.* vol.26, 1–11. (1961)
26. Lipson R., Baldes E., Olsen A. Further Evaluation of the Use of Hematoporphyrin Derivative as a New Aid for the Endoscopic Detection of Malignant Disease. *Dis Chest.* 46, 676–679. (1964)

27. Kobayashi N., Numaoa M.; Komdo R.; Nakajima S. Planar Binuclear Tetrabenzoporphyrin and its Dicopper Derivative. *Inorg Chem.*, vol. 30 (9), 2241-2244. (1991)
28. Huff A.; Chang C.; Cooper K.; Smith K., Dawson J. Imidazole-Ligated and Alkylamine-Ligated Iron (II, III) Chlorin Complexes. *Inorg Chem* 32 (8), 1460-1466. (1993)
29. Bennett B., Schroder H., Leitman D., Waldman S., Murad F. Glycerol Trinitrate-Induced Desensitization of Guanylate Cyclase in Cultured Rat Lung Fibroblasts. *J Pharmacol Exp Ther.* Vol. 245, 413–418. (1988)
30. Morgan A., Selman R. Steven H. Porphyrin Derivatives., *J.C.S.* vol. 2. 1660-1670. (1992)
31. Nappa M., Valentine J. The Influence of Axial Ligands on Metalloporphyrin Visible Absorption Spectra. Complexes of Tetraphenylporphyrinatozinc., *J. Am. Chem. Soc.*, vol.100, 5075–5080. (1998)
32. Wessels J., Nuesse M. Possible Use of Porphycenes as a Membrane Marker for Flow Cytometric Detection of Micronuclei. *Cytometry*, vol.6, 16-20. (1993)
33. Kornberg R.D. Chromatin structure: A Repeating unit of Histones and DNA. *Science*, vol. 184, 868-871. (1974)
34. Olins A., Olins D. Spheroid Chromatin Units. *Science*, vol.183, 868-871. (1974)
35. Wang J.C. The Path of DNA in the Nucleosome. *Cell*, vol. 29, 724-726 (1982)
36. Luger K., Mader A., Richmond R. X-ray Structure of the Nucleosome Core particle at 2.8 Å Resolution. *Nature*. Vol.389, 251-260. (1997)
37. Rhodes D. Chromatin Structure: The Nucleosome Core All Wrapped Up. *Nature*, 389, 231-233. (1997)

38. McGhee J., Fenselfeld G. Nucleosome Structure. *Ann.Rev. Biochem.*, Vol. 59, 1115-1156. (1990)
39. Sperling J., Sperling R. Photochemical Cross-Linking to DNA Nucleosomes. *Nucleic Acids Res.* Vol.5 (8), 2755-27773. (1978)
40. Redon Ch., Pilch D., Rogakou E. Histone H2AX and H2AZ. *Current Opinion in Genetics and Development.*, Vol.12. 162-169. (2002)
41. Shick V.V., Belyavski A.V., Bavykin S.G., Mirzabekov A.D. Primary Organization of the nucleosome core particles. Sequential Arrangement of histones along DNA. *J.Mol. Biol.*, v.139, p.519-536. (1980)
42. Belyavski A.V., Bavykin S.G., Gogvadze E.G., Mirzabekov A.D. Primary Organization of nucleosome containing all Five Histones and DNA 175 and 165 Base-pairs long. *J. Mol.Biol.*, vol.139, 519-536. (1980)
43. Bently G., Finch J., Lewit-Bently A. Neutron Diffraction Studies on Crystals of Nucleosome Cores Using Contrast Variation. *J.Mol.Biol.*, v.155,p.771-784. (1991)
44. Maryshige K., Bonner J. Template Properties of Liver Chromatin. Intermolecular Interactions. .. In Book, *Molecular Biophysics*. New York: *J.Mol.Biol.*, v.17,160-174. (1966)
45. Bonner J., Huang R. Properties of Chromosomal Nucleohistones. *J.Mol.Biol.*, v.6, 169-174. (1963)
46. Fulmer D., Fasman G. Ionic Strength Dependent Conformational Transitions of Chromatin. Circular Dichroism and Thermal Denaturation Studies. *Biopolymers.*, v. 18, 2875-2891. (1979)

47. Monaselidze J.R., Majagaladze G.V., Chikvashvili R.I., Kalandadze Ya.L. Differential Scanning Microcalorimeter for the Investigation of Complex Biological Systems. XIX Yugoslav Symposium on Biophysics and Satellite Symposium "Medical Bioacoustics", Sarajevo-Igman, p.68 (1988)
48. Goldbloom D., Chouinard G. Schizophreniform psychosis associated with chronic industrial toluene exposure: case report. *J. Clin. Psychiatry.*, 46, 350-351 (1985)
49. Damasceno B., de Capitani E. Cerebellar Atrophy Related to Chronic Exposure to Toluene. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, vol. 52, 90-92, (1994).
50. Meulenberg C., Silverberg H. Selective Inhibition of Gamma-Aminobutyric Acid Type a Receptors in Human IMR-32 Cells by Low Concentrations of Toluene *Toxicology.*, 190(3), 243-248. (2003)
51. Wu P., Hoven C., Liu X., Cohen P., Fuller C. Substance Use, Suicidal Ideation and Attempts in Childreb and Adolescents. *Suicide Life Threat Behav.* Vol. 34, 408-20. (2004)
52. Riegel a., French E. Abused Inhalants and Central Reward Pathways: Electrophysiological and behavioral Studies in the Rat *Ann N Y Acad Sci.*, vol.965, 281-291. (2002)
53. Pierce C., Chen Y., Hurtle W., Morgan M. Exponential Modeling, Washout Curve Reconstruction, and Estimation of Half-life of Toluene and its Metabolites. *J Toxicol Environ Health A.*, vol.67, 1131-58. (2004)
54. Pitarque M., Vaglenov M., Nosko A., Hirvonen H., Norpa H. Evaluation of DNA Damage by the Comet Assay in Shoe Workers Exposed to Toluene and other Organic Solvents. *Mutation Research.*, vol. 441, 115-127. (1999)

55. Thiesen, FV, Barros H.M. Measuring Inhalant Abuse among Homeless Youth in Southern Brazil. *J.Psychoactive Drgas*. Vol. 36 (2), 201-205 (2004)
56. Ryu Y., Lee J., Yoon P., Jeon P. Cerebral Perfusion impairment in a patient with Toluene Abuse. *J Nucl Med.*, vol. 39, 632-633. (1998)
57. Kyrklund, T., Kjellstrand P., Haglid K. Brain Lipid Changes in Rats Exposed to Xylene and Toluene. *Toxicology.*, vol.45, 123-133. (1987)
58. Kyrklund T., Haglid K. Brain Lipid Changes after Organic Solvent Exposure. *Ups. J. Med. Sci. Suppl*. Vol. 48, 267-277. (1990)
59. Atay A., Kismet E., Turkbay T. Bone Mass Toxicity Associated with Inhalation Exposure to Toluene. *Biol Trace Elem Res.*, 105(1-3), 197-203 (2005)
60. Hildenbrand F., Schulz C., Sick V., Josefsson G., Magnusson I. Laser Spectroscopic Investigation of Flow Fields and NO-formation in a Realistic SI Engine. *SAE Technical Paper Series*. vol. 98. 148-151. (1998)
61. Von Euler M., Pham T., Hillefors M. Inhalation of Low Concentrations of Toluene Induces Persistent Effects on a Learning Retention Task, Beam-walk Performance, and Cerebrocortical Size in the Rat. *Exp. Neurol.*, vol.163, 1-8. (2000)
62. Calderon-Guzman D., Hernandez-Islas J., Juarez-Olguin H. Effect of Toluene and Cresols on Serotonin in Rat Brain. *Regul Toxicol Pharmacol.*, vol. 45, 1-5. (2005)
63. Mollenhauer H., Morre D. Pikaard D., Clark D. An Ultrastructural Evaluation of Toluene Toxicity using Cultured Mammalian Cells. *J Submicros Cytol Path.* Vol. 22, 523-527. (1990)

64. Dolgo-Saburov V. Role of Cholinreactive Systems Regulation of Cell Genetic Apparatus. *Pharmacol and Toxicol.*, vol. 1, 5-10. (1982)
65. Nakaia N., Murata M., Nagahama M., Hirase T. Oxidative DNA Damage Induced by Toluene is Involved in its Male Reproductive Toxicity. *Free Radic Res.*, vol. 37, 69-76. (2003)
66. Drabkin D., The Crystallographic and Optical Properties of the Human Hemoglobin in Comparison with those of other Species. *JBC.*, vol. 164, 703. (1946)
67. Drabkin D., A Simplified Technique for a Large Skale Crystallization of Human Oxyhemoglobin. Isomorphous Transformations of Hemoglobin and Myoglobin in the Crystalline State. *Archives of Biochemistry and Biophysics.*, vol. 21, 224. (1949)
68. Chikvashvili R., Chkhaidze M. Microcalorimetric Examination of Hemoglobin in Healthy People and Patients with Leucosis. The First USSR Conference “Biofizika Raka”. Chernogolovka. p.148. (1987).
69. Dodge J., Mitchell C., Hanahan D. The Preparation and Chemical Charastiristics of Hemoglobin-Free Ghosts of Human Red Blood Cells. *ABB.*, vol.100, 119. (1963)
70. Chkhaidze M., Monaselidze J., Haroutiunian S.G., Gevorkian S.G., Vardanyan V.I. Microcalorimetric Investigation of Water Soluble DNA-TOEPyP and DNA-Zink TOEPyP Complexes. *Bull.Georg.Acad.Sci.*, vol.174, No.1, 143-145. (2006)
71. Monaselidze J., Majagaladze G., Chikvashvili R. Differential Microcalorimeter. Author’s Certificate # 1267175, USSR. (1986)

72. Tsanev R., Markov G. Quantitative Definition of Nucleic Acids. *Biokhimiya.*, vol.25, 151. (1960)
73. Topchishvili L., Barbakadze Sh., Khizanisvili A. Quantitative Analysis of Polymers. *Biomacromolecules.*, vol.3 (3), 4315-420. (2002)
74. Privalov. P., Monaselidze J., Mrevlishvili G., Majagaladze G. Intermolecular Heat of Fusion of Macromolecules. *J. Experimental Theoretical Physics (USSR).*, vol. 47, 2073-2079. (1964)
75. Gill S.J., Beck K. Differential Calorimeter for Measurements of Heat Transformation of Polymers. *Rev.Sci. Inst.*, vol. 36, 274-276. (1965) Monaselidze J. et al. *Biofizika.*, vol. 5, 950. (1977)
76. Privalov P., Plotnikov V. Adiabatic Differential Microcalorimeter. Certificate of Authorship № 328776. (1974) Boguslav S., Troxler R., Teeter M. Crystal Structure of C-Phycocyanin. *Biophys J.* vol. 76, 2912-2921. (1999)
77. Privalov V. *Advanced Protein Chemistry.*, vol. 39, 191-231. (1988)
78. Boguslav S., Troxler R., Teeter M. Crystal Structure of C-Phycocyanin. *Biophys J.* vol. 76, 2912-2921. (1999)
79. Chpthio C. *J.Mol. Biol.*, vol.104, 1-14. (1976)
80. Privalov P., Makurin P., Plotnikov V., Koriagin V., Polpudnikov V. Differential Adiabatic Microcalorimeter. Certificate of Authorship № 276465. (1968)
81. Hinz H., Privalov V. *europ. J. Biochem.*, vol. 72, 79-86. (1977)
82. Privalov P., Makurin P., Plotnikov V., Koriagin V., Polpudnikov V. Differential Adiabatic Microcalorimeter. Certificate of Authorship № 276465. (1968)
83. Monaselidze J. et al. *Biofizika.*, vol. 5, 950. (1977)

84. Starodub N. Alkaline Denaturation of Fractions of hemoglobin of rats. *Molecular Biology.*, vol. 20, 32-35. (1978)
85. Polet h., Steinhardt J. Sequential Stages in the Acid denaturation of Horse and Human Ferrihemoglobin. *Biophysics.*, vol. 8, 857-859. (1969)
86. Andronikashvili E., Bregadze V., Monaselidze J. Metal Ions in Biological Systems, vol. 23, 331. (1988)
87. Sari M., Battioni J., Dupre D., Mansuy D. Interaction of Cationic Porphyrins with DNA. *Biochemistry.* Vol.29. 17-21. (1990)
88. Pasternack R., Ewen S., Rao A., Meyer A., Freedman M., Collings P., Frey S., Ranen M., Paula J. Interactions of Copper (II) Porphyrins with DNA. *Inorg Chem Acta*, vol.317, 59-71. (1998)
89. Marzilli L., Banville D., Zon G., Wilson W. Pronounced H-1 and P-31 NMR Spectral Changes on Meso-tetrakis(*N*-methylpyridinium-4-yl)Porphyrin Binding to Poly[d(G-C)]·Poly[d(G-C)] and to 3-Tetradecaoligodeoxyribonucleotides: *J. Am. Chem. Soc.*, vol.108, 4188-4192. (1986)
90. Strickland J., Marzilli L., Wilson W. Binding of Meso-tetrakis Porphyrin isomers to DNA: Quantitative Comparison of the Influence of Charge Distribution and Copper (II) Derivatization. *Biopolymers.*, vol.29, 1307-1323. (1990)
91. Bennett M., Krah A., Wien F., Garman E, Mckenna R., Saderson M. A DNA-Porphyrin Minor-groove complex at Atomic Resolution. The Structural Consequences of Porphyrin Ruffling. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, vol.10, 1073-1079. (2001)

92. Dougherty T., Gomer Ch., Henderson B. Photodynamic Therapy. *J.Nat.Cancer Inst.* 90, 899-905. (1988)
93. Majagaladze G., Khachidze D., Barbakadze Sh., Birkaia B., Meskhi T., Chkhaidze M., Monaselidze J. Microcalorimetric Study of poly[d(A-T) d(A- T)] at Very Low Concentrations of Peptide Bioregulator Prostomax. *Bull.Georg.Acad.Sci.*, vol.172., № 3, 546-549. (2005)
94. Privalov. P., Monaselidze J., Mrevlishvili G. Intermolecular Heat of Fusion of Macromolecules. *J. Experimental Theoretical Physics (USSR)*., vol. 47, 2073-2079. (1964)
95. Balbi. C., Abelmoshi M., Parody S., Barboro R. Structural Domains and Conformational Changes in Nuclear Chromatin: Quantitative Thermodynamic Approach of Differential Scanning Calorimeter. *Biochemistry.*, vol. 28, 3220-3229. (1989)
96. Barboro P., Pasini A., Parodi S., Balbi C. Chromatin Changes in Cell Transformation. A Differential Scanning Calorimetry Study.*Biochemical Journal.*, 65, 1690-1699. (1993)
97. Andronikashvili E., Bregadze V., Monaselidze J. Interactions between Nickel and DNA. In Book: *Metal Ions in Biological Systems*, New York, Vol. 23, 331. (1988)
98. Monaselidze J., Chanchalashvili Z., Mgeladze G., Majagaladze G. Thermal Properties of Intact Nucleoproteids *J. Polymer Sci.* vol. 69, 17-20. (1981)
99. Kyrklund T., Haglid K. Brain Lipid Changes after Organic Solvent Exposure. *J.Med. Scu Suppl.* Vol. 48, 267-77 (1990)

- 100.** Nakaia N., Murata M., Nagahama M., Hirase T. Oxidative DNA Damage Induced by Toluene is Involved in its Male Reproductive Toxicity. *Free Radic Res.*, vol. 37, 69-76. (2003)
- 101.** Fulmer D., faman G. Ionic Strength-Dependent Conformational Transition of Chromatin. Circular Dichroism and Thermal Denaturation Studies. *Biopolymers.*, v.18, 2845-2851.(1979)
- 102.** Barboro P., Pasini A., Parodi S., Balbi C. Chromatin Changes in Cell Transformation. A Differencial Scanning Calorimetry Study. *Biochemical Journal.*, 65, 1690-1699. (1993)
- 103.** Barbakadze Sh., Kiladze M., Kvavadze R., Chkhaidze, M., Monaselidze J., Gelazonia L., Svanidze I. Toluene Influence on Stability of White Rat Hippocampus and Bulb Nodules Chromatin *in vivo*. *Biophysics*, Vol. 50, No. 6, 140–144. (2005).