

საჯარო სამართლის იურიდიული პირი
მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტი

ხელნაწერის უფლებით

ეკატერინე თაბუაშვილი

დნმ-ისა და გლობულური ცილების თერმული ლღობის მიკროკალორიმეტრული
თავისებურებანი დენატურანტების თანაობისას

03.00.02 – ბიოფიზიკა

ბიოლოგიის მეცნიერებათა კანდიდატის სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად
წარმოდგენილი

დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა

სამეცნიერო ხელმძღვანელი:
ქიმიის მეცნ. დოქტორი
დ.ე. ხოშტარია

თბილისი - 2006

შინაარსი:

შესავალი;

ნაწილი I. ლიტერატურის მიმოხილვა;

§ 1.1. დნმ-ის აგებულება;

§ 1.2. თანამედროვე წარმოდგენები დნმ-ის ჰიდრატაციისა და იონებთან ურთიერთქმედების შესახებ;

§ 1.3. გლობულური ცილები და მათი აგებულების თავისებურებანი;

§ 1.4. თანამედროვე წარმოდგენები ბმული წყლისა და დენატურანტების როლის შესახებ ცილების სტაბილობაში;

§ 1.5. გამოსაკვლევი ცილების დახასიათება;

ნაწილი II. კვლევის მეთოდები;

§ 2.1. დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრია;

§ 2.2. ექსპერიმენტის ჩატარების პირობები;

§ 2.3. ექსპერიმენტიდან მიღებული შედეგების დამუშავება;

§ 2.4. პრეპარატები და ხსნარები;

ნაწილი III. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა;

§ 3.1. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლლობის შესწავლა 0 - 8.5 მოლ/ლ მარდოვანას შემცველ წყალხსნარებში;

§ 3.2. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლლობის შესწავლა 0 - 10 მოლ/ლ გუანიდინიუმის ქლორიდის შემცველ წყალხსნარებში;

§ 3.3. დნმ-ის თერმული ლლობა ნატრიუმის ქლორიდისა და კადმიუმის ქლორიდის თანაობისას;

§ 3.4. დენატურანტების, ფონური ელექტროლიტისა და იონების დნმ-ზე ზემოქმედების შედარებითი ანალიზი;

§ 3.5. გლობულური ცილების (α -ქიმოტრიპსინი, მიოგლობინი, ლიზოციმი) თერმული დენატურაციის კალორიმეტრული კვლევა მადესტაბილუბელი ფაქტორების ზემოქმედების ქვეშ;

§ 3.6. გლობულური ცილების მადესტაბილუბელი ფაქტორების, დენატურანტის (მარდოვანა) და წინასწარი თერმული "გამოწვის" ზემოქმედების შედარებითი ანალიზი;

დასკვნები;

ციტირებული ლიტერატურა.

შესავალი

თანამედროვე მოლეკულური ბიოფიზიკის ერთ-ერთ ძირითად ამოცანას წარმოადგენს ბიოლოგიური სტრუქტურების დადგენა და შესწავლა მოლეკულურ დონეზე ფიზიკო-ქიმიური მეთოდების გამოყენებით. ეს კი პირველ რიგში გულისხმობს ამ ბიოლოგიური ობიექტების შემადგენელი მაკრომოლეკულების

აგებულებისა და ფუნქციონირების მექანიზმების დადგენას. ფაქტია, რომ არსებობს საკმაო და მჭიდრო კავშირი სტრუქტურასა და ფუნქციას შორის ბიოლოგიურად ისეთი უმნიშვნელოვანესი მაკრომოლეკულებისათვის, როგორებიცაა ცილები, ნუკლეინის მჟავები.

ბიომაკრომოლეკულების *in vivo* სინთეზის და ფუნქციონირების განუყოფელ და უმნიშვნელოვანეს მხარეს წარმოადგენს ამ მოლეკულების ან მათი სტრუქტურული სუბერთეულების, (დომენების, ბლოკების) კონფორმაციული გარდაქმნები, რის შედეგადაც მკაცრად განსაზღვრული ნატიური სტრუქტურის ნაცვლად ვღებულობთ პოლიმერულ ჯაჭვს ან სტატისტიკურ გორგლად დახვეულ რამოდენიმე ჯაჭვს (დენატურირებული მდგომარეობა). ეს გადასვლები ძირითადად გამოწვეულია ამა თუ იმ გარემო პირობების ზემოქმედებით (ტემპერატურული, pH, დენატურანტის კონცენტრაცია). ეს გადასვლები ძირითადად ორი ტიპისაა: დენატურაციულ - რენატურაციული (ანუ დახვევა – განხვევის) და ფუნქციონალური. აქედან პირველი გულისხმობს გადასვლებს გლობალურ (ენერგეტიკულად მკვეთრად განსხვავებულ) სტრუქტურულ, კერძოდ, ნატიურ და ერთ-ერთი სახის დენატურირებულ ფორმებს შორის, ხოლო მეორე – სტრუქტურის (ძირითადად მესამეული) დინამიკურ ცვლილებებს გლობულური ნატიური კონფორმაციის ფარგლებში. ამ გადასვლების შესწავლა ნათელს ჰფენს ამ ობიექტების მასტაბილიზებელი ძალების ბუნებას და კომპლემენტარული ჯაჭვების რღვევის მექანიზმს. სწორედ ეს არის ამ მაკრომოლეკულების ბიოლოგიური ფუნქციონირების ძირითადი არსი.

ცალკეული მაკრომოლეკულების სტრუქტურის და ფუნქციის რაოდენობრივი ფიზიკო-ქიმიური დახასიათება საზოგადოდ შესაძლებელია გარკვეული თერმოდინამიკური და კინეტიკური პარამეტრების საშუალებით, შესაბამისად ვანდ-ჰოფისა და არენიუსის თეორიების გამოყენების გზით. ამ მოდელების გამოყენება ჩვეულებრივად გულისხმობს იმას, რომ საკვლევ სისტემაში თერმოდინამიკურ და კინეტიკურ გადასვლებს ადგილი აქვს ცალსახად ორ თერმოდინამიკურად სტაბილურ მდგომარეობას შორის, თანაც მხოლოდ ერთი თერმოდინამიკურად არასტაბილურ (ანუ აქტივირებულ) მდგომარეობის გავლით.

ექსპერიმენტული თვალსაზრისით ამ გადასვლების (გარდაქმნების) რეგისტრაცია შეიძლება მოხდეს სხვადასხვა ტიპის კალორიმეტრული, სპექტროსკოპული და პოტენციომეტრული მეთოდების საშუალებით.

ბიომაკრომოლეკულები ხასიათდებიან სტრუქტურული და ფუნქციური მრავალფეროვნებით. ამიტომ მოლეკულური ბიოლოგიის ერთ-ერთ ძირითად და ფუნდამენტურ ამოცანას წარმოადგენს ბიოსტრუქტურების ორგანიზაციის პრინციპების აღწერა და ახსნა თავისუფალი ენერჯის იმ ნაწილის ცვლილებით, რომელიც იწვევს დნმ-ის დენატურაციას წყალხსნარში.

ჩვენი სამუშაოს მიზანს წარმოადგენდა ცილებისა და დნმ-ის თერმოდინამიკური და კინეტიკური პარამეტრების განსაზღვრა სკანირებადი მიკროკალორიმეტრიის მეთოდით. მიუხედავად იმისა, რომ ეს პრობლემა ბოლო 25 წლის განმავლობაში ინტენსიურად შეისწავლებოდა სხვადასხვა ქვეყნის ლაბორატორიებში, ბევრი საკითხი მაინც ღიად რჩებოდა. მიკროკალორიმეტრიის გამოყენება საშუალებას გვაძლევს განვსაზღვროთ მთელი რიგი თერმოდინამიკური პარამეტრები ცილებისა და ნუკლეინის მჟავების განზავებულ ხსნარებში სკანირების სხვადასხვა სიჩქარესა და სხვადასხვა ადიაბატურ პირობებში.

ბოლო ორი ათწლეულის განმავლობაში გლობულური ცილების სტრუქტურასა და მისი მასტაბილიზებული ფაქტორების შესახებ წარმოდგენებმა მნიშვნელოვანი პროგრესი განიცადა. დადგინდა, რომ ორი ძირითადი კონფორმაციული მდგომარეობის, ფიზიოლოგიურად აქტიური (ნატივურის) და დენატურირებულის (განხვეულის) განხილვა და ანალიზი არ არის საკმარისი გლობულური ცილების დახვევის კანონზომიერებათა სრულყოფილი გაგებისათვის. კერძოდ, სულ უფრო ცხადი ხდება ე. წ. არასწორად დახვეული და გაღმდვალნი გლობულური ქვემდგომარეობათა ფართო სპექტრის არსებობა. ეს ქვემდგომარეობანი, ძირითად კონფორმაციულ მდგომარეობებთან ერთად მნიშვნელოვან როლს უნდა ასრულებდნენ გლობულური ცილების ფიზიოლოგიურ წრებრუნვაში. ამდენად, „დამატებითი“ ქვემდგომარეობების

გამოვლინება და მათი სხვადასხვა ფიზიკო-ქიმიური მეთოდებით შესწავლა ფრიად აქტუალური ამოცანაა.

ნაშრომის მიზანი. სადისერტაციო ნაშრომის მიზანი იყო გარკვეული ტიპის დნმ-ის (ორაგულის სპერმის) და ტიპური გლობულური ცილების, α -ქიმოტრიპსინის, მიოგლობინისა და ლიზოციმის თერმული ლღობის ზოგიერთი თავისებურების დადგენა არასპეციფიკური მადესტაბილიზებული ფაქტორების ზემოქმედების ქვეშ. კერძოდ, დნმ-ის ტემპერატურით გამოწვეული დენატურაციის მიკროკალორიმეტრული კვლევა შარდოვანასა და გუანიდინიუმის ქლორიდის თანაობისას, შარდოვანას თანაობისას α -ქიმოტრიპსინის ტემპერატურით ინდუცირებული დენატურაციის თერმოდინამიკური პარამეტრების ანალიზი, α -ქიმოტრიპსინის, მიოგლობინისა და ლიზოციმის თერმული ლღობის და განმეორებითი თერმული ზემოქმედებით გამოწვეული დენატურაციის თერმოდინამიკური პარამეტრების ანალიზი.

კვლევის ძირითადი ამოცანები. ამათგან უნდა გამოიყოს შემდეგი:

1. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობის მიკროკალორიმეტრული შესწავლა არასპეციფიკური დენატურანტების, შარდოვანას და გუანიდინიუმის ქლორიდის დანამატების თანაობისას, კონცენტრაციების ფართო (შესაბამისად, 8,5 და 10 მოლ/ლ-მდე) დიაპაზონში.

2. შარდოვანას და გუანიდინიუმის ქლორიდის თანაობისას დნმ-ის თერმული ლღობის თერმოდინამიკური პარამეტრების შედარებითი ანალიზი, მადესტაბილური დანამატების დნმ-თან მოლეკულურ დონეზე ურთიერთმოქმედების თავისებურებათა დადგენის მიზნით.

3. შარდოვანას თანაობისას α -ქიმოტრიპსინის ტემპერატურით ინდუცირებული დენატურაციის თერმოდინამიკური პარამეტრების ანალიზი, დენატურანტის კონცენტრაციების ფართო (8 მოლ/ლ-მდე) დიაპაზონში.

4. α -ჰიმოტრიპსინის, მიოგლობინისა და ლიზოციმის თერმული ლღობის და განმეორებითი თერმული ზემოქმედებით გამოწვეული დენატურაციის თერმოდინამიკური პარამეტრების ანალიზი.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე. სადისერტაციო ნაშრომში პირველად იქნა ჩატარებული დნმ-ის თერმული ლღობის მიკროკალორიმეტრული კვლევა გუანიდინიუმის ქლორიდის თანაობისას, ამ დენატურანტის კონცენტრაციათა ფართო დიაპაზონში, ხოლო შარდოვანას თანაობისას, ამ დენატურანტის კონცენტრაციათა გაფართოებულ დიაპაზონში (წინა სამუშაოებთან შედარებით). პირველად არის ჩატარებული ამ დენატურანტების თანაობისას მიღებული თერმოდინამიკური პარამეტრების შედარებითი ანალიზი. აღმოჩენილია, რომ დნმ-ის თერმული ლღობის კალორიმეტრული ენტალპიების მნიშვნელობები ორივე შემთხვევაში მონოტონურად მცირდება დერანტურანტის 0-დან დაახლოებით 5-6 მოლლ კონცენტრაციის ფარგლებში, ხოლო ამის შემდეგ იწყება ენტალპიების მნიშვნელობების ნაწილობრივი ზრდა. ამავე დროს, თერმული ლღობის სითბოტევადობების მრუდების მაქსიმუმების გადასვლის ტემპერატურები ამჟღავნებენ არსებითად განსხვავებულ ქცევას ამ ორი დერანტურანტის თანაობისას. პირველად არის ჩატარებული α -ჰიმოტრიპსინის, მიოგლობინისა და ლიზოციმის თერმული ლღობისა და განმეორებითი თერმული ზემოქმედებით გამოწვეული დენატურაციის თერმოდინამიკური პარამეტრების (კალორიმეტრული ენტალპია, კალორიმეტრული ენტროპია) შედარებითი ანალიზი. აგრეთვე, ამ პარამეტრებისა და შარდოვანას თანაობისას მიღებული თერმული დენატურაციის თერმოდინამიკური პარამეტრების შედარებითი ანალიზი.

ნაშრომის თეორიული და პრაქტიკული მნიშვნელობა. სადისერტაციო ნაშრომში მიღებული შედეგები მნიშვნელოვანწილად აღრმავებს ფუნდამენტურ ცოდნას ბიომაკრომოკულების (დნმ, გლობულური ცილების) ნატივურ მდგომარეობათა კონფორმაციული სტაბილობის განმსაზღვრელი ფაქტორების

შესახებ, და იმის შესახებ, თუ როგორ ახდენს არასპეციფიკური მადესტაბილურული ზემოქმედება (ისეთი დენატურანტები, როგორცაა შარდოვანა და გუანიდინიუმის ქლორიდი, აგრეთვე თავად ტემპერატურა) ამ მდგომარეობათა დესტაბილიზაციას. პრაქტიკული თვალსაზრისით, მიღებული ცოდნა შესაძლებელია სასარგებლო იყოს სხვადასხვა ტიპის ბიოსენსორებში, ან მზის ენერჯის გარდამქმნელ ბიონიკურ სისტემებში, ბიომაკრომოლეკულების, როგორც ძირითადი აქტიური შემადგენელი კომპონენტების გამოყენების თვალსაზრისით.

ნაშრომის აპრობაცია. სადისერტაციო ნაშრომის შედეგები მოხსენებული იყო: მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტის სამეცნიერო სემინარებზე, 2003, 2005 წწ., და წარდგენილი იყო ორი მოხსენების სახით სრულიად რუსეთის ბიოფიზიკოსთა II ყრილობაზე, მოსკოვში, 1999 წ.

დისერტაციის თემაზე გამოქვეყნებული სამეცნიერო შრომები:

1. M. Makharadze, G. Getashvili, **E. Tabuashvili**; D.E. Khoshtariya “Calorimetric study of selected globular proteins by the method of thermal annealing”.
Bulletin of the Georgian Academy of Sciences, v. 164, №3, 2001, p. 531-534.
2. D.E. Khoshtariya, M. Shushanian, R. Sujashvili, M. Makharadze, **E. Tabuashvili**, G. Getashvili “Enzymatic activity of α -chymotrypsin in the urea-induced molten-globule-like state: A combined kinetic/thermodynamic study”.
Journal of Biological Physics and Chemistry (Basel-Tbilisi), 2003, v. 3, №1 p. 2-10.
3. **E. Tabuashvili**, G. Getashvili, M. Makharadze, L. Tsulukidze, R. Sujashvili, D.E. Khoshtariya. “Calorimetric studies of the thermal denaturation of salmon sperm DNA in aqueous solutions of urea and guanidinium chloride”.
Journal of Biological Physics and Chemistry (Basel-Tbilisi), 2006, v. 6. №1, p. 25-29.
4. M. Shushanian, R. Sujashvili, **E. Tabuashvili**, M. Makharadze, G. Getashvili, D.E. Khoshtariya. “Kinetic and thermodynamic manifestations of thermally-induced molten-globule-like-state of α -chymotrypsin”.
Journal of Biological Physics and Chemistry (Basel-Tbilisi), 2006, v. 6. №2, p. 51-55.

ნაწილი I ლიტერატურის მიმოხილვა

§ 1.1. დნმ-ის აგებულება

ნატივურ დნმ-ს აქვს ორმაგი სპირალის სახე, რაც წარმოადგენს ორი ერთმანეთზე დახვეული პოლინუკლეოტიდური ჯაჭვის ერთობლიობას, რომელთა აზოტოვანი ფუძე-ჯგუფები ერთმანეთთან წყალბადური ბმებით არიან ურთიერთდაკავშირებული. ამასთან ერთი ჯაჭვის ადენინის (A) ჯგუფები უკავშირდება მეორე ჯაჭვის თიმინის (T) ჯგუფებს, ხოლო გუანინის (G) ჯგუფები, შესაბამისად, უკავშირდებიან ციტოზინის (C) ჯგუფებს, და ქმნიან ე.წ. უოტსონ-კრიკის ფუძე-წყვილებს [1]. ამრიგად, დნმ-ის ორი შემადგენელი ჯაჭვი ურთიერთკომპლემენტარულია. სხვადასხვა ექსპერიმენტულ პირობებში დნმ-ი იღებს განსხვავებულ კრისტალურ ფორმებს. ასე მაგალითად, დაბალი (70% - ზე ნაკლები) ფარდობითი ტენიანობის პირობებში დნმ-ი იღებს ე.წ. “მონოკლინურ” A-ფორმას, რომლის კრისტალური მესერის პარამეტრებია: $a = 40.4 \text{ \AA}$, $b = 22, 07 \text{ \AA}$, $\beta = 97.1^\circ$. მეტი ტენიანობის შემთხვევაში წარმოიშობა ჰექსაგონალური B-ფორმა, რომლისთვისაც $a = 46 \text{ \AA}$. მოგვიანებით აღმოჩენილი იყო აგრეთვე C, Z და სხვა ფორმებიც. ამკარაა, რომ დნმ-ის ორმაგი სპირალური ბუნება შესაძლებელია გამოვლინდეს მისი შემადგენელი ჯაჭვების როგორც პარალელური, ისე ანტიპარალელური განლაგების სახით. რენტგენოსტრუქტურული და ბიოქიმიური ანალიზის საშუალებით დადგენილი იქნა, რომ ნატივურ დნმ-ში ჯაჭვების განლაგება ანტიპარალელურია.

დნმ-ის მაკრომოლეკულები მეცნიერებისთვის დღემდე ცნობილი ყველაზე დიდი მოლეკულებია; მაგალითად, *E. coli*-დან გამოყოფილი დნმ-ის სიგრძე 400 მიკრომეტრს აღწევს, რაც დაახლოებით 10^9 D მოლეკულურ მასას შეესაბამება. დნმ-ის წყალხსნარები ძალიან ბლანტია, მაგრამ ეს არ ნიშნავს, რომ ამ მაკრომოლეკულების უაღრესად ხისტი ბუნება არ აძლევს მათ მოხრის საშუალებას. ხსნარებში დნმ-ის მაკრომოლეკულები დახვეულია ძალიან ფაშარ გორგლებად, სადაც დნმ-ის პერსისტენტული სიგრძე 0.15 M NaCl თანაობისას 50 ნმ (დაახლ. 150 ფუძე-წყვილს) აღწევს [1].

მაღალი ტემპერატურის, pH-ის ცვლილებისა, თუ სხვა ზემოქმედების ქვეშ ხდება დნმ-ის ნატივური სტრუქტურის დენატურაცია – ორმაგი სპირალური სტრუქტურის გადასვლა ერთმაგი ჯაჭვებისგან შედგენილ ორ გორგლად. ამ მოვლენის დამხერა შესაძლებელია როგორც სპექტროფოტომეტრული (ულტრაიისფერ უბანში, 260 ნმ მახლობლად, დნმ-ის როგორც სინათლის შთანთქმის, ისე წრიული დიქროიზმის სპექტრებში ცვლილებების დამხერით), ისე მიკროკალორიმეტრული (დიფერენციული მასკანირებელი კალირიმეტრია) მეთოდების გამოყენებით.

დნმ-ის მაკრომოლეკულის ნატივური და მსგავსი კონფორმაციების სტრუქტურა განსაზღვრულია “სუსტი” ურთიერთქმედებებით – წყალბადური ბმებით, ელექტროსტატიკური და დისპერსიული ძალებით. აღსანიშნავია, რომ წყალხსნარების შემთხვევაში დნმ-ის ორმაგი სპირალი ძირითადად უოტსონ-კრიკის მოდელის შესაბამისად ფორმირდება; ანუ, წყალბადური ბმები არსებობს ფუძე-წყვილებში: AU, AT და GC, მაგრამ არა GU, AG და AC. ამის საპირისპიროდ, კრისტალური ნიმუშების შემთხვევაში, აგრეთვე აღმოჩენილი იყო უოტსონ-კრიკის მოდელისგან განსხვავებული, ანუ “დეფექტური” სტრუქტურებიც. აზოტოვანი ფუძეების ზემოაღწერილი “განივი” ურთიერთქმედების გარდა, აგრეთვე უნდა არსებობდეს “გრძივი” ურთიერთქმედებაც, რომელიც განეკუთვნება მეზობელ არაკომპლემენტარულ ფუძე-წყვილებს. ამ ურთიერთქმედებას, რომელსაც ხშირად “სტეკინგს” უწოდებენ, საგრძნობი წვლილი უნდა შეჰქონდეს დნმ-ის ორმაგი სპირალის სტაბილურობაში. ამასთან ერთად, აზოტოვანი ფუძეები წარმოადგენენ π -ელექტრონულ სისტემებს. ურთიერთ-პარალელურად განლაგებულ ბრტყელ π -ელექტრონულ რგოლებს შორის ხორციელდება მნიშვნელოვანი მიზიდულობითი ხასიათის ელექტრონულ-დისპერსიული ურთიერთქმედება, რაც ასევე არსებით წვლილს უნდა იძლეოდეს დნმ-ის ორმაგი სპირალის სტაბილურობაში.

დნმ-ის მაკრომოლეკულისთვის, მისი ნებისმიერი კონფორმაციის შემთხვევაში, დამახასიათებელია ორი, ე.წ. განიერი და ვიწრო (მთავარი და მინორული) “ღარების”, არსებობა, რომლებიც სპირალურად გასდევენ დნმ-ის ორმაგ სპირალს მოლეკულის მთელ სიგრძეზე. ვიწრო ღარი უფრო ღრმაა და

შესაფერის სივრცეს ქმნის წყლის მოლეკულების და კათიონების განსათავსებლად (იხ. ნაწილი III). დნმ-ის A, B და C ფორმები განეკუთვნება მარჯვენა ტიპის სპირალებს, და გარემოს ტენიანობის მიხედვით ადვილად განიცდიან ურთიერთ-გარდასახვას, ხოლო Z-ფორმა წარმოადგენს მარცხენა სპირალს. ეს უკანასკნელი უფრო „მკვრივია“, ვიდრე მარჯვენა სპირალი: ვან-დერ-ვაალსის დიამეტრი ტოლია 18,1-18,4 Å. B-დან Z ფორმაში გადასვლისათვის საჭირო არ არის ჯაჭვების გახსნა. გადასვლა იწყება რამდენიმე ფუძეთა წყვილის გახლეჩვით, რის შედეგადაც გუანინი „მაგრდება“ ცის-კონფორმაციაში, ხოლო დეზოქსიცისტიდინი ბრუნდება როგორც მთლიანი სისტემა. წყალბადური კავშირები აღდგება და ნაშთები კვლავ წარმოქმნიან უოტსონ-კრიკის წყვილებს. ეს ნიშნავს, რომ არ არის საჭირო ერთეულოვანი ჯაჭვების სრული გახსნა და B → Z-გადასვლის უბანი გადაადგილდება სპირალის გასწვრივ მცირე მონაკვეთის სახით. მარჯვენა სპირალის მარცხენაში გადასვლა ხასიათდება აქტივაციის ენერჯის დიდი მნიშვნელობით 21 კკალ/მოლ.

§ 1.2. თანამედროვე წარმოდგენები დნმ-ის ჰიდრატაციისა და იონებთან ურთიერთქმედების შესახებ.

რიგი ექსპერიმენტული მონაცემებისა მოწმობს იმას, რომ დნმ-ი რომელიც წარმოადგენს პოლიელექტროლიტს, ძლიერ და არათანაბრად არის ჰიდრატირებული. მის ირგვლივ წარმოქმნება წყლის ორი დისკრეტული ფენა-პირველი და მეორე ჰიდრატული შრე. დნმ-ის პირველი ჰიდრატული ფენა მოიცავს ერთ ნუკლეოტიდზე 11-12 წყლის მოლეკულას. ამ მოლეკულებს ძალუძთ შეამცირონ დაკავშირების ძალის სიდიდე. ამის მიხედვით ისინი შეიძლება დავეყოს სამ კლასად: ფოსფატთან დაკავშირებული (I), ფოსფორიფორული კავშირებითა და შაქროვანი ნაშთებით (II), ფუძეებით (III) $\approx 80\%$ ფარდობითი ტენიანობის დროს ორმაგი სპირალის პირველადი ჰიდრატული გარსი ივსება და ერთ ნუკლეოტიდზე მოდის დაახლოებით წყლის 20 მოლეკულა. წყლისთვის ატომური ჯგუფის შელწევადობა ნაჩვენებია [2] შრომაში. აქ მოყვანილია მონაცემები, რომლის თანახმადაც A, B და C ფორმების ჰიდრატაციის საშუალო

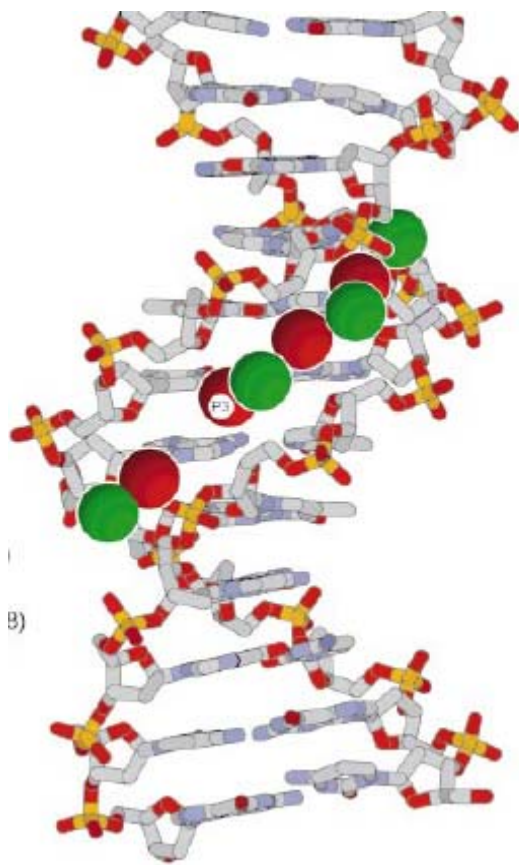
პარამეტრები ოდნავ თუ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან – ყველა მათგანისთვის ჰიდრატული გარსის პირველი ფენა შედგება 1 ნუკლეოტიდზე 16-20 წყლის მოლეკულისაგან. ინფრაწითელი სპექტროსკოპიით მიღებული მონაცემები გვიჩვენებს, რომ ჰიდრატული გარსი თავისი სტრუქტურით განსხვავდება ჩვეულებრივი წყლის სტრუქტურისაგან. დნმ-თან პირდაპირ კონტაქტში არ შედის წყლის 20-ივე მოლეკულა. 8-9 მათგანი უკავშირდება დანარჩენ 11-12 მოლეკულას ჰიდრატული გარსის შიდა არეში. შიდა გარსი შეუღწევადია კათიონების მიმართ და არ „იყინება“ (ე-ი. არ წარმოქმნის ყინულის სტრუქტურას) 0 °C-ზე დაბალ ტემპერატურაზე. გამხსნელისთვის ხელმისაწვდომი ზედაპირი შეადგენს დნმ-ის სრული ზედაპირის 35%. უფრო მეტ ადგილს იკავებს ფოსფატური ჯგუფების ჟანგბადის ატომები – 44%, მათ მოსდევს ალიფატური ნახშირბადის ატომები -35%, ამინოჯგუფის წყალბადი-6%, რიბოზის ჟანგბადი - 5,3%, კარბონილის რგოლის ჯანგბადი -2,6%. ნუკლეოტიდური ფუძეები შეადგენს ზედაპირის 20%, შაქარი - 33%.

მიუხედავად საშუალო სიდიდეებს შორის მსგავსებისა, დნმ-ის ფორმებს შორის განსხვავება მაინც არსებობს, ეს ძირითადად განპირობებულია ორმაგი სპირალის დიდი და მცირე ღარების ჰიდრატაციის განსხვავებული პარამეტრებით. უფრო კონკრეტულად, ამ ფორმის ღარების სრული მოცულობა განლაგდება წყლის 10,5 მოლეკულაზე, მაშინ როცა B ფორმისთვის ეს რიცხვი 19,3-ის ტოლია. წყლის ჩონჩხის სტრუქტურა მკაფიოდაა გამოხატული A-T უბნებში, მაგრამ განიცდის რღვევას G-C წყვილებით მდიდარ უბნებში. ამის მიზეზია ამ უბნებზე გუანინის NH₂ - ის არსებობა, რაც მნიშვნელოვან ბარიერს წარმოადგენს წყლის „ხიდაკის“ წარმოქმნისთვის. [2] ავტორების მოსაზრებით წყლის ჩონჩხის სტრუქტურა ძირითად როლს ასრულებს B დნმ-ის სტაბილიზაციაში.

მეორე ჰიდრატული გარსი ჩვეულებრივი წყლის მსგავსად შედგება კათიონებისთვის და წარმოქმნის ყინული 1-ის სტრუქტურას, თუმცა თავისი სტრუქტურით მაინც განსხვავდება დნმ-ისგან შორს მყოფი წყლის სტრუქტურებისაგან.

B-დნმ-ის ჰიდრატული გარსის მოდელი გულისხმობს ძაფების სიჭარბეს. ძაფები ურთიერთმოპირდაპირე ჯაჭვების ფოსფატებს ერთმანეთთან აკავშირებს დიდ ღარში. ამ შემთხვევაში სტაბილიზაციის ენერგია 15 კკალ (მოლ წყალი). ე.ი. იმდენად დიდია, რომ დნმ-ის ირგვლივ წარმოიქმნება მეორე და მესამე ჰიდრატული შრე, რომლებიც დნმ-ის საერთო რადიუსს ზრდიან 6 Å-ით, ორი შრის შემთხვევაში და 9 Å-ით სამი შრის შემთხვევაში. წყლის ის მოლეკულები, რომლებიც განლაგებულნი არიან შაქარ-ფოსფატურ ჯაჭვებს შორის, ძირითად და მინორულ ღარებს შიგნით დნმ-თან სუსტადაა დაკავშირებული. მათი სტაბილიზაციის ენერგია ≈ 10 კკალ (მოლ წყალი)⁻¹.

ჰიდრატაციის როლი ორმაგი სპირალის სტაბილიზაციაში ძირითადად დაკავშირებულია განზიდვის შემცირებასთან (შესუსტებასთან) უარყოფითად დამუხტულ მეზობელ ფოსფატებს შორის (15 კკალ (ფუძეთა წყვილი)⁻¹) ჰიდრატაციისას ძლიერდება მიზიდულობა ფუძეებსა და ფოსფატურ ჯგუფებს შორის (12 კკალ მოლ) და იცვლება მეზობელი ფუძეების სტეკინგი (7-10 კკალ მოლ). ფოსფატების განზიდვის შესუსტება გამოწვეულია ელექტროსტატიკური ძალების შესუსტებით და გარკვეულწილად პოლარიზაციის ენერგიის გაზრდით. ფოსფატებსა და ფუძეებს შორის მიზიდულობის გაზრდა განისაზღვრება პოლარიზაციის ენერგიის და დისპერსიული ენერგიის გაზრდით. სტეკინგზე ჰიდრატაციის მასტაბილიზებელი მოქმედება დაკავშირებულია ელექტროსტატიკურ და დისპერსიულ ურთიერთქმედებებთან. პოლარიზაციის როლი დიდი არაა, სტეკინგის წარმოქმნის ენერგიაში განზიდვის წვლილი არის 5 კკალ მოლ, ხოლო ჯამური ენერგიული მოგება 7-10 კკალ მოლ (GC წყვილებისთვის).



სურათი 1.1. პირველი
 სოლვატური წყლის
 მოლეკულების და
 ზოგიერთი საპირწონე
 იონის (მაგალითად, Na^+)
 განლაგება დნმ-ის
 “მცირე” დარის მახ-
 ლობლობაში.

§ 1.3. გლობულური ცილები და მათი აგებულების თავისებურებანი.

გლობულური ცილების სტრუქტურული იერარქია. ცილების ძირითადი თავისებურება გამოიხატება იმაში, რომ წარმოქმნან სპეციფიკური ბიოლოგიური ფუნქციის განხორციელებისათვის საჭირო დინამიკური თვისებების მქონე დეტერმინირებული სივრცითი სტრუქტურა, მხოლოდ იმ ინფორმაციის გამოყენებით, რომელსაც შეიცავს ამინომჟავების თანამიმდევრობა. სწორედ ასეთმა სტრუქტურამ მიიღო ცილის ნატივური მდგომარეობის სახელწოდება. ცილები უამრავ ბიოქიმიურ ფუნქციას ასრულებენ. ცილის მაკრომოლეკულების ერთ-ერთი ყველაზე დამახასიათებელი თვისებაა კატალიზური აქტიურობა, მაგრამ, გარდა ამისა, არის ცილები, რომლებიც ასრულებენ შემკუმშავ, საყრდენ, რეცეპტორულ, სატრანსპორტო, სარეგულაციო, იმუნურ და მრავალ სხვა ფუნქციას. ფუნქციების ამ მრავალფეროვნებას ბუნებრივად შეესაბამება ცილის სტრუქტურული ფორმების მრავალფეროვნება [3]. ამ მრავალფეროვნებას საფუძვლად უდევს მოცემული ცილის შემადგენლობაში შემავალი ყველა ამინომჟავას გვერდითი ჯგუფების თავისებურებანი, რომლებიც განსაზღვრავენ მისი, როგორც ბიოლოგიური ფუნქციური ერთეულის თვისებას [4,5].

როგორც სხვადასხვა ცილის სივრცითი სტრუქტურის შედარებისას გამოირკვა, მიუხედავად იმისა, რომ თითოეულ ცილას უნიკალური კონფორმაცია აქვს, არსებობს ჯაჭვის რამდენიმე ტიპის წყობა, რომლებიც ამა თუ იმ სიხშირით მეორდება მაკრომოლეკულების ცალკეულ ნაწილებში. განსაკუთრებით ხშირად გვხვდება α -სპირალისა და β -სტრუქტურების ტიპის პერიოდული სტრუქტურები (და მათი მოდიფიკაციები) [6,7], აგრეთვე ხვეულები, რადგან ისინი განპირობებულია თვით პეპტიდურ ჯგუფებს შორის წყალბადური ბმების სწორი წარმოქმნით, და არა გვერდითი ჯაჭვების უნიკალური ურთიერთმოქმედებით. ასეთმა პერიოდულმა სტრუქტურებმა სხვადასხვაგვარ ცილებში შეიძლება დიდი სახეცვლილება განიცადონ. (თუ მიოგლობინს 80% სპირალური სტრუქტურა აქვს, მთელ რიგ ცილებში იგი შეიძლება საერთოდ არ იყოს). ამის მიზეზი არის ის, რომ ზოგიერთი ამინომჟავა სტაბილურს ხდის სპირალს (ალა, გლი, მეთ), ხოლო სხვები

შლიან (სერ, ცის). სპირალიზაცია ირღვევა იმის გამო, რომ არახელსაყრელი კონტაქტები მყარდება სპირალურ ჯაჭვსა და გვერდით ჯაჭვებს შორის, რომლებსაც აქვთ განშტოება C^{β} ატომის მახლობლად (ვალ). მეორე მიზეზი ის არის, რომ ძირითადი ჯაჭვის ამიდურ ჯგუფსა და ჰეტეროატომს შორის გვერდით ჯაჭვში წარმოიქმნება ძლიერი წყალბადური ბმა, რომელსაც შეუძლია კონკურენცია გაუწიოს პეპტიდურ ჯგუფებს შორის შიდაჯაჭვურ წყალბადურ ბმას [8]. α -სპირალები და β -სტრუქტურები შეადგენს ცილის მეორეული სტრუქტურის საფუძველს – უფრო ზოგადი სახით მეორეული სტრუქტურა შეიძლება განისაზღვროს, როგორც ყველა სამგანზომილებიანი უბნის ერთობლიობა, რომლებსაც აქვთ ძირითადი ჯაჭვის მოწესრიგებული, ლოკალურ-სიმეტრიული სტრუქტურა. α -სპირალები და β -ფორმები წარმოადგენს ცილის გლობულის სივრცითი სტრუქტურის ელემენტებს, მაგრამ ბიოლოგიურად აქტიური და ფუნქციურია ცილის უნიკალური სივრცითი სტრუქტურა, რომელიც მეორეული სტრუქტურის ელემენტების გარდა, საერთოდ, განპირობებულია მოცულობითი ურთიერთმოქმედებით, როგორც არის გვერდითი ჯაჭვების უნიკალური ურთიერთმოქმედება, ახლო და შორეული რიგის ჰიდროფობული ურთიერთმოქმედება, მარილოვანი ბმები, დისულფიდური ხიდაკები. როგორც მიღებულია, ასეთი სახის სტრუქტურას მესამეულს უწოდებენ [9]. სინამდვილეში ძნელია გლობულური ცილის მეორეული და მესამეული სტრუქტურების გაყოფა – ფაქტობრივად, საქმე გვაქვს ერთადერთ სივრცით სტრუქტურასთან, რომელიც შეიცავს ამა თუ იმ რეგულარულ უბანს და მოუწესრიგებელ რგოლებს. დიდი ცილების ნატივური გლობულის სტრუქტურა (მაგ., კინაზები და დეჰიდროგენაზები, პაპაინი, თერმოლიზინი და სხვ.) გართულებულია იმით, რომ იგი შედგება ორი ან რამდენიმე სუბგლობულისგან – დომენებისაგან, რომლებიც შეერთებულია პოლიპეპტიდური ჯაჭვის ერთი ან ორი მოქნილი არასტრუქტურირებული ჭიმით. დომენების სიდიდე ძალზე ცვალებადია, ისინი შეიძლება შეიცავდნენ 40-დან 400-მდე ამინომჟავურ ნაშთს [10]. ფერმენტებში დომენებს შორის ხშირად განლაგებულია კატალიზური ცენტრი. ზოგიერთი დომენის სტრუქტურა შეიძლება იმდენად მყარი და დამოუკიდებელი იყოს, რომ იგი არ

იცვლება ლიმიტირებული პროტეოლიზის შედეგად ამ დომენების განცალკევებისას (მაგ. ტროპონინის შემთხვევაში [10]). ერთი პოლიპეპტიდური ჯაჭვისაგან აგებული გლობულები – მონომერები – ბევრ ცილაში უერთდებიან სტრუქტურითა და ფუნქციით მსგავს ან განსხვავებულ მონომერებს და ქმნიან უმაღლესი რიგის გლობულას – ოლიგომერს, რომლისთვისაც უკვე დამახასიათებელია მეოთხეული სტრუქტურა. მონომერების ან სუბერთეულების რაოდენობა ოლიგომერში შეიძლება ძალზე ფართოდ ვარიირებდეს. ოლიგომერი წარმოიქმნება დამოუკიდებელი სუბერთე-ულების არაკოვალენტური ურთიერთმოქმედებით, ამასთანავე ეს სუბერთეულები ოლიგომერში შეიძლება განლაგებული იყოს როგორც სიმეტრიულად, ისე არასიმეტრიულად. გლობულური ცილების ორგანიზაციის იერარქიული დონე დაკავშირებულია ფუნქციურ დატვირთვასთან. დისოციაცია სუბერთეულებზე და პირუკუ ასოციაცია ღრმად ცვლის ცილების ფუნქციურ თვისებას. მაგალითად, ფოსფორგლიცერინის ალდეჰიდის ფერმენტი დეჰიდროგენეზა კარგავს აქტიურობას, როდესაც ცილის ორი მოლეკულა შეერთდება და ერთ მოლეკულად გარდაიქმნება, ფერმენტი ტუტე ფოსფატაზა კი, პირიქით, კარგავს აქტიურობას სუბერთეულებად დაყოფისას [11-13]. ამგვარად, რთულ კომპლექსებში გლობულური ცილების ასოციაცია-დისოციაციის რეაქციები ხშირად მათი ბიოლოგიური აქტიურობის საფუძველს წარმოადგენს.

ამინომჟავური ნაშთების ნახევრადფუნქციონირების შედეგად გლობულის შენარჩუნებაში მონაწილეობს სხვადასხვა ძალა. ერთადერთი ძლიერი ურთიერთმოქმედება გლობულაში არის კოვალენტური დისულფიდური ბმები ცისტეინის ნაშთებს შორის. ერთი ჯაჭვის ან რამდენიმე ჯაჭვის რგოლებს შორის რამდენიმე დისულფიდური «ნაკეცი» შესამჩნევად ზღუდავს ჯაჭვის შესაძლო კონფორმაციებს. მაგრამ, ურთიერთმოქმედება დისულფიდური ხიდაკებით რომ იფარგლებოდეს, გლობულაზე ლაპარაკი, საერთოდ ზედმეტი იქნებოდა. გლობულის სივრცითი ფორმა ყალიბდება ძირითადად სუსტი ურთიერთმოქმედებით – ვან-დერ-ვალსის ძალებით, წყალბადური ბმებით, დამუხტული იონოგენური ჯგუფების ელექტროსტატიკური

ურთიერთმოქმედებით (მარილოვანი ბმები) და რაღა თქმა უნდა, @»ჰიდროფობული ურთიერთმოქმედებით».

შიდამოლეკულური წყალბადური ბმები და სხვა პოლარული ურთიერთქმედებანი. წყალბადურ ბმებსა და ვან-დერ-ვალსის ურთიერთმოქმედებას, მათი მსგავსი ბუნების გამო, ხშირად ერთად განიხილავენ ცილის მასტაბილიზებელი სივრცითი სტრუქტურის ძალებზე მსჯელობისას. ვან-დერ-ვალსის ძალები ჩნდება ორ ატომსა ან ორ მოლეკულას შორის, რომლებიც ერთმანეთთან ახლოს იმყოფებიან და განპირობებულია დიპოლ-დიპოლური ურთიერთმოქმედებით, მუდმივი, ინდუცირებული და ოსცილირებადი დიპოლების მონაწილეობით. ვან-დერ-ვალსის ძალები ხანმოკლედ მოქმედი ძალებია და უაღრესად არიან დამოკიდებული ატომებს შორის მანძილზე. ამჟამად, ბოლომდე გარკვეული არ არის, რა შემთხვევებში ახდენენ ეს ძალები ცილის მოლეკულის სტაბილიზაციას ან დესტაბილიზაციას [14]. რადგან ცილის გაშლის დროს, საშუალო ატომებს შორის მანძილი ძალიან არ იცვლება, უნდა ვივარაუდოთ, რომ ვან-დერ-ვალსის ძალებს მხოლოდ მცირეოდენი წვლილი შეაქვთ გაშლის თავისუფალ ენერგიაში, მაგრამ, ატომებს შორის მანძილის განაწილება ცილის გაშლის დროს, საკმაოდ იცვლება, რადგან დახვეული ცილის შიგთავსი მჭიდროდ არის ჩალაგებული მცირე ორგანული მოლეკულების კრისტალების მსგავსად [15,16]. ასეთმა მჭიდრო წყობამ შეიძლება განაპირობოს სტაბილიზაციის მეტად მნიშვნელოვანი ენერგია იმ შორეული რიგის კონტაქტების ხარჯზე, რომლებიც მყარდება სივრცეში დაახლოებულ ამინომჟავური ნაშთების გვერდით ჯგუფებს შორის, ამავე დროს, ვან-დერ-ვალსის კონტაქტების ოპტიმალური ქსელის წარმოქმნას ხელს უშლის როგორც არარეგულარულობა ჩაწყობაში, ისე ენტროპიული ფაქტორიც, რომელიც ესწრაფვის ჯაჭვის სიხისტის შესუსტებას. ცილის საერთო სტაბილურობაში ვან-დერ-ვალსის კონტაქტების წვლილის უტყუარი რაოდენობრივი შეფასებების უქონლობის მიუხედავად, ცხადია, რომ მათ ძლიერი ზემოქმედება უნდა მოახდინონ დახვევის სპეციფიკურობაზე, რადგან სტაბილური ნატივური კონფორმაციების

დაკმაყოფილება შეუძლია მხოლოდ იმ თანამიმდევრობას, რომელსაც შესწევს უნარი წარმოქმნას მჭიდროდ ჩაწყობილი ბირთვი ახლო და შორეული კონტაქტების მაქსიმალური რეალიზაციითურთ [14].

ცილის გლობულის სტაბილურობაში წყალბადური ბმების წვლილიც დღემდე საკმაოდ საკამათო თემაა [17,18]. როგორც ცნობილია, წყალბადური ბმები განპირობებულია ელექტროსტატიკური ბუნების ურთიერთმოქმედებით, რომელიც ჩნდება მაშინ, როდესაც წყალბადის ატომი მდებარეობს ერთ ხაზზე ორ ელექტროუარყოფით ატომს შორის. წყალბადური ბმის ბუნება რთულია და არ დაიყვანება მარტო ელექტროსტატიკურ მიზიდულობამდე. წყალბადური ბმით დაკავშირებულ ელექტროუარყოფით ატომებს შორის მანძილი შესაბამისი ატომების ვან-დერ-ვალსის რადიუსებზე დაახლოებით 0.04 ნმ-ით ნაკლებია. ელექტროსტატიკურ ურთიერთმოქმედებასთან, ვან-დერ-ვალსის მიზიდვა-განზიდვასთან ერთად, წყალბადური ბმის ენერგიაში წვლილი შეაქვს A-Bორი ელექტრონის და მეორე ელექტროუარყოფითი ატომის ელექტრონების გაუყოფელი წყვილის ენერგიას.

პოლინგისა და კორის დროიდან, წყალბადური ბმები გამოცხადებული იყო ბიომაკრომოლეკულების ენერგეტიკის საფუძვლად. მაგრამ, შემდგომში, პირველ პლანზე სულ უფრო მეტად დგებოდა ჰიდროფობული ურთიერთმოქმედება, როგორც დომინანტური ძალა, რომელიც უზრუნველყოფს ცილის სტაბილურობას. ამას ხელს უწყობდა მოდელური ნაერთების გარკვეული ექსპერიმენტული გამოკვლევები, რომელთა მეოხებითაც გაირკვა, რომ სტაბილურობაში მაინც და მაინც დიდი წვლილი არ მიუძღვით წყალბადურ ბმებს [19,22]. მიუხედავად ამისა, ცილის მუტაგენეზის [20] შესახებ მონაცემები და ცილის კრისტალური სტრუქტურის [24] გამოკვლევები, ისევე როგორც გილისა და პრივალოვის [17] კალორიმეტრიული გამოკვლევები, ცხადყოფს, რომ წყალბადური ბმები, ყოველივეს მიხედვით, მეტად არსებით როლს ასრულებენ ბიომაკრომოლეკულებში. იმ სიძნელის მიუხედავად, რომელიც თან სდევს რაოდენობრივი შეფასებების მიღებას, მთელი რიგი არგუმენტები ადასტურებენ

თვალსაზრისს, რომ წყალბადურ ბმებს უაღრესად დიდი მნიშვნელობა აქვს გლობულური სტრუქტურის დახვევისა და შენარჩუნებისათვის:

შიდამოლეკულურ წყალბადურ ბმებს დახვეულ ცილაში უპირატესობა ენიჭება, ვიდრე ცილის გაშლილ მოლეკულასა და წყალს შორის წარმოქმნილ ბმებს, ტრანსლაციური და როტაციული ენტროპიის ნაკლები დანაკარგის შედეგად [21].

წყალბადური ბმების უმრავლესობა, როგორც თვით წყალში, ისე წყალსა და ცილას შორის, ჩვეულებრივ არსებობს მხოლოდ დროის რაღაც მონაკვეთში, მაშინ როდესაც წყალბადური ბმები თვით ცილაში თითქმის მუდმივია [14]; ამის შედეგად, წყალბადურ ბმებს ნატივურ ცილაში მეტი უარყოფითი ენტალპია უნდა ჰქონდეთ. აღსანიშნავია, რომ ეს არგუმენტი, რომელიც ხშირად მოჰყავთ, რამდენადმე ეწინააღმდეგება პირველ მტკიცებულებას, რადგან წყალბადური ბმა, რომელიც მხოლოდ დროის რაღაც ნაწილში არსებობს, გულისხმობს ტრანსლაციური და როტაციული ენერჯის ნაკლებ დაკარგვას წყალბადურ ბმასთან შედარებით, რომელიც დროის თვალსაზრისით გაცილებით დიდხანს არსებობს.

წყალბადური ბმა ძირითად როლს ასრულებს ისეთი მეორეული სტრუქტურების ელემენტების სტაბილიზაციაში, როგორც არის β -სპირალები და β -ფორმები [23]. ნატივურ ცილებში, პოლარული ჯგუფების თითქმის ნახევარი ჩაძირულია ცილის შიგთავსში და ყველა ისინი უცვლელად არიან დაკავშირებული წყალბადური ბმებით. სპირალის წარმოქმნას შეუძლია შეასრულოს დირექტიული როლი ცილის დახვევის პროცესში. გარდა ამისა, წყალბადურ ბმებს აქვთ განსაკუთრებით დიდი მნიშვნელობა ცილის მოლეკულის ზედაპირზე მიმდინარე მრავალი ურთიერთმოქმედებისათვის [18,25].

ცილის სტაბილურობაში ეგრეთ წოდებულ ელექტროსტატიკურ ურთიერთქმედებათა წვლილი, რომლებიც არსებითად წარმოადგენენ საპირისპიროდ დამუხტული იონოგენური ჯგუფების ელექტროსტატიკურ მიზიდულობას, განსაკუთრებით არის დამოკიდებული pH გარემოზე. დაბალი ან მაღალი pH-ის დროს, ცილები არასტაბილური ხდება მუხტების განზიდვის

მზარდი ძალის გამო. ნეიტრალური pH-ის დროს და იზოელექტრული წერტილების ახლოს, ამ ძალებს თუმცა გარკვეული წვლილი შეაქვთ სტაბილიზაციის თავისუფალ ენერჯიაში, მაგრამ სულაც არ ასრულებენ დომინანტურ როლს [22,28]. ცილის ზედაპირზე ელექტროსტატიკური ურთიერთმოქმედება ანაზღაურდება ენტროპიის დაკარგვით ურთიერთმოქმედი პარტნიორების იმობილიზაციის ხარჯზე [66] და ამიტომ შედარებით მცირე წვლილი შეაქვთ გლობულის ჯამურ სტაბილურობაში [28]. მარილოვანი ბმები ცილებში სტაბილიზდება წყლის გარემოცვით, რადგან მათი წარმოქმნისას თავისუფლდება წყლის ორიენტირებული მოლეკულები, რომლებიც გარემოცავენ დამუხტულ ჯგუფებს. ამის შედეგად, მარილოვანი ბმების წარმოქმნას თან სდევს წყლის ენტროპიის გაზრდა. თავისუფალ ენერჯიაში ეს მოგება უფრო მნიშვნელოვანია, ვიდრე მუხტების კოლონური ურთიერთმოქმედებით განსაზღვრული მოგება [15]. მაგრამ, მარილოვან ბმაზე წყლის ზემოქმედება განსხვავდება ჰიდროფობული ეფექტისაგან – მარილოვანი ბმები ძლიერდება, ჰიდროფობული კი სუსტდება არაწყლოვანი გამხსნელების დამატებისას [15].

კონფიგურაციული ენტროპია. გლობულური ცილების სტაბილუ-რობის განხილვისას მხედველობაში უნდა ვიქონიოთ კიდევ ერთი მნიშვნელოვანი ფაქტორი – კონფიგურაციული ენტროპია. საერთოდ, ცილების გაშლილი მდგომარეობა წარმოადგენს სხვადასხვა კონფორმაციების ანსამბლს, რომელთაგან არც ერთი არ წარმოქმნის მნიშვნელოვან პოპულაციას. ამიტომ, დახვეული გლობულური ფორმის წარმოქმნა გულისხმობს კონფორმაციული თავისუფლების ხარისხების უმრავლესობის დაკარგვას. კონფიგურაციული ენტროპიის დაკარგვა ძირითადი ფაქტორია, რომელიც ხელს უშლის პოლიპეპტიდური ჯაჭვის დახვევას. ამ ფაქტორის რაოდენობრივი შეფასება უფრო ძნელია [14,22]. თუ რაოდენ დიდი მნიშვნელობა აქვს კონფორმაციული ენტროპიის ამსახველ ფაქტორს, ნაჩვენები იყო ექსპერიმენტებში, რომლებშიც სტრუქტურის სტაბილიზაციისათვის იქმნებოდა განივი კოვალენტური ბმები, რომლებიც შეეფარდება ცილის ნატივურ სტრუქტურას. სტაბილიზაცია იქმნება გაშლილ მდგომარეობაში ხელმისაწვდომი კონფორმაციების რიცხვის შემცირების გზით.

ლიზოციმსა და რიბონუკლეაზა წარმოქმნილი ცალკეული განივი ბმები 29-25 გრადუსით ზრდიდა დენატურაციის ტემპერატურას. თერმოდინამიკურმა ანალიზმა ცხადყო, რომ რიბონუკლეაზა A განივი ბმა იძლევა, დაახლოებით 5 კკალ/მოლ სტაბილიზაციურ ენერგიას ენტროპიული ფაქტორის ხარჯზე [27].

ჰიდროფობული ეფექტი. ცილის გლობულიზაციისათვის ჰიდრო-ფობული ურთიერთმოქმედების განმსაზღვრელ მნიშვნელობათა შესახებ კაუცმანმა ჯერ კიდევ 1954 წელს გამოთქვა ვარაუდი, რომ ამინომჟავური ნაშთების არაპოლარული რადიკალები გაურბიან წყალთან კონტაქტებს, და უპირატესად ერთმანეთთან აქვთ ურთიერთქმედება [29]. პოლარული რადიკალები, პირიქით, სწორედ წყალთან ურთიერთმოქმედებენ. ამის შედეგად ცილის მოქნილი მაკრომოლეკულა წყალში გლობულად ეხვევა, და ცდილობს მიიღოს ფორმა, რომელიც დაეხმარება, თავი აარიდოს არასასურველ კონტაქტებს არაპოლარული რადიკალების წყალთან მაშინ, როდესაც პოლარული ნაშთები განლაგდება გლობულის ზედაპირზე. თუ ჰიდროფილური ნაშთების რაოდენობა საკმარისია სფეროს ზედაპირის დასაფარად, გლობულა მიიღებს ელიფსოიდის ფორმას, თუ ჰიდროფილური ნაშთები არ არის საკმარისი, მაშინ რჩება დაუცავი ჰიდროფილური უბნები, რასაც მოჰყვება გლობულების შერწყმა და მეოთხეული სტრუქტურების წარმოქმნა [35]. მაგრამ ეს რამდენადმე გამარტივებული მიდგომაა, რადგან არ შეიძლება 20 ტიპის ნაშთების მხოლოდ ორი ტიპით შეცვლა. როდესაც «ჰიდროფობულობის ხარისხზე» ვლაპარაკობთ, მხედველობიდან არ უნდა გამოგვრჩეს მისი რაოდენობრივი ხარისხი [30]. ამინომჟავური ნაშთების ჰიდროფობულობის ხარისხი, ძირითადად, იძლევა ინფორმაციას წყლის გარემოცვაში გლობულის სტაბილიზაციისა და ფორმის შესახებ. მაკრომოლეკულების ფარგლებში ჰიდროფობული, ჰიდროფილური და ნეიტრალური ჯგუფების განლაგების სტატისტიკური ხასიათისა და გლობულის ზედაპირზე ან მის შიგნით ჯგუფის გადატანის (გადაადგილების) თავისუფალი ენერგიის მნიშვნელობის გათვალისწინებით, ბრანდტის მიერ შესრულებულმა დეტალურმა გაანგარიშებებმა ცხადყო, რომ ჰიდროფობული ჯგუფები (დაახლოებით 20) შეიძლება განლაგდეს გლობულის ზედაპირზე [30].

ექსპერიმენტებმა დაადასტურა, რომ მთელ რიგ შემთხვევებში, არაპოლარული ჯგუფების რაოდენობა ზედაპირზე შეიძლება აღემატებოდეს კიდევ მათ რიცხვს ცილის შიგნით (მაგალითად, ლიზოციმის მოლეკულაში მათი რიცხვი არის, შესაბამისად, 32 და 16). როგორც ჩანს, ჰიდროფობულ ძალებს გადამწყვეტი მნიშვნელობა აქვთ ცილის გლობულის ტოპოგრაფიის ზოგადი ხასიათის განსაზღვრისათვის, მაგრამ მაკრომოლეკულის ფარგლებში ურთიერთმოქმედების ნამდვილი სურათი გაცილებით რთულია. ცილის გლობულის საერთო ტოპოგრაფია განისაზღვრება იმით, რომ მის ზედაპირზე, ძირითადად, განლაგებულია წყალთან ელექტროსტატიკური და წყალბადური ბმებით დაკავშირებული პოლარული ჯგუფები, აგრეთვე, მცირე რაოდენობის არაპოლარული ჯგუფები, მაშინ, როდესაც არაპოლარული ჯგუფების ძირითადი რაოდენობა გლობულის შიგნით იმყოფება და მის ჰიდროფობულ ბირთვს ქმნის [8]. შიდამოლეკულური წყალბადური ბმები ვან-დერ-ვალსის ურთიერთქმედებასთან ერთად წარმოადგენს უმნიშვნელოვანეს ფაქტორს, რომელიც განსაზღვრავს გლობულის სამგანზომილებიან კონფორმაციას. ჰიდროფობული ჯგუფები წარმოქმნიან მთელ ჰიდროფობულ უბნებს მეორეული სტრუქტურების ძირითადი სეგმენტების α -სპირალებისა და β -სტრუქტურების ზედაპირზე. ამის მეოხებით თითოეული სტრუქტურული სეგმენტის სიგრძე განისაზღვრება ჰიდროფობული ზედაპირის ზომით ან მის შემადგენლობაში შესული ჰიდროფობული ჯგუფების რაოდენობით. მიოგლობინის მოლეკულის მაგალითით ადვილად დავინახავთ, რომ ამ ცილის α -სპირალებში შეინიშნება არაპოლარული ამინომჟავური ნაშთების პერიოდული განლაგება [31]. სპირალური თანამიმდევრობანი იმგვარად არის ორიენტირებული, რომ ეს ნაშთები განლაგებული აღმოჩნდება სწორედ გლობულის ბირთვში. პოლიპეპტიდური ჯაჭვის სპირალიზაცია თერმოდინამიკურად ხელსაყრელია მთელი რიგი ამინომჟავებისათვის, რადგან იგი უზრუნველყოფს წყალბადური ბმების გაჯერებას. მაგრამ β -სპირალიზაცია, ისევე როგორც β -სტრუქტურების წარმოქმნა, განისაზღვრება, ამასთანავე, ჰიდროფობული ურთიერთ-ქმედებებითაც. სხვაგვარად რომ ვთქვათ, მეორეული სტრუქტურა სტაბილიზდება ცილის

სივრცითი სტრუქტურით. შედარებით მარტივი სტერეოქიმიური მოსაზრებების საფუძველზე, რომლებიც ემყარება ვ. ლიმის, პტიცინის პოპულარულ მოდელს, დადინახავთ, რომ კონკრეტული α -სპირალის ან β -უბნის ჰიდროფობული ჯგუფები ერთმანეთს შორის შუალედებში შეიცავენ სხვა უბნების ჰიდროფობულ ჯგუფებს, რითაც ქმნიან ცილის მჭიდრო ჰიდროფობულ ბირთვს [32,33]. ეს უკანასკნელი ეკრანირდება წყლისაგან და სტაბილიზდება ასევე გრძელ ჰიდროფობულ ჯგუფებად, რომლებიც განლაგებულია ჰიდროფობული უბნის ნაპირებზე. იქვე განლაგებული მოკლე პოლარული უბნები, პირიქით, ახდენენ ამ სტრუქტურული სეგმენტების დესტაბილიზაციას.

§ 1.4. თანამედროვე წარმოდგენები ბმული წყლისა და დენატურანტების როლის შესახებ ცილების სტაბილობაში.

ბმული წყალი და ნატივური მდგომარეობა. ყოველთვის უნდა ვიქონიოთ მხედველობაში, რომ რთული ამინომჟავური შემადგენლობის მქონე პოლიპეპტიდური ჯაჭვი, რომლის ნარჩენები უნიკალურად მონაცვლეობენ ჯაჭვის გასწვრივ, ცილად გადაიქცევა მხოლოდ მას შემდეგ, როდესაც უნიკალურ სამგანზომილებიან სტრუქტურად დაიხვევა წყლის გარემოცვაში. ცილები ფუნქციონირებენ წყალში, რომელიც აქტიურად მოქმედებს დაშლილ მოლეკულებზე. ცილის მაკრომოლეკულას წყლის გარემოცვაში სპეციფიკური აგებულება აქვს და განსხვავდება მისი აგებულებისაგან სხვა გარემოცვაში. ამასთანავე ცილის დახვევა-განხვევის (გაშლის) პროცესების შესწავლა შეუძლებელია, თუ არ გავითვალისწინებთ თვით წყლის თვისებასა და სტრუქტურას, აგრეთვე იმას, თუ როგორ იცვლება ეს სტრუქტურა დახვეული ან გაშლილი ცილის დროს, როდესაც ყველა გვერდითი რადიკალი წყლიან გარემოშია. ბოლო ათწლეულის განმავლობაში ჩატარებული კვლევები იმაზე მიუთითებენ, რომ ბმულ წყალს შესაძლოა უმნიშვნელოვანესი ადგილი უკავია ბიომოლეკულების, და კერძოდ, გლობულური ცილების თერმოდინამიკურ სტაბილობაში. ფურიე-გარდაქმნის ინფრაწითელი დიფერენციული სპექტროსკოპიის გამოყენებით ჩატარებულმა უახლესმა გამოკვლევებმა აჩვენა,

რომ ცილის ზედაპირული დამუხტული და პოლარული ჯგუფები მათთან დაკავშირებულ ბმულ წყალთან ერთად ქმნიან ძლიერი წყალბადური ბმების ბადეს, რომელთა ენერგია ბევრად აღემატება საშუალო წყალბადური ბმის ენერგიას სუფთა წყალში [31]. ეს გაძლიერებული წყალბადური ბმები იშლება ცილის განხვევის შედეგად.

პრინციპში, პოლიპეპტიდურ ჯაჭვში მრავალი კოვალენტური ბმის გარშემო შესაძლებელია თავისუფალი ბრუნვა და ცილის ნებისმიერ მოლეკულას შეუძლია თეორიულად მიიღოს უამრავი რაოდენობის სხვადასხვა კონფორმაცია. მაგრამ ბიოლოგიურ პირობებში პოლიპეპტიდური ჯაჭვების უმრავლესობა არსებობს და ფუნქციონირებს მხოლოდ ერთ-ერთ ისეთ კონფორმაციაში (ან კონფორმაციათა შეზღუდულ ერთობლიობაში), რომლისთვისაც დამახასიათებელია მინიმალური თავისუფალი ენერგია. ჯერ კიდევ 60-იან წლებში ანფისენი პოსტულატად მიიჩნევდა იმას, რომ ცილის თვითაწყობის პროცესში ნატივური კონფორმაციის მიღწევისათვის საჭირო მთელ ინფორმაციას შეიცავს ამინომჟავური თანმიმდევრობა; და რომ ნატივური მდგომარეობა თერმოდინამიკურად უფრო (გაცილებით) სტაბილური უნდა იყოს სხვა შესაძლო მდგომარეობებთან შედარებით, და მაშასადამე ნატივური მდგომარეობა არის მდგომარეობის ფუნქცია, რომელიც არ არის დამოკიდებული პროცესის მიმდინარეობაზე ან იმ საწყის პირობებზე, რომლებიც განსაზღვრავს ამ მდგომარეობის მიღწევას [5]. შემდგომმა გამოკვლევებმა მნიშვნელოვანწილად დაადასტურა ამ პოსტულატების მართებულობა.

მარტივი პოლიმერების გლობულებთან შედარებით ცილის გლობულები უფრო რთულად ორგანიზებულები, მაგრამ ნაკლებად მჭიდროდ დალაგებული სტრუქტურებია, რომელთა მეოხებითაც, ერთი მხრივ, უზრუნველყოფილია შიდა გლობულური კონტაქტების მაღალი სპეციფიკურობა, მეორე მხრივ, შესაძლებელი ხდება გლობულად დახვეული პოლიპეპტიდური ჯაჭვის ცალკეული სეგმენტების სივრცითი გადაადგილება, რომელიც საჭიროა ცილის ბიოლოგიური ფუნქციონირებისათვის [38]. სხვა მხრივ, სტატისტიკური გორგალისაგან განსხვავებით, ცილის გლობულა არის არა 100 %-ით ფლუქტუირებადი

წარმონაქმნი, არამედ კომპაქტური, რეგულარული სტრუქტურა შეზღუდული ფლუქტუაციური შესაძლებლობებით აპერიოდული კრისტალისთვის დამახასიათებელი თავისებურებებით (იხ. ქვევით) [15]. ხაზგასმით უნდა აღინიშნოს, რომ კომპაქტური ფორმა, მჭიდროდ განლაგებული ჰიდროფობული "ბირთვი" (ან "ბირთვები") და პოლარული «გარსები», სწორედ ის ყველაზე მკაფიო და საერთო სტრუქტურული თავისებურებებია, რომლებიც გლობულურ (გლობულარულ) ცილებს ბიოპოლიმერთა განსაკუთრებულ კლასს მიაკუთვნებენ [32]. ცილის მოლეკულის მჭიდრო გლობულური სტრუქტურა უშუალოდ დასტურდება გლობულური ცილების შემცველი ხსნარების მეტისმეტად მცირე სიბლანტით. ამ ხსნარების დამახასიათებელი სიბლანტე და გახსნილი ცილების ხვედრითი მოცულობა გაცილებით ნაკლებია, ვიდრე ჩვეულებრივი პოლიმერების შემთხვევაში, რომლებიც ხსნარში გორგლებს წარმოქმნიან. ამ უკანასკნელი პარამეტრის მნიშვნელობა უახლოვდება მშრალი ცილის ხვედრით მოცულობას, რაც დასტურდება სედიმენტაციის, დიფუზიის, რენტგენოგრაფიის, შუქბნევისა და ელექტრონული მიკროსკოპიის შედეგების მთელი ერთობლიობით [15].

ანფისენის დროიდან მოყოლებული, ვარაუდობენ, რომ ნატივური კონფორმაცია აკმაყოფილებს თავისუფალი ენერჯის მინიმუმს და ხასიათდება ყველა სახეობის შიდამოლეკულური შეთანხმებული ურთიერთმოქმედებით [34]. მაგრამ ბოლო დროს უპირატესობა ენიჭება იმ თვალსაზრისს, რომ ნატივურ მდგომარეობას შეესაბამება თავისუფალი ენერჯის არა გლობალური, არამედ კინეტიკურად მისაღწევი მინიმუმი [14]. სიტუაცია იმიტომ რთულდება, რომ ნატივური მდგომარეობა წარმოადგენს ერთმანეთთან ახლოს მყოფი კონფორმაციული მიკრომდგომარეობების ნაკრებს, რაც გლობულის მოუწესრიგებელი («რბილი») უბნების ლაბილურობის შედეგია. ნატივური კონფორმაციის ფარგლებში განსაკუთრებით დიდი რაოდენობის მიკროკონფორმაციებით არის განპირობებული ენერჯის ლოკალური მინიმუმების ასევე დიდი რაოდენობა. ამის გამო, ცილის მოლეკულისათვის თავისუფალი ენერჯის გლობალური მინიმუმის ძიება პრაქტიკულად შეუძლებელია თანამედროვე კომპიუტერული ტექნიკის მეოხებითაც კი. ალბათ, აქ

ერთადერთი სწორი გზა იქნება იმ ცალკეულ სახეობათა ურთიერთმოქმედების ეტაპობრივი განხილვა, რომლებიც განსაზღვრავს ჯაჭვში უახლოეს, მეზობელ და დამორბეულ ნაშთებთან თითოეული ნაშთის კონფორმაციას. უახლოეს პეპტიდურ ჯგუფებთან ახლო ურთიერთმოქმედების აღრიცხვამ, რომელიც გაკეთდა მოდელოვანი შენაერთებზე გვიჩვენა, რომ ახლო ურთიერთმოქმედებები იძლევა თავისუფალი მონოპეპტიდის დაბალ-ენერგეტიკული კონფორმაციების ნაკრებს, საშუალო და შორეული კი განსაზღვრავს უკვე ამ ნაკრებიდან იმ კონფორმაციების შერჩევას, რომლებიც შედის ცილის ნატივურ სტრუქტურაში [8]. ცილაში შეთანხმებული ურთიერთმოქმედებების შედეგად, საშუალო და შორეული ურთიერთმოქმედება არ «აფუჭებს» მონოპეპტიდის ხელსაყრელ დაბალენერგეტიკულ კონფორმაციას. ამიტომ თავისუფალი ნაშთების დაბალენერგეტიკული მდგომარეობა ავტომატურად უნდა შევიდეს ფრაგმენტების დაბალ-ენერგეტიკული მდგომარეობის შემადგენლობაში. თავის მხრივ, ეს გულისხმობს, რომ თავისუფალ ფრაგმენტებს აქვთ ის სტრუქტურული თავისებურებები, რომლებიც აკმაყოფილებს საშუალო და შორეულ ურთიერთმოქმედებას გლობულაში. თუ შევაჯამებთ ყოველივე ზემონათქვამს, შეგვიძლია გახედულად ვთქვათ, რომ ფიზიოლოგიურ პირობებში მოცემული პოლიპეპტიდური ჯაჭვის მკაცრად განსაზღვრული კონფორმაცია, რომელიც ამ გლობულური ცილის ბიოლოგიური ფუნქციონირების გარანტია, გარკვეული თვალსაზრისით, განსაკუთრებული მოვლენაა, და არა უბრალოდ ერთი იმ შესაძლო კონფორმაციათაგანი, რომლებიც ოდნავ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან ენერჯის მიხედვით.

განხვეული მდგომარეობა და დენატურაციის სისრულე. ცილის ნატივურ მდგომარეობას ინარჩუნებს სხვადასხვა, ხშირად ურთიერთსაწინააღმდეგო ძალების სუსტი ბალანსი, და ამიტომ, შეიძლება ითქვას, რომ ნატივური ცილა ფუნქციონირებს თავისი მდგრადობის ზღვარზე. ნატივური კონფორმაციის შესანარჩუნებლად საჭიროა გარკვეულ დონეზე იყოს დაცული გარემოს მთელი რიგი პარამეტრები. ამ პარამეტრების მნიშვნელოვანი ცვლილებების შემთხვევაში (ტემპერატურის მომატება-დაკლება, pH-ის ცვლილება, წყლის სტრუქტურის

შეცვლა, დიელექტრიკული შეღწევადობის ვარიაციები და ა.შ.) მიმდინარეობს ლლობა (ანუ დენატურაცია), რაც დამახასიათებელია ამ შიდამოლეკულური სტრუქტურის მქონე ცილისათვის, რის შედეგადაც ცილა გადადის სტოქასტიკური გორგალის მდგომარეობაში. ასეთი მდგომარეობა, რომელსაც ახასიათებს მაქსიმალური ენტროპია, წარმოადგენს სისტემას, რომლის თითოეულ მოლეკულაში რეალიზებულია ჯაჭვის პირველადი თანამიმდევრობის შემთხვევითი განლაგება [8]. გორგალი ეწევა განუწყვეტელ მაკროსკოპიულ პულსაციებს და მასში არ ხდება არანაირი ვექტორულად გამორჩეული ფიზიკური ურთიერთქმედება, ანუ არ არის დადგენილი სივრცითი სტრუქტურა. ასეთ მდგომარეობაში სიმკვრივის ფლუქტუაციებს აქვთ თავად სიმკვრივის სიდიდის რიგი და იმავე რიგის კორელაციის რადიუსი, როგორც არის მაკრომოლეკულების ზომები [36]. ნატივური მდგომარეობის სტრუქტურებისაგან განსხვავებით, გაშლილი მდგომარეობის სტრუქტურები გაცილებით ნაკლებად არის შესწავლილი მათთვის დამახასიათებელი თვისებებისა და იმის გამო, რომ არ არსებობს მათი აღწერისათვის საიმედო მეთოდოლოგია მიუხედავად ამისა, არსებობს უამრავი მონაცემი, რომლებიც მიგვანიშნებს, რომ ცილის გაშლილი ფორმა მეტად მრავალფეროვანია და სხვადასხვა ცილისათვის, აგრეთვე დენატურაციის სხვადასხვა პირობებში მიიღება ისეთი სტრუქტურები, რომლებიც ყველაზე ნაკლებად მოგვაგონებს «მოუწესრიგებელ გორგალს» [37]. თუმცა ტერმინი «მოუწესრიგებელი გორგალი» უწინდებურად ფართოდ იხმარება განხვეული მდგომარეობის აღწერისათვის, ბოლო დროს ეს მოსაზრება იცვლება და გაშლილი ფორმების შესწავლას ახლებურად შეუდგნენ. ნაწილობრივ, ეს ინტერესი განაპირობა იმან, რომ ცილის განხვეული ფორმები წარმოადგენს სუბსტრატებს მოლეკულური «შაპრონებისათვის», რომლებიც მონაწილეობენ ცილების *ინ ვივო* დახვევაში და მოლეკულურ მემბრანების გავლით ცილების ტრანსპორტირებაში [45-47].

მეორე მხრივ, ეს ინტერესი განპირობებულია ბმრ ტექნიკის სწრაფი განვითარებით, რაც ხსნარებში ცილის სხვადასხვა ფორმის სტრუქტურის შესწავლის შესაძლებლობას იძლევა [39]. ამასთან, განსაკუთრებით სასარგებლო

გამოდგა ჰეტერობირთვული მეთოდები, რომელთა მეოხებითაც შეგვიძლია შევაფასოთ არასტაბილური სტრუქტურის მქონე ცილის წვლილი ბმრ-ის სპექტრში [40]. ამჟამად, ნარჩენი ნატივურის ტიპის სტრუქტურა აღმოჩნდა განხვეული კონფორმაციის მქონე მრავალ ცილაში, თანაც ვლინდება, რომ ამ სტრუქტურის პროცენტი დამოკიდებულია როგორც პოლიპეპტიდური ჯაჭვის ამინომჟავურ შემადგენლობაზე, ისე დენატურანტის ხასიათზე [41-43]. ასეთი განხვეული ფორმებისათვის, რომლებიც გაშლილია და არ არის გლობულური, იმ ფორმებისაგან განსხვავებით, რომლებიც «საკმარისად კომპაქტურია და თავისუფლადაა ჩალაგებული (ანუ «მოლტენ გლობულური ფორმები», იხ. ქვევით), შემოდებული იყო ტერმინი «პრემოლტენ გლობულა» [44]. ექპერიმენტული მონაცემები ცხადყოფს, რომ ცილა «პრემოლტენ გლობულის» მდგომარეობაში ჯერ კიდევ ინარჩუნებს წრიული დიქროიზმის შესამჩნევ სიგნალს შორეულ ულტრაიისფერში (რაც მოწმობს, რომ არსებობს გარკვეული მეორეული სტრუქტურა), მაგრამ ძალზე სუსტად არის დაცული პროტონული გაცვლისაგან [48].

ცილის პირველადი სტრუქტურის მნიშვნელობა დენატურირებული მდგომარეობის ხასიათისათვის განსაკუთრებით მკაფიოდ იჩენს თავს ლიზოციმის და α -ლაქტალბუმინის დენატურაციის შედეგებისას. ამ ცილების ამინომჟავური შემადგენლობები საოცრად ჰგავს ერთმანეთს, თუმცა ფუნქციური თვალსაზრისით არაფერი აქვთ საერთო. პირველადი სტრუქტურის მსგავსების მიუხედავად, დენატურანტების მიმართ ეს ცილები ერთმანეთისაგან განსხვავებულად იქცევიან. დაბალი კონცენტრაციის გუანიდინის ქლორიდის ზემოქმედებისას, აგრეთვე pH 2,5-ის პირობებში α -ლაქტალბუმინი იღებს ფორმას, რომელიც შეიძლება დავახასიათოთ, როგორც «მოლტენ გლობულა». გუანიდინ ქლორიდის უფრო კონცენტრირებულ ხსნარში მეორეული სტრუქტურა ირღვევა და გლობულა იშლება იმდენად, რამდენადაც ამის საშუალებას აძლევს ინტაქტური შ-შ ბმების სისტემა [49]. ლიზოციმი გუანიდინის ქლორიდით დენატურაციის დროს სულ სხვაგვარად იქცევა. იგი არ იძლევა შუალედურ ფორმებს და მდგრადია მჟავურ გარემოში [50] მაგრამ ლიზოციმის დენატურაცია შეიძლება შუა გზაზე შეჩერდეს:

მჟავურ გარემოში გახურება ლიზოციმის მოლეკულაში ტოვებს მოწესრიგებული სტრუქტურის ნაწილს, რომელიც იშლება გუანიდინ ქლორიდით დამატებითი დამუშავებისას. რიბოსომულ ცილას L-7/L-12 გახურების შედეგად (90 °C-მდე) დენატურაციის შემდეგ უნარჩუნდება მეორეული სტრუქტურის დაახლოებით 60 %. მჟავური დენატურაცია (pH 1,6) იწვევს უფრო ღრმა ეფექტს რის შედეგად ნარჩუნდება მეორეული სტრუქტურის მხოლოდ 35 %. თუ სითბურ და მჟავურ დენატურაციის პროდუქტებზე დამატებით 6 M გუანიდინის ქლორიდით ვიმოქმედებთ, მაშინ საბოლოოდ ირღვევა მეორეული სტრუქტურა [10]. ამრიგად, სხვადასხვა მადენატურირებელი ფაქტორი იწვევს ცილის მაკრომოლეკულების მეორეული და მესამეული სტრუქტურების მეტნაკლებად რღვევას. ამადმა და ბიგელოუმ გვიჩვენეს, რამდენად განსხვავდება რიბონუკლეაზა მეორეული სტრუქტურის დეზორგანიზაციის საზღვრები, რომელთა მიღწევა შეიძლება სამი სხვადასხვა მარილითა და შარდოვანათი [51].ამჟამად, ფართოდ არის გავრცელებული თვალსაზრისი, რომ სითბურ დენატურაციას, გუანიდინის ქლორიდის მოქმედებით მიმდინარე დენატურაციისაგან განსხვავებით, არ მოყვება ცილის სტრუქტურის სრული რღვევა. ასეთ მტკიცებულებას, ზემოთმოყვანილი ფაქტების გარდა, ხელს უწყობდა სხვადასხვა პირობებში მთელი რიგი ცილების სიბლანტის განსაზღვრა. მაგალითად, ლიზოციმის შემთხვევაში სიბლანტე იზრდება ნატივური მდგომარეობისათვის 3 სმ³/გ-დან 4.7 სმ³/გ-დე თერმულად დენატურირებული ლიზოციმისათვის [52]. საკუთრივ სიბლანტე 6 M GuHCl თანაობისას შეადგენს 6.5 სმ³/გ 25 °C პირობებში. ეს მნიშვნელობა შეესაბამება მაქსიმალურად შესაძლებელს 25 °C-ზე, დისულფიდური ხიდაკებით განივად დაკავშირებული ლიზოციმისათვის, როდესაც ყველა დანარჩენი სტრუქტურული ელემენტი დარღვეული აქვს [37]. დისულფიდური ბმების დარღვევის შემდეგ სიბლანტე იზრდება 17 სმ³/გ-მდე [37].

მიუხედავად ამისა, ზემოხსენებული თვალსაზრისი იმის შესახებ, რომ გუანიდინის ქლორიდის ან შარდოვანას ზემოქმედებით დენატურაცია განსხვავდება სითბური დენატურაციისაგან, სერიოზულ წინააღმდეგობებს აწყდება.

1. ბმრ-ის, წყალბადური მიმოცვლის, ინფრაწითელი სპექტრო-სკოპიისა და რამანის გაზნევის მონაცემები ცხადყოფს, რომ ყველა ჯგუფი თერმულად დენატურირებულ ლიზოციმში ზედაპირზე იმყოფება [53].

2. სხვადასხვა ტემპერატურის დროს სიბლანტის მნიშვნელობათა შედარება მთლად სწორი არ არის. გუანიდინ ქლორიდით კონცენტრირებულ ხსნარში ლიზოციმის სიბლანტე ძლიერ არის დამოკიდებული ტემპერატურაზე [54] და 55 °C- ის დროს მისი სიბლანტე აღწევს 4,8 სმ³/გ-ს, მაგრამ ეს შედეგი ემთხვევა სითბური დენატურაციის მონაცემებს, ანუ არავითარი განსხვავება არ შეინიშნება ლიზოციმის სიბლანტეში გაზრდილი ტემპერატურის დროს არც სითბური დამუშავების და არც გუანიდინ ქლორიდით დენატურაციის შემდეგ.

3. სითბური დენატურაციის დროს, სითბოტევადობის ცვლილებათა უშუალო კალორიმეტრული გაზომვა იძლევა სიდიდეს $\Delta C_p = 1,6$ კკალ/მოლ. მოლური სითბოტევადობის ცვლილებები, რომლებიც მიღებულია დენატურაციისათვის გუანიდინ ქლორიდის ზემოქმედებით (იზოთერმიულ ტიტრტაციულ კალორიმეტრული მონაცემებით), როგორც აღმოჩნდა, შეადგენს $\Delta C_p = 1,5$ კკალ/მოლ [58].

ამრიგად, დამტკიცებულად ვერ მივიჩნევთ, რომ გუანიდინ ქლორიდის მეოხებით ცილის დენატურაცია საერთოდ უფრო სრულია, ვიდრე სითბური დენატურაცია. უფრო მეტიც, ზოგიერთი ცილისათვის ნარჩენი სტრუქტურა შეიმჩნეოდა GuHCl კონცენტრირებულ ხსნარში, მაშინ, როდესაც სითბური დენატურაციის დროს მთლიანად ირღვეოდა ცილის სტრუქტურა [55]. უნდა აღინიშნოს, აგრეთვე, რომ ცილაზე შარდოვანას, გუანიდინ ქლორიდის და დოდეცილსულფატის ზემოქმედების კვლევისას გამოვლინდა ანომალური ოპტიკური ეფექტები, რომლებიც განისაზღვრება დენატურანტებთან ცილის ურთიერთმოქმედებით და ამ ეფექტების ახსნა შესაძლებელი გახდა მხოლოდ პოლიპეპტიდური ჯაჭვების მოწესრიგებით [57]. თუმცა, ჯერ კიდევ გაურკვეველია ცილებთან შარდოვანასა და გუანიდინ ქლორიდის ურთიერთმოქმედების მექანიზმი [56]. შესაძლებლად მიგვაჩნია, რომ ამ ნაერთებს, რომლებიც ეფექტიანად არღვევენ ცილების სტრუქტურას, მაღალი კონცენტრაციების დროს

აქვთ სტრუქტურის წარმომქმნელი თვისებები. ეს დამაჯერებლად დაადასტურა რენტგენოსტრუქტურულმა მეთოდებმა [59]. გარდა ამისა, უნდა აღინიშნოს, რომ ალკილმარდოვანას ცილებს შეუძლიათ ზოგიერთი ცილის (მაგალითად, β -ქიმოტრიპსინი) არანატივურ, მაგრამ მაინც რეგულარულ მოწესრიგებულ კონფორმაციად რეორგანიზაციის ინდუცირება. ამრიგად, გაშლილი ფორმის ცილებში ნარჩენი სტრუქტურების არსებობა საკმაოდ ზოგადი თვისებაა [60].

ამრიგად, გაშლილი მდგომარეობის ბუნება დამოკიდებულია ამ მდგომარეობის გამომწვევ დენატურატორზე. გარდა ამისა, გაშლილი მდგომარეობის თვისება მნიშვნელოვანწილად განისაზღვრება ამინომჟავების თანამიმდევრობით, ისევე, როგორც ეს შეინიშნება ნატივურ მდგომარეობაში. დენატურაციის პირობებში წარმოქმნილ მდგომარეობათა ანსამბლი წარმოადგენს დინამიკურად ცვალებადი, ინტერკონვერტირებადი კონფორმაციების განაწილებას. პოლიპეპტიდური ჯაჭვის ნატივურ კონფორმაციად დახვევის მექანიზმის გამორკვევისათვის ძალზე ძნელია სხვადასხვა ცილის გაშლილ მდგომარეობაში არსებული ნარჩენი სტრუქტურების მონაცემების გამოყენება. იმის გამო, რომ გაშლილი მდგომარეობა ხასიათდება ცვალებადი და ფლუქტუირებადი ბუნებით, გარდა ამისა, მეტად მწირი ინფორმაცია გვაქვს ნარჩენი სტრუქტურების შესახებ. ცილების გაშლილი მდგომარეობის შემდგომი სტრუქტურული გამოკვლევები დახვევის პროცესების კინეტიკურ გამოკვლევებთან ერთად ამ ფუნდამენტური პრობლემის ბევრ გაურკვეველ მხარეს მოჰფენს ნათელს.

გალმღვალი გლობულა. მოლეკულურ ბიოლოგიაში დიდხანს იყო პოსტულირებული ის მოსაზრება, რომ არსებობს ცილის მხოლოდ ორი სტაბილური მდგომარეობა – ნატივური და დენატურირებული. მაგრამ, 70-იანი წლების შუა ხანებში აღმოაჩინეს მდგრადი ფორმები, რომლებიც, ფაქტობრივად, არც ნატივურია და არც მთლიანად გაშლილი. კუვამამ თანამშრომლებთან ერთად [65] პირველად აღმოაჩინა, რომ α -ლაქტალბუმინი დაბალი pH-ისა და მარილის გარკვეული კონცენტრაციის დროს ქმნის საკმაოდ სტაბილურ კონფორმაციას, რომელსაც «A მდგომარეობა» უწოდეს. «A მდგომარეობას»

ახასიათებდა მეორეული სტრუქტურის ისეთივე რაოდენობა, როგორც ნატივურ ცილას და ოდნავ ნაკლები კომპაქტურობა, მაგრამ სპეციფიკური მესამეული ურთიერთმოქმედება მასში დარღვეული იყო ამ მახასიათებლების გამო, ოგუშიმ და ვადამ ამ მდგომარეობას უწოდეს «მოლტენ გლობულა» (გალმღვალი გლობულა) [61]. ყველა იმ ახალი ცილის აღმოჩენის შემდეგ, რომელთათვისაც გარკვეულ პირობებში ხერხდებოდა ასეთი მდგომარეობის მიღება და თვით «მოლტენ გლობულის» ცნების სწრაფი ევოლუცია, გაჩნდა მისწრაფება, ცილის ნაწილობრივ დახვეული მდგომარეობა მიეჩნიათ პრინციპულად ახალ უნივერსალურ თერმოდინამიკურ შუალედურ მდგომარეობად, რომლის მეოხებითაც შეიძლება აიხსნას ცილის დახვევის მეტისმეტად დიდი სიჩქარე და ეფექტიანობა. მეტად უტყუარი ჩანდა, რომ სითხისმაგვარ გლობულაში პოლიპეპტიდური ჯაჭვის კოლაფსი მნიშვნელოვნად ამცირებს კონფიგურაციულ ფაზურ სივრცეს, რომელშიც შეიძლება ნატივური მდგომარეობისათვის ოპტიმალური კოორდინატების ძიება და მთელი რიგი ისეთი პრობლემების ახსნა, როგორც არის «ლევინტალის პარადოქსი» [62]. მოგვიანებით აღმოჩნდა, რომ მოლტენ გლობულის წონასწორული ფორმები ძალზე ჰგავს ცილის დახვევის კინეტიკურ ინტერმედიატებს და გამოთქვა ვარაუდი, რომ გალხობილ გლობულას შეუძლია არსებითი როლი შეასრულოს ცოცხალ უჯრედში ცილების მომწიფებისას. გამოირკვა, აგრეთვე, რომ შეიძლება გალხობილი გლობულის ზოგიერთ თვისებას მნიშვნელობა ჰქონდეს უჯრედში ცილების ფუნქციონირებისათვის. მაგალითად, ტოქსინებისათვის გალმღვალი გლობულის არსებობის პირობები ძალზე ახლოა იმასთან, რაც შეინიშნება უჯრედში [63,68]. ანალოგიურ მაგალითად გამოგვადგება რეტინოლ-დამაკავშირებელი ცილა, აგრეთვე ასპარტატ-ამინოტრანსფერაზა, რომლისთვისაც ნაჩვენებია, რომ მონომერი, სანამ დომერს წარმოქმნის, იმყოფება გალმღვალი გლობულის მდგომარეობაში [66,67]. გარდა ამისა, გამოირკვა, რომ ცილა გლობულის მდგომარეობაში შეიძლება დაუკავშირდეს სითბური შოკის ცილების ტიპის დამხმარე ცილებს, რომელთა დანიშნულებაა გამოიცნოს ცილები არანატივურ მდგომარეობაში. ყველა ეს ფაქტი განაპირობებს სწორედ იმას, რომ უდიდესი

ინტერესით ეკიდებიან სტაბილურ შუალედურ მდგომარეობაში ცილის ფიზიკო-ქიმიური პარამეტრების კვლევას.

თანამედროვე განსაზღვრებით, გალმღვალი გლობულა არის ცილის მოლეკულის თერმოდინამიკურად სტაბილური მდგომარეობა, რომლის რეალიზაცია ხდება რბილ დენატურირებად პირობებში (მჟავე ან ტუტე pH, მარილების თანაობისას, ისეთი ძლიერი დენატურანტების ზომიერი კონცენტრაცია, როგორც არის შარდოვანა ან გუანიდინ ქლორიდი) და თავისი თვისებებით შუალედურია ნატივურ და მთლიანად გაშლილ მდგომარეობებს შორის. ცილის მოლეკულა გალმღვალი გლობულის მდგომარეობაში პრაქტიკულად ისეთივე კომპაქტურია, როგორც ნატივურ მდგომარეობაში, აქვს გამოკვეთილი მეორეული სტრუქტურა, მაგრამ ვან-დერ-ვალსის ურთიერთქმედება რბილ უჯრედებში უკვე დარღვეულია, მაშინ, როდესაც წყალბადური ბმები ხისტ უბნებში (II-სპირალი და დახვეული β-სტრუქტურები) ინარჩუნებენ თავიანთ სტრუქტურას [63,68-70]. β-სტრუქტურები ირღვევა იმ შემთხვევაში, როდესაც მესამეული სტრუქტურების ელემენტების როლს ასრულებენ. მიკროსკოპული მახასიათებლები (ატომების ფადობითი განლაგება რბილ უბნებში, მათი სითბური რხევების ამპლიტუდა და ა.შ.) არსებითად განსხვავდება ნატივურისაგან [70]. ქიმიური თვისებებით, და, უწინარესად, თავის კატალიზური უნარით, გალმღვალი გლობულა შესაძლოა ძალზე განსხვავდებოდეს ნატივური ფორმისაგან: რიგ შემთხვევებში ფუნქციური აქტიურობა მასში მკვეთრად არის შემცირებული. თავის მხრივ, ცილა გალმღვალი გლობულის მდგომარეობაში მეტად განიცდის პროტეოლიზს, ვიდრე ნატივურ მდგომარეობაში, მაგრამ არსებითად ნაკლებად, ვიდრე მთლიანად გაშლილ ფორმაში [63]. გალმღვალი გლობულის მდგომარეობაში გადასვლის შედეგად, ძლიერდება ცილის ჰიდროფობულობა, რაც ვლინდება ჰიდროფობულ ფლუორესცირებელ ზონდთან (I-ანილინონაფტალენ-8-სულფონატთან) ურთიერთქმედების გაძლიერებაში [71]. გალმღვალი გლობულის მდგომარეობას უწოდებენ, აგრეთვე, «კომპაქტურ ინტერმედიატს» (გალმღვალი გლობულის მდგომარეობა ნატივური გლობულის მოცულობას აღემატება არა უმეტეს 20%-ით)

ან «კოლაფსირებულ ფორმას» [72]. ბოლო დასახელებაში ასახულია ის ფაქტი, რომ გამდნარი გლობულის ჰიდროფობულ შიგთავსს, ბმრ-ის მონაცემებით, ჯერ კიდევ აქვს მოწესრიგებული სივრცითი კონფორმაცია, ამიღური პროტონები კარგად არის დაცული გამხსნელთან გაცვლისაგან.

ყველაზე საკამათოა გალმღვალ გლობულაში შორეული ტიპის ურთიერთმოქმედებათა მონაწილეობის ხარისხი. განსაზღვრის თანახმად, შორეული ურთიერთმოქმედება არის ატომებს შორის ურთიერთმოქმედება, რომლებიც ჯაჭვში დაშორებული არიან ერთმანეთისაგან, მაგრამ სივრცეში დაუახლოვდნენ პოლიპეპტიდური ჯაჭვის გაღუნვის შედეგად. ამიტომ, მათ უწოდებენ მოცულობითს ურთიერთმოქმედებას. ახლო ურთიერთმოქმედება (ახლომდებარე რგოლების ატომების ურთიერთმოქმედება) იძლევა დაბალენერგეტიკული კონფორმაციების ნაკრებს, შორეული ურთიერთ-მოქმედება კი, ჰიდროფობულთან ერთად, განსაზღვრავენ ამ ნაკრებიდან იმ კონფორმაციების შერჩევას, რომლებიც შედიან კონკრეტულ მყარ სტრუქტურაში. გალმღვალი გლობულის შუალედური მდგომარეობა ენერგეტიკულად ნაკლებად ხელსაყრელია, სამაგიეროდ ენტროპიულად უფრო ხელსაყრელია, ვიდრე ნატივური მდგომარეობა [70]. ეს დაკავშირებულია მოცულობითი ურთიერთმოქმედების მკვეთრ შესუსტებასთან და შიდამოლეკულური მოწესრიგებულობის შემცირებასთან. გალმღვალი გლობულის მდგომარეობაში მცირეოდენი შებერვა მკვეთრად ასუსტებს ვან-დერ-ვალსის ხანმოკლედ მოქმედ ძალებს ჰიდროფობულ ურთიერთმოქმედებასთან შედარებით. იმავედროულად მკვეთრად იზრდება მიკროკონფორმაციული მოძრაობა, რის შედეგადაც ირღვევა ამინომჟავების გვერდითი ჯაჭვების მჭიდრო წყობა. ყველა ამ დაკვირვებამ, პტიცინს გააკეთებინა კლასიკური განსაზღვრება, რომლის თანახმად: «გალმღვალი გლობულა არის ფლუქტუირებადი მესამეული სტრუქტურის მქონე კომპაქტური გლობულა» [68]. თავდაპირველად ნავარაუდევია იყო, რომ გამდნარი გლობულის მდგომარეობა შენარჩუნებულია წყლის გარეშე ზემოქმედებით, რომელმაც ვერ შეაღწია გლობულის შიგნით [73]. მოგვიანებით «მშრალი მოლტენ გლობულის» ეს ცნება შეიცვალა «სველი მოლტენ გლობულისა» და «გაბერილი მოლტენ

გლობულის» მოდელებით, რომელთა მეოხებითაც დაშვებულია შიდა წყლის მოლეკულების გარკვეული რაოდენობის არსებობა [74]. გარდა ამისა, იმის გათვალისწინებით, რომ გალმღვალ გლობულაში პოლიპეპტიდური ჯაჭვი ნატივეურის მსგავსად არის დახვეული, გაჩნდა ტერმინი «მაღალმოწესრიგებული მოლტენ გლობულა» [75]. და მაინც, გარკვეული მესამეული სტრუქტურის შენარჩუნების ძირითადი საკითხი უწინდებურად სადავოა და, არსებული გამოცდილებიდან გამომდინარე, თითოეული ცილისათვის ინდივიდუალურად წყდება.

გალმღვალი გლობულის მდგომარეობის ყველაზე დამახასიათებელი ნიშანია მისი კომპაქტურობა, რომელიც დასტურდება დამახასიათებელი სიბლანტის გაზომვის, დიფუზიის კოეფიციენტის გაზომვის, ნეიტრონული გაბნევის მეთოდებით ინერციის რადიუსის პირდაპირი გაზომვის მეშვეობით [68,76]. ყველა შესწავლილი ცილა, რომელთათვისაც შეინიშნებოდა ისეთი წონასწორული, სტაბილური შუალედური მდგომარეობები, როგორც არის α -ლაქტალბუმინი, აპომიოგლობინი, ცხენის ლიზოციმი, რიბონუკლეაზა A, კარბოანჰიდრაზა A, ფაგოლიზოციმი, ციტოქრომი C, პანკრეასის ტრიფსინის ინჰიბიტორი, სტაფილოკოკის ნუკლეაზა და მრავალი სხვა ადასტურებს, რომ მათი შუალედური მდგომარეობა თავისი კომპაქტურობითა და მეორეული სტრუქტურის შემცველობით ჰგავს ნატივეურ მდგომარეობას, მაგრამ მათში, წრიული დიქროიზმის მონაცემებით თუ ვიმსჯელებთ, არ არის ხისტი მესამეული სტრუქტურა [63,70,76,77]. ლიტერატურული მონაცემების [78] თანახმად, ცილის ჰიდროდინამიკური მოცულობის გაზრდა ორ სტადიად მიმდინარეობს, თანაც პირველ სტადიაზე, pH 5.0-4.5 უბნებში შეინიშნება მხოლოდ სიბლანტის უმნიშვნელო მომატება. ამასთანავე ელიპტურობა ახლო ულტრაიისფერში, რომელიც ახასიათებს გარკვეულ მესამეულ სტრუქტურას, ამ სფეროში pH თითქმის ნულამდე მცირდება. ელიპტურობა კი შორეულ ულტრაიისფერში, რომელიც ახასიათებს სპირალურობას, ამ უბანში ჯერ კიდევ მაღალია. ამრიგად შეიძლება გამოვიტანოთ დასკვნა, რომ pH 4.5-4.0 უბანში აპომიოგლობინი იმყოფება გალხობილი გლობულის მდგომარეობაში: ცილის ასეთი მდგომარეობა

კომპაქტურია, იგი ინარჩუნებს მნიშვნელოვან სპირალურობას, და ამავე დროს იკარგება მესამეული სტრუქტურისათვის დამახასიათებელი შორეული ურთიერთმოქმედების ფიქსირებულობა. ეს მდგომარეობა ფლუქტუირებად გვერდით ჯაჭვებთან დადასტურებულია ბმრ-ის მონაცემებით. pH-ის შემდგომ შემცირებას მოჰყვება აპომიოგლობინის მოლეკულის სრული გაშლა: ჰიდროდინამიკური მოცულობა მკვეთრად იზრდება, მეორეული სტრუქტურის ელემენტები კი, შორეულ ულტრაიისფერში ელიპტურობის შემცირებით, მთლიანად ნიველირდება.

როგორც უკვე ზემოთ იყო ნათქვამი, გალმღვალი გლობულის მდგომარეობის სტაბილიზაციაში დიდ როლს ასრულებს ჰიდროფობული ურთიერთმოქმედება. ამასთანავე, გოტომ და სხვებმა [80,81] გამოთქვეს ვარაუდი, რომ მჟავით დენატურირებული ცილის კონფორმაციას განსაზღვრავს ელექტროსტატიკური განზიდვის ძალთა კრიტიკული ბალანსი პოლიპეპტიდური ჯაჭვის გაჭიმვის ხელშემწყობ ცილის პროტონირებულ ჯგუფებსა და ჰიდროფობული ურთიერთმოქმედების ძალებს შორის, რომლებიც ხელს უწყობს კონდენსირებულ მდგომარეობად შეკუმშვას. იაკონელ მეცნიერთა აზრით, სწორედ ამით აიხსნება ის ფაქტი, რომ მარილის ანიონების დამატებისას შეინიშნება, რომ მთელი რიგი ცილები სპონტანურად გადადის დენატურირებული მდგომარეობიდან გალხობილი გლობულის მდგომარეობაში. ძალთა ამ ფაქიზი ბალანსის დასადასტურებლად განხორციელდა ექსპერიმენტთა სერია ციტოქრომ C-ს მონაწილეობით, რომლის ნიმუშებში ლიზინის α -ამინოჯგუფები აცეტილირდება სხვადასხვა ხარისხით. როგორც წინასწარმეტყველებდნენ, აცეტილაციის ხარისხის ზრდის კვალობაზე, რომელიც ახშობს ამინოჯგუფების პროტონირებას, მჟავით დენატურირებული ციტოქრომ C კოოპერატიულად გადადის გალმღვალი გლობულის მდგომარეობაში [82]. თუმცა აქამდე ცნობილი იყო, რომ ელექტროსტატიკური განზიდვა ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი ფაქტორია, რომელიც განსაზღვრავს ცილის სტრუქტურას, ამგვარი პირდაპირი ეფექტი არ ვლინდება ნატივური მდგომარეობისათვის. ეს ბადებს აზრს, რომ გალმღვალი გლობულის მდგომარეობის სტაბილიზაციის მექანიზმი რამდენადმე

სხვაგვარი და გაცილებით უფრო მარტივია, ვიდრე ნატივური მდგომარეობის შემთხვევაში. როგორც სხვადასხვა ხარისხის ინტაქტური, ისე აცეტილირებული ციტოქრომ C-ს ნატივური და მოლტენ გლობულის სტაბილურობის გამოკვლევებმა ტემპერატურის, აგრეთვე შარდოვანასა და გუანიდინის ქლორიდის კონცენტრაციის მიხედვით გამოავლინა: მაშინ, როდესაც აცეტილირება სტაბილურს ხდის გალმდვალი გლობულის მდგომარეობას pH 2,0 დროს, იგი ახდენს ნატივური მდგომარეობის დესტაბილიზაციას pH 7,0 დროს, რაც ადასტურებს მოსაზრებას ამ ორი მდგომარეობის კონფორმაციული სტაბილურობის სხვადასხვა მექანიზმის შესახებ [83].

მეტასტაბილური მდგომარეობანი. იმის გათვალისწინებით, თუ რაოდენ დიდი მნიშვნელობა აქვს კინეტიკურ ფაქტორს ცილის დახვევაში, არსებობს ალბათობა, რომ საკვლევი დახვეული მდგომარეობა სულაც არ არის გლობალური მინიმუმის მქონე თავისუფალი ენერჯის მდგომარეობა. სავსებით შესაძლებელია, რომ ეს იყოს უფრო დაბალი კინეტიკურად მისაღწევი ენერჯის მდგომარეობა, ნატივური მდგომარეობა კი წარმოადგენდეს მეტასტაბილურ კონფორმაციას [62]. ასეთი შესაძლებლობა დემონსტრირებული იყო ინჰიბიტორის _ პლაზმინოგენის აქტივატორისათვის [84]. ეს ცილა თავდაპირველად ეხვევა აქტიურ (ბიოლოგიური თვალსაზრისით), მაგრამ შედარებით არასტაბილურ ფორმად. შემდგომში, აქტიური ფორმა 37 °C- ის დროს ნელ-ნელა იღებს გაცილებით უფრო სტაბილურ, მაგრამ არააქტიურ (ლატენტურ) ფორმას. ლატენტური ფორმიდან ამ ცილის მეტასტაბილურად აქტიური ფორმის რესტავრირება შეიძლება ამ ცილის გაშლისა და ხელმეორედ დახვევის გზით.

სხვა მაგალითად გამოდგება α -ლიტიური პროტეაზის დახვევა. ბეიკერმა და მისმა თანამშრომლებმა [90] დაამტკიცეს, რომ ცილის დახვევის პროცესი კინეტიკურად კონტროლდება. როგორც გამოირკვა, α -ლიტიური პროტეაზას ნატივურ პირობებში შეიძლება ჰქონდეს ორი კონფორმაციული მდგომარეობა: აქტიური და არააქტიური. სინთეზის დროს ეს პროტეაზა ეხვევა პრეკურსორად, რომელიც შეიცავს 166 ამინომჟავურ პროლინურ უბანს. მოწიფული აქტიური პროტეაზა პრეკურსორიდან წარმოიქმნება ამ პროლინური უბნის მოხლეჩის

შემდეგ. ამასთანავე ნაჩვენები იყო, რომ დახვევის შემდეგ პროტეაზა კვლავ აქტიურ ფორმად კი არ ეხვევა, არამედ იღებს საკმაოდ სტაბილურ არააქტიურ ფორმას [91]. არააქტიურიდან აქტიურ ფორმად კონვერსიისათვის საჭიროა არსებობდეს პროლინური უბანი, რომელიც, როგორც ჩანს, ახდენს არააქტიური და აქტიური ფორმების გამყოფი მაღალი კინეტიკური ბარიერის გავლის კატალიზებას. თუ ამ ორი ფორმისათვის არ არსებობს პროლინური უბანი, არანაირი ინტერკონვერსია არ შეინიშნება. ამ ორი ფორმის შედარებითი სტაბილურობის შეფასება საკმაოდ ჭირს, რადგან პროლინური უბნის უქონლობისას შეუძლებელია აქტიური და არააქტიური ფორმების თერმოდინამიკური წონასწორობის განსაზღვრა. და მაინც, თუმცა არააქტიური ფორმა ჰგავს სწორედ მეტასტაბილურ მდგომარეობას, მაგრამ, სწორედ ამ მდგომარეობას ახასიათებს ყველაზე ნაკლები თავისუფალი ენერგია, მაშინ, როდესაც აქტიური ფორმა წარმოადგენს, არსებითად, კინეტიკური «ხაფანგის» მდგომარეობას [91].

§ 1.5. გამოსაკვლევი ცილების დახასიათება.

α-ქიმოტრიპსინი. α-ქიმოტრიპსინი ერთ-ერთი ყველაზე საგულდაგულოდ შესწავლილი ფერმენტია. იგი არ არის ისეთი სპეციფიკური, როგორც ტრიფსინი, მაგრამ გაცილებით უფრო სწრაფად ახდენს პეპტიდური ბმების ჰიდროლიზებას, რომელთა წარმოქმნაში მონაწილეობენ არომატული ამინომჟავების – ტიროზინის, ტრიპტოფანისა და ფენილალანინის ნაშთები. α-ქიმოტრიპსინით კატალიზისა და ალკილირებადი აგენტების ზემოქმედებით კატალიზის ინგიბირების სიჩქარეზე pH-ის ზეგავლენის გამოკვლევამ საშუალება მოგვცა დაგვედგინა, რომ სუბსტრატთან ურთიერთმოქმედების დროს წარმოიქმნება კოვალენტური შუალედური ნაერთი აცილფერმენტი [38]. რენტგენოსტრუქტურული ანალიზის მეთოდით ნაჩვენები იყო, რომ ფერმენტის აქტიური ცენტრის უბანში არის სერინისა და ჰისტიდინის ნაშთები, და გარდა ამისა, ჰისტიდინის გვერდზე განლაგებულია -NH_3^+ ბოლო ჯგუფი, რომელსაც კონტაქტი აქვს ასპარაგინის -COO^- ჯგუფთან [15]. β-ქიმოტრიპსინის მოქმედების მექანიზმი გულისხმობს

სუბსტრატის ნახშირბადის კარბონილის ატომის სერინის ჰიდროქსილური ჯგუფის მიერ შეტევას, რომელიც ძლიერდება ჰისტიდინის ნაშთის იმიდაზოლური ფრაგმენტის ზემოქმედებით, ზოგადი ფუძე-კატალიზური მექანიზმის ხარჯზე [32].

β-ქიმოტრიპსინი წარმოიქმნება არააქტიური წინამორბედის – ქიმოტრიპსინოგენისგან ოთხი გარკვეული პეპტიდური ბმის გახლეჩის შედეგად, რასაც თან სდევს ორი დიპეპტიდის დაკარგვა. იმოტრიპსინოგენის β-ქიმოტრიპსინად გადაქცევას თან სდევს ერთადერთი სტრუქტურული ცვლილება აქტიური ცენტრის უბანში, სახელდობრ, ჰისტიდინი თავისუფლდება ასპარგინის მჟავასთან მარილის ბმისგან, რომელიც რამდენადმე გადაიწვეს და გადაეხმება უფრო შორეულ იზოლეიცინს. იზოლეიცინის α-ამინოჯგუფის ლიკვიდაციას აცეტილირების გზით მოჰყვება ქიმოტრიპსინის სრული ინაქტივაცია [32].

α-ქიმოტრიპსინი არის პროტეოლიტური ფერმენტი, რომელიც წარმოადგენს 24500 დალტონი მოლეკულური წონის მქონე ტიპურ გლობულურ ცილას, შედგება სამი პოლიპეპტიდური ჯაჭვისაგან, რომლებიც შეიცავენ 241 ამინომჟავურ ნაშთს. ჯაჭვები ჩვეულებისამებრ აღინიშნება A, B, და C- თი და შეიცავენ შესაბამისად 13, 131, და 97 ნაშთს [29]. სამი პოლიპეპტიდური ჯაჭვი შეერთებულია ერთმანეთთან არსებული ხუთი დისულფიდური ხიდაკიდან ორი ხიდაკით. მაღალი გარჩევის მქონე რენტგენოსტრუქტურული ანალიზის მეშვეობით გამოვლინდა ამ ცილის მეორეული და მესამეული სტრუქტურების შემდეგი თავისებურებები [85]. C ბოლოზე რვა ნაშთის გამოკლებით, რომლებიც წარმოქმნიან მოკლე ββ-სპირალს, ჯაჭვები თითქმის გამოწეულია. ქიმოტრიპსინის ძირითადი პოლიპეპტიდური ჯაჭვის განლაგებაში ყურადღებას იპყრობს ნავარაუდები β-სტრუქტურა, რომელიც წარმოქმნილია ჯაჭვის უბნებით, რომელთა შემადგენლობაში შედის 91_86, 103_108, 55_50, 39_46, და 35_29 ნაშთები. რადგან ჯაჭვები გაჭიმულია მოლეკულის შიგნით, ისინი ხშირად ერთმანეთის პარალელურად არიან განლაგებული დაახლოებით 4,5 Å დაშორებით. ამრიგად, გამოწეულ ჯაჭვებში შეიძლება პეპტიდური ჯგუფები მონაწილეობდნენ მოლეკულათაშორისი წყალბადური ბმების წარმოქმნაში. ამიტომ მესამეული

სტრუქტურა შეიძლება სტაბილიზებული იყოს სწორედ ამ ფაქტორის მეშვეობით [30]. მეზობელ უბნებთან ურთიერთმოქმედებისადმი ჯაჭვების მეტად შესამჩნევი ტენდენცია არსებობს. ამის შედეგად ჯაჭვი შემობრუნდება და საპირისპირო მიმართულებით მიდის. უნდა აღინიშნოს, რომ α -ქიმოტრიპსინში არსებული გლიცინის 19 ნაშთიდან, 17 განლაგებულია შემობრუნების უბნებში, რითაც დასტურდება, თუ რაოდენ მნიშვნელოვან როლს ასრულებს გლიცინი, როგორც «სახსარი» [31]. საერთოდ ჯაჭვი უფრო ხშირად «ლაგდება», ვიდრე დაიგრძელება ან დაიხვევა გორგლად. ყოველივე ამის შედეგად, შეიძლება გამოვიტანოთ დასკვნა, რომ ქიმოტრიპსინის მოლეკულა ბირთვის გარშემო შეიძლება დალაგდეს მაღალსტაბილიზებული და ლოკალური კონფორმაციის სახით [30]. ისევე როგორც ლიზოციმში, β -ქიმოტრიპსინშიც არის საკმაო რაოდენობის სიღრუე, რომლებიც ალბათ, ავსებულია გამხსნელით. α -ქიმოტრიპსინის კრისტალურ სტრუქტურაში აღმოჩენილია წყლის 16 შიდა მოლეკულა [31]. α -ქიმოტრიპსინის მოლეკულის ზოგიერთი ნაწილი, განსაკუთრებით C ჯაჭვის «მეთიონინის მარყუჭი» და B ჯაჭვის შუაში მარყუჭი მოლეკულის ღრმულებში მდებარეობს [29]. α -ქიმოტრიპსინისთვის დასტურდება ის, რაც შეიმჩნევა აგრეთვე მიოგლობინის და ლიცოზიმის შემთხვევაში არსებული საერთო დაკვირვებით: ხსნარისაკენ შემობრუნებულია ყველა დამუხტული ჯგუფი. მოლეკულის შიდა უბნების მეტი ნაწილი შედგება უბნებისაგან, რომლებშიც მიმდინარეობს სხვადასხვა ჯაჭვის გვერდითი ჰიდროფობული ჯგუფების ურთიერთმოქმედება. ეს ყოველთვის როდი ეხება ალანინისა და ვალინის მოკლე ჰიდროფობულ ჯგუფებს. ისინი ზოგჯერ შებრუნდებიან გამხსნელის მიმართულებით [30].

α -ქიმოტრიპსინის მოლეკულაში არ არის იმის მაგვარი მკაფიოდ გამოხატული ნაპრალი, როგორც, ვთქვათ, ლიზოციმში. მაგრამ სერინის აქტიურ ცენტრში (Ser-195) არის ჩარმავება, სადაც სტრუქტურა არ არის მჭიდროდ ჩალაგებული [30]. გვერდიდან ამ ჩარმავებაში შეწყულია ჰისტიდინი 57, რაც ადასტურებს სერინისა და ჰისტიდინის უპირატეს როლს კატალიზურ მექანიზმში [15]. არსებით როლს ასრულებს აგრეთვე ასპარგინის მჟავა, რომლის კარბოქსილის ჯგუფი წარმოქმნის იონურ წყვილს იზოლეიცინის ბოლო ამინოჯგუფთან ერთად,

რომელიც აგრეთვე შეზღუდულია მოლეკულის ცენტრისაკენ, როგორც ზემოთ იყო აღნიშნული. ორივე ჯგუფი სტაბილიზებულია წყალბადური ბმებით ახლო მყოფ პეპტიდურ ჯაჭვთან და სერინთან შეერთებულ გვერდით ჯაჭვებთან. ამრიგად, ბოლო იზოლაციური ჯგუფი ახდენს ფერმენტის ნატივური კონფორმაციის სტაბილიზაციას [30].

ცხრილი 1.1. α -ქიმოტრიპსინის მოლეკულის ძირითადი ფიზიკო-ქიმიური პარამეტრები [13].

ხვედრითი მოცულობა	მოლეკულური წონა	სედიმენტაციის კოეფიციენტი	იზოელექტრული წერტილი
0.72	25400	2.5	8.1

ლიზოციმი. ფერმენტი, რომელსაც შემდგომში ლიზოციმი ეწოდა, 1922 წელს აღმოაჩინეს [32]. ამ ფერმენტს, რომელსაც შეიცავს ცხოველებისა და მცენარეების მრავალი ქსოვილი, შესწევს უნარი სწრაფად დაშალოს ზოგიერთი სახეობის ბაქტერია. სხვადასხვა ორგანიზმის ლიზოციმები განსხვავდებიან ერთმანეთისგან ქიმიური თვალსაზრისით, მაგრამ ერთნაირ ბიოლოგიურ აქტიურობას ავლენენ და აქვთ მნიშვნელოვანი საერთო თვისებები, რომელთა საფუძველზე ისინი შეგვიძლია გავაერთიანოთ ფერმენტების ერთ კლასში [12]. როგორც წესი, ნებისმიერი ლიზოციმი წარმოადგენს მაღალი იზოელექტრული წერტილის (10–ზე მაღალი) და მცირე მოლეკულური წონის (დაახლოებით 15000 დალტონი) მქონე ფიბე ცილას. ლიზოციმების კლასისათვის ფერმენტის მიკუთვნებისას ენზიმურ კრიტერიუმს წარმოადგენს მისი უნარი, მოახდინოს იცროცოცტუს ლყსოდეიკტიცუს-ის უჯრედის კედლების სუსპენზიის ლიზირება დაბალმოლეკულური ამინოსახარიდების გამოთავისუფლებით. უჯრედის კედელში ლიზოციმის სუბსტრატია მუკოპოლისახარიდი, რომელიც აგებულია გლიკოზიდური ბმებით შეერთებული ერთმანეთის მონაცვლე N-აცეტილგლუკოზამინისა და N-აცეტილმურამინის მჟავების ნაშთებისაგან [13]. ბაქტერიების უჯრედის კედლების გარდა, ლიზოციმი ხლეჩს აგრეთვე ხიტინ-

წრფივ პოლიმერ N-აცეტილგლუკოზამინს [38]. უამრავი მონაცემი გვაფიქრებინებს, რომ მუკოპოლისახარიდული სუბსტრატი განლაგდება ნაპრალში ფერმენტის ზედაპირზე და უერთდება მას სპეციფიკური ბმებით [15].

არსებული მონაცემების მიხედვით, აქტიური ცენტრის წარმოქმნაში მონაწილეობს ძირითადად ტრიპტოფანის ექვსიდან სამი ნაშთი (ნაშთები 62, 63, 108), ასპარაგინის მჟავის ნაშთი 52, რომელსაც უარყოფითი მუხტი აქვს და გლუტამინის მჟავის ნაშთი 35, რომელსაც შეუძლია შეასრულოს დონორი პროტონის როლი [32]. ლიზოციმის ფერმენტული აქტიურობის გამოვლენისათვის საჭიროა მოლეკულაში არსებული ოთხი დისულფიდური ხიდაკიდან მხოლოდ რამდენიმეს შენარჩუნება. ნაწილობრივ აღდგენილი ლიზოციმი აქტიურია მანამ, სანამ მასში შენარჩუნებულია სამი დისულფიდური ბმა. პოლუცისტინის ნაშთია C ბოლოიან თანამიმდევრობაში გლუ-ცის-არგ-ლეი. იგი არ არის არსებითი ფერმენტის აქტიურობისათვის. პეპტიდი, რომელიც შეიცავს მხოლოდ ორ დისულფიდურ ხიდაკს, მთლიანად ინაქტივირებულია [29,35].

ამინომჟავური თანამიმდევრობა და დისულფიდური ხიდაკების მდებარეობა პირველად ერთმანეთისგან დამოუკიდებლად გამოიკვლიეს ჟოლემ და კენფილდმა [30,35]. ლიზოციმის მოლეკულა წარმოადგენს ცალკეულ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვს, რომელიც შედგება 129 ამინომჟავისა და ოთხ ადგილას დამაგრებული დისულფიდური ბმებისაგან. 1965 წელს შეიქმნა რენტგენოსტრუქტურულ მონაცემებზე დაფუძნებული 2\AA გარჩევითობის ლიზოციმის მოდელი [31]. ლიზოციმის მორფოლოგიის აღწერა შეიძლება $45 \times 30 \times 30 \text{\AA}$ ზომების გაჭიმული ელიფსოიდით, რომელსაც გააჩნია დამორებული სოლისებრი უბანი [32]. წარმოქმნილი ნაპრალი წარმოადგენს ფერმენტის აქტიურ ცენტრს. ლიზოციმის სპირალიზაცია შეადგენს მიოგლობინისათვის შესაბამისი სიდიდის ნახევარზე ნაკლებს. ლიზოციმის მოლეკულა შეიცავს Π -სპირალის მსგავსი უბნების მხოლოდ მცირე რაოდენობას (ნაშთები 5-15, 24-34, 88-96) და რამდენიმე უფრო მოკლე უბანს, რომელთა ნაშთებს აქვთ თითქმის ისეთივე θ და Ψ კუთხეები, როგორც Π -სპირალს ან α -სპირალს [9], მაგრამ კლასიკური სპირალისაგან განსხვავებით $-C=O^-$ და $-NH^+$ ჯგუფები აქ ისე არ უახლოვდებიან

ერთმანეთს. ლიზოციმის სტრუქტურის მნიშვნელოვანი თავისებურებაა β -შრის არსებობა [9]. იგი წარმოქმნილია წყალბადური ბმებით დაკავშირებული სამი ანტიპარალელური ჯაჭვით (ნაშთები 42_48, 49_54, 57_61), რომლებშიც მონაწილეობენ ამიდისა და კარბოქსილის ჯგუფები, აგრეთვე სერინის, ტრეონინის, ასპარგინისა და გლუტამინის გვერდითი ჯაჭვების ატომები. ზემოთ ჩამოთვლილი გვერდითი ჯგუფებიდან ზოგიერთი მიეკუთვნება არა თვით β -შრის ნაშთებს, არამედ ჯაჭვში უფრო დაშორებით განლაგებულ ნაშთებს. მიჩნეულია, რომ ეს β სტრუქტურა მნიშვნელოვან როლს ასრულებს ფერმენტის ნატივური კონფორმაციის ფიქსაციასა და მის სტაბილიზაციაში. თუმცა, საეჭვოა, რომ ეს უბანი განივი წყალბადური ბმების განსაზღვრული რაოდენობით ისეთივე მნიშვნელოვანი იყოს საერთოდ სტრუქტურის ფორმირებისათვის, როგორც არის ჰიდროფობული ურთიერთმოქმედება. რაც შეეხება ლიზოციმის მოლეკულის დანარჩენ ნაწილს, მისი სტრუქტურა არ გამოირჩევა აშკარა რეგულარულობით. ისევე როგორც მიოგლობინში, ლიზოციმის გვერდითი ჯაჭვები მდებარეობს გლობულის გარეთ, არაპოლარული კი საიმედოდაა დაცული შიგნით. საგულისხმოა, რომ პირველი 40 ნაშთი, N ბოლოდან დაწყებული, წარმოქმნის კომპაქტურ სტრუქტურას, რომელიც, შესაძლოა წარმოადგენს ერთგვარ «სუბსტრუქტურას», რომლის გარშემოც თითქოსდა ეხვევა ფერმენტის მოლეკულის მთელი დარჩენილი ნაწილი [32]. თუ მიოგლობინში არის დაახლოებით ქსენონის ატომის ზომების შესაბამისი ღრუ, მაშინ ლიზოციმში არის რამდენიმე ღრუ, რომლებიც ალბათ ავსებულია გამხსნელით [9].

ლიზოციმის სტრუქტურაში ყველაზე ყურადსადებია მოლეკულის ცენტრის გასწვრივ ნაპრალის არსებობა. სწორედ ეს ნაპრალია სუბსტრატის მიერთების ადგილი, როგორც დაამტკიცა ფილიპსმა რენტგენოსტრუქტურული ანალიზის მეთოდით [32]. ლიცოზიმსა და მის სუბსტრატს _ პოლისახარიდულ ჯაჭვს შორის ურთიერთმოქმედება ხორციელდება სწორედ ამ ნაპრალში ექვსი წყალბადური ბმისა და მთელი რიგი არაპოლარული ურთიერთმოქმედებების მეოხებით. სუბსტრატის მიერთებისას ცვლილებას განიცდის ფერმენტული მოლეკულის კონფორმაცია, ისე, რომ ნაპრალი ოდნავ ვიწროვდება და ღრმავდება [32]. ეს იყო

ინდუცირებული ურთიერთმოქმედების კომლანდისეული თეორიის პირველი აშკარა დადასტურება. ლიზოციმის მოქმედების მექანიზმი ზოგადად ხასიათდება შემდეგი ფაქტორებით: 1) ირღვევა შაქრის ნაშთისათვის დამახასიათებელი «სავარძლის» სტაბილური კონფიგურაცია, რასაც თან სდევს C-O ბმის რეაქციულუნარიანობის ზრდა. 2) გლუტამინის მჟავის ნაშთის კარბოქსილის ჯგუფი წყალბადის იონს აძლევს C-O ხლეჩადი ბმის ჟანგბადის გლიკოზიდურ ატომს. 3) ასპირგინის მჟავას ნაშთის კარბოქსილის ჯგუფი ურთიერთმოქმედებს ამ დროს წარმოქმნილ დადებითად დამუხტულ კარბონის იონთან [12].

ცხრილი 1.2. ქათმის კვერცხის ლიზოციმის დამახასიათებელი ფიზიკო-ქიმიური პარამეტრები [13].

შპირა- ლურობა	ხვედრითი მოცულობა	მოლეკულური წონა	სედიმენტაციის კონსტანტა	იზოელექტრული წერტილი
38%	0.69	14000	1.9	11.0

მიოგლობინი. მიოგლობინი არის გლობულური ჰემ-შემცველი ცილების ჯგუფის ტიპური წარმომადგენელი. ასეთი სახის ცილები შეიცავს ოთხვალენტაან ლიგანდს, პორფირინის რგოლს ორ-ვალენტაან რკინასთან ერთად (ე. წ. ჰემს). პორფირინის რკინასთან კომპლექსს აქვს ორი დამატებითი შეკავშირების ადგილი, რომლებიც განლაგებულია პორფირინის რგოლის სიბრტყის ზემოთ და ქვემოთ. მიოგლობინში ერთ-ერთ შემაკავშირებელ ადგილს იკავებს ჰისტიდინის იმიდაზოლური ნაშთი, მაშინ, როდესაც მეორე თავისუფალი რჩება და შეიძლება დაკავებული იყოს ისეთი ლიგანდით, როგორც არის ჟანგბადი [13]. მიოგლობინის ფუნქცია არის მოლეკულური ჟანგბადის შექცევადი შეკავშირება. მიოგლობინი ასრულებს ჟანგბადის ერთგვარი «საცავის» როლს და იმარაგებს მას შემდეგი მოხმარებისათვის. ამიტომაც არის, რომ დიდი რაოდენობის მიოგლობინი შეიმჩნევა იმ ცხოველების ორგანიზმებში, რომლებიც დიდ დროს ატარებენ წყალქვეშ. მიოგლობინი, ისევე როგორც ჰემოგლობინი, არ არის ფერმენტი. მაგრამ ამ ცილების გამოკვლევა მნიშვნელოვან ინფორმაციას იძლევა იმისათვის, რომ

გავიგოთ როგორც ფერმენტების მოქმედების მექანიზმი, ისე გავარკვიოთ, თუ რა ურთიერთკავშირია გლობულური ცილების სტრუქტურასა და ფუნქციას შორის. საქმე ის არის, რომ მიოგლობინთან ჟანგბადის მიერთება ძალზე ჰგავს სუბსტრატის ფერმენტთან მიერთებას, თუმცა როდესაც ჟანგბადის მოლეკულა შეაღწევს მიოგლობინის გლობულის დრუმში, არ განიცდის რაიმე ცვლილებას ან კონფორმაციის მოდიფიკაციებს. პერუტსის განსაზღვრების საფუძველზე, მიღებულია, რომ მიოგლობინს და ჰემოგლობინს ეწოდოს «საპატიო ფერმენტები» [138].

ისტორიულად, მიოგლობინი ერთი იმ პირველ გლობულურ ცილათაგანია, რომლებისთვისაც გაიშიფრა როგორც პირველადი, ისე მეორეული და მესამეული სტრუქტურები [15,32]. მიოგლობინის სამგანზომილებიანი სტრუქტურა, რომელიც დაადგინეს პერუტსმა და კენდრიუმ რენტგენოსტრუქტურული ანალიზის მეთოდით [86], მნიშვნელოვნად განსხვავდება ჩონჩხის კონფორმაციით ბევრი სხვა ცილის, მაგალითად ლიზოციმის სტრუქტურისაგან. მოლეკულა მოგვაგონებს მასიურ, $44 \times 44 \times 25 \text{ \AA}$ ზომების პოლუსებთან გაბრტყელებულ ელიფსოიდს [29]. მიოგლობინი შედგება ერთი პოლიპეპტიდური ჯაჭვისაგან, რომელიც შეიცავს 153 ამინომჟავურ ნაშთს და რომელსაც აქვს 7-დან 26 ნაშთამდე სიგრძის 8 სპირალური უბანი [35]. ყველა სპირალური უბანი წარმოადგენს მარჯვენა α -სპირალებს. ლიზოციმისაგან განსხვავებით მიოგლობინში სრულიად არ არის β -ფენების ტიპის სტრუქტურები. მოლეკულაში არ არის აგრეთვე დისულფიდური ხიდაკები. მიოგლობინის სპირალიზაციის ხარისხი ძალზე მაღალია და სხვადასხვა გამოკვლევის მონაცემებით შეადგენს 78-80%-ს [30]. უნდა აღინიშნოს მიოგლობინის სპირალიზაციის მიხედვით არსებული მონაცემების კარგი თანხვედრა კრისტალსა და ხსნარში. სპირალური უბნები მიოგლობინში აღინიშნება A-დან H-მდე ასოებით, N ბოლოდან: ყოველი სპირალური უბნის შიგნით ამინომჟავური ნაშთები ინომრება 1-დან n-მდე. შიდასპირალური მოუწესრიგებელი უბნები აღინიშნება AB, CD და ა.შ; ბოლო უბნები – ასოებით NA და HC. მიოგლობინის მოლეკულის «მიგთავსი» შევსებულია ამინომჟავური ნაშთების მჭიდროდ ჩალაგებული არაპოლარული გვერდითი ჯაჭვებით [31].

მრავალი სუსტად ჰიდროფობული ნაშთი გლი და ალა განლაგდება გლობულის ზედაპირზე. დიდი მოცულობის არაპოლარული გვერდითი ჯაჭვები, რომლებიც არ იმყოფებიან გლობულის შიგნით, ინახება ჭრილში ზედაპირის ახლოს, რაც მინიმუმამდე ამცირებს წყალთან კონტაქტს. 77 პოლარულიდან გლობულის შიგნით განლაგდება მხოლოდ F8 ჰისტიდინის რკინასთან დაკავშირებული პროქსიმალური ნაშთები, დისტალური ჰისტიდინური ნაშთები E7 და წყალბადური ბმით დაკავშირებული ტრეონინის ნაშთი [31]. ჰემი ლოკალიზებულია ჭრილში E და F სპირალებს შორის, ხოლო პორფირინთან მაკოორდინირებელი ჰისტიდინის ნაშთი განლაგებულია სპირალში. ჰემის ბოლო, რომელიც შეიცავს პოლარულ პროპიონილურ ნაშთებს, განლაგებულია ზედაპირის ახლოს, ხოლო ჰემის დარჩენილი ნაწილი, კერძოდ არაპოლარული ვინილის ჯგუფები, ჩაძირულია ღრმად ცილის გლობულაში. შემაკავშირებელი ჟანგბადის ცენტრი ასევე იმყოფება მيوგლობინის მოლეკულის შიგნით. ამ «ლიგანდური ჯიბის» შემზღვეველ ნაშთებს წარმოადგენს ჰისტიდინი E7, ვალინი E11 და ფენალამინის ნაშთი CD1 [38]. რკინა-ჰისტიდინის ბმის გამოკლებით, ყველა ბმა, რომლებიც განსაზღვრავენ ჰემის მდგომარეობას მيوგლობინში, განეკუთვნება სუსტ ურთიერთმოქმედებას, ვთქვათ, ციტოქრომ C-სგან განსხვავებით, სადაც ჰემი ცისტეინის ორ ნაშთან დაკავშირებულია კოვალენტური ბმებით. ამრიგად, «ლიგანდური ჯიბე», რომელიც ცილის აქტიური ცენტრია, შემოსაზღვრულია ამინომჟავური ნაშთების გვერდითი ჯაჭვებით და აქვს მკაფიოდ გამოხატული ჰიდროფობული ხასიათი.

ამრიგად, მيوგლობინში მკვეთრად იჩენს თავს ჰიდროფობული ურთიერთმოქმედების გზით გლობულის არაპოლარული ბირთვის წარმოქმნის ტენდენცია, რაც დამახასიათებელია გლობულური ცილების უმეტესობისათვის. ამასთანავე მيوგლობინში ვლინდება მნიშვნელოვანი თავისებურებანიც. α -სპირალების A, B, E, G D და H უბნების ანალიზი მოწმობს, რომ მათში პერიოდულად განლაგებულია არაპოლარული ნაშთები [29]. სპირალური თანამიმდევრობა იმგვარად არის ორიენტირებული, რომ ეს ნაშთები სწორედ გლობულის ბირთვში აღმოჩნდება ხოლმე განლაგებული. პოლიპეპტიდური

ჯაჭვის სპირალიზაცია თერმოდინამიკურად ხელსაყრელია მთელი რიგი ამინომჟავური ნარჩენებისათვის, რადგან იგი უზრუნველყოფს წყალბადური ბმების გაჯერებას. მაგრამ α -სპირალიზაცია განისაზღვრება ჰიდროფობული ურთიერთმოქმედებითაც, ანუ მეორეული სტრუქტურა სტაბილიზდება ცილის სივრცითი (მესამეული) სტრუქტურით. უნდა აღინიშნოს, რომ მიოგლობინსა და მსგავს ცილებში გლი, რომელიც «უნივერსალურ სახსარს» წარმოადგენს, უზრუნველყოფს კონტაქტებს სპირალურ სეგმენტებს შორის, რადგან სპირალის იმ ადგილებში, სადაც იმყოფება გლიცინი, წარმოიქმნება განთავსებისთვის ხელსაყრელი ჭრილები. ამიტომ მესამეული სტრუქტურა ახდენს გლიცინის შემცველი α -სპირალის სტაბილიზაციას. გარდა ამისა, მიოგლობინში გლიცინის ახლოს ჩვეულებრივ იმყოფება გლუ და ალა, რომლებიც ასევე ეწევიან α -სპირალის სტაბილიზაციას.

მიოგლობინის სტრუქტურის გათვალისწინებით, სავსებით ცხადია, რომ ცილის მოლეკულის კონფორმაციის შეცვლა გავლენას ახდენს იმ ამინომჟავურ ნაშთებზე, რომლებიც ახლოს არიან ჰემთან (ჰისტიდინ F8- ის გარდა, ჰემთან მჭიდრო კონტაქტი შეიძლება ჰქონდეთ ალანინ E14, ჰისტიდინ FG3, იზოლეიცინ FG5, ლეიცინ G5, იზოლეიცინ G8 და ფენილალანინ H15-ს) და ამით ზემოქმედებს ლიგანდის მიერთების პროცესზე. შეიძლება მოხდეს საპირისპირო ზემოქმედებაც, რომელსაც მოჰყვება ლიგანდის მიერთება, რაც ცვლის რკინის კომპლექსის ელექტრონულ სტრუქტურას და ამის შედეგად იცვლება ცილის მიმდებარე ნაწილებთან ჰემის ურთიერთმოქმედებაც. თავის მხრივ, ამას მოჰყვება შესამჩნევი ცვლილებები ცილის იმ უბნებში, რომლებიც ძალზე ჩამორჩებიან ჰემს. ცილაში აქტიურ ცენტრსა და მისგან დაშორებულ ცენტრებს შორის ასეთი ტიპის ალოსტერიული ბმა ფართოდ არის გავრცელებული ფერმენტებში [32]. მაგალითად ასეთი ურთიერთმოქმედება შეინიშნებოდა ჰემთან აპომიოგლობინის (ანუ მიოგლობინი ჰემის გარეშე) რეკომბინაციის დროს [12]. რეკომბინაციის შედეგად შესწავლილი გაგანიერება წრიული დიქროიზმის სპექტრებში შორეულ ულტრაიისფერ უბანში ინტერპრეტირებულია როგორც იმის შედეგი, რომ ჯერ კიდევ 15 ამინომჟავურმა ნაშთმა შეიძინა სპირალური კონფორმაცია. ამავე დროს,

როგორც ჩანს, ამინომჟავური ნაშთების უმნიშვნელო გადანაცვლებასაც კი შეუძლია გამოიწვიოს ცილის გლობულის მნიშვნელოვანი ნაწილის შემობრუნება ლიგანდის მიერთების დროს. კმრ სპექტროსკოპიის მეოხებით ნაჩვენებია, რომ ოქსიგენირებისას ხდება სიგნალების წანაცვლება, რომლებიც განეკუთვნება ალიფატური ამინომჟავური ნაშთების მეთილის ჯგუფების წყალბადებს. ეს ყველაზე მეტად შეიძლება იყოს ვალინ E11 ან ლეიცინ B10 ნაშთები. შეინიშნება აგრეთვე ზოგიერთი ტრიპტოფანული ნაშთის სიგნალების წანაცვლება, რომელთაგან არც ერთი არ იმყოფება ჰემის ახლოს. ამრიგად, კონფორმაციული ცვლილებები უნდა გადაეცემოდეს ცილის მოლეკულის დიდი უბნის მეშვეობით, რაც მოწმობს მიოგლობინის მოლეკულის კონფორმაციულ მოქნილობას. მიოგლობინთან ჟანგბადის მიერთებისას ენტროპიის ძლიერი ცვლილება ასევე მოწმობს, რომ მიოგლობინის ცილის ნაწილი მონაწილეობს ლიგანდის მიერთებაში [38]. მიოგლობინის ფიზიკური და ქიმიური თვისებების დაწვრილებითი მიმოხილვა მოცემულია ნაშრომში [15].

ცხრილი 1.3. ცხენის გულის მიოგლობინის დამახასიათებელი ფიზიკო-ქიმიური პარამეტრები [13].

სპირალურო-ბა	ხვედრითი მოცულობა	მოლეკულური წონა	სედიმენტაციის კონსტანტა	იზოელექტრული წერტილი
78-80%	0,74	17300	2,04	7,0

ნაწილი II. კვლევის მეთოდები

§ 2.1. დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრია.

გამოყენების სფერო. დიფერენციული მასკანირებელი კალორი-მეტრიის (დმკ) მეთოდი ფართოდ გავრცელდა ბოლო ათწლეულის განმავლობაში იმ პროცესების შესწავლისათვის, რომლებიც მიმდინარეობს ბიოპოლიმერებში და გამოწვეულია ტემპერატურის ცვლილებით. ბიოპოლიმერების მსგავსი

მაღალკოოპერაციული სტრუქტურები, რომლებიც სტაბილიზებულია უამრავი სუსტი ურთიერთმოქმედებით, ტემპერატურის ცვლილების დროს ხშირად განიცდიან ფაზურ გარდაქმნებს, რაც განპირობებულია კონფორმაციული ცვლილებებით. დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრის მეთოდი მთელ რიგ იმ სპექტროსკოპიულ მეთოდებთან ერთად, რომლებიც უფრო დეტალურ ანალიზს იძლევა მოლეკულურ დონეზე, შესაძლებელს ხდის, მნიშვნელოვნად გავზარდოთ მიღებული ინფორმაციის ხარისხი, რადგან ტემპერატურის ცვალებადობისას მოლეკულურ დონეზე მიმდინარე ცვლილებები შეიძლება დავუკავშიროთ საერთო ენერგეტიკულ მდგომარეობას. მრავალრიცხოვანი ტიპის კონფორმაციულ გადასვლებს შორის ტემპერატურულ დენატურაცია/რენატურაციას, საერთოდ, განსაკუთრებული ადგილი უკავია, რადგან პროცესის თერმოდინამიკური პარამეტრების განსაზღვრისათვის ზომავენ, რამდენად არის გარდაქმნის ხარისხი დამოკიდებული ტემპერატურაზე, ანუ იმ ფაქტორზე, რომლის შეცვლაც იწვევს საკვლევ გარდაქმნას [87]. სისტემის ტემპერატურით განპირობებულ ყველა ცვლილებას, საზოგადოდ, თან უნდა სდევდეს სისტემის ენტალპიის შეცვლა. სისტემის ენტალპიასა და ტემპერატურას შორის, ანუ შეუღლებულ ექსტენსიურ და ინტენსიურ პარამეტრებს შორის ფუნქციური კავშირი შეიცავს მთელ თერმოდინამიკურ ინფორმაციას სისტემისათვის ხელმისაწვდომი მდგომარეობების შესახებ ტემპერატურების განსახილველ ინტერვალში [88]. სწორედ მოწესრიგებულ-მოუწესრიგებლობის ტიპის სითბოთი ინდუცირებული კონფორმაციული ცვლილებების დროს ენტალპიის ცვლილების გაზომვისას შეიძლება შევაფასოთ ბიოპოლიმერებში შიდამოლეკულური ურთიერთ-მოქმედების ენერგეტიკა, რაც თავის მხრივ საჭიროა მოლეკულურ დონეზე მრავალი ბიოლოგიური მოვლენის გაგებისათვის.

ამრიგად, მასკანირებელი კალორიმეტრის ყველაზე აშკარა უპირატესობა ის არის, რომ შეიძლება ტემპერატურის ცვლილებით გამოწვეული კონფორმაციული გადასვლის ენტალპიის უშუალო გაზომვა, რისთვისაც არ არის საჭირო რაიმე ცნობები ამ ცვლილების მექანიზმთან დაკავშირებით. ცვლილების მარეგისტრირებელი ყველა სხვა მეთოდი საკმარისი სიზუსტით აღწერს სხვა

გადასვლის ტემპერატურას, მაგრამ თუ რეაქცია არ არის მონომოლეკულური, თერმოდინამიკური პარამეტრები, უკეთეს შემთხვევაში, შეიძლება განისაზღვროს მხოლოდ გარკვეული მიახლოებით (სხვადასხვა აპროქციმაციის საშუალებით). მასკანირებელ კალორიმეტრს, პირიქით, შეუძლია თავად შეასრულოს ტესტის როლი გადასვლის რეაქციის მონომოლეკულური ბუნების დასადგენად [89]. ამრიგად, კალორიმეტრიული ტექნიკა შეიძლება წარმატებით გამოვიყენოთ ბიოლოგიური მაკრომოლეკულების სითბური დენატურაცია რენატურაციის პარამეტრების შესწავლისათვის, მაგრამ მისი გამოყენების სფერო გაცილებით უფრო ფართო აღმოჩნდა, რადგან სითბო (ენტალპია), რომელიც საჭიროა ფიზიკურ-ქიმიური გარდაქმნისათვის, ერთ-ერთი ფუნდამენტური სიდიდეა თერმოდინამიკაში.

მაღალსტრუქტურირებული ბიოპოლიმერების ყველაზე ფართო კლასის (ცილები, ნუკლეინის მჟავები, ლიპიდები, კომპლექსური სისტემები) გამოკვლევისას, დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრიის მეთოდი საშუალებას გვაძლევს განვსაზღვროთ კონფორმაციული გადასვლების ისეთი თერმოდინამიკური პარამეტრები, როგორცაა კალორიმეტრიული და ე.წ. ვანტ-ჰოფის ენტალპია, სითბოტევადობის ცვლილებანი, თავისუფალი ენერგია, ენტროპია, გადასვლის ტემპერატურა, და გადასვლის ტემპერატურული ინტერვალის ნახევარსიგანე (ΔH_{cal} , ΔH_{VH} , ΔC_p , ΔC_p^d , ΔG , ΔS , T_m , $\Delta T_{1/2}$, იხ. ქვევით), შევაფასოთ თერმოდინამიკურ პარამეტრებზე გარეშე პირობების ზეგავლენა, ტემპერატურაზე დამოკიდებული პროცესების კინეტიკა და შექცევადობა, შევაფასოთ მაკრომოლეკულებს შორის ურთიერთ-მოქმედება, გამოვიკვლიოთ მაკრომოლეკულების ჰიდრატაცია, გამოვაგ-ლინოთ გადასვლის საერთო სითბოში სხვადასხვა მოლეკულური ჯგუფის წვლილის ტემპერატურული დამოკიდებულება, განვახორციელოთ თეორიული მოდელირება [89]. გარდა ამისა, ცილების შემთხვევაში, დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრიის მეთოდით შეიძლება შევისწავლოთ და შევაფასოთ: პროცესის შექცევადობა, ნაწილობრივი შექცევადობა ან შეუქცევადობა, გადასვლის ბუნება, შუალედური მდგომარეობების არსებობა და მათი ხასიათი; დომენური ან სუბდომენური

ერთეულების არსებობა ცილაში და მათ შორის ურთიერთმოქმედების ტიპი; ლიგანდური ასოციაცია/ დისოციაციის პროცესები; პოლიმერიზაციის რეაქციები; რეაქციაში პროტონების ჩაბმა; მულტიმერული ცილებისათვის ოლიგომერიზაციის ხარისხის გაზრდა/ შემცირება; ცილების ურთიერთმოქმედება, გვერდითი ჯაჭვების ქიმიური მოდიფიკაციის წვლილი განსაზღვრული კონფორმაციის სტაბილურობაში; მუტაციური ცვლილებების წვლილი ცილის ამინომჟავურ შემადგენლობაში, ამა თუ იმ კონფორმაციის სტაბილურობაში [23,25,26].

სისტემის ენტალპიის ცვლილების კალორიმეტრიულ გაზომვას საფუძვლად უდევს ის ფაქტი, რომ ტემპერატურის მიხედვით ენტალპიის პირველი წარმოებული არის პარციალური სითბოტევადობა მუდმივის წნევის დროს და, მაშასადამე ენტალპიის ცვლილების გაზომვისათვის საჭიროა სითბოტევადობის შეცვლის ინტეგრირება ტემპერატურების ჩვენთვის საინტერესო ინტერვალში კირხჰოფის ცნობილი შეფარდების შესაბამისად. სწორედ ტემპერატურის ცვლილებით გამოწვეული მუდმივი წნევის დროს პრეპარატის სითბოტევადობის შეცვლას აღნუსხავს მასკანირებელი კალორიმეტრი. მაგრამ, უნდა აღინიშნოს, რომ ცილის ან სხვა ბიოპოლიმერის სითბოტევადობის ცვლილების რეგისტრაციას მეტად ართულებს ის გარემოება, რომ გაზომვა წარმოებს ხსნარში. ამასთან კონცენტრაციები, რომელთა დროს შიდამოლეკულური ურთიერთმოქმედება საკმაოდ მცირე ხდება, საშუალო ცილისათვის ერთ წონით პროცენტზე ნაკლებია. თუ გავითვალისწინებთ წყლის კოლოსალურ სითბოტევადობას, ცილის სითბოტევადობის წვლილი ხშირად შეადგენს ხსნარის სითბოტევადობის 0,03 პროცენტზე ნაკლებს. ამიტომ სწორედ ბიოპოლიმერებით განპირობებული სითბური ეფექტების საკმაოდ ზუსტი განსაზღვრისათვის საჭიროა დიფერენციული სქემის გამოყენება, რომელშიც სითბოს გაზომვა ხდება საკვლევი ნიმუშის ისეთ (თითქმის იდენტურ) ეტალონთან შედარების გზით, რომელიც არ შეიცავს საკვლევ პრეპარატს. კალორიმეტრი აფიქსირებს სითბურ პროცესებს სწორედ ბიოპოლიმერში, რადგან სითბური ეფექტები გამხსნელში ურთიერთკომპენსირებული იქნება. მაგრამ ასეთი გაზომვის განხორციელებისათვის საჭიროა მეტად რთული, პრეციზიული ტექნიკა.

ზოგადად, დიფერენციული მასკანირებელი მიკროკალორიმეტრი შემდეგნაირად მუშაობს [15,27]. შედარების და ნიმუშის შემცველ კამერებში მულტივი სიჩქარით მიეწოდება იდენტური სიმძლავრე, რომელმაც კამერების სითბური იზოლაციის პირობებში უნდა გამოიწვიოს ორივე კამერის ტემპერატურის გარკვეული მულტივი ზრდა. ტემპერატურის მომატების სიჩქარეს განსაზღვრავს კამერების გამხურებელში მიწოდებული დენის სიდიდე $\sigma = PR/C$, სადაც C თითოეული კამერის სითბოტევადობას აღნიშნავს. თუ ნიმუშის შემცველი კამერის სითბოტევადობა მეტია, ვიდრე გამხსნელით ავსებული (შედარების) კამერის სითბოტევადობა, პირველი კამერის ტემპერატურა ჩამორჩენას დაიწყებს. ორივე კამერაში მულტივი გახურების სიჩქარის შენარჩუნებისათვის, ტემპერატურული მგრძობელობის სქემა, რომელიც უკუკავშირის სისტემის საშუალებით აფიქსირებს კამერებს შორის ტემპერატურის სხვაობას, გამოიწვევს კამერის გამახურებელში დამატებითი სიმძლავრის ΔP მიწოდებას, რომელიც ჩამორჩება ტემპერატურის მიხედვით, და ნულამდე შეამცირებს ტემპერატურის სხვაობას. ამრიგად, შეიძლება ჩავწეროთ:

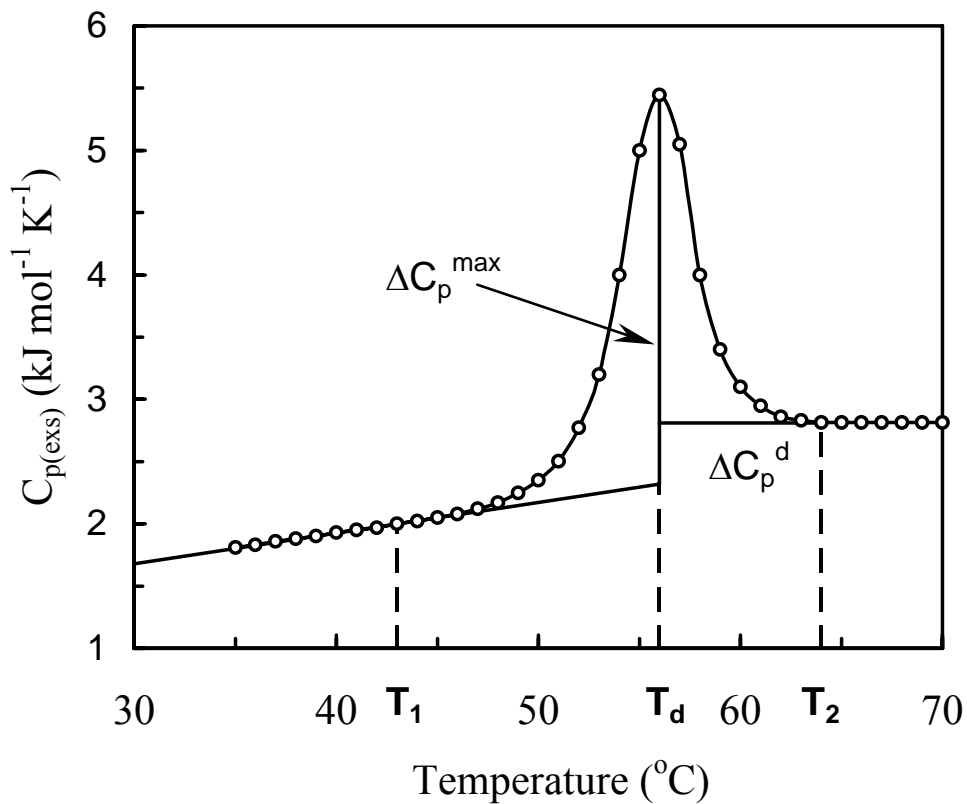
$$\sigma = \frac{P}{C} = \frac{P + \Delta P}{C + \Delta C} \quad (2.1)$$

საიდანაც
$$\Delta C = \frac{\Delta P}{\sigma}$$

სადაც ΔP არის მყისიერი დამატებითი სიმძლავრე, რომელიც მიეწოდება მეტი სითბოტევადობის კამერის გამხურებელს, ΔC კი აღნიშნავს კამერების განსხვავებულ სითბოტევადობას. ასე რომ, საწყისი სიგნალი, ფაქტობრივად, იძლევა სიმძლავრეს, როგორც დროის ფუნქციას. რეალური თერმოდინამიკური მნიშვნელობის მქონე მონაცემების მიღების მიზნით თერმოგრამის ღერძები სათანადოდ ტრანსფორმირდება. უფრო ზუსტი სახით სიმძლავრე მოლურ სხვაობრივ სითბოტევადობასთან დაკავშირებულია შეფარდებით [23]:

$$C_{p(exs)} = \frac{dQ_p}{dt} \times \frac{1}{\sigma M} \quad (2.2)$$

სადაც Q_p – მუდმივი წნევის დროს შთანთქმული სითბოა, α – სკანირების სიჩქარეა, M – ნიმუშის მოლების რიცხვი პრეპარატიან კამერაში, და ბოლოს T ტემპერატურა, რომელიც უშუალოდ არის დაკავშირებული სკანირების სიჩქარესთან $T = \beta t$. ამის შედეგად, ექსპერიმენტული დამოკიდებულების მრუდი წარმოგვიდგება როგორც გრაფიკი, სადაც სითბოტევადობა წარმოადგენს ტემპერატურის ფუნქციას. სწორედ ასე მუშაობენ აკერმანის [92], ბრანდტის [12], გილის [93], პრივალოვის [14,27] და სხვა კონსტრუქციის მიკროკალორიმეტრები. რამდენადმე სხვაგვარად გარდაიქმნება სიმძლავრის სიგნალი სტიურტევანტის [34] კონსტრუქციის კალორიმეტრში.



სურათი 2.1. α -ქიმოტრიპსინის პარციალური სითბოტევადობის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების ტიპური კალორიმეტრიული მრუდი. ცდის პირობები: ცილის კონცენტრაცია 1 მგ/მლ, pH 3.5 (ფოსფატის ბუფერი), ტემპერატურის სკანირების სიჩქარე 2 K/წთ (სურათის აღწერილობა იხ. ტექსტში).

ცილის (ამ შემთხვევაში α -ქიმოტრიპსინის) პარციალური სითბოტევადობის ტემპერატურაზე დამოკიდებულების ტიპური კალორი-მეტრიული მრუდი გამოსახულია სურათზე 2.1 [12,13]. სითბოტევადობის მრუდი პირობითად შეიძლება დაიყოს სამ ნაწილად. ნატივური ცილის სითბოტევადობის წინადენატურაციული ცვლა (T_1 -ის ქვევით) ხასიათდება საკმაოდ კარგად გამოხატული, დაახლოებით წრფივი ტემპერატურული დამოკიდებულებით – ტემპერატურის ერთი გრადუსით მომატება იწვევს C_p -ს დაახლოებით 0,7 %-ით ზრდას. სითბოტევადობის ეს ცვლილება თვით ცილის მაკრომოლეკულის, ან ცილის და მასთან ძალიან მჭიდროდ დაკავშირებული წყლის თვისებაა, რადგან შენარჩუნებულია ცილების გამომშრალი ნიმუშებისთვისაც. დენატურირებული ცილის სითბოტევადობას (T_2 -ზე ზევით) ახასიათებს გაცილებით ნაკლები ტემპერატურული კოეფიციენტი. T_1 -სა და T_2 -ს შორის სითბოტევადობა გაივლის მაქსიმალურ მნიშვნელობას, რის შედეგადაც წარმოიქმნება ინტენსიური სითბოს შთანთქმის პიკი, რომელიც შეესაბამება დენატურაციულ გადასვლას. პიკის სიმაღლე ΔC^d სითბოტევადობის ერთეულებში განისაზღვრება გადასვლის ტემპერატურის T_d დროს ნატივური და დენატურირებული ცილის სითბოტევადობების საშუალო სიდიდის მიხედვით, ანუ როგორც $C_p^n + 1/2 \Delta C_p^d$ (იხ. სურ. 2.1). ყურადღება უნდა მივაქციოთ იმ ფაქტს, რომ გადასვლის ტემპერატურა T_d (რომელიც აღებულია როგორც გადასვლის ტემპერატურული ინტერვალის საშუალო წერტილი) ზოგად შემთხვევაში შეიძლება არ დაემთხვეს სითბოშთანთქმის პიკის ტემპერატურულ მაქსიმუმს [32]. ამ ტემპერატურების ურთიერთკავშირი განისაზღვრება ენტალპიის ტემპერატურული დამოკიდებულებით, პიკის სიმაღლით და სითბოს შთანთქმის პიკის ორი ნახევრის მასების ცენტრებს შორის მანძილით ΔT . პრაქტიკული გამოყენებისათვის სავსებით გამოსადეგია შემდეგი აპროქსიმაცია [32]:

$$T_m - T_d = \frac{\Delta T \Delta C_p^d}{\Delta C^d} \quad (2.3)$$

მეტი წილი ცილებისათვის T_d T_m –გან განსხვავდება არა უმეტეს 0.7 °C–ით, ანუ 0,2 % –ით ტემპერატურების აბსოლუტურ სკალაზე, ამიტომ T_m –ის შეცვლა T_d –ით არ იწვევს რამდენადმე შესამჩნევ შეცდომებს გადასვლის პარამეტრების განსაზღვრაში.

დენატურაციის სითბური ეფექტი ΔH_d განისაზღვრება სითბოშთანთქმის პიკის ფართობით ცნობილი სიმძლავრის საკალიბრებელი ნიმუშის ფართობთან ამ ფართობის შედარების გზით. პიკის ფართობი განისაზღვრება როგორც ფიგურის ფართობი, რომელიც ზემოდან შემოსაზღვრულია სითბოტევადობის მრუდით, ქვემოდან ნატივური და დენატურირებული ფორმების სითბოტევადობებით, რომელთა წრფივი ექსტრაპოლაცია ხდება გადასვლის ტემპერატურის მიმართულებით. ამ პროცედურის შედეგად წარმოიქმნება სითბოტევადობის ნახტომი ΔC_p^d , რომელიც გლობულური ცილების შემთხვევაში შეადგენს 0.4_0.6 ჯ/გ გრად. რადგან ლღობის მრუდების ასიმეტრია, როგორც წესი, არ არის დიდი, სითბოტევადობის საფეხურით სიგმოიდის შეცვლა არ იწვევს რამდენადმე არსებით შეცდომას ფართობის განსაზღვრაში [32].

სურ. 2.1 გამოსახული ყოველი ტემპერატურული უბნის შიგნით ნატივური და დენატურირებული ფორმების თანაფარდობა გადასვლის ყოველ წერტილში იცვლება ტემპერატურის ცვალებადობის მიხედვით. ტემპერატურის ზრდასთან ერთად გადასვლის სიმკვეთრეს განსაზღვრავს ორ კონფორმაციულ მდგომარეობას შორის ენტალპიების სხვაობის აბსოლუტური სიდიდე გიბს-ჰელმჰოლცის ტოლობის შესაბამისად [32]:

$$\left(\frac{\partial}{\partial T} \left(\frac{\Delta G_i}{T} \right) \right)_p = -\frac{\Delta H_i}{T^2} \quad (2.4)$$

გადასვლის სიმძაფრე (კოოპერაციულობა) შეიძლება დახასიათდეს დენატურაციის ტემპერატურული ინტერვალის ნახევარსიგანით, $\Delta T_{1/2}$ (ფაქტობრივად, ტემპერატურების სხვაობით პიკის ნახევარსიმაღლეზე). გადასვლის ენტალპიის გამოსათვლელად T ტემპერატურის დროს, აუცილებლად გასათვალისწინებელია, რომ დენატურაციის ჯამურ სითბურ ეფექტში შედის არა მარტო ენტალპიის ცვლილება N მდგომარეობიდან D მდგომარეობაში გადასვლის დროს, არამედ ტემპერატურების მოცემულ ინტერვალში და მდგომარეობებში მყოფი მოლეკულების მიერ შთანთქმული სითბოს «ფონური» რაოდენობაც. იმისათვის, რომ ვიპოვოთ სწორედ $\Delta H(T)$ – ენტალპიის ცვლილება, რომელიც დაკავშირებულია T ტემპერატურის დროს გადასვლასთან, უნდა ΔH_d -დან გამოვიანგარიშოთ სითბოს შთანთქმასთან დაკავშირებული წვლილები იმ მოლეკულებისა, რომლებიც იმყოფებიან N მდგომარეობაში T_1 -დან T_d -მდე ტემპერატურების ინტერვალში და მოლეკულებისა, რომლებიც იმყოფებიან D მდგომარეობაში T_d -დან T_2 -მდე ტემპერატურების დროს [58,87,88]:

$$\Delta H(T) = \int_{T_1}^{T_d} C_p^N dT - \int_{T_d}^{T_2} C_p^D dT = \Delta H_d - \int_{T_1}^{T_d} \Delta C_p^d dT \quad (2.5)$$

სადაც C_p^N და C_p^D – ცილის სითბოტევადობებია შესაბამისად N და D მდგომარეობებში; T_d – გადასვლის ტემპერატურაა, რომლის დროსაც $[N] = [D]$ (ფაქტობრივად, სითბოშთანთქმის მაქსიმუმის ტემპერატურა); $\Delta C_p^d = C_p^D - C_p^N$ არის დენატურირებული და ნატივური მდგომარეობების სითბოტევადობების სხვაობა T_d -ს, გადასვლის ტემპერატურის, დროს [58].

ენტროპიის ცვლილება ამ პროცესში შეადგენს

$$\Delta S = \frac{\Delta H_d}{T_d} - \int_{T_1}^{T_d} \frac{\Delta C_p^d}{T} dT \quad (2.6)$$

გიბსის თავისუფალი ენერგია, ΔG , კი ასე იცვლება

$$\Delta G(T) = \Delta H_d - T_1 \Delta S = \Delta H_d \frac{T_d - T_1}{T_d} - \int_{T_1}^{T_d} \frac{T - T_1}{T} \Delta C_p^d dT \quad (2.7)$$

კონსტრუქციის თავისებურებები და მოქმედების პრინციპი. თანამედროვე დიფერენციალურ მასკანირებელ კალორიმეტრებს მთელი რიგი საერთო თვისებები გააჩნიათ [12,31,32,38,39]. ჯერ ერთი, ისინი სითბოტევადობას ზომავენ არა დისკრეტულად, არამედ უწყვეტად, ნიმუშის მუდმივი სიჩქარით გახურების ან გაცივების დროს. გახურების სიჩქარის მუდმივობის შენარჩუნებისათვის პრეციზიულ მასკანირებელ მიკრო-კალორიმეტრებში ჩვეულებისამებრ გამოიყენება კალორიმეტრული კამერების სრული ან ნაწილობრივი ადიაბატიზაცია, რომელიც საჭიროა არა მარტო გასაზომ კამერაზე გარემოს სითბური გავლენის თავიდან აცილებისათვის, არამედ თვით კამერაში შიდა პირობების, ტემპერატურული ველებისა და გრადიენტების შენარჩუნებისათვის. ადიაბატიზაციისათვის კალორიმეტრიული კამერები გარშემორტყმულია გარსით (ეკრანით), რომლის ტემპერატურა კამერების ტემპერატურის ტოლია და ამ ტემპერატურას არეგულირებს ავტომატური სამართავი სისტემა. ყველაზე მგრძობიარე თანამედროვე მიკროკალორიმეტრებში, რომლებსაც განეკუთვნება DACM-4, გამოიყენება ერთმანეთში ჩადგმული რამდენიმე სითბური ეკრანი. ეს უკანასკნელები წარმოადგენს თბოგამტარი მასალისაგან დამზადებულ გარსებს, რომელთა გარე ზედაპირზე თანაბარზომიერად არის განაწილებული ელექტრო-გამხურებელი [30]. თანამედროვე მასკანირებელი კალორიმეტრების მესამე დამახასიათებელი თვისება არის ის, რომ მათში არ არის სარეველა სითხის მოსარევეად მთელ ფართობზე ტემპერატურის გათანაბრების მიზნით. ამის შედეგად, ჩნდება მორევის მექანიკური სითბო, რომელიც არ ექვემდებარება აღრიცხვას. თანამედროვე მიკროკალორიმეტრებში სარევის გამორიცხვა შესაძლებელი გახდა მეტად მცირე მოცულობის კამერების გამოყენების მეოხებით, რაც თავის მხრივ ხელს უწყობს ტემპერატურული გრადიენტების გათანაბრებას და

კონვექციული ნაკადების თავიდან აცილებას. კალორიმეტრიული კამერის მცირე მოცულობა მასკანირებელი კალორიმეტრების მართო ერთ-ერთი მახასიათებელი როდია, რომლებიც მცირე რაოდენობის პრეპარატებთან მუშაობის საშუალებას იძლევა. იგი პრინციპულ მოთხოვნასაც უყენებს ამ ხელსაწყოების კონსტრუქციას.

გასაზომი კამერების კონსტრუქციასთან უშუალოდ არის დაკავშირებული კიდევ ორი არსებითი პრობლემა: თანაბარი და მკაცრად განსაზღვრული რაოდენობის ნივთიერებებით კამერების დატვირთვის პრობლემა და თავისუფალი მოცულობის პრობლემა. საქმე ის არის, რომ კამერების დატვირთვის სიზუსტე უნდა იყოს არა ნაკლებ 10^{-5} გ, ასეთი სიზუსტის მიღწევა კი ჩასახმელი სითხის აწონვით შეუძლებელია. ამავე დროს, არ შეიძლება ჰერმეტიული კამერის მთლიანად ავსება, რადგან კამერის და სითხის სითბური გაფართოების კოეფიციენტები განსხვავებულია. მაგრამ თუ კამერაში დავტოვებთ თავისუფალ მოცულობას, გახურების პროცესში ხდება ორთქლწარმოქმნა და ორთქლწარმოქმნის სითბოს სხვაობითი ეფექტი შეიძლება ხსნარიან და გამხსნელიან კამერებში მეტად მნიშვნელოვანი აღმოჩნდეს.

ორივე ეს პრობლემა ერთდროულად გადაიჭრება, თუ გაიზომება არა გარკვეული მასის, არამედ გარკვეული მოცულობის ნივთიერებათა სითბოტევადობა [32]. ამასთან გასაზომი სითხის მოცულობა ფიქსირდება არა დასაშლელი კალორიმეტრიული კამერების ხისტი მოცულობით. თანაც კამერა ავსებული უნდა იყო მთლიანად, რისთვისაც იყენებენ კაპილარულ მილს, რომელიც კამერას გარემოსთან აკავშირებს. საკვლევ სითხეს კამერაში ასხამენ კაპილარული მილით, ისე რომ შეივსოს თავად მილიც. კამერის სამუშაო მოცულობა მთლიანად შემოსაზღვრულია ადიაბატური გარსით, რომელიც კამერაზე მილის გარეთა ნაწილის გავლენას აღკვეთს. კაპილარული მილების გარეთა ნაწილს ადებენ რამდენიმე ატმოსფეროს სიმძლავრის ჭარბ წნევას, რომელიც გამორიცხავს ბუშტუკების წარმოქმნას სითხის გაცხელების დროს. გარდა ამისა, გარეშე ჭარბი წნევა ხელს უწყობს საკვლევ სითხის დუდილის ტემპერატურის არსებით წანაცვლებას და, მაშასადამე სკანირების ტემპერატურული დიაპაზონის ზედა ზღვრის გაზრდას. მთლიანად ავსებული

კამერების გაცხელების პროცესში, სითბური გაფართოების შედეგად კამერებიდან სითხე გამოიდევნება კაპილარულ მილებში, ანუ კამერების სამუშაო მოცულობაში სითხის მასა მცირდება ტემპერატურის ზრდის მიხედვით. მაგრამ, გაზავებულ ხსნარებთან მუშაობის დროს, რომლებსაც პრაქტიკულად სითბური გაფართოების ისეთივე კოეფიციენტი აქვთ, როგორც გამხსნელს, ორივე კამერიდან სითხის გამოდევნა ფაქტობრივად ერთნაირი ხარისხით ხდება და გავლენას არ ახდენს სხვაობითი სითბოტევადობის გაზომვის შედეგზე.

ფიქსირებული მოცულობის სითხის სითბოტევადობის გაზომვის მეთოდი გამოყენებულია ДАСМ – 4 და ДАСМ – 4А კალორიმეტრში (Биоприбор, Пушино). ასეთი ტიპის კალორიმეტრებში გასაზომი კამერები წარმოადგენს სპირალად დახვეულ გამჭოლ კაპილარულ მილს. კამერების ასეთი კონსტრუქცია მთელ რიგ უპირატესობებს იძლევა: ჯერ ერთი, მილის პატარა დიამეტრისა და მისი მაღალი სითბოგამტარობის გამო გახურების პროცესში არ ჩნდება ტემპერატურის მნიშვნელოვანი გრადიენტი სითხეში, რომლითაც ავსებულია მილი. შესაბამისად, ტემპერატურული ველი ასეთ კამერებში უფრო ერთგვაროვანია და კაპილარული კამერების გახურება შეიძლება მეტი სიჩქარით, ვიდრე მოცულობითის. თავის მხრივ, სკანირების სიჩქარის გაზრდას მოჰყვება ხელსაწყოს რეალური მგრძნობიარობის გაზრდა. მეორე ის, რომ გაცილებით იოლია კაპილარული კამერების გარეცხვა, გაშრობა და ხსნარით ავსება ისე, რომ არ დარჩეს ჰაერის ბუშტუკები. და ბოლოს, კაპილარული კამერები უძლებენ გაცილებით მეტ წნევას, ვიდრე მოცულობითი, ეს კი საშუალებას იძლევა მნიშვნელოვნად გავზარდოთ სამუშაო ტემპერატურული დიაპაზონის ზედა ზღვარი. ДАСМ – 4 ხელსაწყოში იგი აღწევს 130 °C [94].

მიკროკალორიმეტრები ДАСМ-4 და ДАСМ-4А. დიფერენციული ადიაბატური მასკანირებელი მიკროკალორიმეტრი ДАСМ-4 განკუთვნილია მოლეკულური ბიოლოგიის, ბიოლოგიური ფიზიკის და სხვა დარგებში წარმოებული კვლევის დროს სითბური სიმძლავრის რეგისტრაციისათვის, რომელიც ახასიათებს სითხეების სხვაობითი სითბური ტევადობის ცვლილებებსა და ტემპერატურის ცვლილებით განპირობებულ სუსტ სითბურ ეფექტებს [94].

უშუალოდ გაზომვისათვის განკუთვნილი კალორიმეტრიული კვანძი წარმოადგენს ჰერმეტიულ ჭურჭელს. მის შიგნით განლაგებულია მასისა და მოცულობის მიხედვით ორი იდენტური კალორიმეტრიული კამერა, რომლებსაც გარს არტყია ორი კონცენტრირებული ადიაბატირებადი ეკრანი და თერმოსტატი. კალორიმეტრიული კამერები წარმოადგენს 1-6 მილიმეტრი დიამეტრის მქონე პლატინის კაპილარს, რომელიც ცილინდრულ სპირალად არის დახვეული. ყოველ კამერას აქვს ორი ბიფილარული გამაცხელებელი. აქედან ერთი გამოიყენება კამერის გაცხელებისა და სითბური სიმძლავრეების სხვაობის კომპენსაციისათვის, ერთ-ერთი კამერის მეორე გამაცხელებელი ემსახურება მიკროკალორიმეტრის დაკალიბრებას, მეორე კამერისა კი განკუთვნილია მუდმივას კომპენსაციისათვის, რომელიც წარმოადგენს კამერების სითბური სიმძლავრეების სხვაობას. კამერების ტემპერატურების სხვაობის ელექტრულ სიგნალად გარდამქმნელია თერმოზატარეა. სხვა თერმოზატარეები თითოეულ ეკრანსა და კალორიმეტრიულ კამერებს შორის ტემპერატურების სხვაობის გარდამქმნელებს წარმოადგენენ. ადიაბატირებადი ეკრანების ტემპერატურა რეგულირდება ეკრანის ზედაპირზე თანაბრად განლაგებული ელექტრული გამაცხელებლების მეოხებით. თერმოსტატის ტემპერატურის გაზომვისათვის გამოიყენება წინაღობის სპილენძის თერმომეტრი. მეორე ასეთივე თერმომეტრი, რომელიც განკუთვნილია კალორიმეტრიული კამერების ტემპერატურის გაზომვისათვის, მდებარეობს შიდა ეკრანზე.

მიკროკალორიმეტრის მოქმედების პრინციპი ასეთია: ერთ-ერთ კამერას ავსებენ შესადარებელი სითხით, მეორეს – შესადარებელ სითხეში გაზავებული საკვლევი ნივთიერების ხსნარით. კამერის გამაცხელებლებში გამოყოფილი მუდმივი სიმძლავრე უზრუნველყოფს საკვლევი ხსნარის და შესადარებელი სითხის მოცემული სიჩქარით გაცხელებას. გაცხელების სიჩქარის მუდმივობა განისაზღვრება ავსებული კამერების სითბური ტევადობის მუდმივობით. თუ I და II კამერაში მოთავსებული სითხეების სითბურ-ფიზიკური თვისებები განსხვავებულია, მათი გაცხელების დროს წარმოიქმნება ტემპერატურების სხვაობა, რომელსაც თერმოწყვილი გარდაქმნის ელექტრულ სიგნალად. ეს

უკანასკნელი გაძლიერებისას და გარდაქმნის შემდეგ ზემოქმედებს კამერების გაცხელების დენზე იმგვარად, რომ ტემპერატურის სხვაობა მინიმალური გახდეს. კომპენსაციის სიმძლავრის პროპორციულ ძაბვას აღნუსხავს ორკოორდინატიანი თვითმწერი ორდინატების ღერძზე. თერმომეტრის წინაღობა კი გარდაიქმნება აბსცისის ღერძზე აღნუსხულ ძაბვად. სხვაობითი სიმძლავრის მიხედვით მიკროკალორიმეტრის დაკალიბრება ხორციელდება I კამერის დამატებით გამაცხელებელში ცნობილი მნიშვნელობის საკალიბრებელი სიმძლავრის მიწოდებით. ამასთან თვითმწერის დიაგრამაზე აღნუსხება საკალიბრებელი საფეხური, რომლის მიხედვითაც შეიძლება განისაზღვროს საკვლევი პროცესების სხვაობითი სიმძლავრის მნიშვნელობები და, მაშასადამე ენტალპიის შეცვლა. საჭიროების შემთხვევაში, თვითმწერის აბსცისის ღერძის მიმართ აღნუსხული მრუდის დახრილობა შეიძლება შეიცვალოს დახრილობის კორექციის ათვისების მექანიზმის მეშვეობით.

ცხრილი 2.4. კალორიმეტრ DACM-4-ის ძირითადი ტექნიკური მონაცემები:

1. ხმაურის დონე, $V=1/წთ$ სიჩქარით კალორიმეტრიული კამერების გაცხელების დროს, არა უმეტეს 5×10^{-7} ვტ
2. ბაზისური ხაზის აღწარმოება $V=1/წთ$ დროს 3×10^{-6} ვტ
3. გასაშუალოებული მრუდისაგან ბაზისური ხაზის გადახრა $V=1/წთ$ დროს, არა უმეტეს 15×10^{-6} ვტ
4. კამერების ტემპერატურის ცვლილების დიაპაზონი $0.5 \text{ - } 130 \text{ }^{\circ}\text{C}$
5. კალორიმეტრიული კამერების გაცხელების სიჩქარე, V $0.125; 0.25; 0.5; 1.0$ და 2.0 K/წთ
6. საკალიბრებელი სიმძლავრეები $25, 50, 10 \text{ } \mu \text{ ვტ}$

7. რეგისტრაციის რეჟიმზე გადასვლის დრო,
 არა უმეტეს 500 წმ.
8. სითბური სიმძლავრის გაზომვის მგრძობიარობა,
 არა ნაკლებ 100 ვ/ვტ
9. წნევა საკვლევ სითხეზე 2.6 კგ/სმ²
10. სითხის გასამართი მოცულობა
 ერთ კამერაში 0.8 მლ
11. კამერების სამუშაო მოცულობა 0.46 მლ.

§ 2.2. ექსპერიმენტის ჩატარების პირობები.

მოთხოვნები საკვლევ პრეპარატებისა და გამხსნელებისადმი. სკანირების სიჩქარეების შერჩევა. კალორიმეტრიული ექსპერიმენტი მეტისმეტად დიდ მოთხოვნებს უყენებს ექსპერიმენტის პირობების შერჩევას, უწინარესად პრეპარატის სისუფთავს. ნიმუშები, რომლებსაც კალორიმეტრიაში ვიყენებთ, მაქსიმალურად სუფთა უნდა იყოს, კონცენტრაცია კი მაქსიმალური სიზუსტით უნდა განისაზღვროს (სასურველია სპექტროსკოპიული მეთოდების გამოყენებით). ზემოხსენებული მოთხოვნები ძირითად როლს ასრულებენ ექსპერიმენტის სისუფთავეში, რადგან გასაზომ კამერაში მიმდინარე ნებისმიერი სითბური ეფექტები ავტომატურად ჯამდება, მაშინ, როდესაც სითბური ეფექტი უნდა ასოცირდებოდეს მხოლოდ საკვლევ ნიმუშთან, და არა რომელიღაც შენარევებთან. შემდგომში დაგვარად, სასურველია გაკონტროლდეს ნიმუშების მდგომარეობა სკანირების შემდეგ, რათა დავრწმუნდეთ, რომ არ მომხდარა რაიმე დეგრადაციული ცვლილება. კალორიმეტრიული კვლევისათვის მაკრომოლეკულების საჭირო კონცენტრაციის შერჩევა განისაზღვრება აგრეგაციისადმი მიდრეკილების, ხელსაწყოს მგრძობიარობისა და დასახული ამოცანის მიხედვით. თუ ჩვენი ამოცანაა ტემპერატურით განპირობებული კონფორმაციული გადასვლის გამოკვლევა, მაშინ ზუსტი შედეგის მიღებისათვის საჭირო კონცენტრაცია დამოკიდებულია ტემპერატურის სკალაზე შესაბამისი სითბური შთანთქმის ხანგრძლივობასა და გადასვლის ინტენსიურობაზე:

შედარებით მკვეთრი გადასვლებისათვის, როგორც არის ხუთი გრადუსის რიგის მქონე ნახევარსიგანის პატარა გლობულური ცილების დენატურაცია, კონცენტრაცია შეიძლება იყოს 0.5_1.0 მგ/მლ. უნდა აღინიშნოს, რომ სასურველია კალორიმეტრში ჩასხმამდე ხსნარების დეგაზაცია (გარკვეული სიფრთხილვა საჭირო, რომ არ შეიცვალოს კონცენტრაცია და ნიმუშის მდგომარეობა), რათა თავიდან ავიცილოთ ბუშტუკების გაჩენა ტემპერატურის მომატების დროს.

ხსნარის შერჩევას, უნდა ვიხელმძღვანელოთ, უწინარესად, შემდეგი მოსაზრებებით: ა) მოცემულ გამხსნელში პრეპარატის მაქსიმალური ხსნადობით მთელ საკვლევ ტემპერატურულ დიაპაზონში. ბ) მოცემულ გამხსნელში ბიოპოლიმერის საკვლევის მდგომარეობის რეალიზაციით. კიდევ ერთხელ უნდა აღინიშნოს, რომ საჭიროა ისეთი პირობების შერჩევა, რომელთა დროს მოლეკულათაშორისი ურთიერთმოქმედების ალბათობა მინიმალურია, სახელდობრ: ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში მინიმალურად შესაძლო კონცენტრაცია და მაქსიმალურად ელექტროსტატიკური განზიდვა მოლეკულებს შორის. ბოლო პირობა განისაზღვრება იზოელექტრული წერტილიდან პრეპარატის დაშორებით და ამა თუ იმ მარილების იონებით მუხტების ეკრანირებით.

ბუფერული სისტემების შერჩევას ასევე უნდა გავითვალისწინოთ გარკვეული ასპექტები. ჯერ ერთი, ზოგიერთმა ბუფერმა შეიძლება ხელი შეუწყოს მაკრომოლეკულების აგრეგაციას. გარდა ამისა, pH ბუფერული ხსნარის ტემპერატურული ცვლილება განისაზღვრება მისი ჯგუფების იონიზაციის ენტალპიით. ამიტომ ტემპერატურული სკანირების დროს სასურველია ვისარგებლოთ იონიზაციის მინიმალური ენტალპიის მქონე ბუფერებით. ყველაზე მოსახერხებელ ბუფერებს აქვთ პოტენციურად სატიტრი ჯგუფების იონიზაციის ისეთივე ენტალპიები, როგორც ცილის იონიზებად ჯგუფებს. ასეთ ბუფერებს განეკუთვნება, კერძოდ გლიცინის ბუფერი, რომლის კარბოქსილური და ამინური ჯგუფის იონიზაცია მიმდინარეობს pH 2-4 და 8-9 უბნებში. ამავე pH უბანში ხდება ცილის ჯგუფების პროტონირება და დეპროტონირება, თანაც იონიზაციის მეტად ახლო ენტალპიებითურთ. ამის შედეგად, ასეთი ტიპის ბუფერში ცილის ანომალური სატიტრი ჯგუფების სითბური ეფექტი (რომლებიც ექსპონირებულია

ხსნარში ტემპერატურული კონფორმაციული გადასვლის დროს) ავტომატურად კომპენსირდება ბუფერში მიმდინარე უკუპროცესის სითბური ეფექტით. ამიტომ ექსპერიმენტულად დასტურდება სწორედ კონფორმაციული გადასვლის სითბური ეფექტი.

მასკანირებელ კალორიმეტრიაში დიდი მნიშვნელობა აქვს აგრეთვე სკანირების ოპტიმალური სიჩქარის შერჩევას. უწინარესად, მხედველობაში უნდა ვიქონიოთ, რომ გაცხელების სიჩქარის მომატებასთან ერთად იზრდება მასკანირებელი კალორიმეტრების სითბოტევადობის მგრძობიარობა, ამასთანავე მათულობს ტემპერატურული ველის არაერთგვარობა. ეს უკანასკნელი განსაკუთრებულად იჩენს თავს მკვეთრი პროცესების კვლევისას, რომლებიც თითქოსდა განითხევინა მაღალი ტემპერატურების მხარეს მეტისმეტად სწრაფი გაცხელების დროს. ამასთანავე გასათვალისწინებელია ის ფაქტიც, რომ კონფორმაციული გადასვლის სიჩქარე არ არის უსასრულო, თუმცა გლობულური ცილებისათვის იგი საკმაოდ დიდია [95]. სიჩქარის ძირითადი კრიტერიუმი იმისა, თუ რამდენად სწორად არის არჩეული სიჩქარე, არის ტემპერატურული მრუდის ფორმის უცვლელობა ხილული სხვაობითი სითბოტევადობის მიხედვით სიჩქარის ვარიაციების (დაკლების ან მომატების) დროს. ყურადსაღებია, რომ მთელ რიგ შემთხვევებში კონფორმაციული გადასვლის მახასიათებლების გაზომვა გაცხელების რამდენიმე სიჩქარის დროს, რასაც მოჰყვება ექსტრაპოლაცია ამა თუ იმ მხარეს, თავისთავად შეიძლება გაჩნდეს უაღრესად საინტერესო ინფორმაციის წყარო [96].

ამრიგად, თუ საკვლევი პრეპარატი საკმაო რაოდენობით გვაქვს, სასურველია კორექტული გამოკვლევისათვის შევისწავლოთ დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრის მიერ რეგისტრირებული პარამეტრები, როგორც შემდეგი ფაქტორების ფუნქცია: კონცენტრაცია მაქსიმალურად შესაძლო დიაპაზონში, სკანირების (უფრო მეტის, ვიდრე ერთი კონცენტრაცია), ნაწილობრივი სკანირებების სიჩქარე მთელ ტემპერატურულ დიაპაზონში შემდგომი სკანირებითურთ, ცვლილებები გამხსნელის პირობებში (მათ შორის რამდენიმე ბუფერის გამოყენება ერთი კონკრეტული pH-ისათვის). საჭიროა

აგრეთვე განმეორებითი სკანირებები როგორც პროცესის შექცევადობის დასადგენად, ისე შესაძლო ჰისტერეზისის, ან შესაძლო მეტასტაბილური მდგომარეობების გამოსავლენად.

§ 2.3. ექსპერიმენტიდან მიღებული შედეგების დამუშავება.

საზომის ჩვენებების დროს, როდესაც ტემპერატურა მერყეობს 25 და 15 °C შორის, კალორიმეტრიულ კამერებს საგულდაგულოდ გამორეცხავენ სითხით, რომელიც მთლიანად მოაშორებს კამერების კედლებს საკვლევ პრეპარატს, რის შემდეგაც კამერები ორჯერ გაირეცხება დეიონიზებული წყლით და ადვილად აქროლადი გამხსნელით. ამწოვი ტუმბოთი კამერების ზედმიწევნით გაშრობის შემდეგ, მათ ავსებენ სითხით. ბაზისური ხაზის ჩაწერისათვის ორივე კამერას ავსებენ შესაძარებელი სითხით, ხოლო საკვლევ სითხის სითბოს შთანთქმის მრუდის ჩაწერისათვის პირველ კამერას ავსებენ შესაძარებელი სითხით, მეორე კამერას კი – საკვლევ ხსნარით. ამის შემდეგ შევსებულ კამერებში იქმნება 2.6 კგ/სმ²-ის რიგის წნევა, კამერები ცივდება 0.5 °C-მდე, რის შემდეგაც გაცხელებისათვის არჩეული სიჩქარის შესაბამისად წარმოებს კამერების გაცხელება გამორთვის ტემპერა-ტურამდე. მრავალჯერადი გაცხელების რეჟიმით მიკროკალორიმეტრის მუშაობისათვის შეიძლება საჭირო რაოდენობით განვახორციელოთ კალორიმეტრიული კამერების გაცხელება-გაცივების ციკლები და თან თვითმწერის დიაგრამაზე აღვსახოთ სხვაობითი სიმძლავრე. კალორიმეტრი DACM-4 საშუალებას იძლევა, ჩაწერა ვაწარმოოთ 0.5 K/წთ სიჩქარით გაცივების რეჟიმის დროსაც.

ყურადსაღებია ორი მეტად მნიშვნელოვანი მომენტი. გაზომვის შედეგების ხარისხი მნიშვნელოვანწილად არის დამოკიდებული იმაზე, თუ რამდენად საგულდაგულოდ სრულდება კალორიმეტრიული კამერების ავსების ოპერაცია. განსაკუთრებული ყურადღება უნდა მიეპყროს ჩასასხმელ ხსნარში ჰაერის ბუშტუკების უქონლობას. გარდა ამისა, უნდა გვახსოვდეს, რომ ბაზისური ხაზის აღწარმოება და ხმაურის დონე მკვეთრად უარესდება კამერების გაჭუჭყიანებისას.

ამიტომ საბოლოო გარეცხვის შედეგად კალორიმეტრულ კამერებში აღარ უნდა დარჩეს ისეთი კომპონენტი, რომელიც ნალექად გადაიქცევა.

სხვადასხვა ნაშრომში მოყვანილია (იხ. [29] და იქ მოყვანილი ლიტერატურა) კალორიმეტრიული კამერების სიმძლავრეთა სხვაობის ტიპობრივი დიაგრამა, რომელიც მიღებულია მიკროკალორიმეტრის DACM-4-ის მეშვეობით. პირველი მრუდი არის ბაზისური ხაზი H_k საკალიბრებელი ნიშნულითურთ, რომელიც მიიღება გამხსნელით ავსებული კალორიმეტრიული კამერების გაცხელების დროს. მეორე მრუდი მიღებულია კამერების გაცხელების (იმავე რეჟიმით) დროს, რომელთაგან ერთი ავსებულია გამხსნელით, მეორე კი – ცილის ხსნარით. როგორც სურათიდან ჩანს, პირველი მრუდი მეორეს ჩამორჩება H_k მანძილით, რომელიც ახასიათებს სხვაობით სიმძლავრის სიდიდეს ΔP , რაც აიხსნება ცილისა და გამხსნელის ხვედრითი სითბოტევადობის სხვაობით. ΔP -ის მნიშვნელობით შეიძლება განვსაზღვროთ ხსნარში არსებული ცილის პარციალური სითბოტევადობა ჩაწერის დიაპაზონში ნებისმიერი ტემპერატურის დროს. ცილის პარციალური სითბოტევადობა $[C]_p^p$ შეიძლება გამოვთვალოთ ფორმულით [32]:

$$[C]_p^p = [C]_p^s \cdot \frac{[v]^p}{[v]^s} - \frac{\Delta P}{m_p V} \quad (2.8)$$

სადაც $[C]_p^p$ – ცილის პარციალური სითბოტევადობა, ჯ/კგ გრად, $[C]_p^s$ – გამხსნელის პარციალური სითბოტევადობა ჯ/კგ გრად, $[v]^p/[v]^s$ – ცილისა და გამხსნელის პარციალურ მოცულობათა შეფარდება მოცემული ტემპერატურის დროს.

განტ. (2.8)-ში შემავალი სიდიდე:

$$\Delta P = \frac{h}{H_k} \cdot P_k$$

არის კალორიმეტრული კამერების სიმძლავრეთა სხვაობის მნიშვნელობა მოცემულ ტემპერატურაზე; P_k – საკალიბრებელი სიმძლავრე, m_p – ცილის მასა კამერაში, V – გაცხელების სიჩქარე

საბოლოოდ, ფორმულა, რომელსაც ვიყენებდით, ასეთი სახისაა:

$$[C]_p^p = [C]_p^s \frac{[v]^p}{[v]^s} - \frac{h \cdot P_k}{H_k V m_p} \quad (2.9)$$

ლღობის პიკის ფართობის მიხედვით, რომელიც შემოფარგლულია ექსტრაპოლირებული წრფეებით, პიკამდე და პიკის შემდეგ პროცესის მიმდინარეობას რომ აღწერენ, შეიძლება განვსაზღვროთ ხსნარში მყოფი ცილის დენატურაციის ხვედრითი სითბო. ამ სიდიდის გამოთვლა შეგვიძლია შემდეგი ფორმულით:

$$Q = \frac{P_k (T_2 - T_1) \cdot S}{S_k \cdot V \cdot m_p} \quad (2.10)$$

სადაც Q არის დენატურაციის ხვედრითი სითბო, ჯ/გ, P_k – საკალიბრებელი სიმძლავრე, ვტ, T_2 და T_1 – საკალიბრებელი სიმძლავრის ჩართვისა და გამორთვის ტემპერატურები, S – ლღობის პიკის ფართობი, S_k – საკალიბრებელი საფეხურის ფართობი, V – გაცხელების სიჩქარე, m_p – ცილის მასა კამერაში არსებულ ხსნარში.

ასევე იოლად შეიძლება გამოითვალოს სითბოტევადობის მაქსიმალური ცვლილება გადასვლის შუაში და სითბოტევადობის ნახტომი, ΔC_p^d , რომელიც წარმოიქმნება ნატივურიდან დენატურირებულ მდგომარეობაში გადასვლის დროს. გადასვლის ენტალპია კი:

$$\Delta H_{cal} = MQ$$

როდესაც ეს სიდიდეები ცნობილია, შეგვიძლია უშუალოდ განვსაზღვროთ გიბსის თავისუფალი ენერჯის ცვლილების ტემპერატურული

დამოკიდებულება. ამისათვის ყველაზე მოსახერხებელია ვისარგებლოთ ფორმულით [89]:

$$\Delta G(T) = \Delta H \left(\frac{T_m - T}{T_m} \right) - \Delta C_p^d [(T_m - T) + T \ln \left(\frac{T}{T_m} \right)] \quad (2.11)$$

კიდევ ერთხელ უნდა გაესვას ხაზი, რომ მთელი გაანგარიშება ΔG ეფუძნება მხოლოდ უშუალოდ გაზომილ პარამეტრებს, ყოველგვარი დაშვების გარეშე. იმ შემთხვევაში, როდესაც სითბოტევადობის დენატურაციული დეკრემენტი ნულის ტოლია ან ძალზე უახლოვდება მას, ფორმულა თავისუფალი ენერჯისათვის მნიშვნელოვნად მარტივდება [97]:

$$\Delta G(T) = \Delta H_{cal} \left(1 - \frac{T}{T_m} \right) \quad (2.12)$$

გარდა ამისა, pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობის დროს განხორციელებული კალორიმეტრული გაზომვების საფუძველზე შეგვიძლია განვსაზღვროთ ცილის მოლეკულაში იმ პროტონების რაოდენობა, რომლებიც მონაწილეობენ pH-ის ცვლილებით ინდუცირებულ გადასვლაში, რაც გამოიხატება ტოლობით [58]:

$$\Delta n = - \frac{\Delta H(T_d)}{2.3RT_d^2} \left[\frac{dT_d}{d(pH)} \right] \quad (2.13)$$

მასკანირებელი კალორიმეტრის უდიდესი უპირატესობა ის არის, რომ მეთოდი საშუალებას გვაძლევს, არა მარტო უშუალოდ განვსაზღვროთ გადასვლის კალორიმეტრიული ენტალპია, ამასთან არანაირ დაშვებას არ მივმართოთ, არამედ უშუალოდ კალორიმეტრიული ჩანაწერიდან განვსაზღვროთ ეგრეთ წოდებული ეფექტიანი ენტალპია, ან ვანტ-ჰოფის ენტალპია. როგორც ცნობილია [58], ვანტ-ჰოფის კლასიკური იზოქორა ასეთი სახისაა:

$$\left(\frac{\partial \ln K(T)}{\partial T}\right)_P = \frac{\Delta H_{VH}(T)}{RT^2} \quad (2.14)$$

ამასთან რეაქციის წონასწორობის კონსტანტა შეიძლება წარმოვადგინოთ როგორც $K(T) = [D]/[N]$, ან როგორც

$$K(T) = \frac{\theta(T)}{1 - \theta(T)}$$

სადაც $\theta(T)$ არის გადასვლის ხარისხი θ ტემპერატურის დროს ნებისმიერი პროცესისათვის, ნულისაგან განსხვავებული ΔH_{VH} $K(T)$ შეიცვლება ტემპერატურასთან ერთად ისევე, როგორც $\theta(T)$, კალორიმეტრიული სიგნალი კი ამასთან აღწერს სისტემის კომპოზიციის ცვლილებას.

ტემპერატურასთან ერთად კომპოზიციის ცვლილება, შესაბამისად, შეიძლება ჩავწეროთ როგორც [98]

$$\frac{d \ln \frac{\theta}{1 - \theta}}{dT} = \frac{\Delta H_{VH}}{RT^2} \quad (2.15)$$

მეორე მხრივ, ამ თანაფარდობის მარცხენა ნაწილის დიფერენცირებით, მივიღებთ

$$\frac{d \ln \frac{\theta}{1 - \theta}}{dT} = \frac{1}{\theta(1 - \theta)} \frac{d\theta}{dT}$$

სავსებით ცხადია, რომ კალორიმეტრიული მრუდისათვის სითბოშთანქმემა $d\theta / dT$ სხვა არა არის რა, თუ არა სითბოშთანქმის პიკის სიმაღლე (მოლზე გაანგარიშებით) გაყოფილი გადასვლის ენტალპიაზე [32] და ამრიგად გვაქვს:

$$\frac{M\Delta C}{\theta(1-\theta)\Delta H_{VH}} = \frac{\Delta H_{VH}}{RT^2}$$

და

$$\Delta H_{VH}^2 = \frac{RT^2 M\Delta C}{\theta(1-\theta)}$$

გადასვლის შუაგულისათვის $\theta = 0.5$ და თუ გადასვლის ტემპერატურას აღვნიშნავთ t_{θ} და სითბოტევადობის მაქსიმალურ ცვლილებას ΔC_d , მივიღებთ დენატურაციის ეფექტიან ენტალპიას.

$$\Delta H_{VH} = [4RM\Delta C_d T_d^2]^{1/2} \quad (2.16)$$

ამ შემთხვევაში პიკის სიმაღლე ΔC_d განსაზღვრულია ნატივური და დენატურირებელი ცილის სითბოტევადობის საშუალო სიდიდის მეშვეობით, ანუ როგორც $\Delta C_p + 1/2\Delta C_p^d$

კონფორმაციული გადასვლისა და ორი მდგომარეობის მოდელთან მისი შესაბამისობის ანალიზის დროს, უმჯობესია გამოვიყენოთ შემდეგი თანაფარდობა კალორიმეტრიულ და ეფექტიან ენტალპიებს შორის:

$$\frac{\Delta H_{cal}}{\Delta H_{VH}} = \frac{M^{1/2} Q_d}{2R^{1/2} T_d \Delta C_d^{1/2}} \quad (2.17)$$

ასეთი თანაფარდობის გამოყენება მნიშვნელოვან უპირატესობას იძლევა ანალიზის სიზუსტისათვის, რადგან ყველა პარამეტრი მიღებულია ერთი და იგივე ექსპერიმენტული მრუდიდან და თანაფარდობა $\Delta H_{cal} / \Delta H_{VH}$ ნაკლებად მგრძობიარე იქნება სიმძლავრის დაკალიბრების, ცილის რაოდენობის

განსაზღვრისა და გადასვლის შუაგულის ფიქსაციაში არსებული უზუსტობებისადმი.

§ 2.4. პრეპარატები და ხსნარები.

ექსპერიმენტების დროს გამოყენებული იყო ცილების შემდეგი კომერციული პრეპარატები: «ფლუკას" (Fluka) ფირმის: ორაგულის სპერმის დნმ-I, ქათმის კვერცხის ცილის ლიზოციმი, ცხენის გულის მიოგლობინი, ხარის პანკრეასის α -ქიმოტრიპსინი. პრეპარატების ჰომოგენურობა კონტროლირდებოდა Sephadex-75-ზე გელ_ფილტრაციითა და პოლიაკრილამიდის გელში ელექტროფორეზით. ცილების ხსნარები მზადდებოდა შესაბამის გამხსნელთან ცილის პრეპარატის პირდაპირი შერევით, რასაც მოჰყვებოდა 5 °C –ით ინკუბირება 24 საათის განმავლობაში. ცილის კონცენტრაცია განისაზღვრებოდა მშრალი წონის მიხედვით და ინკუბაციის შემდეგ კონტროლირდებოდა სპექტროფოტომეტრიული მეთოდის საფუძველზე ექსტინქციის ცნობილი კოეფიციენტების გამოყენებით. ექსტინქციის გაზომვა მიმდინარეობდა სპექტროფოტომეტრის შპეცორდ UV-VIS (Carl Zeiss, Jena) მეშვეობით 4 სმ³ მოცულობისა და 1 მმ სისქის კედლიან კვარცის კიუვეტებში. გაკეთდა სინათლის გაბნევაზე საჭირო შესწორება. ექსტინქციის გათვალისწინებული კოეფიციენტები pH 7.0 დროს შეადგენს:

ქათმის კვერცხის ცილის ლიზოციმისათვის: $E_{280} (0,1\%) = 2690$

ცხენის მიოგლობინისათვის: $E_{400} (0,1\%) = 8960$

ხარის α -ქიმოტრიპსინისთვის: $E_{280} (0,1\%) = 2000$

კალორიმეტრიულ ექსპერიმენტებში გამოყენებული კონცენტრაციები შეადგენდა (თერმული გამოწვის ექსპერიმენტებში):

ლიზოციმი _ 4.5 მგ/მლ; მიოგლობინი _ 3.0 მგ/მლ; α -ქიმოტრიპსინი _ 3.5 მგ/მლ, და α -ქიმოტრიპსინი _ 1.0 მგ/მლ (შარდოვანას დანამატების შესწავლის ექსპერიმენტებში).

გამხსნელებად გამოყენებული იყო შემდეგი ბუფერული სისტემები: ორი ტიპის 0.04 გლიცინის ბუფერი (გლიცინი _ HCl და გლიცინი NaOH) ლიზოციმის შემთხვევაში.

0.04 გლიცინის ბუფერი (გლიცინი NaOH) მიოგლობინის შემთხვევაში.

0.05 ბორატის ბუფერი ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10\text{H}_2\text{O}$ pH _ ბორის მჟავა) და 0.05 ფოსფატის ბუფერი (NaH_2PO_4 _ ლიმონის მჟავა) α -ქიმოტრიპსინის შემთხვევაში. ხსნარების pH კონტროლირდებოდა კალორიმეტრიულ ექსპერიმენტამდე და ექსპერიმენტის შემდეგ. pH-მეტრის (pH_673) დახმარებით, რომელიც აღჭურვილი იყო უჯრედით მიკროგაზომებისათვის.

ლიზოციმისა და მიოგლობინის ხსნარების სკანირება ხორციელდებოდა 0.25 K/წთ სიჩქარით. α -ქიმოტრიპსინის ხსნარების კვლევა წარმოებდა სკანირების სიჩქარეების ფართო დიაპაზონით 0,125-დან 4 K/წთ-მდე.

ნაწილი III. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა.

§ 3.1. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობის შესწავლა 0–8.5 მოლ/ლ შარდოვანას შემცველ წყალხსნარებში.

შარდოვანას დანამატების შემთხვევაში მიკროკალორიმეტრიული ექსპერიმენტები ჩატარებული იქნა ფონური ელექტროლიტის, NaCl-ის 0.01 და 0.1 მოლ/ლ კონცენტრაციების პირობებში და შარდოვანას, შესაბამისად, 11 და 10 სხვადასხვა კონცენტრაციის თანაობისას. შესაბამისი კალორიმეტრიული და გამოთვლილი თერმოდინამიკური პარამეტრები მოყვანილია ცხრილებში 3.1 და 3.2. სურათზე 3.1 მოყვანილია დნმ-ის თერმული ლღობის პარციალური სითბოტევადობის ზოგიერთი დამახასიათებელი მრუდი (საბაზისო ხაზის შესწორების შემდგომ), NaCl 0.01 მოლ/ლ კონცენტრაციის პირობებში და შარდოვანას 0 (1); 5 (2); და 8.5 მოლ/ლ (3) კონცენტრაციების თანაობისას.

ცხრილი 3.1. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობის თერმოდინამიკური პარამეტრები 0.01 მოლ/ლ NaCl პირობებში, შარდოვანას დანამატების სხვადასხვა კონცენტრაციის თანაობისას.

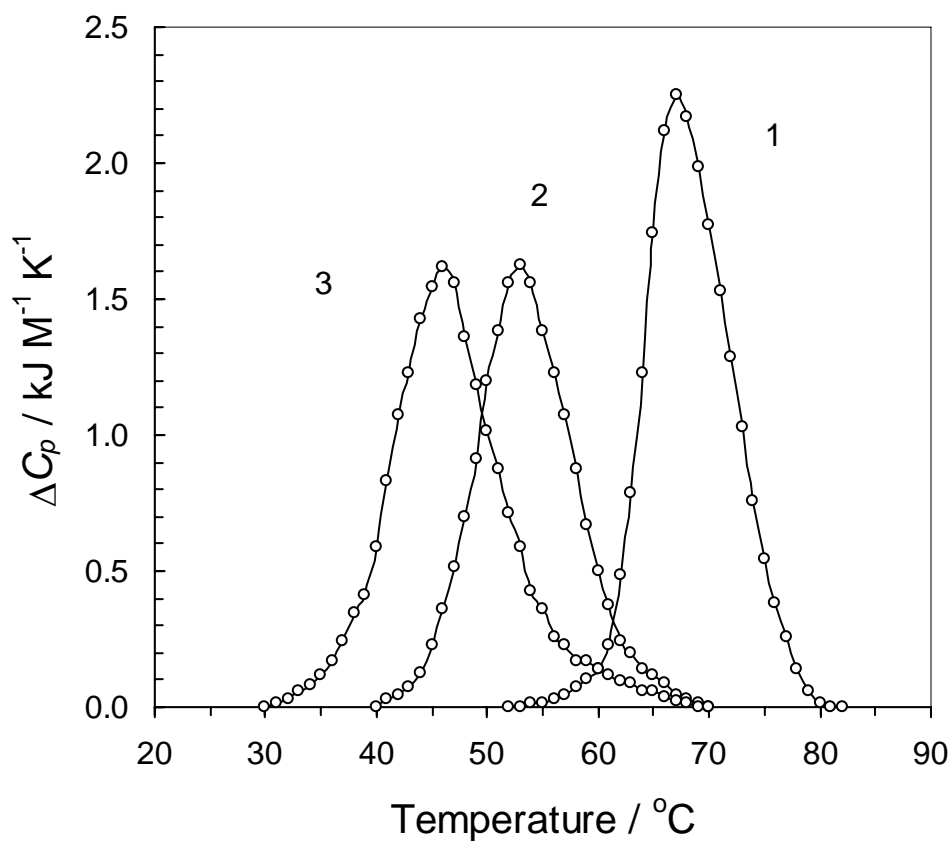
No	[Urea] / in 0.01 M NaCl	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{cal} / \text{kJ mol}^{-1}$ (per BP)	$\Delta S_{cal} / \text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ (per BP)
1	0	68	29.1	85.4
2	0.5	66.5	–	-
3	1	65	27.2	80.5
4	2	61.8	25.6	76.5
5	3	58.8	–	-
6	4	56	23.5	73.1
7	5	53	23.1	75.4
8	6	50	23.6	80
9	7	48	24.2	81.3
10	8	47	25.6	71.4
11	8.5	46.8	26	70.9

ცხრილი 3..2. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობის თერმოდინამიკური პარამეტრები 0.1 მოლ/ლ NaCl პირობებში, გუანიდინიუმის ქლორიდის დანამატების სხვადასხვა კონცენტრაციის თანაობისას.

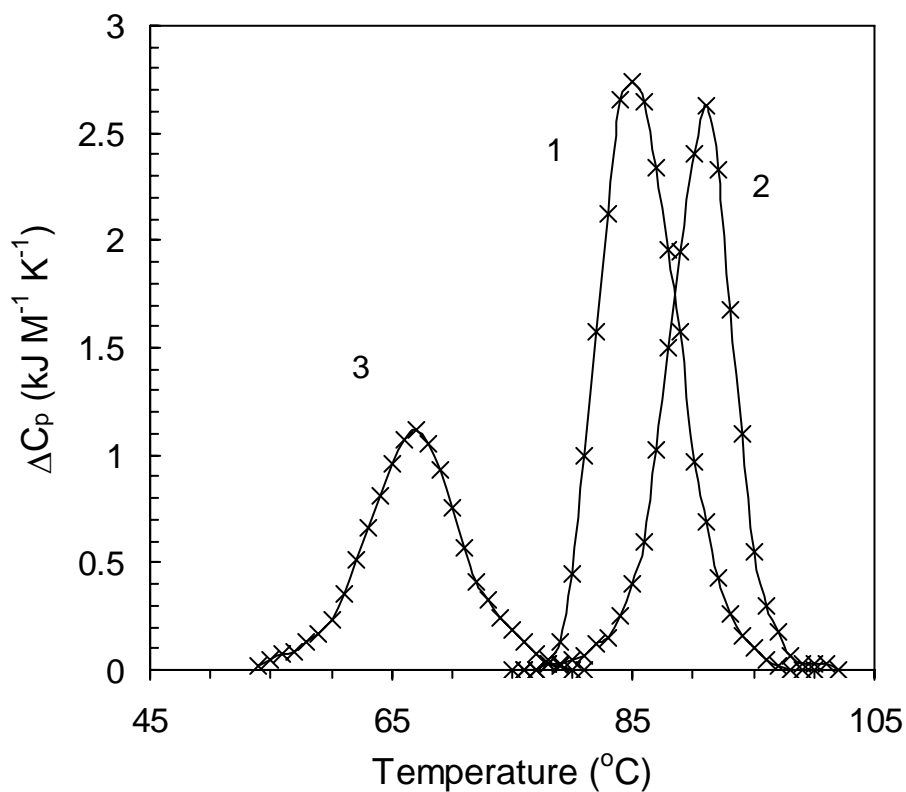
No	[GuHCl] / M in 0.1 M NaCl	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{cal} / \text{kJ mol}^{-1}$ (per BP)	$\Delta S_{cal} / \text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ (per BP)
1	0	81.5	30.3	85.5
2	0.25	90.5	29.6	81.4
3	0.5	91.8	29.2	80.0
4	1	91	28.5	78.3
5	1.5	89.8	27.8	76.6
6	2	88	26.9	74.5
7	3	84.2	25.8	72.2
8	4	81.3	24.8	70.0
9	6	76.5	23.2	66.4
10	8	71.2	24.3	70.6
11	10	67.5	25.7	75.5

ცხრილი 3.3. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლლობის თერმოდინამიკური პარამეტრები NaCl-ის და CdCl-ის სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში.

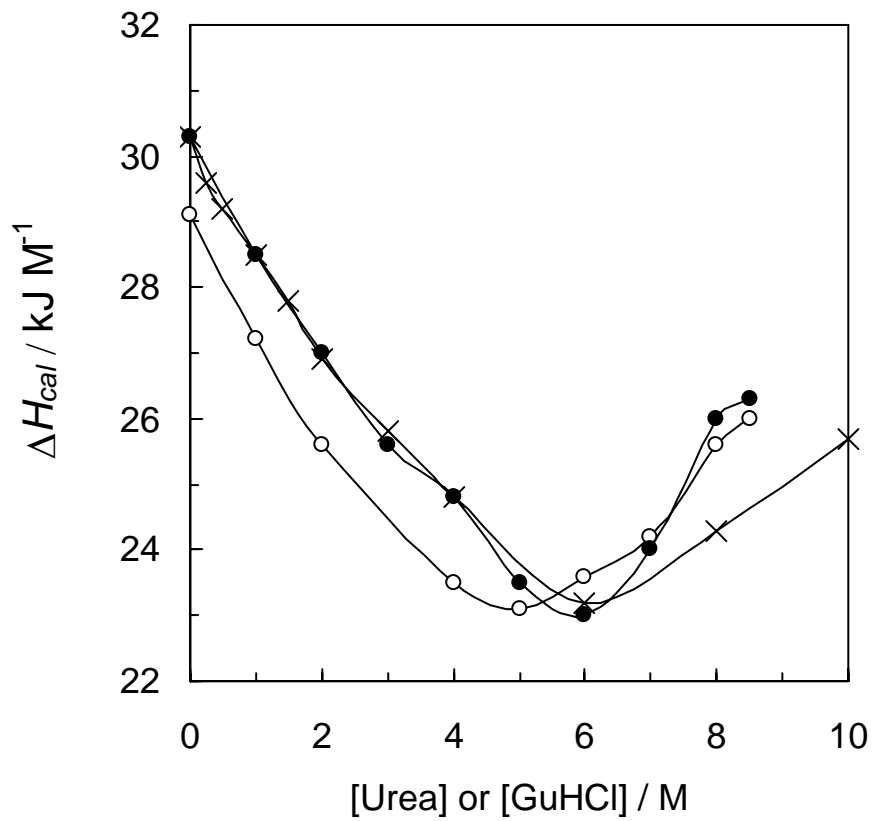
No	Electrolyte, Concentration	$T_m / ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{cal} / \text{kJ mol}^{-1}$ (per BP)	$\Delta S_{cal} / \text{J mol}^{-1}\text{K}^{-1}$ (per BP)
1				85.5
2	0.1 M NaCl	81.5	30.3	85.4
3	0.01 M NaCl	68.0	29.1	72.3
4	0.005 M NaCl	59.0	24.0	69.2
5	+ 0.00125 M CdCl ₂	52.2	22.5	-
	+ 0.0025 M CdCl ₂	49 (59)	23.5 (Sum)	



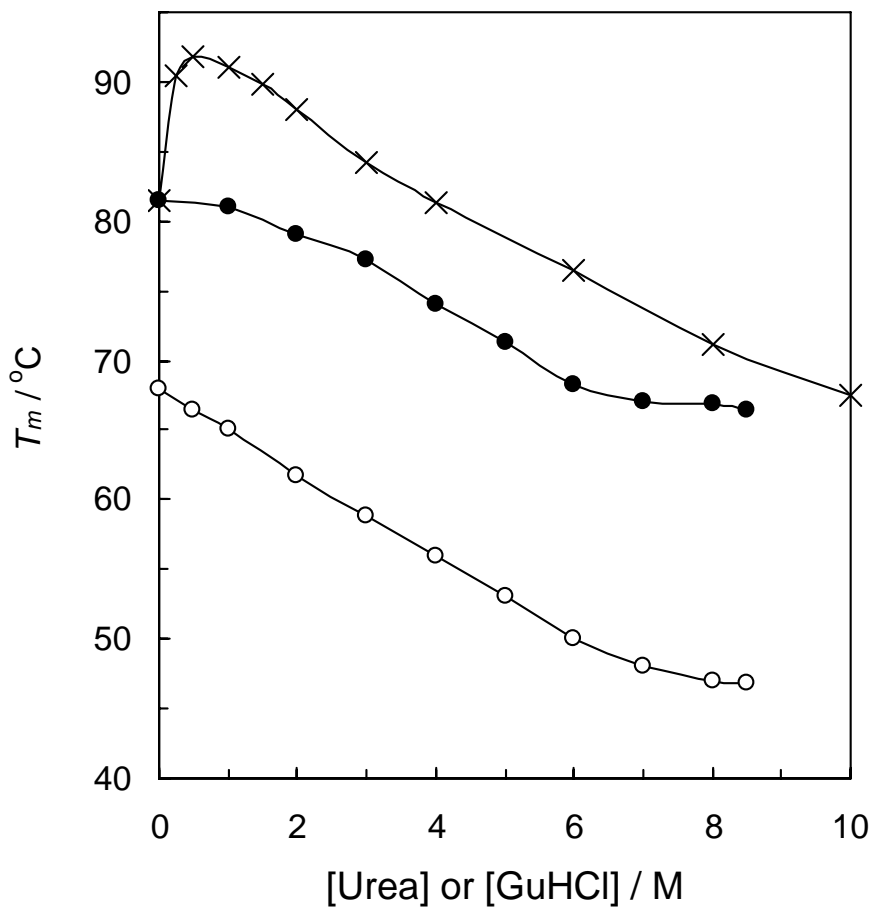
სურათი 3.1. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ღღობის ზოგიერთი მიკროკალორიმეტრული მრუდი (საბაზისო ხაზის შესწორების შემდგომ) 0.01 მოლ/ლ NaCl პირობებში, შარდოვანას 0 (1); 5 (2) და 8.5 მოლ/ლ (3) კონცენტრაციების თანაობისას.



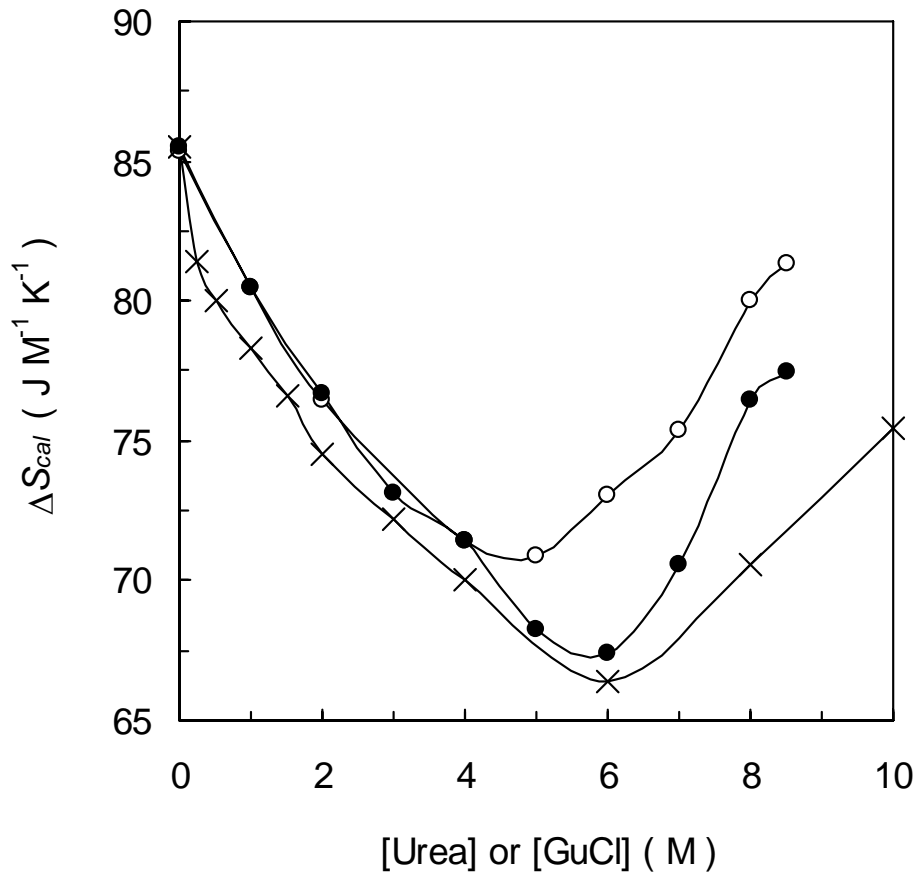
სურათი 3.2. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობის ზოგიერთი მიკროკალორიმეტრული მრუდი (საბაზისო ხაზის შესწორების შემდგომ) 0.01 მოლ/ლ NaCl პირობებში, გუანიდინიუმის ქლორიდის 0 (1); 0.5 (2) და 10 მოლ/ლ (3) კონცენტრაციების თანაობისას.



სურათი 3.3. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლლობის კალორიმეტრული ენტალპიის დამოკიდებულება დენატურანტის (შარდოვანასა და გუანი-დინიუმის ქლორიდის) კონცენტრაციაზე. თეთრი რგოლები: შარდოვანა, 0.01 მოლ/ლ NaCl; შავი რგოლები: შარდოვანა, 0.1 მოლ/ლ NaCl; ჯვრები: გუანიდინიუმის ქლორიდი, 0.1 მოლ/ლ NaCl.



სურათი 3.4. ორგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობის პიკის მაქსიმუმის ტემპერატურის დამოკიდებულება დენატურანტის (შარდოვანასა და გუანიდინიუმის ქლორიდის) კონცენტრაციაზე. სიმბოლოები იგივეა, რაც სურათზე 3.3.



სურათი 3.5. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლლობის კალორიმეტრული ენტროპიის დამოკიდებულება დენატურანტის (შარდოვანასა და გუანიდინიუმის ქლორიდის) კონცენტრაციაზე. სიმბოლოები იგივეა, რაც სურათზე 3.3.

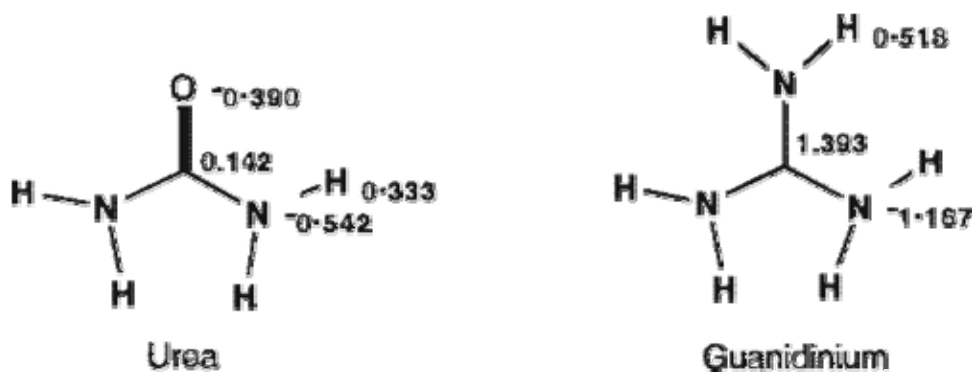
§ 3.2. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლლობის შესწავლა 0–10 მოლ/ლ გუანიდინიუმის ქლორიდის შემცველ წყალხსნარებში.

გუანიდინიუმის ქლორიდის დანამატების შემთხვევაში მიკრო-კალორიმეტრული ექსპერიმენტები ჩატარებული იქნა ფონური ელექტროლიტის, NaCl-ის 0.1 მოლ/ლ კონცენტრაციის პირობებში და გუანიდინიუმის ქლორიდის 11 სხვადასხვა კონცენტრაციის თანაობისას. შესაბამისი კალორიმეტრული და გამოთვლილი თერმოდინამიკური პარამეტრები მოყვანილია ცხრილში 3.3.

სურათზე 3.2 მოყვანილია დნმ-ის თერმული ლღობის პარციალური სითბოტევადობის ზოგიერთი დამახასიათებელი მრუდი (საბაზისო ხაზის შესწორების შემდგომ), NaCl 0.1 მოლ/ლ კონცენტრაციის პირობებში და გუანიდინიუმის ქლორიდის 0 (1); 0.5 (2); და 10 მოლ/ლ (3) კონცენტრაციების თანაობისას.

როგორც ეს ცხრილებიდან 3.1, 3.2 და სურათებიდან 3.1–3.4 გამომდინარეობს, საზოგადოდ, როგორც შარდოვანას, ისე გუანიდინიუმის ქლორიდის დანამატები იწვევენ ორაგულის დნმ-ის ორმაგ-სპირალური ნატივური კონფორმაციის დესტაბილიზაციას საწყის სისტემებთან (0.01 და 0.1 მოლ/ლ NaCl ხსნარები) შედარებით. გამონაკლისს წარმოადგენს გუანიდინიუმის ქლორიდის შემცველი ხსნარები 0–4 მოლ/ლ კონცენტრაციის ფარგლებში (სახელდობრ, T_m -თან მიმართებაში, იხ ქვევით). სურათი 3.3 წარმოაჩენს დნმ-ის თერმული ლღობის კალორიმეტრული ენტალპიის (ΔH_{cal}) ამა-თუ-იმ დენატურანტის კონცენტრაციაზე დამოკიდებულების საკმაოდ საინტერესო ქცევას. ყველა შესწავლილ შემთხვევაში ამ პარამეტრის მნიშვნელობა მონოტონურად კლებულობს მისი მაქსიმალური მნიშვნელობიდან დაახლოებით 25%-ით, დენატურანტის ნულიდან 5–6 მოლ/ლ კონცენტრაციის ფარგლებში ცვლილებისას. ეს ტენდენცია კარგად ეთანხმება ხბოს თიმუსის და ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობისთვის ადრე მიღებულ თერმოდინამიკურ შედეგებს შარდოვანას კონცენტრაციების ამ შედარებით ვიწრო ფარგლებში [99] (Klump & Burkart, 1977). ამავე დროს, შარდოვანას (და, ასევე, გუანიდინიუმის ქლორიდის) მნიშვნელოვნად მაღალი კონცენტრაციების თანაობისას (5–6 მოლ/ლ და უფრო მაღლა), ΔH_{cal} -ის მნიშვნელობა ისევ იზრდება და აღწევს ამ პარამეტრის საწყისი მნიშვნელობის 85–90%-ს (სურათი 3.3). ამ უკანასკნელი კანონზომიერების დაკვირვება ახალია დნმ-ის, როგორც შარდოვანას, ისე გუანიდინიუმის ქლორიდის შემცველი დნმ-ის წყალხსნარების სისტემებისთვის. რაც შეეხება T_m -ის ქცევას, იგი განსხვავებულია შარდოვანას და GuHCl-ის დანამატების შემთხვევაში (მათი კონცენტრაციის ცვლილების მიმართ, ფონური ელექტროლიტის, NaCl-ის, 0.01 და 0.1 მოლ/ლ კონცენტრაციების თანაობისას). სურათი 3.4 გვიჩვენებს T_m -ის მონოტონურ კლებას

შარდოვანას კონცენტრაციის მატებასთან ერთად, ხოლო GuHCl -ის კონცენტრაციის 0–0.5 მოლ/ლ ფარგლებში მატებასთან ერთად T_m -ის მნიშვნელობა ჯერ სწრაფად იზრდება, ხოლო შემდეგ მონოტონურად კლებულობს T_m -ზე შარდოვანას ეფექტის პარალელურად (სურათი 3.4). ამ ეტაპზე გარკვევით უნდა აღინიშნოს ორი სხვადასხვა პარამეტრის, ΔH_{cal} და T_m -ის განსხვავებული ქცევა ორი სხვადასხვა დენატურანტის, შარდოვანასა და გუანიდინიუმის ქლორიდის კონცენტრაციის ზრდის მიმართ (დისკუსია იხ. ქვევით).



სურათი 3.6. მუხტის განაწილება შარდოვანაზე და გუანიდინიუმის იონზე (Vanzi et al., 199)

§3.3 დნმ-ის თერმული ლღობა ნატრიუმის ქლორიდისა და კადმიუმის ქლორიდის თანაობისას (შესადარებელი სისტემები).

ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობისათვის მიღებული წინასწარი კალორიმეტრული მონაცემები ფონური ელექტროლიტის, ნატრიუმის ქლორიდისა (NaCl), და დნმ-თან სპეციფიკურად ურთიერთქმედი დენატურანტის, კადმიუმის ქლორიდის (CdCl_2) სხვადასხვა კონცენტრაციების თანაობისას მოყვანილია ცხრილში 3.3 და სურათებზე 3.7 და 3.8. ამ მონაცემების განხილვა აჩვენებს, რომ დნმ-ის თერმოდინამიკური სტაბილობა მნიშვნელოვნად არის განპირობებული

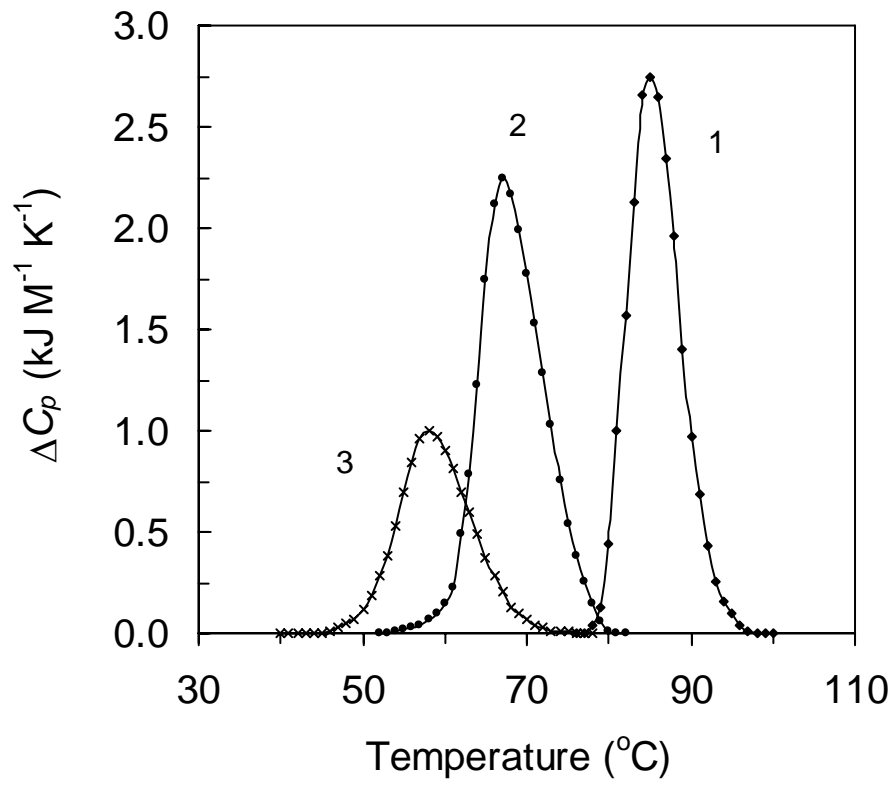
ხსნარში ფონური ელექტროლიტის თანაარსებობით, და რომ ამ უკანასკნელის არარსებობის პირობებში დნმ-ი, როგორც ჩანს, უკვე ოთახის ტემპერატურაზე უნდა გადადიოდეს განხვეულ, ანუ დენატურირებულ (ერთმაგი ჯაჭვის) მდგომარეობაში (იხ. ქვევით). ამასთან ერთად, უნდა აღინიშნოს ფონური ელექტროლიტის, შარდოვანას და გუანიდინიუმის ქლორიდის ზემოქმედების ერთის მხრივ საწინააღმდეგო მიმართულების (მადესტაბილელი ზემოქმედება მასტაბილელის წინააღმდეგ), მაგრამ ამავე დროს, “ჰომოგენური” ხასიათი. ეს გამოიხატება დნმ-ის თერმული ლღობის პარციალური სითბოტევადობის კალორიმეტრული პიკების ზემოაღწერილ ქცევაში: ამ ფაქტორების ზემოქმედება იწვევს ლღობის პიკების მთლიან გადანაცვლებას, მაღალი ან დაბალი ტემპერატურის ზონაში, რასაც, შესაბამისად, თან ახლავს მათი ინტენსივობის ზრდა ან შემცირება (და ასევე დავიწროება ან გაგანიერება), ისე რომ არ ხდება პიკების რამდენადმე შესამჩნევი მეტამორფოზა ჰეტეროგენულობის ზრდის, ანუ სტრუქტურული გახლეჩის თვალსაზრისით. აღნიშნული ქცევა იმის მაჩვენებელია, რომ როგორც ფონური მარილი, ისე მადესტაბილელი დანამატები, სპეციფიკურად (ამორჩეულად) არ რეაგირებენ ამა-თუ-იმ ფუძე-წყვილებთან, ერთის მხრივ დნმ-ის ნატივურ, ორმაგ-სპირალურ, ხოლო მეორეს მხრივ, დენატურირებულ, განხვეულ სტრუქტურასთან (იხ. ქვევით).

ზემოთ აღწერილი არასპეციფიკური მადესტაბილელი (შარდოვანა, GuHCl) და მასტაბილელი (NaCl) ფაქტორებისგან განსხვავებით, ცნობილია, რომ ორვალენტიანი კათიონები დნმ-ზე ზემოქმედებენ ძირითადად სპეციფიკურად, ხსნარებში ძალიან მცირე კონცენტრაციების თანაობისას. კერძოდ, საკმაოდ კარგად არის შესწავლილი ისეთი ფიზიოლოგიურად მნიშვნელოვანი მეტალთა იონების გავლენა დნმ-ის სტაბილობაზე, როგორებიცაა: მაგნიუმი, მანგანუმი, ცინკი, ნიკელი და სხვ. (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) [100].

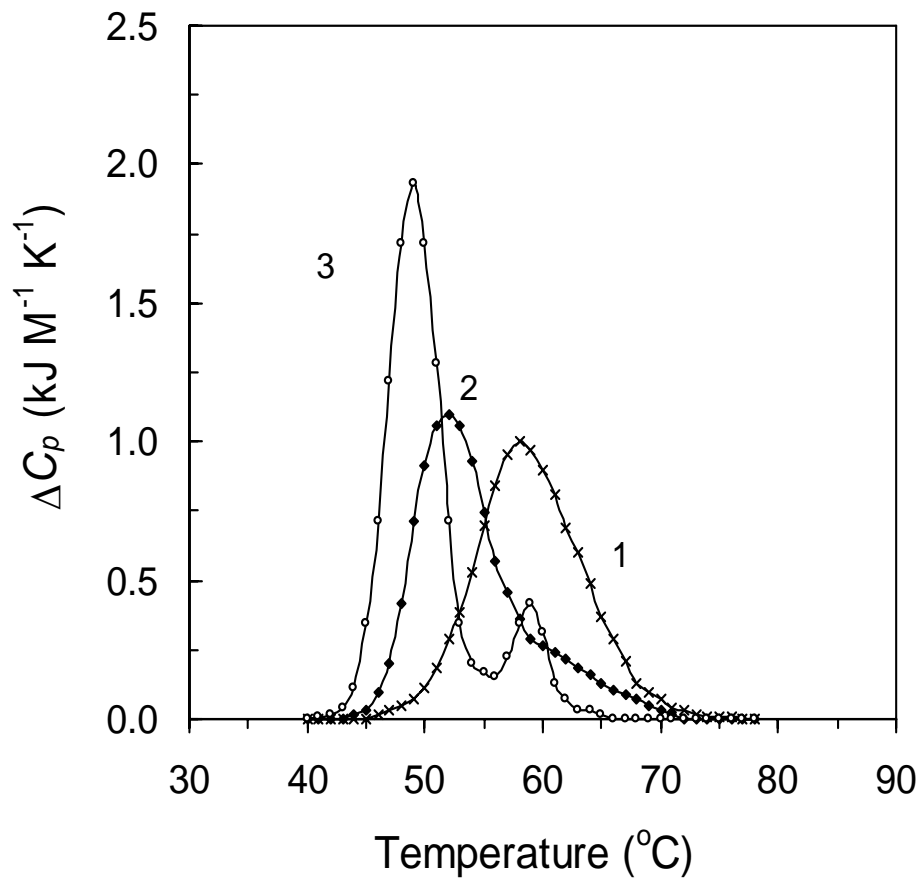
ამასთან ერთად, ბოლო წლების განმავლობაში სულ უფრო დიდ ყურადღებას იპყრობს დნმ-ის ურთიერთქმედება ისეთ ორვალენტიან მეტალებთან, როგორებიცაა ქრომი, კობალტი და კადმიუმი (Cr^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+}). ამ მეტალებისადმი ინტერესი განაპირობა, ერთის მხრივ, მაღალმა ტოქსიკურობამ და

კანცეროგენულობამ, ხოლო, მეორეს მხრივ, მათმა ფართო გამოყენებამ სხვადასხვა ტექნოლოგიებში, რომლებიც იწვევენ გარემოს ეკოლოგიურ დაბინძურებას. სავარაუდო იყო, რომ ფიზიოლოგიურად მნიშვნელოვანი იონებისგან განსხვავებით, Cd^{2+} -ის იონები უნდა ახდენდნენ მადესტაბილურ ეფექტს, და რომ ეს ეფექტი განსხვავებული უნდა იყოს შარდოვანას და $GnHCl$ -ის მადესტაბილური ეფექტისგან. ცხრილი 3.4 და სურათი 3.8 ნათლად აჩვენებს Cd^{2+} -ის იონების დნმ-ზე სპეციფიკური ზემოქმედების სურათს. ეს გამოიხატება იმაში, რომ: (ა) მნიშვნელოვანი დესტაბილიზაცია მიიღწევა Cd^{2+} -ის იონების უკვე ძალიან მცირე კონცენტრაციის პირობებში; და (ბ) ხდება თერმული ლღობის მახასიათებელი კალორიმეტრული პიკის (სითბოტევადობის მრუდის) სტრუქტურის წარმოქმნა, სახელდობრ ორ გამოხატულ პიკად გაყოფა. $CdCl_2$ -ის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად მთლიანად პიკის სიმძიმის ცენტრი გადაადგილდება დაბალი ტემპერატურებისკენ, ამასთან პიკის პირვანდელი მდებარეობის ადგილზე ჯერ ჩნდება კარგად გამოხატული “მხარი”, ხოლო საბოლოოდ რჩება მინორული პიკი, რომელიც ვიწროვდება, მაშინ როდესაც ძირითადი პიკი მნიშვნელოვნად გადაადგილდება დაბალი ტემპერატურის მიმართულებით, და ამასთან ერთად, ისიც ვიწროვდება (სურათი 3.8).

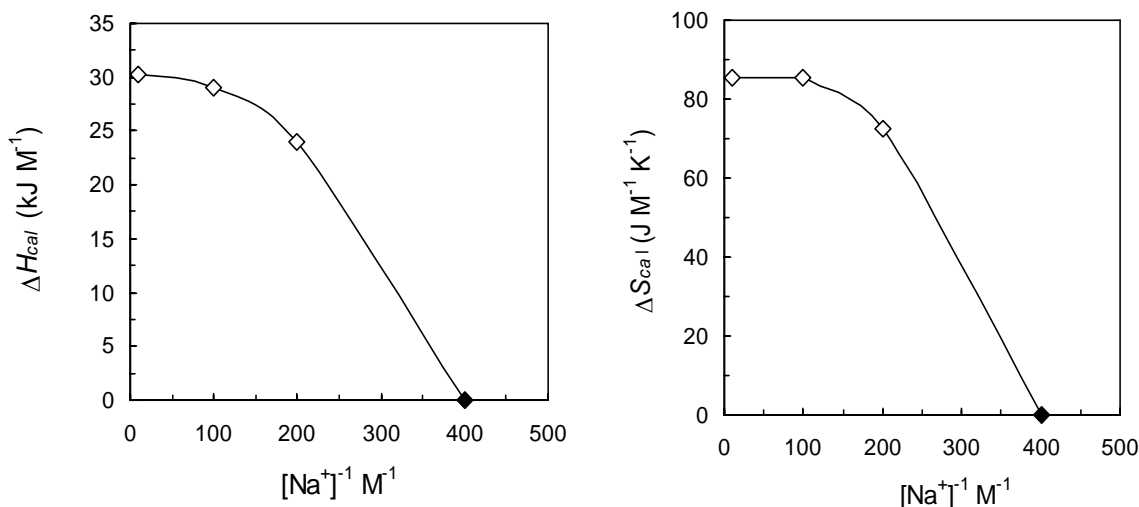
ყოველივე ეს მიუთითებს, Cd^{2+} -ის იონების დნმ-თან სპეციფიკურ, გარკვეულ ჯგუფებთან უპირატესად მიმართულ ურთიერთქმედებაზე, რის შედეგადაც წარმოიშვება დნმ-ის “შემფოთებული” ფუძე-წყვილების ძირითადად ორი ფრაქცია, რომელთაგან ერთ-ერთი (მინორული) პრაქტიკულად ინარჩუნებს პირვანდელ სტაბილურობას, ხოლო მეორე, ძირითადი ფრაქცია მნიშვნელოვნად არის დესტაბილური.



სურათი 3.7. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული დენატურაციის კალორიმეტრული მრუდები NaCl-ის 0.1 (1); 0.01 (2) და 0,005 მოლ/ლ (3) თანაობისას.



სურათი 3.8. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული დენატურაციის კალორიმეტრული მრუდები CdCl_2 -ის 0 (1); 0,00125 (2) და 0,0025 მოლ/ლ (3) კონცენტრაციის პირობებში, 0,005 მოლ/ლ NaCl -ის თანაობისას.



სურათი 3.9. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობის კალორიმეტრული ენტალპიის დამოკიდებულება ნატრიუმის კონცენტრაციის შეზღუდულ სიდიდეზე (კონცენტრაციების მნიშვნელობები აღებულია ცხრილიდან 3.4); შავი რომში აღნიშნავს ექსტრაპოლირებულ ნულოვან სიდიდეს.

სურათი 3.10. ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობის კალორიმეტრული ენტროპიის დამოკიდებულება ნატრიუმის კონცენტრაციის შეზღუდულ სიდიდეზე (კონცენტრაციების მნიშვნელობები აღებულია ცხრილიდან 3.4); შავი რომში აღნიშნავს ექსტრაპოლირებულ ნულოვან სიდიდეს.

§3.4 დენატურანტების, ფონური ელექტროლიტის და Cd²⁺-ის იონების დნმ-ზე ზემოქმედების შედარებითი ანალიზი.

მიღებული მონაცემების ანალიზისას ყურადღებას იქცევს სურათი 3.3, სადაც ფონური ელექტროლიტის (NaCl) ერთნაირი, 0.1 მოლ/ლ კონცენტრაციის პირობებში ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობის ენტალპიები 6 მოლ/ლ-მდე კონცენტრაციის მქონე შარდოვანასა და GuHCl-ის ხსნარებში პრაქტიკულად არ განსხვავდება, მაშინ როდესაც ზოგადი სტაბილობა GuHCl-ის ხსნარებში, 0.5–8 მოლ/ლ კონცენტრაციების დიაპაზონში რამდენადმე უფრო მაღალია (სხვაობა:



დაახლ. 10 °C). როგორც სურ. 3.5-დან ჩანს, ეს განსხვავება ზოგად სტაბილობაში განპირობებულია ენტროპიული ეფექტით. ამავე დროს, სურ. 3.3 – 3.5 შედარება გვიჩვენებს, რომ 0–4 მოლ/ლ შარდოვანას შემცველ ხსნარებში 0.01 და 0.1 მოლ/ლ NaCl თანაობისას განსხვავება დნმ-ის სტაბილობაში განპირობებულია მხოლოდ ენტალპიური ფაქტორით. დასახელებული ეფექტები შესაძლებელია აიხსნას შემდეგი გარემოებებით: რეკორდის და თანაავტორების [101] (Record et al., 2004) ამასწინდელმა ანალიზმა აჩვენა, რომ შარდოვანა, როგორც ხსნარის კომპონენტი, დნმ-ის ზედაპირზე არ აკუმულირდება, მაგრამ მნიშვნელოვანწილად “გროვდება” დენატურიტებული (განცალკევებული ჯაჭვის მქონე) დნმ-ის ახლად ფორმირებულ ზედაპირზე. ამასთან, შარდოვანას ენერგეტიკულად ხელსაყრელი ურთიერთქმედება განხვეული დნმ-ის “გაშიშვლებული” პოლარული, ანუ ამიდის ჯგუფის მსგავსი (მაგრამ არა ჰიდროფობული) ზედაპირის პირდაპირპროპორციულია. თუ ეს ურთიერთ-ქმედება წყალბადური მბების (HB) წარმოქმნის ხარჯზე ხდება, შარდოვანას მოლეკულის და GuH^+ იონის მსგავსი აგებულება (HB-ბმის წარმომშობი მსგავსი დონორული თვისებები; მაგრამ ცხადია, არა ჯამური მუხტი, იხ სურათი 3.6) უნდა უზრუნველყოფდეს ამ ორი მადენატურირებელი აგენტის ენერგეტიკულად მსგავს ურთიერთქმედებას განხვეულ დნმ-თან.

ამავე დროს, ამ ორი აგენტის ნატივურ დნმ-თან ურთიერთქმედება მნიშვნელოვანწილად განსხვავებულია. დადგენილია, რომ ნატივური დნმ-ის ორმაგი სპირალის ე.წ. ვიწრო და ფართო ღრმულებში (ღარებში), ძლიერად დაკავშირებული (სოლვატური) წყლის მოლეკულების გარდა, თავს იყრიან დადებითად დამუხტული ისეთი იონები, რომლებსაც დნმ-ის ფუძე-წყვილებთან სპეციფიკური ურთიერთქმედების უნარი არ გააჩნიათ (ნატრიუმი, ამონიუმი, პოლიამინები, და სხვა). ნატრიუმის კათიონი, Na^+ , დნმ-ის სტაბილობის აუცილებელ ელემენტს შეადგენს (იხ. ქვევით). დნმ-ის ვიწრო ღარში დადებითად დამუხტული იონები ელექტროსტატიკურად ურთიერთქმედებენ უარყოფითად დამუხტულ ფოსფატის ჯგუფებთან, უმთავრესად O1P და O2P ატომებთან (მაგ., იხ. Korolev et al., 2003 [102]). ამასთან ერთად, გარკვეული ანტი-კორელაციური

(გაჯერების) ეფექტები იყო გამოვლენილი ისეთი მცირე ზომის ფიზიოლოგიურად აუცილებელი კათიონისთვისაც კი, როგორცაა Na^+ . აქედან გამომდინარე, შეიძლება ვიფიქროთ, რომ GuHCl -ის შედარებითი მასტაბილური ეფექტი შარდოვანასთან შედარებით გამოწვეული უნდა იყოს GuH^+ იონების ხელსაყრელი ელექტროსტატიკური ურთიერთქმედებით თუნდაც ზემოაღნიშნულ დნმ-ის ვიწრო ღარის ფოსფატის ჯგუფებთან. ამასთან, მასტაბილური ეფექტი მცირეა, როგორც ჩანს, გაჯერების ფაქტორის გამო, და ვერ გადაწონის განხვეულ დნმ-თან HB-ურთიერთქმედების მადესტაბილურ ეფექტს. ამასთან ერთად, ლოგიკურია დავასკვნათ, რომ ნატივურ მდგომარეობაში ელექტროსტატიკურ ურთიერთქმედებას ძირითადად ენტროპიული ბუნება აქვს, ხოლო HB-ურთიერთქმედებას დენატურირებულში – ენტალპიური.

ორაგულის სპერმის დნმ-ის მაგალითზე ჩვენს მიერ აგრეთვე ჩატარებულ იქნა დნმ-ის თერმოდინამიკურ სტაბილობაში ბმული წყლისა და ნატრიუმის იონების როლის შედარებითი ანალიზი. მრევლიშვილის და თანაავტორების [103] (Mrevlishvili et al., 2001) მიხედვით, “დნმ-ის ორმაგი სპირალის სითბურ დენატურაციას თან სდევს ორმაგი სპირალის ჰიდრატულ შრეში წყალბადური კავშირების ბადის რღვევა, რაც გამოიხატება დენატურირებული დნმ-ის ხსნარებში თავისუფალი წყლის ფრაქციის გაზრდაში. დნმ-ის ორმაგი სპირალის დენატურაციის ენტალპიაში ($\Delta H_{cal} = 35 \pm 5$ კჯ/მოლ ფწ) ძირითადი წვლილი მოდის სწორედ ორმაგი სპირალის ჰიდრატული გარსის რღვევის ენერგიაზე ($\Delta H_{water} = 26 \pm 3$ კჯ/მოლ ფწ).”

მრევლიშვილის და თანაავტორების შრომებში ჩატარებული ღრმა ანალიზი და გაკეთებული დასკვნები სრულიად სარწმუნოა. ამავე დროს, ჩვენი აზრით, ისინი მოითხოვენ გარკვეულ დაზუსტებას. სახელდობრ, არ იქნებოდა სწორი გვევარაუდა, რომ ჰიდრატული წყლის მასტაბილური ფაქტორი დამოუკიდებელია ფონური ელექტროლიტის (Na^+ იონები) შესაბამისი როლისგან. მართლაც, ამ ავტორების მიერ შეფასებული ორმაგი სპირალის ჰიდრატული გარსის რღვევის ენერგია ($\Delta H_{water} = 26 \pm 3$ კჯ/მოლ ფწ) დამოუკიდებელი სიდიდე რომ იყოს, მაშინ ფონური ელექტროლიტის კონცენტრაციის ნულისკენ

მისწრაფების შემთხვევაში ($[Na^+] \rightarrow 0$) კალორიმეტრული ენტალპიის მნიშვნელობა ასიმპტოტურად მიუახლოვდებოდა ჰიდრატული გარსის ენერჯიის მნიშვნელობას ($\Delta H_{cal} \rightarrow \Delta H_{water}$). სურათებზე 3.9 და 3.10 მოყვანილია ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული დენატურაციის კალორიმეტრული ენტალპიისა და ენტროპიის დამოკიდებულებანი ფონური ელექტროლიტის ნატრიუმის კომპონენტის შებრუნებულ სიდიდეზე. ექსპერიმენტული პარამეტრების ამგვარ კოორდინატებში წარმოდგენა საშუალებას იძლევა, მოვახდინოთ დამოკიდებულების მდორე ექსტრაპოლაცია ელექტროლიტის ძალიან მცირე (ექსპერიმენტულად მიუწვდომელი) კონცენტრაციებისკენ. როგორც სურათიდან 3.9 ნათლად ჩანს, თერმული ღებობის უშუალოდ გაზომილი კალორიმეტრული ენტალპია (და ენტროპიის გამოთვლილი სიდიდეც, სურათი 3.10), ელექტროლიტის კონცენტრაციის შემცირებასთან ერთად ასიმპტოტურ ქცევას არ ამჟღავნებს, არამედ ადგილი აქვს მისი სიდიდის ფაქტობრივად ნულისკენ ვარდნას. ეს შედეგი ეთანხმება ლიტერატურაში ჩამოყალიბებულ აზრს იმის შესახებ, რომ ელექტროლიტის ნულოვანი კონცენტრაციის პირობებში დნმ-ის მოლეკულა იმყოფება დენატურირებულ, ანუ განხვეულ მდგომარეობაში. ამრიგად, მივდივართ იმ დასკვნამდე, რომ ჰიდრატული ანუ ბმული წყალი ქმნის წყალბადური ბმების ერთიან ბადეს, ერთის მხრივ დნმ-ის მაკრომოლეკულის ზედაპირულ ჯგუფებთან (მაგალითად, დნმ-ის ვიწრო ღარში გამომავალი ფოსფატის ჯგუფების O1P და O2P ატომებთან), ხოლო მეორეს მხრივ, იქ “მიკედლებულ” კათიონებთან [102,104], კერძოდ, Na^+ , ან თუნდაც GuH^+ იონებთან. ამასთან, აშკარა ხდება, რომ დნმ-ის ნატივური სტრუქტურის სტაბილიზაცია მიიღწევა სოლვატური წყლისა და კათიონების ერთობლივი ზემოქმედების კოოპერატიული ეფექტით.

§3.5 გლობულური ცილების თერმული დენატურაციის კალორიმეტრული კვლევა მადესტაბილელი ფაქტორების ზემოქმედების ქვეშ.

ტიპიურ გლობულურ ცილებზე, α -ქიმოტრიპსინზე, მიოგლობინზე, ლიზოციმზე განმეორებითი თერმული ზემოქმედებით გამოწვეული დენატურაციის მიკროკალორიმეტრული კანონზომიერებები მნიშვნელოვან ყურადღებას იმსახურებს და ჯეროვნად არ არის გაშუქებული. აგრეთვე, α -ქიმოტრიპსინის თერმული ლღობის მიკროკალორიმეტრული კანონზომიერებები არასპეციფიკური დენატურანტის, შარდოვანას თანაობისას, ამ უკანასკნელის კონცენტრაციების ფართო დიაპაზონში არ იყო სისტემატურად შესწავლილი და გაანალიზებული. შესაბამისი ექსპერიმენტული მრუდები მოცემულია სურათებზე 3.11 – 3.13, ხოლო კალორიმეტრული და გამოთვლილი თერმოდინამიკური პარამეტრები მოცემულია ცხრილებში 3.3 – 3.8.

მიღებული შედეგების განხილვა გვაჩვენებს შემდეგს: არასპეციფიკური დენატურანტის, შარდოვანას ზემოქმედება ტიპიურ გლობულურ ცილაზე - α -ქიმოტრიპსინზე იწვევს როგორც პირდაპირი მეთოდით განსაზღვრული კალორიმეტრული, ისე გამოთვლილი ვანტ-ჰოვის ენტალპიის თანდათანობით და, ამავე დროს, მნიშვნელოვან შემცირებას (სურათები 3.11 და 3.14), და საბოლოო ანგარიშში (6-7 მოლ/ლ შარდოვანას თანაობისას) პრაქტიკულად ნულოვან მნიშვნელობამდე ვარდნას (ცხრილები 3.7, 3.8). შარდოვანას და მსგავსი დენატურანტების მიმართ ესეთი ქცევა ადრე დამზერილი იყო სხვა გლობულური ცილებისთვისაც და, ნაწილობრივ, დნმ-ისთვის მოცემულ სამუშაოში. პარალელურად, თერმული ლღობის ენტროპიის კალორიმეტრული და გამოთვლილი მნიშვნელობებიც თანდათან, მაგრამ არსებითად მცირდება და 6-7 მოლ/ლ შარდოვანას კონცენტრაციების პირობებში ასევე ნულამდე ეცემა. გარკვეულწილად მსგავსი, მაგრამ მაინც საკმაოდ განსხვავებული მიკროკალორიმეტრული ქცევა შეიმჩნევა სხვა სახის მადენატურირებელი ზემოქმედების ქვეშ – განმეორებითი თერმული ზემოქმედებისას. ეს პროცედურა გულისხმობს პირველი ტემპერატურული სკანირების გარკვეულ (ე.წ. “გამოწვის”) ტემპერატურაზე შეჩერებას, ნიმუშის თანაბარ გაციებას საწყის ტემპერატურამდე, და ხელმეორე სკანირებას.

ცხრილი 3.3. მიოგლობინის P-თერმული ლღობის კალორიმეტრული და გამოთვლილი პარამეტრები სხვადასხვა ტემპერატურაზე გამოწვის შემდგომ, pH 9.0. ექსპერიმენტის სხვა პირობები: იხ. ტექსტი და სურ. 3.13.

No	T_A , K (°C)	T_m , K (°C)	$\Delta T_{1/2}$	$\Delta C_p^{(max)}$, J/mol K	ΔC_p^d , J/mol K	ΔH_{cal} , kJ/mol	ΔS_{cal} , kJ/mol K	ΔH_{VH} , kJ/mol	ΔS_{VH} , kJ/mol K
1	I Scan	354 (81.2)	3.7	111.6	6.3	546	1542	853	2410
2	349 (76)	354 (81.4)	4.8	77.4	4.5	425	1200	858	2424
3	354 (81)	355(82.0)	5.0	49.6	3.6	283	797	727	2048
4	357(84)	356 (83.0)	5.4	42.0	3.6	265	744	880	2472
5	363 (90)	356 (83.0)	6.0	23.4	2.8	225	632	956	2686
6	368 (95)	356 (83.0)	9.0	10.2	1.8	90	253	560	1573

ცხრილი 3.4. მიოგლობინის P-თერმული ლღობის კალორიმეტრული და გამოთვლილი პარამეტრები სხვადასხვა ტემპერატურაზე გამოწვის შემდგომ, pH 10.7. ექსპერიმენტის სხვა პირობები: იხ. ტექსტი და სურ. 3.4.

No	T_A , K (°C)	T_m , K (°C)	$\Delta T_{1/2}$	$\Delta C_p^{(max)}$, J/mol K	ΔC_p^d , J/mol K	ΔH_{cal} , kJ/mol	ΔS_{cal} , kJ/mol K	ΔH_{VH} , kJ/mol	ΔS_{VH} , kJ/mol K
1	I Scan	345 (72.1)	6.0	81.0	13.8	620	1797	516	1496
2	338 (65)	345 (72.0)	6.0	75.6	12.6	605	1754	515	1493
3	345 (72)	345 (72.0)	6.0	73.8	12.6	557	1614	520	1507
4	349 (76)	345 (72.1)	5.8	80.0	10.8	510	1478	521	1510
5	354 (81)	345 (72.0)	7.5	48.6	12.6	455	1319	402	1165
6	358 (85)	345 (72.0)	9.0	27.0	14.8	363	1052	336	974

ცხრილი 3.5. ლიზოციმის Pთერმული ღღობის კალორიმეტრული და გამოთვლილი პარამეტრები სხვადასხვა ტემპერატურაზე გამოწვის შემდგომ. ექსპერიმენტის დეტალური პირობებისთვის იხ. ტექსტი და სურ. 3.6.

N o	T_A , K (°C)	T_m , K (°C)	$\Delta T_{1/2}$	$\Delta C_p^{(max)}$, J/mol K	ΔC_p^d , J/mol K	ΔH_{cal} , kJ/mol	ΔS_{cal} , kJ/mol K	ΔH_{VH} , kJ/mol	ΔS_{VH} , kJ/mol K
1	I Scan	343.1 (70.1)	7.4	45.1	4.5	398	1160	439	1280
2	331 (58)	343 (70.0)	7.6	49.0	4.5	400	1166	420	1225
3	343 (70)	343.2 (70.2)	7.4	52.7	5.1	500	1457	410	1195
4	350 (77)	343.1 (70.1)	7.8	40.7	4.2	440	1282	400	1166
5	353 (80)	343 (70.0)	8.0	32.1	3.3	406	1183	430	1254
6	360 (87)	342.6 (69.6)	9.0	24.5	2.0	282	823	376	1095
7	363 (90)	343 (70.0)	11.0	20.2	-	170	496	260	758
8	367 (94)	342 (69.0)	13.0	10.1	-	92	269	180	526
9	371 (98)	342.5 (69.5)	14.0	9.8	-	100	291	172	502

ცხრილი 3.6. α -ქიმოტრიპსინის Pთერმული ღღობის კალორიმეტრული და გამოთვლილი პარამეტრები სხვადასხვა ტემპერატურაზე გამოწვის შემდგომ. ექსპერიმენტის პირობები: იხ. ტექსტი და სურ. 3.1.

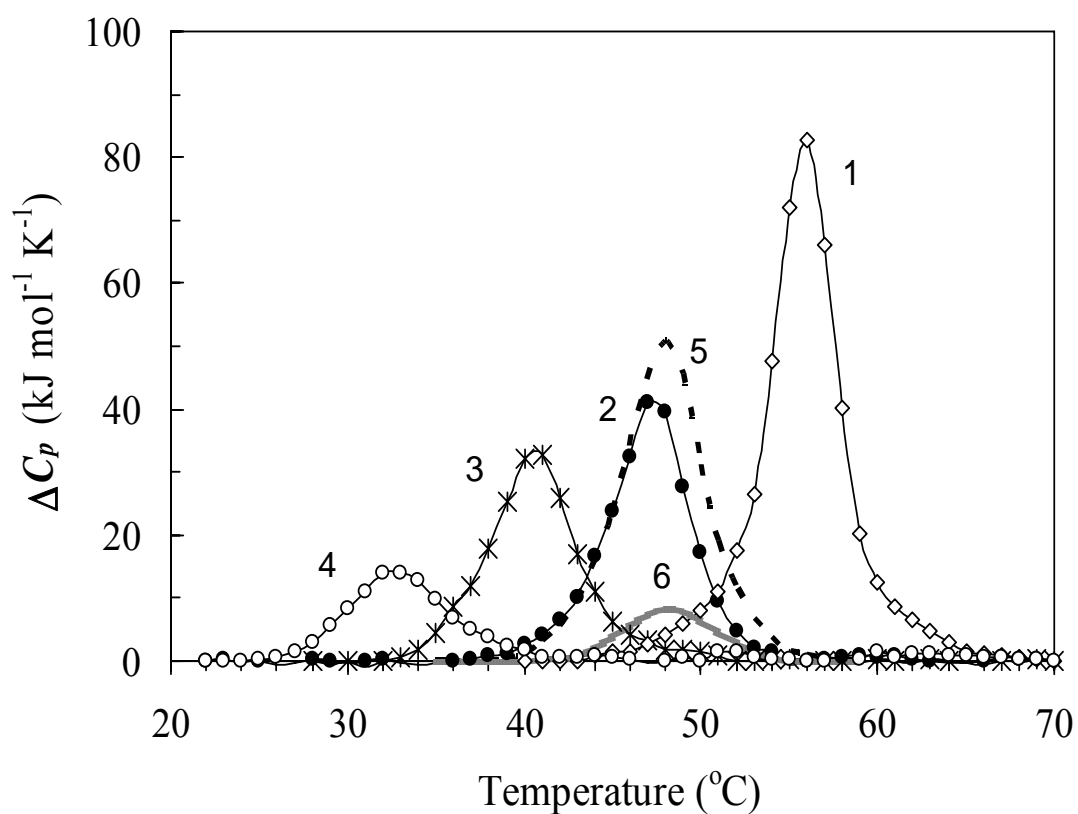
N o	T_A , K (°C)	T_m , K (°C)	$\Delta T_{1/2}$	$\Delta C_p^{(max)}$, J/mol K	ΔC_p^d , J/mol K	ΔH_{cal} , kJ/mol	ΔS_{cal} , kJ/mol K	ΔH_{VH} , kJ/mol	ΔS_{VH} , kJ/mol K
1	I Scan	321 (48.0)	6.0	54	4.0	327	1018	570	1776
2	311 (38)	321.5 (48.5)	6.0	53	3.5	328	1020	570	1773
3	317 (44)	322 (49)	5.7	45	3.0	329	1022	554	1721
4	319 (46)	322 (49)	5.7	33	2.5	299	929	560	1739
5	321 (48)	322 (49)	5.7	17	2.4	224	696	558	1733
6	323 (50)	322 (49)	5.7	10	2.3	188	584	591	1836
7	325 (52)	322 (49)	6.0	7	2.0	104	323	547	1699
8	327 (54)	322 (49)	6.0	4	2.0	58	180	609	1891

ცხრილი 3.7. α -ქიმოტრიპსინის თერმული დენატურაციის თერმოდინამიკური პარამეტრები შარდოვანას სხვადასხვა კონცენტრაციის თანაობისას, pH 3.5 (ფოსფატის ბუფერი) 0.05 M NaCl.

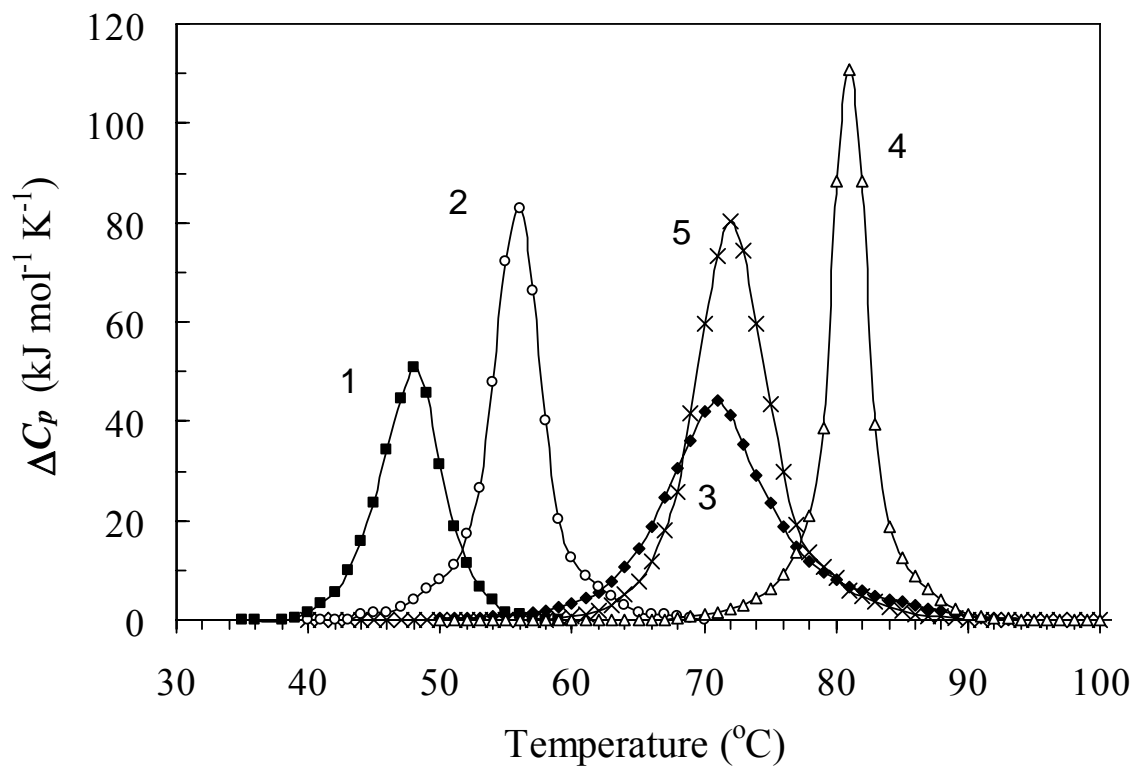
No	Urea, M	T_m , K ($^{\circ}$ C)	ΔT , deg	$\Delta C_p^{(max)}$ J/g K	ΔH_{cal} kJ/mol	ΔS_{cal} kJ/mol K	ΔH_{VH} kJ/mol	ΔS_{VH} kJ/mol K
1	0	329.4 (56.4)	4.5	3.3	421	1278	608	1846
2	2	320 (47)	6.0	1.4	307	960	462	1444
3	3	314 (41)	6.4	1.4	263	838	384	1229
4	4	307 (34)	9.4	0.66	164	534	271	883
5	5	303 (30)	>10	0.3	123	406	164	541
6	6	-	-	≈ 0	~ 0	~ 0	-	-

ცხრილი 3.8. α -ქიმოტრიპსინის თერმული დენატურაციის კალორიმეტრული და გამოთვლილი თერმოდინამიკური პარამეტრები შარდოვანას სხვადასხვა კონცენტრაციის თანაობისას, pH 3.5 (ფოსფატის ბუფერი) 0.05 M NaCl.

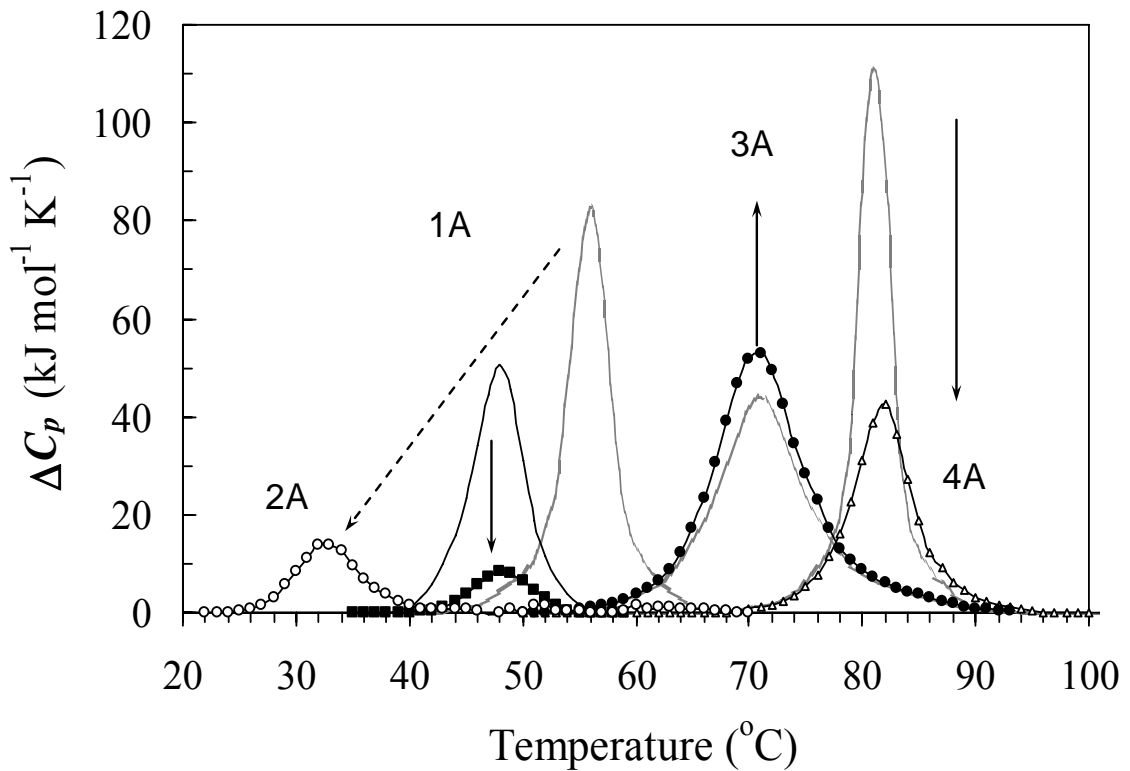
No	Urea, M	T_m , K ($^{\circ}$ C)	ΔT , deg	$\Delta C_p^{(max)}$ J/g K	ΔH_{cal} kJ/mol	ΔS_{cal} kJ/mol K	ΔH_{VH} kJ/mol	ΔS_{VH} kJ/mol K
1	0	329.4 (56.4)	4.5	3.3	421	1278	608	1846
2	2	320 (47)	6.0	1.4	307	960	462	1444
3	3	314 (41)	6.4	1.4	263	838	384	1229
4	4	307 (34)	9.4	0.66	164	534	271	883
5	5	303 (30)	>10	0.3	123	406	164	541
6	6	-	-	≈ 0	~ 0	~ 0	-	-



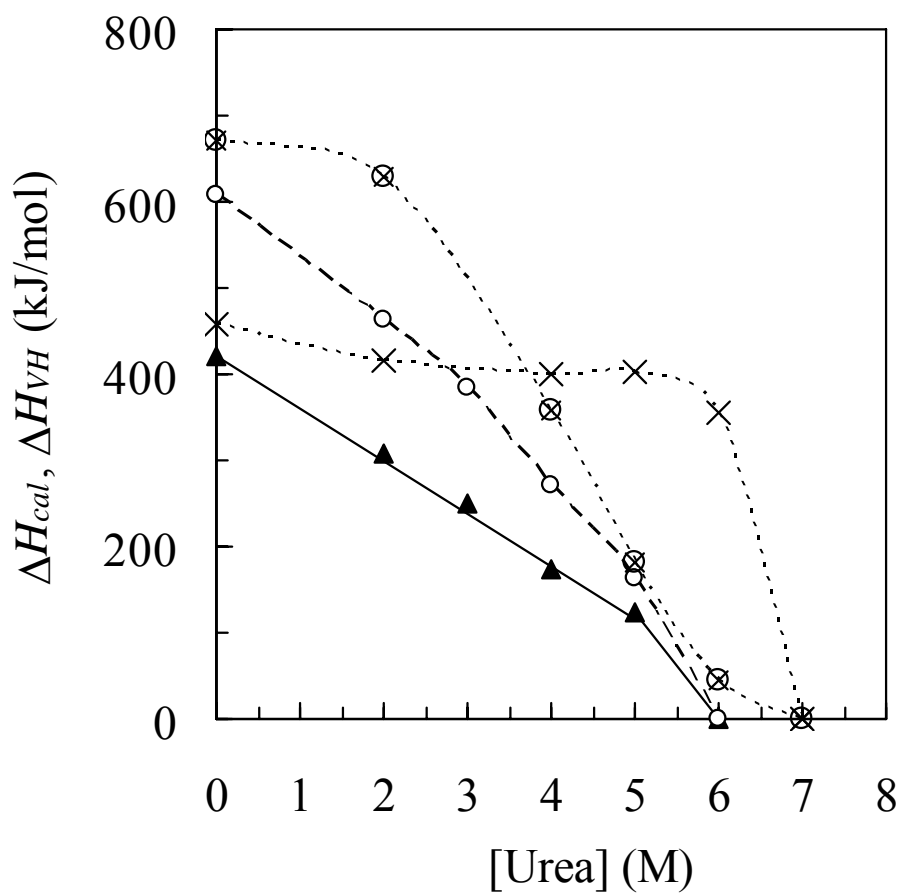
სურათი 3.11. α -ქიმოტრიპსინის თერმული ლღობის კალორიმეტრული მრუდები: (1) - pH 3.5, ფოსფატის ბუფერი; (2)-(4) – კლუს 2, 3 და 5 მოლ/ლ შარდოვანა; (5), (6) – იხ. სურ. 3.12.



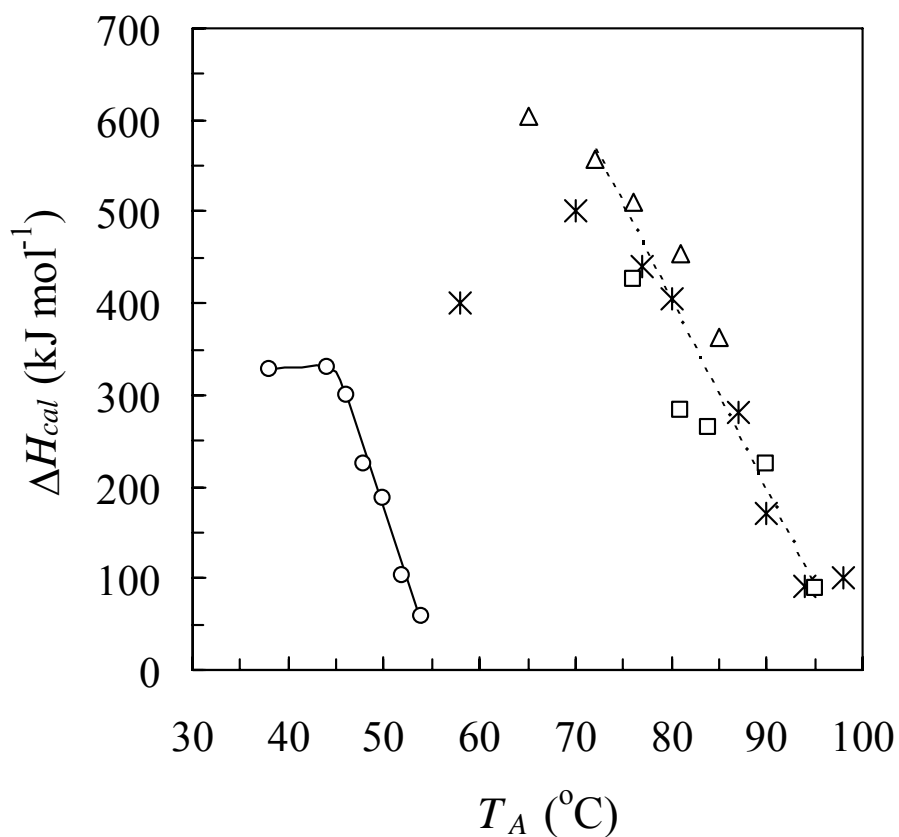
სურათი 3.12. სხვადასხვა გლობულური ცილების თერმული ლღობის კალორიმეტრული მრუდები: (1), (2) - ქიმოტრიპსინი (3), (4) - მიოგლობინი (5) - ლიზოციმი ნატივურ მდგომარეობაში.



სურათი 3.13. მადესტაბილური ზემოქმედების ქვეშ მყოფი ზოგიერთი გლობულური ცილის თერმული ლღობის მიკროკალორიმეტრული მრუდები ექსპერიმენტის სხვადასხვა პირობებში (სიმბოლოების შემცველი მრუდები, ხოლო მრუდები სიმბოლოების გარეშე შეესაბამება სურ. 3.11-ზე მოცემულ პირველსაწყის მრუდებს): (2A): α -ქიმოტრიპსინი 5 მოლ/ლ შარდოვანას ზემოქმედების ქვეშ; დანარჩენი მრუდები ასახავს მეორადი თერმული ზემოქმედების მიკროკალორიმეტრულ ქვევას T_m ტემპერატურაზე პირველადი გახურების შემდგომ: (1A) - α -ქიმოტრიპსინი ($T_A \approx T_m = 48$ °C); (3A) - ლიზოციმი ($T_A \approx T_m = 70$ °C); (4A) - მიოგლობინი ($T_A \approx T_m = 81$ °C)



სურათი 3.14. შარდოვანას სხვადასხვა კონცენტრაციის დანამატების გავლენა α -ქიმოტრიპსინის თერმული ლობის კალორიმეტრულ და გამოთვლილ (ვანტ-ჰოფის) ენტალპიებზე pH-ის ორი სხვადასხვა მნიშვნელობისას. pH 3.5: შავი სამკუთხედები – ΔH_{cal} , თეთრი წრეები – ΔH_{VH} ; pH 9.5: ჯვრები წრეში – ΔH_{cal} , უბრალო ჯვრები – ΔH_{VH} .



სურათი 3.15.. წინასწარი თერმული ზემოქმედების გავლენა სხვადასხვა გლობულური ცილების თერმული ღლობის კალორიმეტრულ ენტალპიაზე (T_A – “გამოწვის” ტემპერატურა): თეთრი წრეები – α -ქიმოტრიპსინი; ჯვრები – ლიზოციმი; სამკუთხედები – მიოგლობინი, pH 9; კვადრატები - მიოგლობინი, pH 10.7.

ცხრილებში 3.3 – 3.6 და სურათებზე 3.12, 3.13 და 3.15 მოყვანილი მონაცემების ანალიზიდან გამომდინარეობს შემდეგი: გლობულური ცილების, α -ქიმოტრიპსინის, მიოგლობინის, ლიზოციმის თერმული ლღობის მიკროკალორიმეტრული მრუდები მნიშვნელოვან ტრანსფორმაციას განიცდიან მადესტაბილური ფაქტორის – გარკვეულ ტემპერატურამდე წინასწარი გახურების შემთხვევაში. ეს გამოიხატება იმაში, რომ წინასწარი გახურების ტემპერატურის ზრდასთან ერთად, როგორც წესი, მნიშვნელოვნად მცირდება თერმული ლღობის კალორიმეტრული ენტალპია. ამასთან ერთად, უნდა აღინიშნოს, რომ კალორიმეტრული ენტალპიის ცვლილებები სხვადასხვა ცილების, და თუნდაც ერთი მოცემული ცილისთვის ექსპერიმენტის სხვადასხვა პირობებში (მაგალითად მიოგლობინისთვის pH-ის ორი სხვადასხვა მნიშვნელობისას), განსხვავებულია. თუ, შედარების მიზნით, განვიხილავთ კალორიმეტრული ენტალპიების მნიშვნელობებს მას შემდგომ, რაც ჩატარებულია წინასწარი გახურება მოცემული ცილის თერმული ლღობის პიკის მაქსიმუმის ტემპერატურაზე (T_m -ზე), დავინახავთ, რომ α -ქიმოტრიპსინის შემთხვევაში კალორიმეტრული ენტალპია დიდწილად ეცემა წინასწარ გაუხურებელ ნიმუშთან შედარებით. მიოგლობინის შემთხვევაში ასევე ხდება კალორიმეტრული ენტალპიის შემცირება, მაგრამ ეს ეფექტი ბევრად უფრო პატარაა. რაც შეეხება ლიზოციმის შემთხვევას, წინასწარი გახურების ეფექტი აქ ბევრად უფრო კომპლექსურია. სურათი 3.13-დან (3A) ნათლად ჩანს, რომ “სტანდარტულ” პირობებში წინასწარი გახურების შემდეგ კალორიმეტრული ენტალპია, განსხვავებით ყველა დანარჩენი შესწავლილი შემთხვევისგან, შემცირების ნაცვლად **იზრდება**. ეს “ანომალია” ლიზოციმის შემთხვევაში ერთადერთი არ არის. “გამოწვის” ტემპერატურის შემდგომი გაზრდის პირობებში დაიმზირება ლიზოციმის თერმული ლღობის სითბოტევადობის მრუდის “გახლეჩა” მინიმუმ ორ ნაწილად, რაც მიუთითებს შედარებით უფრო რთულ კონფორმაციულ ქცევაზე (იხ. ქვევით). აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ წინასწარი გახურების შედეგად, განსხვავებით შარდოვანას დანამატებით გამოწვეული ეფექტისა, თერმული ლღობის პიკის მაქსიმუმის ტემპერატურა, T_m , პრაქტიკულად არ იცვლება.

§3.6 გლობულური ცილების მადესტაბილუბელი ფაქტორების, დენატურანტის (შარდოვანა) და წინასწარი თერმული “გამოწვის” ზემოქმედების შედარებითი ანალიზი.

გლობულურ ცილებზე მოქმედი ორი მადესტაბილუბელი ფაქტორის პირობებში მიღებული მიკროკალორიმეტრული მონაცემების უკვე წინასწარი განხილვა მიგვანიშნებს იმაზე, რომ ამ ორი ფაქტორის ზემოქმედების მოლეკულური მექანიზმი სრულიად განსხვავებულია.

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ შარდოვანა წარმოადგენს ზომიერ, არასპეციფიკურ დენატურანტს ბიომაკრომოლეკულების, კერძოდ კი – გლობულური ცილებისთვის. მიღებულია, რომ ცილებზე შარდოვანას მადენატურირებელი ეფექტი ძირითადად განპირობებულია შარდოვანას მოლეკულების უპირატესი და ენერგეტიკულად “ხელსაყრელი” ურთიერთქმედებით განხვეულ მდგომარეობასთან და ამ უკანასკნელის სტაბილიზაციით “გამიმვლელ” პეპტიდურ ჯგუფებთან საკმაოდ ძლიერი წყალბადური ბმების წარმოქმნის ხარჯზე. მაგრამ, ზემოთ აღწერილი მოდელი არ ითვალისწინებს შარდოვანას მოლეკულების შესაძლო ურთიერთქმედებას ცილის მოლეკულის ნატივურ მდგომარეობასთან. ჩვენს ლაბორატორიაში და აგრეთვე სხვა ავტორების მიერ [105-109] (Khoshtariya et al., 2003-2006, Winter et al., 2003-2004, Hedoux et al., 2006) განვითარებული წარმოდგენების საფუძველზე ე.წ. “ბმული”, ანუ სოლვატური წყალი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს გლობულური ცილების ნატივური მდგომარეობის თერმოდინამიკურ სტაბილობაში. სხვადასხვა ტიპის არასპეციფიკური ზემოქმედების მქონე დანამატები, როგორც მასტაბილუბელი (გლიცერინი, შაქრები და სხვ.), ისე მადესტაბილუბელი (შარდოვანა, გუანიდინიუმის ქლორიდი, და მათი წარმოებულები), განსაკუთრებით მაღალი კონცენტრაციების პირობებში, წყალთან ერთად ქმნიან წყალბადური ბმების ერთიან განტოტვილ ბადეს. ამასთან, მადენატურირებელი დანამატების შემთხვევაში, ცილის ზედაპირის არეში ესეთი “შემფოთება” უნდა იწვევდეს “ნატივური”, ძლიერი წყალბადური ბმების შემცველი სტრუქტურების

რღვევას. ჩვენი ვარაუდით, შარდოვანას დანამატებით გამოწვეული დესტაბილიზაცია, კერძოდ როგორც კალორიმეტრული, ისე “ჭეშმარიტი” ენტალპიების მნიშვნელოვანი შემცირება და, საბოლოოდ, ნულამდე დაცემა განპირობებული უნდა იყოს ზემოთ აღწერილი ორივე ეფექტის ჯამური მოქმედებით.

ამის საწინააღმდეგოდ, კალორიმეტრული ენტალპიის შემცირება ტემპერატურის წინასწარი ზემოქმედების შედეგად კარგად აიხსნება ე.წ. სამი მდგომარეობის მოდელის ფარგლებში, რომლის მიხედვით თერმული ლღობის პირველ ენდოთერმულ, სწრაფ და თერმოდინამიკურად შექცევად სტადიას, მოყვება მეორე, ეგზოთერმული, შედარებით ნელი და შეუქცევადი სტადია [110], იხ. სქემა 3.1:

swrafi neli

$$N \Leftrightarrow D_R \Rightarrow D_I \quad (3.1)$$

სადაც D_R შეესაბამება შექცევადად დენატურირებულ, ხოლო D_I - შეუქცევადად დენატურირებულ მდგომარეობას. ეს უკანასკნელი წარმოადგენს არა იდეალურად განხვეული ცილას, არამედ აგრეგირებულ მდგომარეობას (აქ იგულისხმება როგორც “შიგამოლეკულური”, ასევე სხვა მსგავს მოლეკულებთან ასოცირებული აგრეგაცია), რომლის ჭარბად წარმოშობა “ნიღბავს” პირველი (შექცევადი) გადასვლის “ჭეშმარიტი” ენტალპიის გამოვლინებას [110].

ასეთი მოდელის ფარგლებში შესაძლებელია ადვილად აიხსნას როგორც კალორიმეტრული თერმული გამოწვის, ასევე ტემპერატურის სკანირების სიჩქარის ვარირების მეთოდით ადრე მიღებული [110] შედეგები. კერძოდ, როგორც თერმული გამოწვის ტემპერატურის აწევის, ასევე ტემპერატურის სკანირების სიჩქარის შემცირებასთან ერთად, იზრდება ცილის D_R მდგომარეობაში ყოფნის ალბათობა (ფაქტობრივი ყოფნის დრო), და შესაბამისად, D_I მდგომარეობაში ნელი გადასვლის ალბათობა, საიდანაც D_L და N მდგომარეობებში დაბრუნება უკვე შეუძლებელია.

დასკვნები

1. არასპეციფიკური ზომიერი დენატურანტების, შარდოვანასა და გუანიდინიუმის ქლორიდის თანაობისას (აქედან, GuHCl შემთხვევაში – პირველად), ამ დანამატების კონცენტრაციების ფართო დიაპაზონში, ჩატარებულია ორაგულის სპერმის დნმ-ის თერმული ლღობის სისტემატური მიკროკალორიმეტრული კვლევები და გამოვლენილია შესაბამისი თერმოდინამიკური პარამეტრების დამახასიათებელი ქცევა; ზოგადად ნაჩვენებია დნმ-ზე მათი მადესტაბილელი გავლენა.

2. ნაჩვენებია, რომ ხსნარებში შარდოვანასა და გუანიდინიუმის ქლორიდის კონცენტრაციებთან დამოკიდებულებაში, ნულიდან 5-6 მოლ/ლ კონცენტრაციების ფარგლებში, კალორიმეტრული ენტალპიის მნიშვნელობა თანაბრად და მნიშვნელოვანწილად (დაახლოებით 25%-ით) მცირდება, ხოლო შემდგომ, 9-10 მოლ/ლ კონცენტრაციებამდე ზრდის პირობებში, ნაწილობრივ აღდგება. ამგვარად, ამ პარამეტრისთვის, დნმ-ის ყველა შესწავლილი ნიმუშის შემთხვევაში დამზერილია კალორიმეტრული ენტალპიის მინიმუმის წერტილი. მსგავსი ქცევა არის გამოვლენილი გამოთვლილი პარამეტრის - კალორიმეტრული ენტალპიის შემთხვევაში.

3. ნაჩვენებია, რომ დნმ-ის თერმული ლღობის კალორიმეტრული მრუდის პიკის, T_m , მდებარეობა შარდოვანასა და გუანიდინიუმის ქლორიდის კონცენტრაციის ვარირების შემთხვევაში გამოავლენს განსხვავებულ ქცევას; სახელდობრ, შარდოვანას დანამატების შემთხვევაში T_m თანაბრად გადაინაცვლებს 15-20 °C-ით დაბალი ტემპერატურებისკენ, ხოლო GuHCl -ის დანამატების შემთხვევაში T_m -ის კონცენტრაციაზე დამოკიდებულება დაახლ. 0.5 მოლ/ლ არეში ამჟღავნებს მაქსიმუმს.

4. ორგულის დნმ-ზე შარდოვანასა და გუანიდინიუმის ქლორიდის ზემოქმედების განსხვავებული თერმოდინამიკური სურათი აიხსნება, ერთის მხრივ, ამ დენატურანტების მსგავსი წყალბადური ბმის დონორული თვისებებით, და ამდენად, დნმ-ის განხვეულ მდგომარეობასთან მსგავსი წყალბადურ-ბმებიანი ურთიერთქმედებით, ხოლო, მეორე მხრივ, დნმ-ის ნატივურ მდგომარეობასთან განსხვავებული ურთიერთქმედებით (იხ. შემდეგი პუნქტი).

5. მიღებული შედეგების და ლიტერატურული მონაცემების ანალიზის საფუძველზე გამოთქმულია მოსაზრება, რომ შარდოვანა, როგორც ნეიტრალური მოლეკულა, სუსტად ურთიერთქმედებს ნატივური დნმ-ის ფოსფატური ჯგუფების უარყოფითად დამუხტული ჟანგბადის ატომებით მდიდარ ე.წ. “ვიწრო ღართან”, მაშინ როდესაც დადებითი მუხტის მატარებელი გუანიდინიუმის იონი ელექტროსტატიკური ურთიერთქმედების ხარჯზე ინტენსივურად ურთიერთქმედებს აღნიშნულ ატომებთან რაც, სავარაუდოდ, იწვევს ნაწილობრივ მასტაბილურ ეფექტს. მაგრამ, ეს უკანასკნელი მცირეა ზოგად მადესტაბილურ ეფექტთან შედარებით.

6. რიგი გლობულური ცილების, α -ქიმოტრიპსინის, მიოგლობინის, ლიზოციმის თერმული ლღობის მიკროკალორიმეტრული შესწავლის საფუძველზე გამოვლენილია მადესტაბილური ფაქტორების (შარდოვანა, წინასწარი ტემპერატურული ზემოქმედება) გავლენა დენატურაციის თერმოდინამიკურ პარამეტრებზე და ნაჩვენებია, რომ ეს ფაქტორები იწვევენ კალორიმეტრული ენტალპიის და ენტროპიის მნიშვნელობების შემცირებას. ამავე დროს, თერმული ლღობის პიკის მაქსიმუმის ტემპერატურის, T_m , ქცევა ამ ორ შემთხვევაში არსებითად განსხვავებულია, რაც შეიძლება აიხსნას ორი სხვადასხვა მექანიზმით (იხ. ქვევით პუნქტები 7 და 8).

7. ტიპური გლობულური ცილის, α -ქიმოტრიპსინის მაგალითზე ნაჩვენებია, რომ შარდოვანას დანამატების მაღალი კონცენტრაციების პირობებში

კალორიმეტრული ენტალპიის შემცირება, ერთის მხრივ, განპირობებულია ცილის ნატივურ მდგომარეობაში სოლვატური წყლის ძლიერი წყალბადური ბმების მომცველი ბადის დაშლით, ხოლო, მეორეს მხრივ, განხვეული მდგომარეობის დესტაბილიზაციით, “გაშიშვლებულ” პეპტიდურ ჯგუფებთან საკმაოდ ძლიერი წყალბადური ბმების წარმოქმნის ხარჯზე.

8. ამის საპირისპიროდ, კალორიმეტრული ენტალპიის შემცირება ტემპერატურის წინასწარი ზემოქმედების შედეგად კარგად აიხსნება ე.წ. სამი მდგომარეობის მოდელის ფარგლებში, რომლის მიხედვით თერმული ღღობის პირველ ენდოთერმულ, სწრაფ და თერმოდინამიკურად შექცევად სტადიას, მოყვება მეორე, ეგზოთერმული, შედარებით ნელი და შეუქცევადი სტადია. ამ უკანასკნელის პროდუქტს წარმოადგენს არა იდეალურად განხვეული ცილა, არამედ აგრეგირებული (განმხოლოებული ან სხვა მოლეკულებთან ასოცირებული) მდგომარეობა, რომლის ჭარბად წარმოშობა “ნილბავს” პირველი (შექცევადი) გადასვლის “ჭეშმარიტი” ენტალპიის გამოვლინებას.

ციტირებული ლიტერატურა:

1. Arnott, S., Chandrasekaran, R. & Selsing, E. Polymorphism of DNA double helices. In: Structure and Conformation of Nucleic Acids and Protein-Nucleic Acid Interactions (eds. M. Sundaralingam & S.T. Rao), pp. 477–603. Baltimore: University Park Press (1975).
2. Saenger W. Principles of Nucleic Acid Structure, Springer Verlag, New York, 1984.
3. Williams R.J.P., Biol. Rev., 1979, v.54, p.389-437.
4. Richardson J.S., Adv. Protein Chem., 1981, v.34 p.167-339
5. Anfinsen C.B., Science, 1973, v.181, p.223-230
6. Orengo C.A., Flores T.P., Taylor W.R., Protein Eng. 1993, v.6, p.425-500.
7. Richardson J.S., Richardson D.C., In: Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation (Fasman G.D. Ed), Plenum, New York, 1989, p.485-500
8. Рубин А.Б., Биофизика, т.1. Москва, Высшая школа, 1987, с.149.
9. Кантор Ч., Шиммел П., Биофизическая химия, т.1 Москва, "Мир", 1985, с.54.
10. Александров В.Я., Реактивность клеток и белки, Ленинград, "Наука", 1985, с. 78.
11. Волькенштейн М.В., Биофизика. Москва, "Наука", 1981, с. 112.
12. Kannan K.K. et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1971, v.36, p.221.
13. Бреслер С.Е., Молекулярная Биология, Ленинград, "Наука", 1973, с.37.
14. Zhi-Ping Liu., Rizo J., Gierasch L.M., Protein Folding, In:Bioorganic Chemistry, (Hecht S.M., Ed.) Oxford Press, 1998. p.224-257.
15. Волькенштейн М.В., Молекулярная биофизика, Москва, "Наука", 1975, с.221.
16. Richards F.M., Ann. Rev. Biophys. Bioeng., 1977, v.6, p.151-176.
17. Privalov P.L. Gill S.J., Adv. Protein. Chem., 1988, v.39, p.191-234.
18. Rose G.D., Wolfenden R., Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct., 1993, v.22, p.381-415.
19. Kauzmann W., Adv. Protein. Chem., 1959, v.14, p.1-63.
20. Shirley B.A., Stanssens P., Hahn U., Pace C.N., Biochemistry, 1992, v.31, p.725-732.
21. Stahl N., Jencks W. P., J. Am. Chem. Soc., 1986, v.108, p.4196-4205.
22. Dill K.A., Biochemistry, 1990, v.29, p.7133-7155.
23. Pauling L., Corey R.B., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 1951, v.37, p.252-256.
24. Jeffrey D. G., Saenger W., Hydrogen Bonding in Biological Structures, Springer, New York, 1991.
25. Stickle D.F., Presta L.G., Dill K.A., Rose G.D., J. Mol. Biol., 1992, v.226, p.1143-1159.
26. Daopin S., Sauer U., Nicholson H., Matthews B.W., Biochemistry, 1991, v.30, p.7142-7153.

27. Alber T., In: Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation (Fasman G. Ed), Plenum, New York, 1989, p.161-192.
28. Matthews B.W., Annu. Rev. Biochem., 1993, v.62, p.139-160.
29. Kauzmann W., In: The Mechanism of Enzyme Action (McElroy W.D., Glass B., Eds), Baltimore, MD, 1954, p.70-120.
30. Брандтс Д., Структура и стабильность биологических макромолекул, 1973, Москва, "Мир" с. 174-254.
31. Perutz M, Kendrew J., Watson H., J. Mol. Biol., 1965, v.13, p.669.
32. Лим В., Биофизика, 1974, т. 19, с.366.
33. Птицын О.Б., ДАН СССР, 1973, т.210, с.1213.
34. Gibson K., Sheraga H., Physiol. Chem. Phys., 1969, v.1, p.109.
35. Yang J., Adv. Protein Chem, 1961, v.16, p.323.
36. Лифшиц И.М., Гросберг А.Ю., ЖЭТФ, 1973, т.65, с.2403.
37. Tanford C., Adv. Protein Chem., 1970, v.24, p.1-95.
38. Кушнер В.П., Конформационная изменчивость и денатурация биополимеров, Ленинград, "Наука", 1977, с. 147-187
39. Wuthrich K., Curr. Opin. Struct. Biol., 1994, v.4, p.93-99.
40. Neri D., Billeter M., Wider G., Wuthrich K., Science, 1992, v.257, p.1559-1563.
41. Robertson A.D., Baldwin R.L. Biochemistry, 1991, v.30, p.9797-9714.
42. Labhardt A.M., J. Mol. Biol., 1982, v.157, p.331-355.
43. Liu Z.P., Rizo S., Gierasch L.M., Biochemistry, 1994, v.33, p.134-142.
44. Alonso D.O., Dill K.A., Stigter D., Biopolymers, 1991, v.31, p.1631-1649.
45. Georgopoulos C., Welch W.J., Annu Rev. Cell Biol., 1993, v.9, p.601-634.
46. Hartl F.U., Hlodan R., Langer T., Trends. Biochem. Sci, 1994, v.19, p.20-26.
47. Neupert W., Hartl F.U., Craig E.A., Cell, 1990, v.63, p.447-450.
48. Baldwin R.L., Chemtracts: Biochem. Mol. Biol., 1991, v.2, p.379-389.
49. Contaxis C.C., Bigelow C., Biochemistry, 1981, v.20, p.618-622.
50. Tanford C., Aune K.C., Tsai A., J. Mol. Biol., 1973, v.73, p.185-197.
51. Ahmad F., Bigelow C.C., J. Mol. Biol., 1979, v.131, p.607-617.
52. Kugimiya M., Bigelow C.C., Canad. J. Biochem., 1973, v.51, p.581-585.
53. Федоров О.В., Хечинашвили Н.Н., Биофизика, 1976, т.26, с.1207-1209.
54. Ahmad F., Salahuddin A. Biochemistry, 1974, v.13, p.245-249.
55. Tsong T.Y., Biochemistry, 1975, v.14, p.1542-1547.
56. Roseman M., Jencks W.P., J. Amer. Chem. Soc., 1975, v.97, p.631-640.

57. Balasubramanian D., *Biopolymers*, 1974, v.13, p.407-410.
58. Пфайль В., Привалов П.Л., В сб. Биохимическая Термодинамика, Москва, "Мир", 1982, с.95-139.
59. Snape K.W., Tjian r., Blake C.C., Koshland D.E., *Nature*, 1974, v.250, p.295-298.
60. Warren J.R., Gordon J.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, v.420, p.397-405.
61. Warren J.R., Gordon J.A., *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, v.420, p.397-405.
62. Levinthal C., In: *Mossbauer Spectroscopy in Biological Systems* (Degennes P., Ed) University of Illinois Press, 1969, p.22-24.
63. Ptitsyn O.B. The molten globule state, In: *Protein Folding* (Creighton T.E. Ed.), Freeman, New York, 1992, p.243-300.
64. Mellmann I., Fuchs R., Helenius A., *Annu. Rev. Biochem.*, 1986, v.55, p.663-670.
65. Kuwajima K., Nitta K., Yoneyama M., Sugai S., *J. Mol. Biol.*, 1976, v.106, p.359-373.
66. Bychkova V.E., Berni R., Rossi G.L. Ptitsyn O.B., *Biochemistry*, 1992, v.31, p.7566-7571.
67. Herold M., Kirschener K., *Biochemistry*, 1990, v.29, p.907-911.
68. Ptitsyn O.B., *J. Protein. Chem.*, 1987, v.6, p.273-293.
69. Чернавский Д.С., Хургин, Ю.Н., Шполь С.Э., *Биофизика*, 1987, т.5, с.775.
70. Haynil D.T., Freire E., *Struct. Funct. Genet.*, 1993, v.3, p.237-246.
71. Semisotnov G.V., Rodionova N.A., Razgulyaev O.I., *Biopolymers*, 1991, v.31, p.119-127.
72. Creighton, T.E., *Biochem. J.*, 1990, v.270, p.1-16.
73. Dill K.A., Stigter D., *Adv. Protein Chem.*, 1995, v.46, p.59-104.
74. Hamada D., Kuroda Y. Kataoka M., *J. Mol. Biol.*, 1996, v.256, p.172.
75. Ptitsyn O.B., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1995, v.5, p.74-78.
76. Бычкова В.Е., Птицын О.Б., *Биофизика*, 1993, т.38, с.58-65.
77. Griko Y.V., *J. Mol. Biol.*, 2000, v.297, p.1259-1268.
78. Griko Y.V., Privalov P.L., Venyaminov S.Y., Kutushenko V.P., *J. Mol. Biol.*, 1988, v.202, p.127-138.
79. Griko. Y.V., Privalov P.L., *J. Mol. Biol.*, 1994, v.235, p.1318-1325.
80. Goto Y., Calciano L.J., Fink A.L., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1990, v.8, p.573-577.
81. Goto Y., Aimoto S., *J. Mol. Biol.*, 1991, v.218, p.387-396.
82. Goto Y., Nishikiori S., In: *Techniques in protein chemistry*, Academic Press, San Diego, 1992, p.337-346.
83. Hagihara Y., Tan Y., Goto Y., *J. Mol. Biol.*, 1994, v.237, p.336-348.

84. Keil B., Sorm F., Prusik Z., *Biophys. Biochim. Acta*, 1963, v.78, p.559.
85. Блюменфельд Л.А., Проблемы биологической физики, Москва, "Наука", 1977.
86. Kendrew J.C., *Nature*, 1961, v.190, p.663.
87. Привалов П.Л., Калориметрические исследования растворов биополимеров, В сб. Физические методы в молекулярной биологии, 1975, с.7-33.
88. Dobson C.M., *Struct. Biol.*, 1995, v.2, p.513-517.
89. Leharn S.A., Chowdhry-Babur Z., *Biocalorimetry*, J. Wiley, London, 1998. p.162.
90. Privalov P.L., Potekhin S.A., *Methods Enzymol.*, 1986, v.131, p.4-51.
91. Sturtevant J.M., *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 1987, v.38, p.463-488.
92. Cooper A., *Biphsical. Chem.*, 2000, v.85, p.25-39.
93. Privalov P.L., *J. Mol. Biol.*, 1996, v.258, p.707-725.
94. Албетрс Б. Брей Д., Люис Дм., Рэфф.М., Уотсон Дж., В кн. Молекулярная биология клетки, Москва, "Мир", 1986.
95. Griko Y.V., Makhatadze G.I. Privalov P.L., Hartley R.W., *Prot. Sci.*, 1994, v.3, p.669-676.
96. Мдзинарашвили Т.Д., Определение термодинамических и кинетических параметров конформационных переходов биополимеров и их естественных комплексов (бактериофагов) с помощью сканирующей микрокалориметрии, Дисс. на соискание уч. ст. докт. физ-мат. наук, Тбилиси 1999.
97. Bae S.J., Sturtevant J.M., *Biophys. Chem.*, 1995, v.55, p.247-252.
98. Privalov P.L., Khechinashvili N.N., *J. Mol. Biol.*, 1974, v.86, p.665-684.
99. Klump H., Burkart W. Calorimetric measurements of the transition enthalpy of DNA in aqueous urea solutions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, v.475, p.601–604.
100. Bregadze V., Khutsishvili I, Chkhaberidze J., Sologhashvili K. DNA as a mediator for proton, electron and energy transfer induced by metal ions. *Inorg. Chim. Acta*, 2002, v.339, p.145-159.
101. Hong, J., Capp, M.W., Anderson, C.F., Saecker, R.M., Felitsky, D.J., Anderson, M.W., Record, M.T. Preferential interactions of glycine betaine and of urea with DNA: Implications for DNA hydration and for effects of these solutes on DNA stability. *Biochemistry*, 2004, v.43, p.14744–14758.
102. Korolev, N., Lyubartsev, A.P., Laaksonen, A., Nordenskiöld, L. A molecular dynamic simulation study of oriented DNA with polyamine and sodium counterions: Diffusion and averaged binding of water and cations. *Nucl. Acids Res.*, 2003, v.31, p.5971–5981.

103. Mrevlishvili, G.M., Carvalho, P.S.M., Ribero da Silva, M.A.V., Mdzinarashvili, T.D., Razmadze, G.Z., Tarielashvili, T.Z. The role of bound water on the energetics of DNA duplex melting. *J. Therm. Anal. Calorim.* 2001, v.66, p.133–144.
104. Volker J., Klump H.H., Manning G.S., Breslauer K.J. Counterion association with native and denatured nucleic acids: an experimental approach. *J. Mol. Biol.*, 2001, v.310, p.1011-1025.
105. Khoshtariya, D.E., Hansen, E., Leecharoen, R. & Walker G.C. Probing protein hydration by the difference O-H (O-D) vibrational spectroscopy: Interfacial percolating network involving highly polarizable water-water hydrogen bonds. *J. Mol. Liquids*, 2003, v.105, p.13–36.
106. Ravindra, R. & Winter, R. Pressure perturbation calorimetric studies on the salvation properties and the thermal unfolding of proteins in solution. *Z. Phys. Chem. (München)*, 2003, v.217, p.1221–1243.
107. Ravindra, R. & Winter, R. Pressure perturbation calorimetry: a new technique provides surprising results on the effects of co-solvents on protein salvation and unfolding behaviour. *Chem. Phys. Chem.*, 2004, v.5, p.566–571.
108. Hedoux A., Ionov R., Willart J.-F., Lebret A., Affouard F., Guinet Y., Descamps M., Prtevest D., Paccou L., Danede F. Evidence of a two-stage thermal denaturation process in lysozyme: a Raman scattering and differential scanning calorimetry investigation. *J. Chem. Phys.* 2006, v.124, 014703 (1-7).
109. Khoshtariya, D.E., Dolidze, T.D., Seifert, S., Sarauli, D., Lee, G. & van Eldik, R. Kinetic, thermodynamic and mechanistic patterns for free (unbound) cytochrome *c* at Au/SAM junctions. Impact of electronic coupling, hydrostatic pressure and stabilizing/denaturing additives. *Chem. Europ. J.*, 2006, v.12, p.7041-7056.
110. Khoshtariya, D.E., Makharadze M., Getashvili G., Zaalishvili. On the DSC rate performance for a three-state thermal denaturation of globular proteins. *Bull. Georgian Acad. Sci.*, 2001, v.164, p.535-537.

მადლობა

ავტორი მადლობას უხდის სამეცნიერო ხელმძღვანელს, დიმიტრი ხოშტარას, საინტერესო სადისერტაციო თემის შერჩევისთვის, სამუშაოს შესრულების დროს გამოჩენილი ხელშეწყობისთვის და ყურადღებისთვის. ავტორი აგრეთვე მადლობას უხდის ბიოქიმიური კინეტიკისა და თერმოდინამიკის ლაბორატორიის რიგ თანამშრომლებს სამუშაოს შესრულებისა და მისი გაფორმების დროს გაწეული დახმარებისთვის, ასევე, მოლეკულური ბიოლოგიისა და ბიოლოგიური ფიზიკის ინსტიტუტის ხელმძღვანელობას - მის მიმართ გამოჩენილი გულისხმიერებისთვის.