ივ. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

მესხი თეა ამირანის ასული

ბიორეგულატორი პეპტიდების ზემოქმედება ქრომატინისა *(in situ)* და დნმ-ის თერმოდინამიკურ სტაბილურობაზე *(in vitro)*

03.00.15- გენეტიკა

დ ი ს ე რ ტ ა ც ი ა

ბიოლოგიურ მეცნიერებათა კანდიდატის
სამეცნიერო ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელი
ფიზ-მათ. მეცნიერებათა დოქტორი ჯ. რ. მონასელიძე

თბილისი - 2006

შ ი ნ ა ა რ ს ი

1. შესავალი

2. ლიტერატურული მიმოხილვა

2.1 ბიორეგულატორი პეპტიდების ზოგადი მიმოხილვა

2.2. ბიორეგულატორი პეპტიდების ბიოლოგიური როლი

2.3 პეპტიდების მოქმედების ექსპერიმენტული შესწავლა

2.4 პეპტიდების მოქმედების კლინიკური შესწავლა

3. კვლევის მასალა და მეთოდები

3.1 საკვლევი აგენტების დახასიათება

3.2 უჯრედების კულტივირების მეთოდი

3.3 კალორიმეტრია, როგორც ბიომაკრომოლეკულების და მათი ***in situ*** კომპლექსების თერმოდინამიკური პარამეტრების განსაზღვრის ერთ-ერთი წამყვანი მეთოდი

4. გამოკვლევათა შედეგები და განსჯა

4.1 ბიორეგულატორი პეპტიდების პროსტომაქსისა და ვილონის გავლენა ციტოპლაზმატურ სტრუქტურებზე, ბირთვულ მატრიქსებსა და ქრომატინის თერმოდინამიკურ სტაბილურობაზე ***in situ***

4.2 სინთეზური პოლიმერის poly[d(A-T)d(A-T)]-ს, პოლიმერ-პეპტიდ კომპლექსისა და თიმუსის დნმ-ის თერმოდინამიკური პარამეტრების განსაზღვრა დ.ს.მ. მეთოდით **(*in vitro*)** პეპტიდის ძალზე მცირე კონცენტრაციის თანაობისას

დ ა ს კ ვ ნ ე ბ ი

ლ ი ტ ე რ ა ტ უ რ ი ს ს ი ა

1. შ ე ს ა ვ ა ლ ი

თემის აქტუალობა. ნეირობიოლოგიასა და მედიცინაში ამჟამად დიდი ყურადღება ექცევა ციტომედინებს - ბიოლოგიურ პეპტიდებს, რომლებიც ინარჩუნებენ უჯრედული პოპულაციის სტრუქტურულ და ფუნქციონალურ ჰომეოსტაზს (Морозов, Хавинсон 1983.,Хавинсон 1996).

ექსპერიმენტული მონაცემების საფუძველზე, რომლებიც მიღებულია ქსოვილის კულტურის შესწავლისას (Хавинсон 2001., Хавинсон, Малинин и др. 2002., Хавинсон, Чалисова и др. 1999., Хавинсон, Окулов и др. 1998., Чалисова, Григорьев и др. 1999) გამოთქმული იყო მოსაზრება, რომ როგორც კომპლექსურ, ასევე სინთეზურ პეპტიდებს აქვთ უნარი გააძლიერონ ქსოვილის ექსპლანტანტის განვითარება, რომელიც შეესაბამება მოცემულ პეპტიდს.

გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ ორგანოსპეციფიურ ქსოვილის კულტურაში პეპტიდების მოქმედება არის დამოკიდებული ქსოვილის ტიპზე. კომპლექსური და სინთეზური პეპტიდების რეგულატორული ზემოქმედება სტრუქტურულ და ფუნქციონალურ ჰომეოსტაზზე სხვადასხვა უჯრედების კულტურაში, რომელიც მიღებული იყო ახალგაზრდა, საშუალო და ხანშიშესული ცხოველებიდან გამოვლინდა იმაში, რომ ისინი ასტაბილებენ ქსოვილების მორფოლოგიურ შენახვას და ამავე დროს აძლიერებენ უჯრედშიგა რეგენერაციას. ნაჩვენებია აგრეთვე, რომ თიმუსიდან მიღებული პეპტიდები ახდენენ

ნეიროტროფიკული ფაქტორების მოდულირებას (ნერვების ზრდა). პეპტიდების ზემოქმედება დამაზიანებელ ფაქტორებზე (ციტოსტატიკა, ეთანოლი) ხასიათდება გამოკვეთილი პროტექტორული ეფექტით. პეპტიდების რეპარაციული თვისებები განსაკუთრებით კარგად ჩანს ორგანოსპეციფიურ კულტურებში, რომლებიც მიღებულია ხანში შესული ცხოველებიდან, რაც მიუთითებს მათ გეროპროტექტორულ თვისებებზე (Быков Н.М. 2003).

ლიტერატურაში ცნობილი არ არის თუ როგორ მოქმედებენ სინთეზური ბიორეგულატორები გენეტიკური მასალის – ქრომატინისა და დნმ-ის თერმოდინამიკურ სტაბილურობაზე ***in situ*** და ***in vitro***. აღნიშნული საკითხების შესწავლას გააჩნია როგორც თეორიული ისე პრაქტიკული მნიშვნელობა.

სამუშაოს მიზანი. შრომის მიზანს წარმოადგენდა, ბიორეგულატორი პეპტიდების (პროსტომაქსისა და ვილონის) ზემოქმედების შესწავლა ეუქრომატინისა და ჰეტეროქრომატინის თერმოდინამიკურ სტაბილურობაზე კლინიკურად ჯანმრთელი მოხუცი დონორების პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტების უჯრედულ კულტურებში და თიმუსის დნმ-ის დნობის თერმოდინამიკულ პარამეტრებზე ფიზიოლოგიურ პირობებში დიფერენციალური სკანირებადი კალორიმეტრით. ბიორეგულატორი პეპტიდების ზემოქმედების შესასწავლად გენეტიკურ მასალაზე ***in situ*** და ***in vitro*** აუცილებელი იყო შეგვესწავლა შემდეგი საკითხები:

1. უჯრედების კულტივირება სტანდარტული მეთოდით (Moorhead et al. 1960).

2. დიფერენციალური სკანირებადი მიკროკალორიმეტრიის მეთოდით პეპტიდების ზემოქმედების შესწავლა მეტაბოლურ და დენატურაციის სითბოზე, მემბრანების, ციტოპლაზმატური ცილებისა ბირთვული მატრიქსების სტრუქტურულ ორგანიზაციაზე - ***in situ***.

3. ამავე მეთოდით პეპტიდების ზემოქმედების შესწავლა ჰეტეროქრომატინის დენატურაციის პარამეტრებზე - ***in situ***.

4. სინთეზური პოლიმერის poly[d(A-T)d(A-T)]-ს, პოლიმერ-პეპტიდ კომპლექსისა და თიმუსის დნმ-ის თერმოდინამიკური პარამეტრების განსაზღვრა დ.ს.მ. მეთოდით განზავებულ ხსნარებში.

ნაშრომის მეცნიერული სიახლე და თეორიულ-პრაქტიკული მნიშვნელობა.

შეწავლილი იქნა poly[d(A-T)d(A-T)] სინთეზურ პოლიმერზე, ხბოს თიმუსის დნმ-სა და 70-80 წლის კლინიკურად ჯანმრთელი ინდივიდების პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტების უჯრედულ კულტურებზე სინთეზური პეპტიდების ვილონისა და პროსტომაქსის გავლენა დიფერენციალური სკანირებადი მიკროკალორიმეტრიის მეთოდის გამოყენებით. ამ მეთოდის საშუალებით პირველად იქნა აღწერილი პეპტიდების გავლენა სინთეზური პოლიმერისა და თიმუსის დნმ-ის თერმოსტაბილობაზე. პირველად იქნა აგრეთვე აღწერილი მათი მოქმედება ქრომატინის სტრუქტურულ ცვალებადობაზე ***in situ***.

ნაჩვენებია, რომ ხანდაზმულ ადამიანებში პეპტიდების მცირე კონცენტრაციები იწვევენ ჰეტეროქრომატინული ფრაქციის გადასვლას აქტიურ ქრომატინში. გამოთქმული იქნა მოსაზრება, რომ ეს გადასვლა დაკავშირებულია ქრომოსომების ჰეტეროქრომატინული რაიონების გაშლასთან (დეკონდენსაციასთან), რაც განაპირობებს ქრომატინის გააქტიურების შესაძლებლობას. მიღებულ მონაცემებზე დაყრდნობით დასაშვებია ქრომატინის მოდიფიკაციისა და რეპარაციული სისტემების გააქტურების დადგენის შესაძლებლობა და ამ პროცესების მართვის გარკვეული პერსპექტივები. აღნიშნულს გააჩნია როგორც თეორიული, ისე პრაქტიკული მნიშვნელობა.

აპრობაცია. ნაშრომის შედეგები მოხსენებული და განხილული იქნა: 2006 წლის 6 ივნისს ე.ანდრონიკაშვილის ფიზიკის ინსტიტუტში ბიოლოგიური სისტემების ფიზიკის განყოფილების სემინარზე

2006 წლის 2 ოქტომბერს ივ. ჯავახიშვილის სახ. თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის სადისერტაციო საბჭოს სხდომაზე გენეტიკის განხრით **(B. 03. 15. №7)**

დისერტაციის სტრუქტურა. სადისერტაციო ნაშრომი მოიცავს შესავალს, ლიტერატურულ მიმოხილვას, მასალისა და მეთოდების აღწერას, შედეგებსა და მათ განხილვას, დასკვნებს და ციტირებული ლიტერატურის სიას. ნაშრომი წარმოდგენილია 92 ნაბეჭდ გვერდზე, ილუსტრირებულია 1 ცხრილითა და 12 სურათით.

პუბლიკაცია. დისერტაციის მასალები გამოქვეყნებულია 3 სამეცნიერო სტატიისა და ერთი თეზისის სახით.

1. **Meskhi T.,** Barbakadze Sh., Gorgoshidze M., Kiladze M., Chkhaidze M., Bablishvili N., INFLUENCE OF BIOREGULATOR VILON ON VITAL FUNCTIONS OF BIOPOLIMERS AND CHROMATINS ***IN SITU***. Proc. of the Geo. Acad. of Scie., Biol Ser. B, V.4, N.3, p.p 30-33 (2006)
2. G.Majagaladze, D.Khachidze, Sh.Barbakadze, B.Birkaia, **T.Meskhi**, M.Chkhaidze, J.Monaselidze. Microcalorimetric Study of poly [d(A-T) d(A-T)] at Very Low Concentrations of Peptide Bioregulator Prostomax. Bulletin. of the Georgian Acad. of Scie., V 172,N 3, November-December (2005).
3. **T.Meskhi,** D.Khachidze, Sh.Barbakadze, G.Majagaladze, M.Gorgoshidze, J. Monaselidze, T.Lezhava, N.Tadumadze. "Effect Prostomax on Human Lymphosyte Heterochromayin ***in situ"***. Biofizika, v. 49(6), 978 of the Peptide Bioregulator– 980, (2004).
4. J. Monaselidze, T. Jokhadze, N. Bablishvili, **T. Meskhi**. “Definition of $NiCl_2$ and $MnCl_2$-induced Chromatin Condensation Changes by the Method of Differential ScanningCalorimetry”. Conference on “Actual Issues of Genetics”, Genetics Department, Tbilisi State University, May, (1999).

2. ლიტერატურული მიმოხილვა

2.1. ბიორეგულატორი პეპტიდების ზოგადი მიმოხილვა

ბიომარეგულირებელი თერაპია, რომლის საფუძველს წარმოადგენს პეპტიდური ბიორეგულატორების კომპლექსური გამოყენება, თანამედროვე მედიცინის ინტენსიურად განვითარებადი ახალი მიმართულებაა.

პეპტიდური ბიორეგულაცია წარმოადგენს მეცნიერულ მიმართულებას, რომელიც მიმართულია ჰომეოსტაზის მამოძრავებელი მოლეკულური და უჯრედული მექანიზმების კვლევებისაკენ. პეპტიდური ბიორეგულატორული თერაპია შეიძლება განვიხილოთ, როგორც ჰომეოსტატიური მიმართულება მედიცინაში.

რეგულატორი პეპტიდები ახალი თაობის, მაღალთერაპიული აქტივობის მქონე სამკურნალო პრეპარატებია. პეპტიდთა კომპლექსები გამოყოფილია პრაქტიკულად ყველა უჯრედიდან, ქსოვილიდან და ორგანიზმის ბიოლოგიური სითხეებიდან. უკანასკნელ ხანებში შუმუშავებულ იქნა პეპტიდური ბიორეგულატორების ქიმიური სინთეზის ტექნოლოგია, რომელიც განაპირობებს მაღალმოლეკულური ცილების და სხვა მოლეკულების სრულ დეგრადაციას, რის შედეგად შენარჩუნებულია მხოლოდ დაბალმოლეკულური პეპტიდები, რომელთა მასა არ აღემატება 10კდ-ს. სინთეზირებულია თიმუსის, თავის ტვინის

ქერქის, ეპიფიზის, რქოვანას, სისხლძარღვების, გულის, ბრონქების, პროსტატის და ღვიძლის პეპტიდები საერთო სახელწოდებით ”ციტოგენები.”

ენდოგენური პეპტიდების საფუძველზე სამკურნალო პრეპარატების შექმნამ შესაძლებელი გახადა შემუშავებულიყო ასაკობრივი პათოლოგიებისადმი ორგანიზმის გენეტიკური წინასწარგანწყობის კორექციის ახალი საშუალებები.

როგორც კლინიკური, ისე ბიოქიმიური გამოკვლევები მიუთითებენ, რომ ორგანიზმის ფუნქციათა ყველაზე ფართო სპექტრი რეგულირდება სწორედ ოლიგოპეპტიდებითა და პეპტიდებით, რომელთაც ხშირად პეპტიდურ ჰორმონებს უწოდებენ. მათ კონფორმაციის ფართო დიაპაზონი გააჩნიათ. ორგანიზმში ცნობილია ნეიროენდოკრინული უჯრედების –APUD დიფუზური სისტემები, რომელთა სპეციფიური ფუნქციაა რეგულატორული პეპტიდების ფართო სპექტრის პროდუცირება. ცოცხალ უჯრედში აღნიშნული ნივთიერებების კონცენტრაციები ძალიან მცირეა (Шатаева и др.2003)..

პირველი პეპტიდური ბიორეგულატორების – ციტომედინების მიღებიდან 30 წელი გავიდა. ციტომედინების საშუალებით შექმნილია პრეპარატების ახალი კლასი, რომლებიც შეიცავენ პოლიპეპტიდური ფრაქციის კომპლექს. ასეთი პრეპარატების რიგში არის ისეთი კომპლექსური პეპტიდები, რომლებიც გამოყოფილია მხვილფეხა პირუტყვის ქსოვილებიდან: თიმალინი მიღებულია მკერდუკანა

ჯირკვლიდან, კორტექსინი და ეპიტალონი – თავის ტვინის ქერქიდან და ეპიფიზიდან, პროსტატილენი გამოყოფილია პროსტატის ჯირკვლიდან, კარდიალინი – გულიდან, რეტიმილამინი - თვალის ბადურიდან. სინთეზირებულია მოკლე პეპტიდები: ვილონი, თიმოგენი, კორტაგენი, ეპიტალონი, პროსტამაქსი (Кузник, Морозов и др. 1998., Морозов, Хавинсон и др. 2000). მათი გამოყენება დაიწყეს მედიცინის პრაქტიკულად ყველა სფეროში. განსაკუთრებული ინტერესით კი სარგებლობენ გერონტოლოგიასა და გერიატრიაში. სამედიცინო პრაქტიკაში წარმატებით გამოიყენება როგორც სხვადასხვა ორგანოდან გამოყოფილი, ისე სინთეზურად მიღებული პეპტიდური რეგულატორები. ცნობილია, რომ ისინი ანელებენ ორგანიზმის ბიოლოგიური საათის სვლას. მათი მოქმედება მიმართულია სიმსივნეების და ასაკთან დაკავშირებული პათოლოგიების პროფილაქტიკისაკენ. რეგულატორი პეპტიდების სამკურნალო თვისებების გამოკვლევებმა გამოავლინა, რომ მათთვის დამახასიათებელია რეგულაციის განსაკუთრებული ტიპი – ქსოვილსპეციფიური მოდულაცია (Шатаева и др.2003). ციტომედინების ბიოლოგიური ტესტირება საშუალებას იძლევა გავარკვიოთ ციტომედინის სპეციფიური აქტივობა. შერჩეულ უნდა იქნეს ქსოვილის ისეთი კულტურა რომელიც შეესაბამება მოცემულ პეპტიდს. ეს თავის მხრივ ხელს შეუწყობს ამა თუ იმ პეპტიდის მიზანდასახულ გამოყენებას კლინიკაში (Быков Н.М. 2003).

უჯრედების მიერ ენდოგენური პეპტიდების გამოყენება შეიძლება განხილულ იქნეს უჯრედული პოპულაციების თვითრეგულაციის, უჯრედული ჰომეოსტაზის ერთ-ერთ საშუალებად (Хавинсон и Морозов 2001).

ბიორეგულატორი პეპტიდები განაპირობებენ ორგანიზმის ძირითადი ფუნქციების ნორმალიზებას, იმუნიტეტის, ჰომეოსტაზის და მეტაბობოლიზმის გაუმჯობესებას, რაც დადებითად აისახება ორგანიზმის ჯანმრთელობაზე. პეპტიდური რეგულაციის დარღვევა და შესაბამისად უჯრედული ჰომეოსტაზის რეგულაციის დარღვევა განაპირობებს პათოლოგიური პროცესების განვითარებას, ეგზოგენური და ენდოგენური დამაზიანებელი ფაქტორებისადმი უჯრედების მდგრადობის დაქვეითებას.

თანემედროვე მედიცინა განსაკუთრებულ ყურადღებას ამახვილებს ჰომეოსტაზის ფენომენის შესწავლაზე ცოცხალი სისტემის ყველა სტრუქტურულ დონეზე (Шатаева и др.2003).

მრავალიერარქიული პრინციპის მიუხედავად ჰომეოსტაზის რეგულაციის ყველა მექანიზმი პრინციპულად ერთი და იგივე მიზანს ემსახურება – კოორდინირებას უწევს უჯრედში ცილის ბიოსინთეზს გენთა ექსპრესიაზე ზემოქმედების გზით. ჰომეოსტაზის პეპტიდური რეგულაციის უნიკალური თავისებურებაა პოლიპეპტიდების პროცესინგი – პეპტიდაზების აქტივაციის გზით საჭირო დროსა და ადგილას საჭირო რაოდენობით პეპტიდური მოკლე ფრაგმენტების წარმოქმნა, რომელთაც

გაცილებით მაღალი ბიოლოგიური აქტივობა გააჩნიათ, ვიდრე საწყის ნაერთს.

ცნობილია, რომ ორგანიზმის სხვადასხვა უჯრედისა და ქსოვილის შემადგენელი პეპტიდური ბიორეგულატორები წარმოიქმნებიან ცილების ორგანული პროტეოლიზის გზით და გააჩნიათ ბიოლოგიური ზემოქმედების ფართო სპექტრი. ისინი კოორდინირებას უწევენ ორგანიზმის განვითარების პროცესს და მრავალუჯრედიანი სისტემების ფუნქციონირებას (Хавинсон и Морозов 2001, 2002).

დაბერებას თან ახლავს ორგანიზმის მარეგულირებელი პეპტიდების სინთეზის, სეკრეციის და მათი სამიზნე-უჯრედების მგრძნობელობის დაქვეითება, რის საფუძველსაც პეპტიდებთან დაკავშირებული ენდოკრინული, პარაკრინული და აუტოკრინული მექანიზმების დარღვევა წარმოადგენს. სინთეზური ბიორეგულატორული პეპტიდები ეფექტური გეროპროტექტორებია, ისინი ზრდიან სიცოცხლის ხანგრძლივობას, ანელებენ კანცეროგენეზისა და ავთვისებიანი სიხშირეების წარმოქმნას, ამცირებენ დაბერების პროცესის ტემპს და ასაკთან დაკავშირებული პათოლოგიების განვითარების რისკს. სწორედ ამან განაპირობა გერიატრიაში პეპტიდური რეგულატორების წარმატებული გამოყენება (Хавинсон, Морозов, 2001., 2002., Корушко, Хавинсон и др., 2002).

თანამედროვე ცოდნის საფუძველზე ნათელი ხდება, რომ ადამიანს და უმაღლესი განვითარების ცხოველებს გააჩნია ერთნაირი მექანიზმი, როგორც ზრდის და უჯრედების განვითარების, ასევე ნერვული,

ენდოკრინული და იმუნური სისტემის ჩამოყალიბების. მრავალუჯრედიან ორგანიზმში რეგულატორული სტრუქტურა გამოირჩევა საკმაოდ მაღალი სირთულით. ინფორმაციის გადაცემისას შუამავლების ან მედიატორების საშუალებით, რომელიც ხორციელდება უჯრედული რეცეპტორების საშუალებით ყალიბდება არა რეცეპტორული მექანიზმები. უნდა აღინიშნოს, რომ ფიზიოლოგიური პროცესების საიმედობა გარანტირებულია რეგულაციის დუბლირებული მექანიზმის საშუალებით, რომლებიც შეძლებისდაგვარად ცვლიან ერთმანეთს. ეს სხვადასხვა რეგულაციის მექანიზმები: ნერვული, ჰუმორალური, ციტოკინური - მრავალუჯრედოვან ორგანიზმში მიმართულია იმისკენ, რომ მოახდინონ ბიოსინთეზის პროცესის კოორდინაცია, ნივთიერებათა ცვლის, გენეტიკური ინფორმაციის აღდგენა (Саркисов 1970., Kerr 1975). ბიოლოგიური რეგულაცია აერთიანებს სხვადასხვა მექანიზმს, რომელიც პასუხს აგებს უჯრედების ურთიერთქმედებებზე (Ашмарин И. П., Обухова М. Ф. 1986).

2.2 ბიორეგულატორი პეპტიდების ბიოლოგიური როლი

ასაკის მატებასთან ერთად ადგილი აქვს ცვლილებების დაგროვებას გენეტიკურ პროცესებში. კერძოდ, მიმდინარეობს ჰეტეროქრომატინიზაციის პროცესი - ქრომოსომების ეუ- და ჰეტეროქრომატინული უბნების კონდენსაცია, რომელსაც თან ახლავს გენების ინაქტივაცია (Lezhava T. 1999., Lezhava T. 2001), ფუნქციონალური დარღვევების განვითარება და სხვადასხვა ასაკობრივი დაავადებანი (Khavinson VKh. 2002., Korkushko OV., et. al. 2002)). შრომებმა აჩვენა, რომ გენეტიკური ინფორმაციის ტრანსკრიბცია საჭიროებს არა მხოლოდ აქტიური გენების, არამედ აქტიური ქრომოსომების არსებობას (Gilbert S. 1994). ბიორეგულატორი პეპტიდების კლასში შედის ფარმაცევტული პრეპერატი - სინთეზური ტეტრაპეპტიდი ეპიტალონი, რომელმაც აჩვენა სიბერის საწინააღმდეგო მკვეთრად გამოხატული ეფექტი მწერებსა და ცხოველებში (Khavinson VKh., et. al. 2000., Khavinson VKh.,et. al.2001), არ ახასიათებს მუტაგენური მოქმედება (Rozenfeld SV., et. al. 2002), გამოავლინა მკვეთრი ანტიოქსიდანტური აქტივობა, ასტიმულირებს სინთეზურ და რეპარაციულ პროცესებს, ზრდის ორგანიზმის თავდაცვას სტრესებისადმი, ახანგრძლივებს სასიცოცხლო ციკლს და რეპროდუქციულ პერიოდს (Bloom S., Goodpasture C. 1976., Lezhava T. 1991)

პეპტიდური ბიორეგულატორები ორგანიზმში ზრდიან რეგულატორული მესენჯერების სეკრეციას და არეგულირებენ ცილის სინთეზის პროცესს (Хавинсон и Морозов 2001.,2002).

ცნობილია, რომ პეპტიდური რეგულატორები უშუალოდ მონაწილეობენ გენთა ექსპრესიის და ცილათა ბიოსინთეზის ქსოვილსპეციფიურ რეგულაციაში. (Морозов и Хавинсон 1985).

პეპტიდური რეგულაციის შედეგად უჯრედებში იკლებს ისეთი პათოლოგიური ცვლილებების დონე, როგორებიცაა დნმ-ის დაზიანება, მუტაცია, ავთვისებიანი ტრანსფორმაცია და სხვა. იზრდება რეპარაციული პროცესების აქტივობა, რაც მიმართულია უჯრედული ჰომეოსტაზის შენარჩუნებისაკენ (Хавинсон, Морозов, 2001).

ბიორეგულატორი პეპტიდების მოქმედების შესწავლამ დაადგინა, რომ ისინი ახორციელებენ განთა ექსპრესიის და ცილათა ბიოსინთეზის შიდაუჯრედულ რეგულაციას, ჰომეოსტაზის დარღვევის შემთხვევაში კი ააქტიურებენ უჯრედის ანტიოქსიდანტურ სისტემებს და მაკრომოლეკულების რეპარაციას (Морозов, Хавинсон 1985., Морозов и др. 2000).

ნაჩვენებია პეპტიდური რეგულატორების ანტისიმსივნური აქტივობა ნეიროენდოკრინული და იმუნური სისტემების მოდულირების გზით. ექსპერიმენტებში ბიორეგულატორული პეპტიდების – თიმალინისა და ეპიტალამინის შეყვანა განაპირობებდა სიმსივნის განვითარების სიხშირის კლებას როგორც ინტაქტურ ცხოველებში, ისე

მაიონიზირებელი რადიაციით და კანცეროგენული აგენტებით ზემოქმედების პირობებში (Dilman et al. 1979., Anisimov et al. 1994., Анисимов и др.1993., Анисимов, 2000., Хавинсон и Морозов, 2001).

პეპტიდურ ბიორეგულატორებს უნარი აქვთ შეცვალონ გენომის ფუნქციონალური აქტივობა უჯრედული ციკლის სხვადასხვა სტადიაზე და გავლენა იქონიონ გენთა ექსპრესიაზე, მრნმ-ის ტრანსკრიფციულ პროცესზე და ცილების ბიოსინთეზზე, უჯრედთა პროლიფერაციისა და დიფერენციაციის პროცესებზე (Морозов и др., 2000., Хавинсон, Морозов., 2001).

ცნობილია, რომ ჰომეოსტაზის ყოველგვარ ცვლილებას და უჯრედის ფუნქციის ასაკთან დაკავშირებულ დარღვევებს ადგილი აქვს ქრომატინის ფუნქციონალურ დომენებში მომხდარი ცვლილებების გამო (Lezhava, 2001).

შეწავლილი იქნა სინთეზური პეპტიდების ლივაგენისა და ეპიტალონის ზემოქმედება რიბოსომული გენების აქტივობაზე, ჰეტეროქრომატინის დენატურაციის პარამეტრებზე, სტრუქტურული C–ჰეტეროქრომატინის პოლიმორფიზმზე და ფაკულტატური ჰეტროქრომატინის ვარიაბელობაზე ხანდაზმული ინდივიდების ლიმფოციტებში. საკვლევი ბიორეგულატორი პეპტიდები იწვევდნენ გენების აქტივაციას, პერიცენტრული სტრუქტურული ჰეტეროქრომატინის დეკონდენსაციას და რეპრესირებული გენების გამოთავისუფლებას ქრომოსომათა ეუქრომატული უბნების ასაკთან

დაკავშირებული კონდენსაციისაგან. გამოკვლევათა შედეგები მიუთითებს, რომ ლივაგენი და ეპიტალონი განაპირობებს ქრომატინის აქტივაციას ჰეტეროქრომატინისა და ქრომოსომათა ჰეტეროქრომატინიზებული რაიონების მოდიფიკაციის გზით (Хавинсон и др. 2002., Khavinson et. al. 2002, 2003). ეპიტალონი ხანდაზმული ადამიანებისაგან მიღებულ PHA-სტიმულირებულ ეჯრედებში იწვევს ქრომატინის ორგანიზაციის უმაღლესი დონის და აგრეთვე 10ნმ-იანი ფილამენტის დეკონდენსაციას (Khavinson V., Lezhava T., et. al. 2003)

ვარაუდობენ, რომ სიმსივნური ტრანსპორმაციისას ირღვევა შესაბამისი რეგულატორული პეპტიდების გამოყოფის პროცესი. გამოთქმული იქნა მოსაზრება, რომ იმუნომოდულირებული ბუნებრივი და სინთეზური პეპტიდების ზემოქმედების საფუძველი ხასიათდება რამდენიმე სხვა-და-სხვა მექანიზმით (Morozov, Khavinson 1997). თიმუსი წარმოადგენს იმუნოგენეზის ერთ-ერთ ცენტრალურ ორგანოს. მის მდგომარეობასა და აქტიურობაზეა დამოკიდებული ორგანიზმის დაცვითი ფუნქცია (Ломакин, Арцимович.,1992). თიმუსის ზოგიერთ პეპტიდს გააჩნია ანტისიმსივნური აქტივობა (Анисимов, Морозов, Хавинсон 1982). ისინი სტიმულირებას უწევენ თავის ტვინის უჯრედებისა და T და B ლიმფოციტების დიფერენცირებას. შესაბამისად ხელს უწყობენ უჯრედული და ჰუმორალური იმუნიტეტის განვითარებას. (Анисимов и др.

1982., Белокрылов и др. 1980., Хавинсон, Южаков и др. 2001., Piguet, Irle, Vassalli 1981).

ასაკის მატებასთან ერთად თირკმელში, ისე როგორც თიმუსში, ხდება ლიმფოიდური სტრუქტურების შემცირება, შემაერთებელი ქსოვილის (სტრომის) (Сапин, Этинген.,1996) გადიდება და იცვლება მისი შემადგენელი უჯრედების აქტივობა. თიმუსში მცირდება იმ უჯრედების რაოდენობა, რომლებიც ასინთეზირებენ რეგულატორულ პეპტიდებს. შესაბამისად მცირდება მათი (პეპტიდების) შემცველობა სისხლში (Ломакин, Арцимович,1992., Лопухин, Морозов, Петров 1974., Miller 1993). ზოგიერთ ორგანოში (თავის ტვინში, თირკმელში, ღვიძლში) არსებობს თიმუსის რეგულატორული პეპტიდების სინთეზის დამატებითი უბნები (Агнеев 1996., Барта 1976., Федоров 1977., Фриденштейн, Лурия 1980., Sztein, Goldstein 1986). ინტერესს იწვევს პოპულაციის ინვოლუციისას უჯრედების პოპულაციის გააქტიურება მათზე რეგულატორული პეპტიდების ზემოქმედებით ასაკის მატებასთან ერთად. დადგენილია, რომ თიმუსის პეპტიდები ხელს უწყობენ სიცოცხლის ხანგრძლივობის ზრდას (Анисимов, Морозов, Хавинсон 1982). დადასტურებულია, რომ თიმუსის იმუნომარეგულირებელი პეპტიდები ეფექტურად მოქმედებენ ნეიროენდოკრინულ სისტემებზე (Автандилов 1990., Белокрылов, Морозов, Хавинсон 1978., Geenen 1990., Green, Bach 1979).

ცნობილია, რომ თიმუსის პეპტიდში არსებობს აქტიური ცენტრი (ფრაგმენტი), რომელიც განაპირობებს მთელი მოლეკულის ბიოლოგიურ

აქტივობას. თიმუსის რეგულატორულ პეპტიდში შეიძლება მოხდეს ფუნქციის დაყოფა პეპტიდის ფრეგმენტებს შორის (Белокрылов, Хавинсон, Морозов 1980).

ვილონის იმუნომამოდულირებელი თვისებების შესწავლისას დადგინდა, რომ ვილონი ისე როგორც თიმოგენი, იწვევენ უჯრედების იმუნიტეტის სტიმულირებას და არასპეციურ რეზისტენტურობას ორგანიზმში. ვილონის მასტიმულირებელი ზემოქმედება თიმოგენთან შედარებით უფრო გამოკვეთილია იმ შემთხვევაში როდესაც იგი მოქმედებს მაკროფაგებზე და ნეიტროფილებზე. (Morozov, Khavinson,1997; Киселева и др.,1999).

სავარაუდოა, რომ ვილონი წარმოადგენს ერთ-ერთ ყველაზე მოკლე პეპტიდს, რომელიც წარმოიქმნება უჯრედებში შეზღუდული პროტეოლიზის პროცესში და ასრულებს სპეციფიკურ რეგულატორულ ფუნქციებს: ხელს უწყობს ტრანსფაქტორების მიწოდებას ბირთვში ან შედის ტრანსფაქტორების კომპლექსის ფუნქცინალურად აქტიურ ცენტრებში. ეს ცენტრები კი აუცილებელია ლიმფოციტებში ილ-2 გენის ტრანკრიფციის აქტივაციისათვის (Dressler et al. 1992., Mathias et al. 1993., Hannun 1994., Rybakina et al. 1997., 1998).

შეიძლება ვიფიქროთ, რომ პრეპარატის მასტიმულირებელი ეფექტი, დაკავშირებულია იმ უჯრედების აქტივაციასთან რომლებიც შეიცავენ **PHA**-ბმულ უბნებს, და ამავე დროს ხდება B-ლიმფოციტების რეცეპტორების ექსპრესიის დათგრუნვა, გარდა ამისა ხდება იმ

უჯრედების დაგროვება, რომლებიც გამიმუშავებენ ანტისხეულებს. დაგროვება ხდება თირკმელის ჩანასახის ცენტრებში.

ჩატარებულ ცდებში (***in vitro***), როდესაც ვილონის კონცენტრაცია იყო 10 ნგ/ლ-დან 100 მკ/ლ-მდე, იგი იწვევდა შიდა უჯრედული Ca^{2+} რაოდენობის გაზრდას, როგორც თიმოციტებში ასევე მიკროფაგებში, რაც თავის მხრივ წარმოადგენს უჯრედების აქტივაციის ერთ-ერთ მექანიზმს (Казакова и др., 1996).

პოლიპეპდიტური კარკასის და მისი გვერდითი ჯგუფების აგებულების ანალიზმა აჩვენა, რომ დნმ-სა და პეპტიდებს შორის არსებობს ოთხი პოტენციალურად შესაძლებელი ურთიერთქმედების ტიპი: (Claud H. 1971., Hippel., McGhee 1972.)

1. ფოსფატებსა და დადებითად დამუხტულ ამინომჟავების ნაშთებს შორის, (ლიზინი, არგინინის გუანიდური ჯგუფი და პროტონირებული ჰისტიდინი) წარმოიქმნება იონური კავშირები.
2. წყალბადური კავშირები ფოსფატურ ჯგუფებსა და ნუკლეოტიდებს შორის, ნუკლეინის მჟავების ნახშირბადური უბნებს შორის, პეპტიდის პროტონულ-დონორულ და პროტონულ-აქცეპტორულ ჯგუფებს შორის.
3. არომატული ამინომჟავების (ტრიფტოფანი, თიროზინი, ფენილალანინი, ჰისტიდინი) გვერდით ჯგუფებს და ნუკლეოტიდებს შორის სტეკინგ ურთიერთქმედება ინტერკალაციის მექანიზმით.

4. ჰიდროფობული ურთიერთქმედება 5-მეთილ ციტოზინსა, თიმინსა და პეპტიდების არაპოლარულ გვერდით ჯგუფებს შორის.

გასთვალისწინებელია ის, რომ ყველა ეს ურთიერთქმედება, ხორციელდება კომპლექსში.

ცნობილია, რომ დნმ-ს გააჩნია პოლიპეპტიდებთან და პოლიამინებთან ურთიერთქმედების მაღალი რეაქციული შესაძლებლობა. დიდი მნიშვნელობა ენიჭება დნმ-ის და პროტამინების კომპლექსების წარმოქმნას. ეს პეპტიდები ისეა განლაგებული დნმ-ის ზედაპირზე, რომ მეზობელი გვერდითი ჯგუფების დადებითი მუხტები "იყურებიან" სხვა და სხვა მხარეს და ამავე დროს უკავშირდებიან დნმ-ის ორივე სპირალის ფოსფატურ ჯგუფებს (Зенгер.,1987).

დნმ-სა და პეპტიდებს შორის კავშირები მტკიცე და მდგრადია. ამასთან ექსპერიმენტულად დადასტურებულია, რომ მეთილირებული დნმ მნიშვნელოვნად მტკიცედ იკავშირებს პეპტიდებს. როგორც ჩანს 5-მეთილციტოზინის მეთილის ჯგუფი გარკვეულ როლს ასრულებს გამომცნობი საიტის კონფიგურაციული თავისებურებებისა და იმ ენერგიისათვის რაც დნმ-სა და პეპტიდებს შორის ბმებს გააჩნია. აღნიშნული ურთიერთქმედებისათვის განსაკუთრებული მნიშვნელობა აქვს ორივე მოლეკულის კონფორმაციას, სივრცით ორიენტაციას, ჰიდროფილური, ჰიდროფობური, დონორ-აქცეპტორული უბნების და წყალბადური კავშირების განთავსების რიგს. ნუკლეოტიდთა ფუნქციონალური ჯგუფების განლაგების წესი დნმ-ისა და

რეგულატორული პეპტიდების მოლეკულათშორისი ამოცნობის საფუძველს წარმოადგენს (Bird. 1992., Alberts et al.1994., Шатаева и др., 2003).

ვარაუდობენ, რომ უჯრედის გენეტიკური აქტივობის მოდულაცია ოლიგოპეპტიდებით განპირობებულია მათი საიტ-სპეციფიური დაკავშირებით დნმ-ის პრომოტორთან. გარდა ამისა პეპტიდები რეგულირებას უწევენ პოსტტრანსკრიფციულ პროცესებს (Морозов и Хавинсон 1985., Adinolfi et al.1999).

2.3. პეპტიდების მოქმედების ექსპერიმენტული შესწავლა

მოროზოვის და ხავინსონის (Морозов, Ховинсон., 1983) მონაცემების თანახმად ციტომედინებმა უნდა იმოქმედონ იმ ორგანოს ქსოვილზე, რომლიდანაც თვითონ არიან გამოყოფილები. ამ შედეგების სამართლიანობას ადასტურებს როგორც ცხოველებზე ჩატარებული ექსპერიმენტები, ასევე კლინიკური მონაცემები. მრავალი კლინიკური გამოკვლევებისას მიღებულ იქნა სტაბილური და დადებითი შედეგები სახვადასხვა პათოლოგიის მკურნალობისას, რაც მიუთითებს იმაზე, რომ მათი ზემოქმედება არის როგორგ პოლიფუნქციონალური, ასევე ქსოვილსპეციფიური.

ნაჩვენებია ბიორეგულატორი პეპტიდების გავლენით რეპროდუქციული სისტემის ფუნქციის ნორმალიზება და რეპროდუქციული პერიოდის გახანგრძლივება ექსპერიმენტულ ცხოველებში(Анисимов и др.,1973., Хавинсон, Морозов.,2001).

ზოგიერთი ბიორეგულატორი პეპტიდი (ეპიტალამინი, ეპიტალონი) ხასიათდება გამოხატული ანტიოქსიდანტური აქტივობით. აღნიშნული ეფექტი შესწავლილია Drosophila melanogaster-ზე და სხვა ექსპერიმენტულ ცხოველებზე (Хавинсон и др.1999., Anisimov et al. 2001).

მრავალრიცხოვან გამოკვლევებში, რომლებიც ტარდებოდა თაგვებზე, ვირთაგვებზე და Drosophila melanogaster-ზე ნაჩვენები იყო, რომ რეგულატორი პეპტიდების ზემოქმედებით მნიშვნელოვნად იზრდებოდა

სიცოცხლის ხანგრძლივობა. ამასთან, აღინიშნებოდა ასაკის ზრდასთან დაკავშირებული პათოლოგიების განვითარების შემცირება(Кузник и др., 1998., Анисимов 2000.,Хавинсон, Морозов.,2001., Khavinson et al.2001., Корушко и др.,2002).

ამჟამად, ექსპერიმენტში და კლინიკაში გამოიყენება რიგი პრეპერატებისა მკერდუკანა ჯირკვლიდან მიღებული (თიმოზინი, თიმოსტიმულინი, თიმალინი და სხვა) და მათი სინთეზური ანალოგები (თიმოგენი, თიმუნოკსი და სხვა). მკერდუკანა და გირჩისებური ჯირკვლები შეიძლება მიეკუთვნონ თერაპიის შემცვლელ საშუალებებს. ასაკის მატებასთან ერთად ხდება ორივე ჯირკვლის ფუნქციონალური მდგომარეობის დაქვეითება. ეპიფიზის და თიმუსის გადანერგვამ ახალგაზრდა ცხოველებიდან მოხუც ცხოველებზე მიგვიყვანა მკაფიოდ გამოხატული გაახალგაზრდავების ეფექტამდე და სიცოცხლის ხანგრძლივობის გადიდებამდე. იგივე ეფექტს იძლევა მკერდუკანა ჯირკვლიდან მიღებული პრეპერატებისა და მათი სინთეზური ანალოგების გამოყენება (Морозов и др., 1977). თიმუსის პეპტიდებს ახასიათებთ მარალი ამორჩევის მოქმედება, ეფექტურია ძალიან მცირე დოზით, ადვილად გამოიდევნებიან ორგანიზმიდან და რაც მთავარია არ იწვევენ უარყოფით გვერდით ეფექტებს (Хмельницкий и др.1975).

ხბოს მკერდუკანა ჯირკვლიდან გამოყოფილი თიმალინის (Морозов, Хавинсон.,1978) ზემოქმედებისას ზღვის გოჭებზე გამოიკვეთა მისი მასტიმულირებელი მოქმედება თიმუსის ლიმფოიდურ კომპონენტზე:

ძლიერდება პროლიფერაცია და დიფერენციაცია, იზრდება ზრდასრული ლიმფოციტების რაოდენობა (Кокотов, Бубажабон, Кузник и др. 1984., Морозов, Хавинсон 1983., Морозов и др. 1982., Софронов и др. 1984., Филев и др. 1982., Хмельницкий, Гринцевич и др. 1975). ამავე დროს მცირდება თიმოციტების რაოდენობა. ხოლო ლეიკოციტების აბსოლიტური რაოდენობა თირკმლის პერიფერიულ სისხლში იზრდება, რაც გამოწვეულია თიმოციტების მიგრაციით პერიფერიისკენ (Хавинсон., Морозов 1981).

ვილონის შეყვანისას ინტაქტურ და ჰიპოქსიის პირობებში მოთავსებულ ხაანდაზმულ და ახალგაზრდა ცხოველებში, აღინიშნებოდა მისი ანტიოქსიდანტური ზემოქმედება. ინტაქტურ ცხოველებზე ვილონის გამოყენებას თან სდევდა ანტიჰისტამინური ეფექტი სისხლის პლაზმაში. უნდა აღინიშნოს, რომ ეს ეფექტი შედარებით მკვეთრად ჩანს ხანდაზმულ ცხოველებში (Морозов., Хавинсон., Малинин. 2000).

T ლიმფოციტების სუბპოპულაცია გამოირჩევა პროლიფერაციისაკენ მიდრეკილებით და გააჩნიათ გმრავლების სხვადასხვა სიჩქარე, რაც თავისთავად დამოკიდებულია ლიმფოციტების ასაკზე. ეს თავისთავად განისაზღვრება დეტერმინანტების და რეცეპტორების სიმკვრივით მემბრანაში. ამაზევეა დამოკიდებული ლიმფოციტების რეაქცია ანტიგენზე და ჰუმორალურ ფაქტორებზე. ეს რეაქცია შეიძლება გამოვლინდეს უჯრედების სიკვდილით, სელექციით და დიფერენცირებით. თიმოციტები კვდებიან აპოპტოზით (Anderson,

Michell at.al 1996., Liu, Zhang at. al. 1996) სიკვდილს საფუძვლად უდევს C_a-M_g დამოკიდებული ენდონუკლეაზის გააქტივება (Ярилин и др. 1990).

თიმუსის ზოგიერთი პეპტიდის ბიოლოგიური აქტივობა შეისწავლებოდა თიმუსის ლიმფოიდური უჯრედების კულტურასა და ძვლის წითელ ტვინში, ლიმფურ კვანძებში, ზღვის გოჭების თირკმელსა და სისხლში, ჯანმრთელი ადამიანების ძვლის ტვინსა და სისხლში (Морозов., Хавинсон. 1981).

თიმუს ამოცლილ ზღვის გოჭებსა და ვირთაგვებზე თიმალინის მოქმედებისას აღდგება T ლიმფოციტების რაოდენობა პერიფერიულ სისხლში, თირკმელსა და ლიმფურ კვანძებში (Хавинсон, Морозов 1981). თავის ტვინის ნაცრისფერი ნივთიერებიდან გამოყოფილი პოლიპეპტიდების კომპლექსის-კორტეკსინის ზემოქმედებამ ვირთაგვებზე, რომელთაც აქვთ თავის ტვინის ტრამვა და დემიელინიზირებული ენცეფალიტი, გამოიღო კარგი შედეგი (Кузник и др. 1998).

ვირთაგვების უჯრედულ კულტურებში ცილის სინთეზის კინეტიკაზე სინთეზური პეპტიდების ზემოქმედების შესწავლამ აჩვენა უჯრედში ცილის სინთეზის ინტენსივობის და რიტმის ზრდა(Хавинсон и Морозов., 2001)

ექსპერიმენტალური ციროზით დაავადებულ ვირთაგვებზე, ვილონის მოქმედება იწვევდა ღვიძლის რეგენერაციის სტიმულირებას. ციროზი გამოწვეული იყო ოთხქლოროვანი ნახშირბადის ზემოქმედებით (CCl_4). ვილონის მოქმედების ეფექტურობა მჟღავნდებოდა ჰეპოციტების

ფუქციონალური აქტივობის ზრდით და წვრილი ნაწლავის ჰიდროლითური ფერმენტების გააქტიურებით (Морозов., Хавинсон., Малинин. 2000).

ხბოს გულიდან გამოყოფილი პეპტიდების კომპლექსის – კარდიალინის ზემოქმედება ორგანიზმში ხელს უწყობს გულსისძარღვთა სისტემის პათოლოგიის ნორმალიზებას.

გულის ტოტალური იშემიით დაავადებულ ზღვის გოჭებზე კარდიალინის მოქმედებამ აჩვენა გულის შეკუმშვის ფუნქციის გაუმჯობესება (Бабенко, Казанцева 1992., Павленко и др. 1992). ეს ეფექტი თავს იჩენს უკვე ისეთი მცირე დოზებისას როგორიცაა $2x10^{-8}$ გ/მლ და იგი დამოკიდებულია დოზის რაოდენობაზე. კონცენტრაციის ზრდისას ეფექტურობა მცირდებოდა. კარდიალინის პროტექტორული ეფექტი მკვეთრად გამოიხატა მოდელირებული იშემიის, მიოკარდის ინფაქტის, გულ-სისხლძარღვთა სისტემის უკმარისობის და სხვადასხვა ტიპის იშემიის დროს (Слепушкин и. др. 1987).

ორგანოსპეციფიური ქსოვილის კულტურის გამოკვლევისას თავს იჩენს ეფექტური კონცენტრაცია, რომლის დროსაც გამოსაკვლევი ფაქტორები მიუთითებენ მაქსიმალურად გამომჟღავნებულ შესაბამის ეფექტებზე. ჩვეულებრივ ბიოაქტივობის ეფექტური კონცენტრაცია მოთავსებულია 10^{-5} – 10^{-4} მოლ დიაპაზონში, თუმცა მე-20 საუკუნის 70-იან წლებში დაგროვდა მონაცემები იმის თაობაზე, რომ ბიოლოგიურ

მოდელებში ულტრამცირე კონცენტრაციებმა (10^{-18} – 10^{-11}) შეიძლება იმოქმედონ ბიოლოგიურ აქტივობაზე (Ашмарин., Обухова. 1986).

უნდა ავღნიშნოთ, რომ ვილონის კონცენტრაციის შემცირებისას გამოვლინდა ამ პრეპარატის აქტივობის რამდენიმე მაქსიმუმი მაგ. 1 დღიან ვირთაგვების ექსპლანტანტზე ეფექტური მოქმედება ვლინდება როდესაც კონცენტრაცია არის $1{,}8x10^{-11}$M - $3{,}6x10^{-11}$M. იმ შემთხვევაშიც კი როცა კონცენტრაცია იყო $1{,}8x10^{-12}$M ეფექტურად მოქმედება 21 და 24 დღიან ვირთაგვებზე. შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ ვილონის ულტრამცირე კონცენტრაციები იწვევენ აპოპტოზურ პროცესებს ლიმფოიდურ ქსოვილში ყველა ასაკობრივი ჯგუფისთვის (Бахтизина и др. 1991., Беседнова, 1999., Беспалов и др. 1984). ვილონის ზემცირე კონცენტრაციების ზემოქმედებისას ლიმფოიდურ ქსოვილზე მტკიცდება ვილონის ულტრამცირე დოზების მასტიმულირებელი ზემოქმედება (Быков 2003).

შესწავლილ იქნა ვილონის ზემოქმედებით გამოწვეული ჰუმორალური იმუნური პასუხი იმ თაგვებისათვის, რომლებიც იმუნიზირებულ იყვნენ ცხვრის ერითროციტებით. დადგინდა, რომ 100მკგ/კგ დოზის გამოყენებისას, პრეპარატი ასტიმულირებს ცხოველების ელენთაში ანტისხეულების წარმომქმნელი უჯრედების გამომუშავებას (Казакова и др. 1996).

ვილონის შეყვანისას ვირთაგვების თიმუსში ადგილი ჰქონდა შემაერთებელი ქსოვილის უჯრედების რაოდენობის ზრდას.

კომპუტერული ანალიზის საფუძველზე დადგინდა, რომ ვილონი T-ლიმფოციტების ციტოპლაზმაში მნიშვნელოვნად არ მოქმედებს ბიოსინთეთიკურ პროცესებზე, მაშინ როცა დამაჯერებლად აძლიერებს უჯრედების პროლიფერაციულ აქტივობას.

ვილონი შეყავდათ იმ ვირთაგვებში, რომლებიც წინასწარ განიცდიდნენ ფრაქციონირებულ 5-ჯერად გამა-დასხივებას. იმუნური და ენდოკრინოლოგიური ფუნქციონალურ – მორფოლოგიური გამოკვლევების საფუძველზე დადგინდა, რომ ვილონი იწვევს რეპარაციული პროცესების სტიმულირებას დასხივებულ ორგანიზმში. დადგენილია ისიც, რომ იგი მოქმედებდა თიმუსის სტრუკტურულ – ფუნქციონალურ ორგანიზაციაზე, რაც გამოიხატებოდა იმაში, რომ სწრაფად აღდგებოდა სისხლძარღვთა კედლები და ხდებოდა შემაერთებელი ქსოვილის უჯრედების, T ლიმფოციტების და მარცვლოვანი ლეიკოციტების დაგროვება.

ირკვევა, რომ ვილონს შეუძლია მოდულირებელი ზემოქმედება აწარმოოს ენდოკრინულ სისტემაზე, იგი ანიველირებს სტრუქტურულ-მეტაბოლური მაჩვენებლების ფაზურ რხევას და აღადგენს მიკროცირკულაციისა და ჰემოდინამიკის დარღვევებს, რომელიც გამოწვეულია იონიზირებული დასხივების შედეგად (Морозов.. Хавинсон., Манилин. 2000).

2.4. პეპტიდების მოქმედების კლინიკური შესწავლა

ორგანიზმის მნიშვნელოვანი ჰომეოსტატიური ფუნქციის რეგულაციისათვის და ამ მოქმედების მექანიზმების შესასწავლად ბიომარეგულირებელი თერაპია ერთ-ერთი პრიოპიტეტულია თანამედროვე ბიოლოგიასა და მედიცინაში.

ამ სამკურნალო პრეპარატების გამოყენებისთვის აუცილებელია მათი მოქმედების მექანიზმების შესწავლა, როგორც უჯრედულ, ისე მოლეკულურ დონეზე. ამისათვის საკმაოდ კარგ მოდელს წარმოადგენს მათი ზემოქმედების შესწავლა სტრუქტურული და ფუნქციონალური ჰომეოსტაზისას უჯრედულ კულტურაში. სხვადასხვა პეპტიდების ბიოლოგიური აქტივობის ტესტირებისათვის გამოიყენება ორგანოსპეციფიური ქსოვილის კულტურა (Калюнов 1986., Чалисова, Журавский, Пеннияйнен и др. 1999., Чалисова, Хавинсон 1999., Levi-Montalchini 1982). თუ მთლიან ორგანიზმში არ არსებობს ნერვული, ჰუმორალური და სხვა სახის ზემოქმედება, შეიძლება შევქმნათ ზუსტი დოზირების პირობები ზემოთ აღნიშნული პეპტიდებისთვის. უჯრედშორის ურთიერთქმედების ანალიზის გარეშე, საკმაოდ რთულია პეპტიდების როლის დადგენა უჯრედული პოპულაციის რეგულაციისას. ამ ამოცანის ამოხსნაში დაგვეხმარება კომპლექსური მორფოფუნქციონალური ანალიზი, რომელსაც შეუძლია ობიექტურად შეისწავლოს უჯრედული პათოლოგიები და

ქსოვილის რეგენერაცია. პროლიფერაციული აქტივობის და უჯრედის კვდომის ვარიფიცირება. გარდა ამისა შეიძლება შევაფასოთ უჯრედული სტრუქტურების და უჯრედშორისი კომუნიკაციების მოქმედება. (Хавинсон 2001., Хавинсон, Малинин и др. 2002., Хавинсон, Чалисова и др. 1999., Хавинсон, Окулов и др. 1998., Чалисова, Григорьев и др. 1999)

ზოგიერთი პეპტიდური პრეპარატები გამოიყენება კლინიკაში მწვავე და ქრონიკული დაავადებების სამკურნალოდ, აგრეთვე იმუნური სისტემის დარღვევისას გერიატრიულ პრაქტიკაში (Хавинсон 1996., Хавинсон и др. 1985., Хавинсон, Морозов, Кузник 1985., Morozov, Khavinson 1997).

ვილონის თერაპიული ეფექტები შეფასებული იქნა იმ პაციენტებში, რომელთაც ღვიძლის დაავადებები და სტომატოლოგიური ანთებები აღენიშნებოდათ. გამოკვლეულნი იყვნენ აგრეთე ოფთალმოლოგიური პაციენტები

ქრონიკული ჰეპატიტითა (23) და ღვიძლის ციროზით (9) დაავადებულ პაციენტებში ინექციის სახით კუნთში შეყვანილი იყო ვილონი 10მგ დოზით 5-10 დღის განმავლობაში. ასეთი დამუშავების შედეგად პაციენტებმა აჩვენეს სისხლის პლაზმის ფიბრონექცინის მომატება და გაუმჯობესებული ლაბორატორიული ღვიძლის ტესტი. (Morozov, Khavinson, Malinin 2000).

კორტექსინის თერაპიული მოქმედება შეწავლილი იქნა 36-48წლის პაციენტებში (52 კაცი, 24 ქალი) რომლებიც შერჩეული იყვნენ განურჩევლად სქესისა, ასაკისა და დაავადებებისა (ჰიპერტონია, ათეროსკლეროზი, ტრამვის შემდგომი გართულებები). მათ მკურნალობა უტარდებოდათ 15 დღის განმავლობაში დღეში ერჯერ 10 მგ დოზით. კორტექსინის მოქმედების ეფექტი აღინიშნებოდა მკურნალობის დაწყებიდან მე-3 მე-4 დღეს და ეფექტიანობა გრძელდებოდა კურსის დამთავრებიდან 3-5 კვირის განმავლობაში, ზოგიერთ შემთხვევაში უფრო ხანგრძლივადაც. (Khavinson, Morozov at.al. 1999)

საერთო პარადანტოზის მქონე პაციენტებში ვილონი შეყვანილ იქნა 10მგ დოზით ყოველდღიურად 3-6 დღის განმავლობაში პირის ღრუში. პაციენტების 80%-ს გაუუმჯობესა მდგომარეობა, შეამცირა ქავილი და ტკივილი 100%- ით, სისხლდენა პირის ღრუში - 71%-ში, 66,7%-ში გაუმჯობესდა ღრძილების ფერი და სიმკვრივე. გააუმჯობესა იმუნიტეტი, შეაჩერა სისხლის დენა ძირითადად იმ პაციენტებში, რომელთაც რბილი და საშუალო პარადანტოზი აღენიშნებოდათ. ვილონით დამუშავებიდან 8-10 თვის შემდეგ რბილ პარადანტოზიანმა პაციენტებმა არ აჩვენეს ავადმყოფობის გამწვავება და არ განუცდიათ რაიმე არასასიამოვნო შეგრძნება ღრძილებში. რენტგენის სხივებით შემოწმებამ აჩვენა ოსტეიპოროზისა (დეკალცინაცია) და ძვლის შემდგომი დაშლის შემცირება. რიგმა პაციენტებმა აჩვენეს ღრძილებს

შუა ძვლის აღდგენა 1-2 მმ-ით და უკეთესი სურათი ამ ადგილებზე (Morozov, Khavinson, Malinin 2000).

რეტინალამინი წარმატებით გამოიყენება ოფთალმოლოგიაში. მისი მოქმედების ეფექტურობა დადასტურებულია სხვადასხვა ოფთალმოლოგიური მეთოდების საშუალებით. პაციენტებში, რომელთაც აღენიშნებოდათ თვალის ბადურის ცენტრალური სისხლძარღვის თრომბოზი, იგი ხელს უწყობდა საცრემლე ჯირკვლის ფიბრინოლიტიკური ფერმენტების აქტივობის ნორმალიზებას, ამცირებდა ბადურის სისხლჩაქცევებს და შეშუპებებს, რის შდეგადაც უმჯობესდებოდა მხედველობა. დიაბეტით გამოწვეულ რეთინოპათიის შემთხვევაში პაციენტების 72%-ში მისი მოქმედების შედეგად აღინიშნებოდა მხედველობის გაუმჯობესება. მისი მოქმედება ეფექტური იყო ყველა სახის დიაბეტის შემთხვევაში. თვალის ბადურის დისტროფიის მქონე 250-ზე მეტ პაციენტში მისმა გამოყენებამ შესაძლებელი გახადა მხედველობის გაუმჯობესება, მხედველობის ველის გაფართოება, გაძლიერდა სინათლისა და ფერის აღქმის უნარი, გაუმჯობესდა ელექტროფიზიოლოგიური პარამეტრები. ამ შედეგებს აძლიერებდა კურნალობის განმეორებითი კურსი. გარდა ამისა იგი ხელს უწყობს იმუნური სისტემის გაძლიერებას და B-ლიმფოციტების რიცხვის შემცირებას (Khavinson, Trofimova, 1999., 2001).

პაციენტებში, რომლებიც დაავადებულნი იყვნენ ოდონტოგენური ანთრიტით (ცხვირის ღრუს დაავადება), რომელიც მოიცავს ზედა ყბის

პერფორაციას, ვილონის კუნთქვეშა ინექციებმა 10მგ დოზით ხელი შეუწყო იმუნიტეტის ნორმალიზაციას, დააჩქარა ეპითელიზაცია 4-6 დღეში და 30% შემთხვევაში დაეხმარა ქირურგიული ჩარევის აუცილებლობაში. შემდგომმა რენტგენოსკოპიურმა და კლინიკურმა შემოწმებამ ვერ გამოავლინა ანტრიტის სიმპტომები და გართულებები (Morozov, Khavinson, Malinin 2000).

მიკროქირურგიაში რეტინალამინის, თიმალინისა და კორტექსინის კომპლექსურად გამოყენებამ პაციენტების 65%- ში გააძლიერა მხედველობითი ფუნქცია. ციტომედინების მოქმედებამ (რეტინალამინი 5 მგ, ეპიტალონი-კორტექსინი 10 მგ) ისულინის თერაპიასთან ერთად დიაბეტით დაავადებული პაციენტების 89%-ში გააუმჯობესა მხედველობა, პაციენტების 11%-ში კი მდგომარეობა არ გაუარესებულა. პეპტიდების მოქმედებამ ხელი შეუწყო მხედველობის ველის გაფართოებას, ჩაქცევებისა და შეშუპებების შემცირებას, იმუნური პარამეტრების ნორმალიზებას, სისხლში შაქრის, ქოლესტერინისა და ჰემოგლობინის შემცველობის შენარჩუნებას (Khavinson, Trofimova 1999).

დადგენილია, რომ ვილონი *in vitro* საგრძნობლად აძლიერებდა რეცეპტორების ექსპრესიას T და B ლიმფოციტებში. ლიმფოციტები გამოყოფილი იყო მეორადი იმუნოდეფიციტით დაავადებული ავადმყოფების სისხლიდან (Морозов.. Хавинсон., Манилин. 2000).

ონკოლოგიურ პაციენტებში ეპიტალამინის გამოყენებამ ხელი შეუწყო უჯრედული იმუნიტეტის და ფაგოციტოზის აღდგენას, რამაც

მნიშვნელოვნად შეამცირა რეციდივებისა და მეტასტაზირების სიხშირე საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით(Слерушкин и др.1990.,Хавинсон и Морозов 2001., Владимирова 2002).

ვილონი იყო გამოყენებული სხვა თერაპიულ საშუალებებთან ერთად მწვავე და ქრონიკული სანერწყვე ჯირკვლის ანთების სამკურნალოდ. მან ხელი შეუწყო პაციენტების საერთო მდგომარეობის ნორმალიზებას, ჩააქრო სანერწყვე ჯირკვლის ანთება, გააუმჯობესა სანერწყვე ჯირკვლის სეკრეცია და აღადგინა სისხლის T-ლიმფოციტების მაჩვენებლები. მკურნალობის ჩატარებიდან ერთი წლის შემდეგ პათოლოგიური ცვლილებები სანერწყვე ჯირკვლებში არ იყო დამზერილი. ნერწყვის ციტოლოგიურმა ტესტების შედეგებმა უშუალოდ მკურნალობის ჩატარებისას და მკურნალობიდან ერთი წლის შემდეგ აჩვენა დადებითი შედეგი (Morozov at. al. 2000).

ასაკოვან პაციენტებზე ეპიტალამინის შეწავლამ აჩვენა სრული ნორმალიზება ორგანიზმის ანტიოქსიდანტური სისტემებისა, რომელთა

აქტივობის პროგრესულ დაქვეითებას ადგილი აქვს ხანდაზმულობასთან ერთად (Хавинсон и др. 1999., Хавинсон и Морозов 2001.,2002)

ოფთალმოლოგიურ პაციენტებში, რომელთაც აღენიშნებოდათ მეზოდერმალური დისტროფია, თანდაყოლილი რქოვანას ანომალიები (კერატოკონუსი და კერატოგლობუსი), მექანიკური, ბაქტერიული და ვირუსული კერატიტები — ვილონი იყო გამოყენებული, როგორც

ჩასაწვეთებელი საშუალება თვალის კონუნქტივიალურ ღრუში. პერიოდი ჭრილობის შეხორცებისათვის შემცირდა ორჯერ უფრო მეტად იმ პაციენტებთან შედარებით ვინც ტრადიციული მეთოდებით იყენენ ნამკურნალევი.

მემკვიდრეობითი და თანდაყოლილი ავადმყოფობის მქონე პაციენტებში ვილონის გამოყენებამ გაახანგრძლივა რემისიის პერიოდები და 70% შემთხვევაში აჩვენა ავადმყოფობის განვითარების ვარდნა.

ვილონის ხანგრძლივმა გამოყენებამ ფილტვის ჭლექით დაავადებულ 18 პაციენტზე დააჩქარა კავერნის განკურვნა და გააუმჯობესა იმუნიტეტი (Morozov, Khavinson, Malinin 2000).

თვალის ბადურიდან გამოყოფილმა რეტინალამინმა გამოიწვია თერაპიული ზემოქმედება ბადურის ტოქსიკური შეშუპებისას. რეტინალამინი ისე როგორც სხვა ციტომედინები ზრდიან რეცეპტორების სიმკვრივეს T და B ლიმფოციტებში. აგრეთვე ზრდიან ნეიტროფილების ფაგოციტარულ აქტივობას და სტიმულირებას უკეთებენ კომპლემენტარული სისტემის აქტივობას (Харинцева, 1996)

ობსტრუქციული ბრონქიტით დაავადებულ 28 ხანდაზმულ პაციენტში ვილონის ყოველდღიურმა ინექციებმა 10მგ დოზით დღეში ერთჯერ 5-10 დღის განმავლობაში ხელი შეუწყო ბრონქოსპაზმების სიხშირის შემცირებას, დარეგულირდა სხეულის ტემპერატურა, პაციენტებს გაუუმჯობესდათ მადა და საერთო მდგომარეობა,

გაიზარდა სისხლის ლიმფოციტების რიცხვი და ლეიკოციტების ფაგოციტური აქტივობა.

ვილონის მოქმედების ეფექტი შეფასებული იყო 89 ონკოლოგიურ პაციენტთა ჯგუფზე სხივური თერაპიის ჩატარების შემდეგ. (26 ფილტვისა და 32 მკერდის კიბო, 31 ლიმფოგრანულომატოზის შემთხვევა). სხივური თერაპიის შედეგად პაციენტებმა გამოავლინეს იმუნოლოგიური პარამეტრების დოზაზე დამოკიდებული დაქვეითება. ამის შემდეგ ვილონი იყო შეყვანილი კუნთქვეშ 10 დღის განმავლობაში 1მგ დოზით. ათი დღის შემდეგ პროცედურა იქნა გამეორებული. ვილონით დამუშავებულ პაციენტთა უმრავლესობამ გამოავლინა იმუნოლოგიური პარამეტრების გაუმჯობესება და პოსტრადიაციული შემთხვევები შემცირდა 1,8-ჯერ (Morozov, Khavinson, Malinin 2000).

ცხრილი: ვილონის ეფექტი იმუნოლოგიურ პარამეტრებზე რადიაციული თერაპიის შემდეგ ონკოლოგიურ პაციენტებში

პარამეტრები	რადიაციულ თერაპიამდე	რადიაციული თერაპიის შემდეგ	ვილონის შემდეგ
ლიმფოციტების რიცხვი, $\times 10^9$/I	1.61±0.18	0.79±0.09*	1.72±0.21**
T-ლიმფოციტების რიცხვი, $\times 10^9$/I	0.83±0.07	0.32±0.03*	0.92±0.21**
CD4+უჯრედების რაოდენობა, $\times 10^9$/I	0.30±0.03	0.12±0.01*	0.39±0.04**
CD8+უჯრედების რაოდენობა, $\times 10^9$/I	0.28±0.04	0.16±0.02*	0.21±0.03**
B-ლიმფოციტების რიცხვი, $\times 10^9$/I	0.15±0.02	0.11±0.01*	0.14±0.02**
LMI ConA-ით, %	68.3±4.0	85.5±5.6*	71.8±4.1**
ნეუტროფილების ფაგოციტების ინდექსი	4.32±0.29	2.06±0.18*	3.66±0.23**

ექსპერიმენტული შედეგები მიუთითებს იმ პერსპექტივაზე, რომ ასეთი სინთეზური და კომპლექსური პეპტიდების გამოყენება ასაკთან

დაკავშირებული ორგანოების და ქსოვილების პათოლოგიის მკურნალობის საშუალებას იძლევა (Быков Н. М. 2003).

3. კვლევის მასალა და მეთოდები

წარმოდგენილ ნაშრომზე მუშაობა ერთობლივად ხორციელდებოდა თ.ს.უ. გენეტიკის კათედრისა (ვაწარმოებდით უჯრედების კულტივირებას) და ე.ანდრონოკაშვილის ფიზიკის ინსტიტუტის ბაზაზე, სადაც დ.ს.მ. მეთოდით ხდებოდა ქრომატინის კონდენსაციის ხარისხისა და დნმ-ის თერმოდინამიკური პარამეტრების განსაზღვრა.

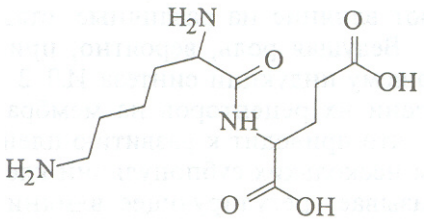
3.1. საკვლევი აგენტების დახასიათება

ადამიანის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტები, რომლებიც სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების მნიშვნელოვან ნაწილს წარმოადგენენ, კულტივირების დროს თითქმის არ იცვლებიან, მორფოლოგიურად ინტაქტურები არიან. მასტიმულირებელი ნივთიერების დამატება კი იწვევს მათ ტრანსფორმაციას, ჩნდება დიდი, აქტიური უჯრედები მსხვილი ბირთვებით და შესამჩნევი ბირთვაკებით. ლიტერატურაში ასეთი დიდი, აქტიური უჯრედები მოიხსენიება სახადასხვა სახელწოდებით: ბლასტური, ტრანსფორმირებული, სტიმულირებული (Линг, 1971). უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობასა და რეაქტიულობაზე (***in vitro***) შეიძლება გავლენა იქონიოს სახადასხვა ფაქტორებმა: PH_1CO_2, ტემპერეტურა, კულტურალური არე, მასტიმულირებელი ნივთიერება(ფჰა). ზუსტი აღწერა იმ პროცესებისა,

რომლებიც ფჰა-თი სტიმულირებულ კულტურაში მიმდინარეობს, მოცემული იყო Joffey-ის და სხვათა მიერ (1965 წ). უნდა აღინიშნოს, რომ ლიმფოციტების სტიმულაცია ასინქრონულად მიმდინარეობს და შესაძლებელია, სტიმულატორი ასრულებდეს "ბიძგის" როლს.

სინთეზური პეპტიდებით ჩვენი დაინტერესება გამოიწვია ლიტერატურაში არსებულმა მონაცემებმა მათი ბიოლოგიური აქტივობის ფართო სპექტრის შესახებ.

ერთ-ერთი ასეთი სინთეზური ბიორეგულატორი არის დიპეპტიდი ვილონი (Lys-Glu), რომელიც იწვევს ზოგიერთ მეტაბოლურ ცვლილებას ქრომატინის დომენში გენის აქტივაციის საშუალებით (Lezhava at. Al. 2004). იგი მიღებულია პირდაპირი ქიმიური სინთეზით თიმუსის კომპლექსური პრეპარატის თიმალინის ამინომჟაური ანალიზის საფუძველზე (Khavinson V. 2002).



სურ. 1 ვილონის სტრუქტურული ფორმულა (მოლეკულური მასა 275.30)

თიმოგენისგან განსხვავებით, ვილონი შეიცავს ლიზინის ყველაზე ჰიდროფილური ამინომჟავის ნაშთს. ვილონის და თიმოგენის ქიმიური თვისებები განსაზღვრავს მათ მდგრადობას წყალხსნარებში პრეპარატის ხანგრძლივი შენახვისას. დადგენილია, რომ თიმოგენი (0.01%

კონცენტრაციისას) ნაკლებად მდგრადია ვიდრე ვილონი, ეს გამოწვეულია იმით, რომ თიმოგენში არსებული ტრიფტოფანის ნაშთი განიცდის დესტრუტუზაციას (Morozov., Khavinson. 1997., Киселева и др., 1999).

პრეპარატი პროსტომაქსი სინთეზური ტეტრაპეპტიდია (H-Lys-Glu-Asp-Pro-OH). ის წყალში ხსნადი თხევადი ნივთიერებაა. პროსტომაქსი ახალი თაობის სამკურნალო საშუალებაა და გამოიყენება გერიატრიაში, როგორც ქსოვილსპეციფიური პროტექტორი, უჯრედული ჰომეოსტაზის რეგულატორი.

კლევის პროცესში ჩვენს მიერ გამოყენებული იყო:

1. უჯრედების კულტივირების მეთოდი (Moorhead et. al. 1960)
2. დიფერენციალური სკანირებადი მიკროკალორიმეტრიის მეთოდი

კვლევის ობიექტად ვიყენებდით სინთეზურ პოლიმერს poly[d(A-T)d(A-T)] –ს, რომელიც წარმოდგენილია მხოლოდ (A-T) ფუძეთა წყვილით, თიმუსის დნმ-სა და 70-76 წლის შედარებით ჯანმრთელი დონორების პერიფერიული სისხლის ბლასტტრანსფორმირებულ მცირე ლიმფოციტების კულტურებს.

3.2 უჯრედების კულტივირების მეთოდი

შეწავლილი იქნა 10 მოხუცი დონორის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტების ქრომატინის კონფორმაციული ცვალებადობა. უჯრედების კულტივირება ხდებოდა სტანდარტული მეთოდით.

წინასწარ ვამზადებდით ჰეპარინიან სტერილურ სინჯარებს (სტერილურ სინჯარაში ვასხამდით ჰეპარინის 1მლ-ს). სისხლის აღება ხდებოდა მკლავის ვენიდან 10-15 მლ-ის ოდენობით. კულტურის დადგმამდე სისხლს 2-3 საათით ვტოვებდით ოთახის ტემპერატურაზე ლიმფოციტებით მდიდარი პლაზმის მისაღებად. მიტოგენად ვიყენებდით ფიტოჰემაგლუტინინს (Sigma-p) 0,01 მლ კონცენტრაციით 4 მლ კულტურალურ ნარევზე (კულტურალური ნარევი შეიცავდა 1მლ პლაზმას, 3 მლ არეს - РПМ I 1640), რომელსაც დადგმისთანავე ვამატებდით კულტურებს და ვდგავდით თერმოსტატში 37^0 C-ზე.

ამის შემდეგ დ.ს.მ. მეთოდით წარმოებდა ქრომატინის კონდენსაციის გრაფიკული გამოსახვა სითბოტევადობის მრუდით და საკვლევი აგენტების მოქმედებისას მიღებულ შედეგებს ვადარებდით იმავე ინდივიდის ინტაქტურ უჯრედებთან.

3.3. კალორიმეტრია, როგორც ბიომაკრომოლეკულების და მათი *in situ* კომპლექსების თერმოდინამიკური პარამეტრების განსაზღვრის ერთ-ერთი წამყვანი მეთოდი

ცილების და ნუკლეინის მჟავების შიდამოლეკულური დნობის პროცესის თერმოდინამიკური სიდიდეების ექსპერიმენტალური განსაზღვრის ამოცანა, გადაწყვეტილ იქნა 1964-1970 წლებში ე.ანდრონიკაშვილის ფიზიკის ინსტიტუტში შექმნილი ახალი სკანირებადი მიკროკალორიმეტრის საშუალებით, რომლის მგრძნობიარობა 3 რიგით აღემატებოდა სხვა იმ დროს არსებული დანადგარების მგრძნობიარობას (Привалов, Монаселидзе и др. 1964). დიფერენციალური სკანირებადი მიკროკალორიმეტრის ახალი მოდელი განკუთვნილია მოლეკულური ბიოფიზიკის და მედიკო-ბიოლოგიური კვლევებისათვის. მოცემული დანადგარი საშუალებას გვაძლევს შევისწავლოთ, როგორც ცილებისა და ნუკლეინის მჟავების განზავებული ხსნარების, ასევე უჯრედების და ქსოვილების სითბური თვისებები. აღნიშნული მეთოდის ბაზაზე შემდგომში შეიქმნა მთელი რიგი მსგავსი დანადგარებისა (Gill and Beck,. 1965.,Привалов, Плотников, 1974) რომლებიც წარმატებით გამოიყენებიან მოლეკულური ბიოფიზიკის სფეროში (Boguslaw at. Al. 1999). უკანასკნელ წლებში მიკროკალორიმეტრიის მეთოდი დახვეწილ იქნა ჯ. მონასელიძის და ნ. ბაქრაძის მიერ, რამაც შესაძლებელი გახადა ბიოპოლიმერების, როგორც

განზავებული და კონცენტრირებული ხსნარების, ასევე რთული ბიოლოგიური სისტემების სითბური თვისებების განსაზღვრა ფართო ტემპერატურულ ინტერვალში.

კალორიმეტრი მოთავსებულია სპეციალურ სქელკედლიან სითბოგაუმტარ ცილინდრში, იგი ემსახურება ექსპერიმენტის დროს კალორიმეტრზე გარემოს მიერ სითბური შეშფოთებების შემცირებას. სისტემის მაღალი ადიაბატურობა მიღწეულია სითბური ეკრანების ტემპერატურის ზუსტი რეგულირებით. ორ ეკრანს შორის ტემპერატურული სხვაობის გასაზომად გამოიყენება მანგანინ-კონსტანტანის თერმობატარეა, რომელიც მიერთებულია მაღალმგრძნობიარე ხელსაწყოსთან (მიკროვოლტმეტრთან -136). ტემპერატურის რეგულაცია წარმოებს ელექტრული ავტომატური სისტემით, რომელიც ინარჩუნებს ეკრანებს შორის ტემპერატურულ სხვაობას 5×10^{-4} სიზუსტით ტემპერატურის მთელ ინტერვალში. ეკრანსა და ამპულებს შორის ტემპერატურული სხვაობის წარმოქმნისას თერმობატარეიის ბოლოებზე აღიძვრება სიგნალი, რომელიც ძლიერდება ელექტრონული (-136) გამაძლიერებლით და მიეწოდება პროპორციონალურ ინტეგრალურ რეგულატორს. ხოლო რეგულატორი მიაწვდის გამახურებელს სიგნალის პროპორციულ დენს.

მიკროკალორიმეტრის მთავარი ბლოკი, კონტეინერი წარმოადგენს ორ ღრუ სპილენძის ცილინდრს, რომელთა შორის გაწებებულია ქრომელ-კონსტანტანის თერმობატარეა (100 წყვ.) ცილინდრების

სიღრუეს აქვს წაკვეთილი კონუსის ფორმა, იგი აუმჯობესებს ცილინდრსა და მასში მოთავსებულ ამპულას შორის სითბურ კონტაქტს. ცილინდრზე გარედან დახვეულია გამახურებელი რომლის წინაღობაა 760 ომი.

გარემოსთან სითბოცვლის გამოსარიცხად, დიფერენციალური კონტეინერები გარშემორტყმულია ადიაბატური ეკრანების სისტემით, რომელიც შედგება ინერტული და რეგულირებადი ეკრანებისაგან. კონტეინერები ერთმანეთთან დაშორებულია 8მმ-ით. კალორიმეტრულ კონტეინერებში ჩარჩილულია თხელკედლიანი, უჟანგავი ფოლადის მილები, რომელებიც განკუთვნილია გამზომი და ეტალონური ამპულის ჩასატვირთად. კალორიმეტრული ამპულები მოთავსებულია ინერტულ სითბურ ეკრანში, რომელიც განკუთვნილია რეგულირებადი ეკრანისაგან წარმოქმნილი სითბური ველის გრადიენტის შესამცირებლად. გარემოს გავლენა ეკრანზე გამოირიცხება რეგულირებად ეკრანებს შორის მუდმივი და მცირე ტემპერატურული გრადიენტის შენარჩუნებით გაზომვის მთელ ტემპერატურულ ინტერვალში. უჟანგავი მილებიდან კონტეინერში იტვირთება საზომი ამპულები, რომლებიც დამზადებულია ტიტანისაგან და აქვთ წაკვეთილი კონუსის ფორმა, დიამეტრი-7.8 მმ. მოცულობა 0.3 სმ^3 (სურ. 2).

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

მოდელებისაგან განსხვავებით გაცილებით აადვილებს მკვლევარის კალორიმეტრთან მუშაობას (Бакрадзе и Монаселидзе 1971., Монаселидзе и Бакрадзе 1973., Majagaladze at. al. 1986.,). საკვლევი ნიმუშის და ეტალონის უწყვეტი და თანაბარი გახურებისას ხორციელდება ორ იდენტურ კონტეინერს შორის წარმოქმნილი თერმო ე.მ.ძ.-ის რეგისტრაცია. იგი ტემპერატურული სხვაობის პროპორციულია, ხოლო ეს უკანასკნელი კი პროპორციულია ნიმუშის სითბოტევადობის ცვლილებისა. ამპულებს შორის სითბური უკუკავშირი ხორციელდება კონტეინერებს შორის გაწებებული დიფერენციული თერმობატარეაში გამავალი სითბური ნაკადით.

ხელსაწყოს მაქსიმალური მგრძნობიარობის და გახურების მუდმივი სიჩქარის მისაღებად, დიფერენციალური ამპულა სრულებით იზოლირებულია გარემოსაგან. სითბური ეფექტების აღრიცხვა წარმოებს ქრომელ-კონსტანტანის თერმოწყვილების ბატარეის საშუალებით. სამუშაო მოცულობა აღნიშნულ სისტემაში 0.3 სმ^3-ია. დიფერენციალურ ამპულებს შორის თერმოწყვილების საშუალებით განხორციელებული უკუკავშირი განაპირობებს კალორიმეტრის სტაბილურ მუშაობას ხანგრძლივი დროის განმავლობაში 10^{-7} ვტ მგრძნობიარობით. აღნიშნულ თერმორეგისტრატორში წარმოიქმნება თერმო ე.მ.ძ. დაახლოებით 6000 მკვ-ის სიდიდის $\Delta T=1^0C$-ზე, რომელიც ძლიერდება მიკროვოლტნანოამპერმეტრით და ჩაიწერება თვითმწერზე. ამგვარად, გაზომვისას ავტომატურად მიიღება მრუდი, რომელიც ასახავს სითბოს

შთანთქმას (გამოყოფას) (ΔT, დრო) კოორდინატებში. აბსოლიტური ტემპერატურის განსაზღვრა ხდება პლატინის თერმომეტრით. გაზომვის სიზუსტე 0.05 ^{0}C-ის რიგისაა, რაც სავსებით საკმარისია ბიოპოლიმერებისა და რთული ბიოლოგიური სისტემების სითბური დნობის პროცესის შესასწავლად. ტემპერატურის რეგულაციის სისტემა უზრუნველყოფს მიკროკალორიმეტრის სხვა და სხვა კვანძებს შორის ტემპერატურის სხვაობის შენარჩუნებას 10^{-3} K სიზუსტით 273 – 423 K ინტერვალში.

შთანთქმული (გამოყოფილი) სითბოს რაოდენობის განსაზღვრისათვის ხდება ხელსაწყოს დაკალიბრება. თუ ერთ-ერთ ამპულაში შევიყვანთ დამატებით ეტალონურ სიმძლავრეს, ამპულებს შორის წარმოიქმნება ტემპერატურული სხვაობა, რომელიც გაიზრდება მანამ, სანამ თერმორეგისტრატორის საშუალებით არ მოხდება სითბური ნაკადის კომპენსირება. შედეგად დამყარდება ახალი მუდმივი ტემპერატურული სხვაობა, რომელიც პროპორციულია მიწოდებული სიმძლავრის: ΔT~ΔW, რომელიც განსაზღვრავს თვითმწერის კალმის გადახრას h ბაზისური ხაზიდან. ΔW ითვლება შემდეგნაირად:

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

სადაც: U – დენის წყაროს ძაბვა.

R_a – ამპულის გამახურებლის წინაღობა.

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

ΔR – კალიბრებისას გარე წრედის წინაღობის ცვლილება.

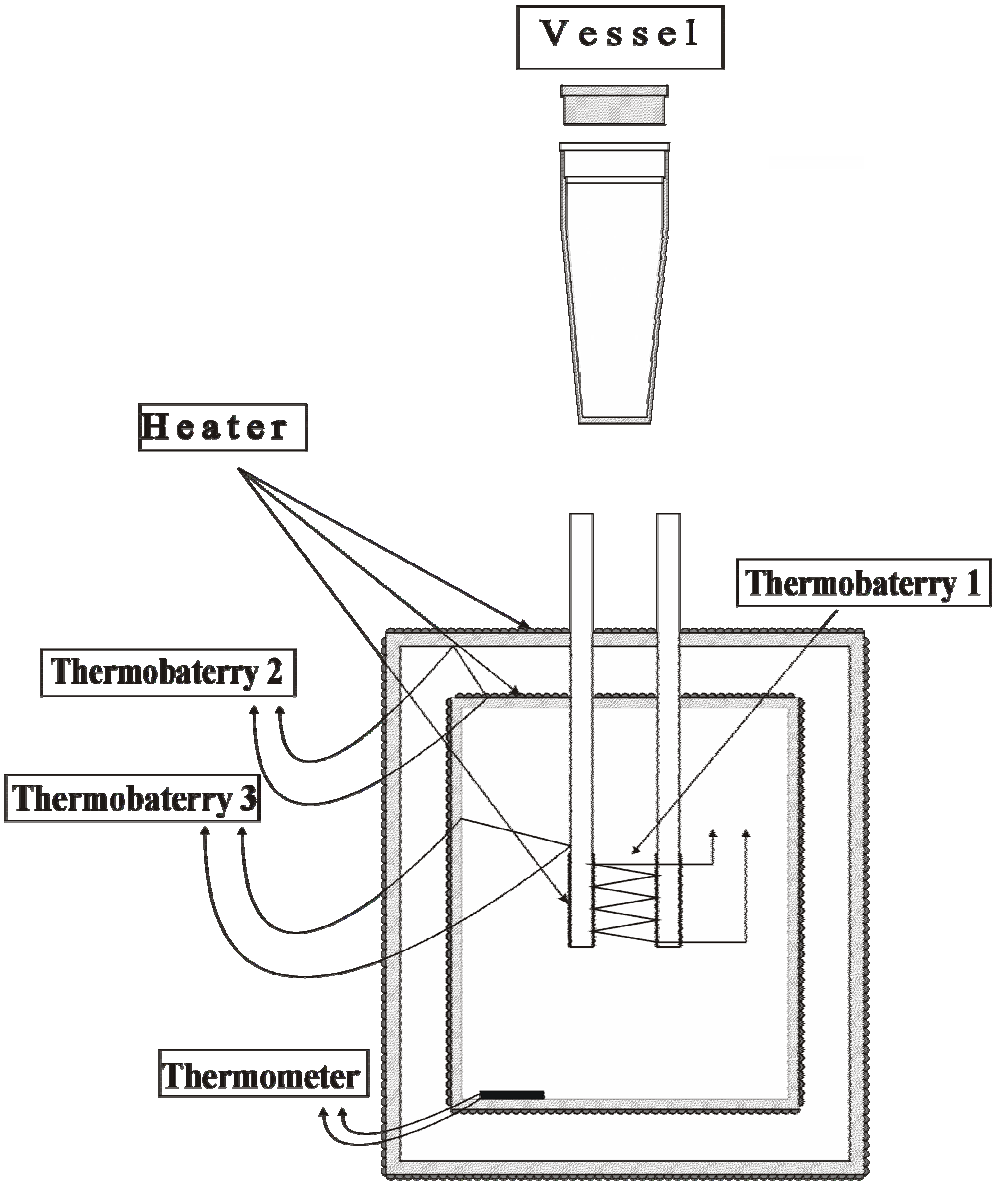
თუ ვიცით ΔW, h და თვითმწერის დიაგრამის მოძრაობის სიჩქარე, შეიძლება გამოვთვალოთ ფართობის ერთეულზე მოსული სითბოს რაოდენობა ფორმულით:

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

დიფერენციალურ მრუდზე ტემპერატურული ნიშნულების დასმის შემდეგ საშუალება გვეძლევა (ΔT; t) კოორდინატიდან გადავიდეთ (ΔT; T) კოორდინატებში. $(\frac{dQ}{dT}, T)$ კოორდინატებში გადასასვლელად აუცილებელი პირობაა dT/dt=const და მივიღებთ: $\frac{dQ}{dT} = \frac{1}{dT/dt}\frac{dQ}{dt}$. ამის შემდეგ უკვე მარტივია დენატურაციის კუთრი სითბოს განსაზღვრა ფორმულით: $Q = qS/M$, სადაც Q – სითბოს რაოდენობაა, რომელიც მოდის S ფართობზე (სითბოს შთანთქმის მრუდითა და ბაზისური ხაზით შემოსაზღვრული), M – საკვლევი ნიმუშის მასა.

გამზომი ბლოკი მიერთებულია PCI კომპიუტერთან (Pentium 3). რეგისტრაციის მაქსიმალური სიჩქარე შეადგენს 4 წერტ. წმ.-ში, გაზომვები ტარდებოდა გამოკითხვის სიჩქარით - 2 წერტ.წმ.-ში, სკანირების სიჩქარე შეგვიძლია ვცვალოთ 0.003 – 2 ^{0}C/წთ-ში

შუალედში. გაზომვის ტემპერატურული ინტერვალი – 0 – 150 ^{0}C-ია. ბაზისური ხაზიდან მინიმალური გადახრა სკანირების რეჟიმში 5 – 150 ^{0}C ინტერვალში არა უმეტეს 10^{-5} J/K. მრუდის პიველადი დამუშავება (ბაზისური ხაზის აპროქსიმაცია, მრუდის კალიბრება და ნორმირება) წარმოებს სპეციალურად შედგენილი პროგრამის საშუალებით, ხოლო დამუშავება (რთული მრუდის შემადგენელ კომპონენტებად დაყოფა, ცალკეული მაქსიმუმების გამოყოფა, მრუდის ინტეგრირება და გრაფიკის აგება) წარმოებს Origin 6.0 პროგრამის პაკეტის საშუალებით.



სურ. 2. დიფერენციული სკანირებადი მიკროკალორიმეტრის ბლოკ-სქემა.

4. გამოკვლევათა შედეგები და განსჯა

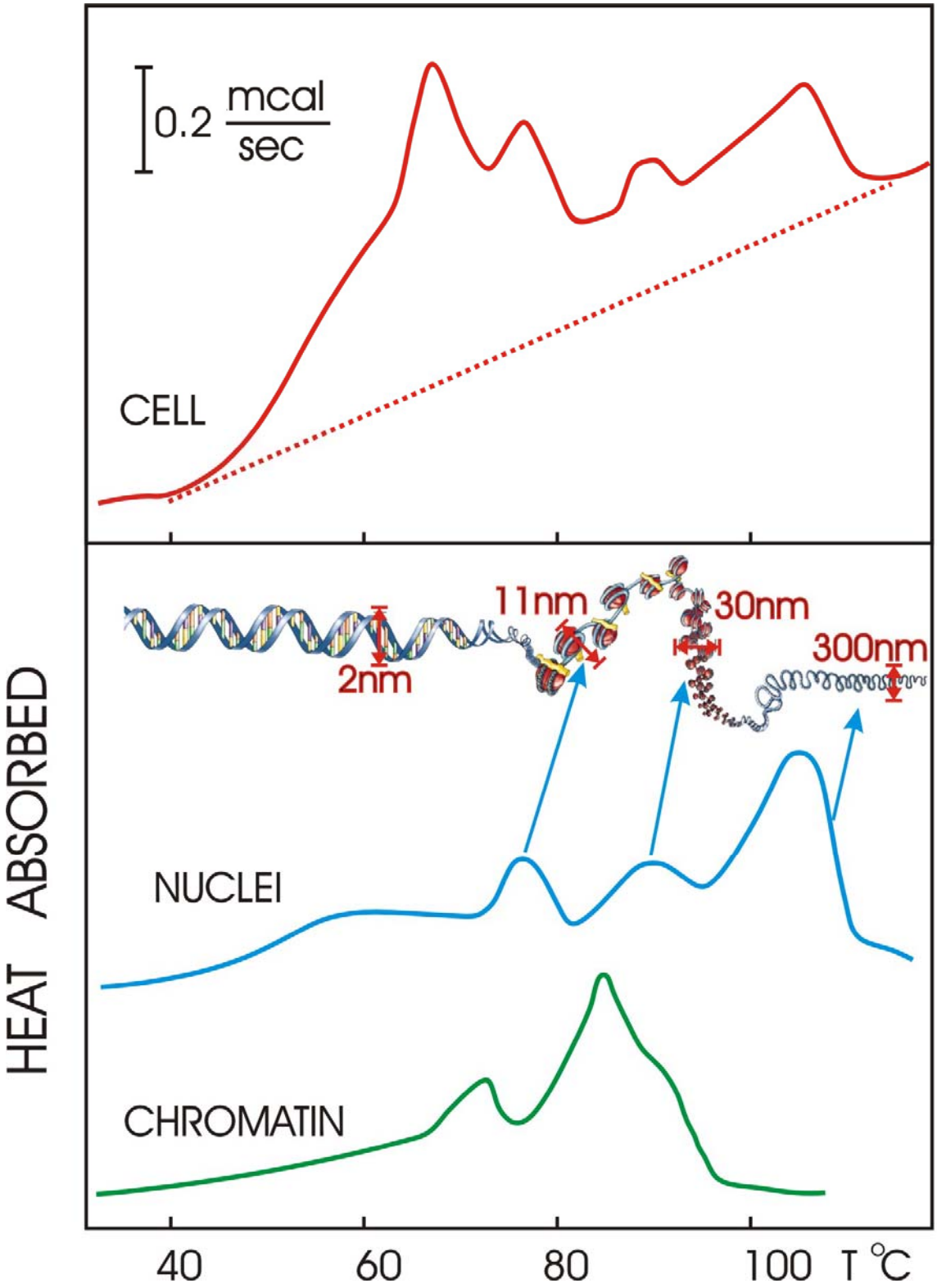
4.1 ბიორეგულატორი პეპტიდების პროსტომაქსისა და ვილონის გავლენა ციტოპლაზმატურ სტრუქტურებზე, ბირთვულ მატრიქსებსა და ქრომატინის თერმოდინამიკურ სტაბილურობაზე *in situ*

ამერიკელი მეცნიერების (Touchette N.A and Cole R.D 1985) თანახმად, HeLa-ს უჯრედების დენატურაცია მიმდინარეობს ტემპერატურულ ინტერვალში 40-110 ^{o}C, რომელიც ხასიათდება მკაფიოდ გამოხატული მხრით ტემპერატურულ ინტერვალში 45-70 ^{o}C და ოთხი სითბოშანთქმის პიკით: T_d = 65 ^{o}C; 78 ^{o}C; 84 ^{o}C; 107 ^{o}C; (სურ. 3). იმავე უჯრედიდან გამოყოფილი ბირთვის დენატურაცია კი ხასიათდება ნაკლებად ინტენსიური მხრით 45-70 ^{o}C და პიკებით 78 ^{o}C; 84 ^{o}C; 107 ^{o}C; მათი აზრით ეს მონაცემები პირდაპირ მიუთითებენ, რომ ბირთვის დენატურაციისას ინტენსიური პიკის გაქრობა კალორიმეტრულ მრუდზე 65 ^{o}C-ზე დაკავშირებულია ციტოპლაზმატური ცილების დენატურაციასთან. ბირთვიდან გამოყოფილი ქრომატინის დენატურაციის მრუდზე კი მკაფიოდ გამოსახული სითბოშთანთქმის გაქრობა ტემპერატურულ ინტერვალში 45-70 ^{o}C, რომელიც დაიმზირება ბირთვის დენატურაციის შემთხვევაში მიუთითებს მასზე, რომ ამ ტემპერატურულ ინტერვალში ციტოპლაზმატურ ცილებთან ერთად დენატუტაციას განიცდის ბირთვის მატრიქსი და არაჰისტონური ცილები. რაც შეეხება, ამავე მრუდზე –

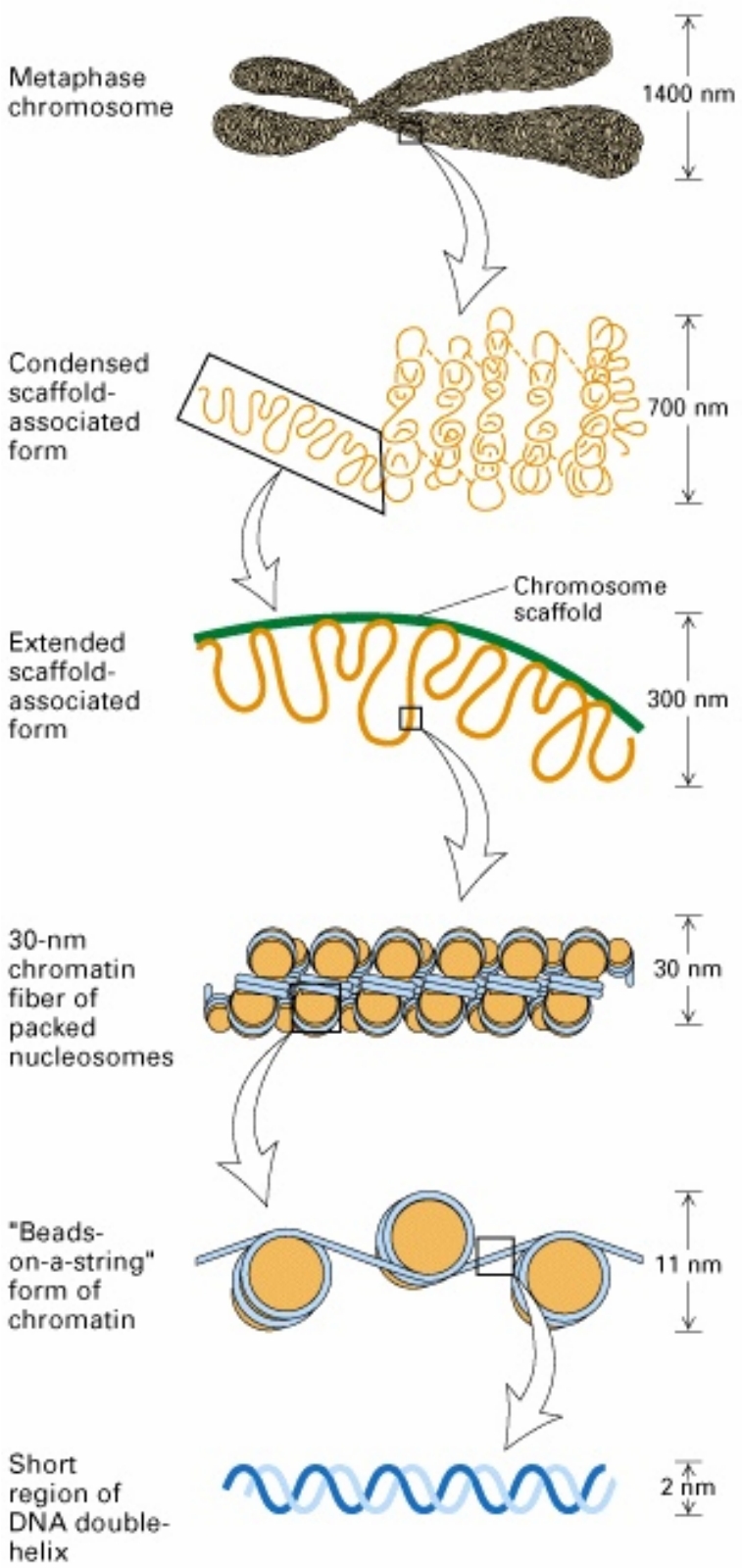
107 °C-ზე ინტენსიური პიკის გაქრობას ნიშნავს, რომ ქრომატინის გამოყოფისას ბირთვიდან ირღვევა მისი ზემაღალი სტრუქტურა. ეს უკანასკნელი მონაცემები კი მიუთითებს იმაზე, რომ ბირთვის და უჯრედის დენატურაციის პროცესი უფრო სრულად ასახავს ნატიური ქრომატინის სტრუქტურულ ორგანიზაციას, ვიდრე ამავე ობიექტებიდან თანამედროვე მეთოდით გამოყოფილი ხსნადი ქრომატინი. ეს ნათლად ჩანს ქრომატინის დენატურაციის მრუდებიდან. ქრომატინის გამოყოფისას 300ნმ-იანი ფიბრილა (T_d = 107 °C;) პრაქტიკულად ინგრევა, მისი გადასვლის ტემპერატურა მცირდება და უდრის: T_d ~ 90 °C (მხარი ქრომატინის მრუდზე) და 82 °C. ამავე დროს სითბოშთანთქმის პიკი ქრომატინის ლრობის შემთხვევაში ბირთვის ლღობასთან შედარებით 3,5-ჯერ უფრო ინტენსიურია.

სურ. 4-ზე ნაჩვენებია ქრომატინის სტრუქტურული იერარქია.

მრავალრიცხოვანი ექსპერიმენტალური შედეგებიდან ნაჩვენებია, რომ სხვადასხვა გარეშე ფაქტორები სხვადასხვანაირად მოქმედებენ აქტიურ და პასიურ ქრომატინზე. მაგ. რაუშერის ვირუსით დაავადებული ვირთხა **BALB/c-**ს ელენთის ქსოვილის გამოკვლევისას 30% აქტიური ქრომატინისა ექვემდებარება მნიშვნელოვან დეკომპაქტიზაციას, ხოლო ჰეტეროქრომატინის სტრუქტურა იცვლება უმნიშვნელოდ. იმ შემთხვევაში კი როცა შეიყვანეს მცირე რაოდენობით კარცეროგენული შენაერთი “ბენზო(ა)პირენი” სურათი შეიცვალა, რაც გამოიხატებოდა პასიური ქრომატინის დეკონდენსაციაში.



სურ. 3. HeLa-უჯრედების, ბირთვის და ქრომატინის მიკროკალორიმეტრული ჩანაწერი



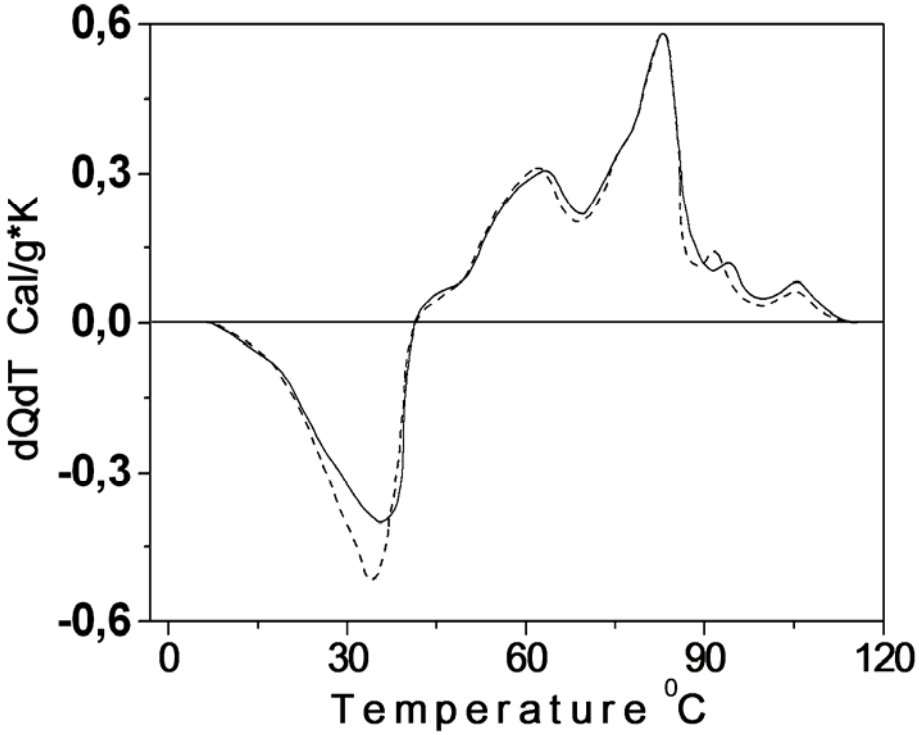
სურ. 4. ქრომარინის სტრუქტურული იერარქია.

კერძოდ, ადგილი ჰქონდა 30ნმ-იანი ფიბრილის გადასვლას 10ნმ-იან ფიბრილაში (Monaselidze et. al. 1996). სითბოს გადანაწილებას ქრომატინის დომენურ სტრუქტურებს შორის ადგილი აქვს აგრეთვე ადამიანის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტების დამუშავებისას პეპტიდური ბიორეგულატორებით (Lezhava T. A., et. al. 2004).

სურ. 5-ზე ნაჩვენებია ადამანის სისხლის ლიმფოციტების გახურებისას თერმული ეფექტების მიკროკალორიმეტრული ჩანაწერი.

მოცემულია ინტენსიური ასიმეტრიული ეგზოთერმული პიკი 8-40^{0}C ტემპერატურულ ინტერვალში მაქსიმუმით 37^{0}C –ზე. გამოყოფილი სითბო(- Q) დათვლილია ბაზისურ ხაზსა და მრუდის ქვეშ არსებული ფართობის მიხედვით და ტოლია 13,4±2,0 ჯ/გ მშრალი ბიომასისა.

მრავალი მონაცემების საფუძველზე მეტაბოლური სითბო (- Q) ჩვეულებრივ დაკავშირებულია უჯრედების სუნთქვასთან, ბიოქიმიურ რეაქციებთან, ნუკლეინის მჟავების მოდიფიკაციასა და მაკრომოლეკულების სინთეზთან და ასახავს უჯრედების გადარჩევის ხარისხს (Monaselidze at. al. 2006). სითბოს გამოყოფა ხდება იმის გამო, რომ 40 ^{0}C-მდე უჯრედი ცოცხალია და მასში მიმდინარე ბიოქიმიური პროცესები მაქსიმუმს აღწევენ დაახლოებით 37 ^{0}C-ზე. 40 ^{0}C-დან იწყება უჯრედში შემავალი სტრუქტურების დენატურაცია. ოთხი პიკი და სამი მხარი იქნა ჩაწერილი 40-120 ^{0}Cტემპერატურულ ინტერვალში.



სურ. 5. ხანდაზმული ადამიანის სისხლის ლიმფოციტების მიკროკალორიმეტრული ჩანაწერი პროსტომაქსის ზემოქმედების პირობებში. pH=7,1. გახურების სიჩქარე 0,1 °C /წთ-ში. უწყვეტი ხაზი – ლიმფოციტები დაუმუშავებელი პროსტომაქსით, უჯრედების რაოდენობა – $2x10^{-7}$ (მშრალი ბიომასა 4,8 მგ. დნმ – 0,095 მგ), წყვეტილი ხაზი - ლიმფოციტები დამუშავებული 0,05 მM/მლ პროსტომაქსით, უჯრედების რაოდენობა – $1,5x10^{-7}$ (მშრალი ბიომასა 4,4 მგ. დნმ 0,092მგ).

ინტეგრალური სითბო დათვლილია ენდოთერმების შიგნით არსებული ფართობიდან და ტოლია 26,5±3,0ჯ/გ მშრალი ბიომასისა. მრავალრიცხოვანი ექსპერიმენტალური შედეგები უმაღლესი ეუკარიოტების ბირთვებისა და უჯრედებისა გვიჩვენებს, რომ მემბრანები, არაჰისტონური ცილები, ციტოპლაზმატური სტრუქტურები და ბირთვული მატრიქსები დენატურირდებიან 40-85 ^{0}C ტემპერატურულ ინტერვალში, ხოლო გენეტიკური მასალა - ქრომატინი კი უფრო მაღალ ტემპერატურაზე 80 – 120 ^{0}C ტემპერატურულ ინტერვალში (Lepock J.R., et. Al. 1995). აღსანიშნავია, რომ ინტენსივობა და ზუსტი ადგილმდებარეობა ყველა ენდოთერმისა ტემპერატურულ სკალაზე დამოკიდებულია ქსოვილის ტიპზე (Andronikashvili E., et. Al. 1983., Monaselidze J.R., et. Al. 1981). იმისათვის, რომ გაგვერკვია მოცემულ ტემპერატურულ ინტერვალში დენატურაციის რომელი სტადია შეესაბამება ქრომატინის დენატურაციას, წარმოდგენილი მრუდი დავყავით გაუსის მრუდებად და მივიღეთ 8 თერმული გადასვლა (პიკი) (სურ. 6.). Q_d (დენატურაციის სითბო) გამოთვლილია მე-VII და მე-VIII ენდოთერმების მიხედვით და შეადგენს 90,5±9,0ჯ/გრამ დნმ-ზე. ეს მნიშვნელობა შეესაბამება ქრომატინის ხსნარის Q_d-ს (75,5±7,5 ჯ/გრამ დნმ-ზე), ექსპერიმენტალური ცდომილების ფარგლებში (Andronikashvili E., et. Al. 1983., Balbi C. M. L., et. Al. 1988., Monaselidze at.al. 2006).

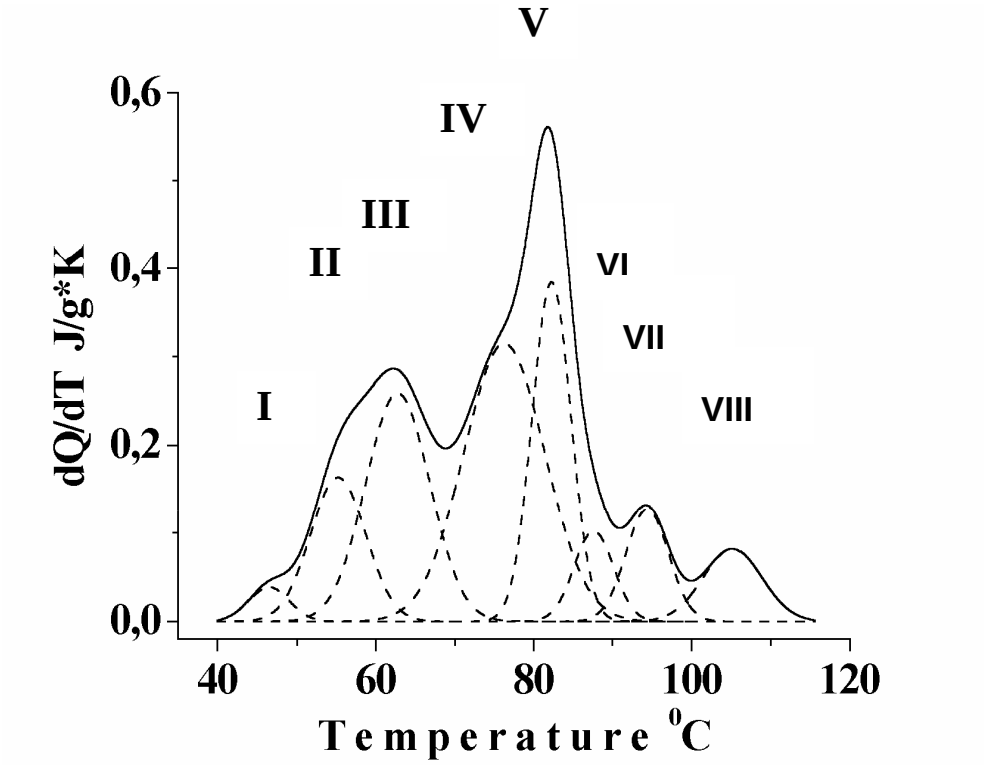
სითბოშთანთქმის მრუდების შედარება გვიჩვენებს, რომ პეპტიდის შეყვანა უჯრედის კულტურაში იწვევს მრუდის პროფილის შეცვლას

მხოლოდ 80-120 ^{0}C ტემპერატურულ ინტერვალში. კერძოდ, პროსტომაქსის ზემოქმედებისას ხდება მე-VII და მე-VIII პიკების წანაცვლება დაბალი ტემპერატურებისაკენ 2,9 და 1 ^{0}C-ით დაუმუშავებელ უჯრედებთან შედარებით. დაიმზირება სითბოს გადანაწილება მე-VII და მე-VII ენდოთერმებს შორის. სითბო, რომელიც მოდის მე-VII ენდოთერმაზე იზრდება, ხოლო მე-VIII ენდოთერმაზე მოსული სითბო მცირდება, სრული გადასვლის სითბო $Q(Q_d^{V11}+Q_d^{V111})$ კი უცვლელი რჩება. ამ გადასვლის დენატურაციის პარამეტრებია:

$T_d^{V11}=94,4^0C\pm0,05$ $T_d^{V111}=105,1^0C\pm0,05$

$Q_d^{V11}=50,8\pm5,0$ ჯ/გ დნმ $Q_d^{V111}=44,9\pm4,9$ ჯ/გ დნმ

სურ. 7-ზე ნაჩვენებია სითბოშთანთქმის მრუდები ინტაქტური და ვილონით დამუშავებული კულტივირებული უჯრედების. (-----) შეესაბამება მოხუცი დონორის ინტაქტურ უჯრედებს, (——) შეესაბამება ვილონით დამუშავებულ მოხუცი დონორის უჯრედულ კულტურას, ხოლო (.....) ახალგაზრდა დონორის სითბოშთანთქმის მრუდს. დენატურაციის პარამეტრებია:



სურ. 6 სურათი (5) დაყოფილია გაუსის მრუდებად 40-120 ^{o}C ტემპერატურულ ინტერვალში.

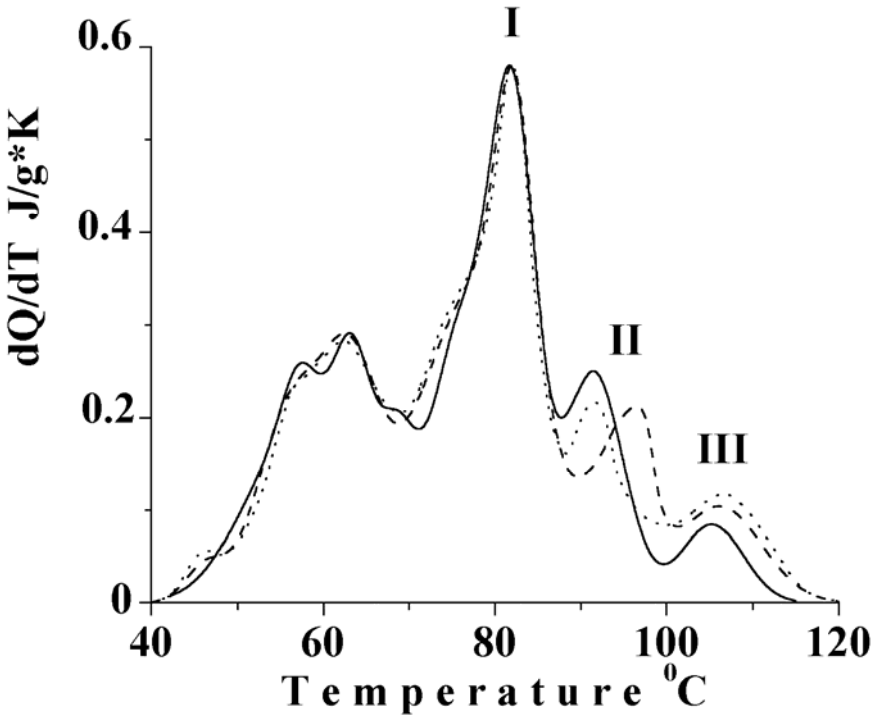
T_d(I) = 82,3^{0}C Q_d(I) = 33,8±3,8ჯ/გ

T_d(II) = 95^{0}C Q_d(II) = 30,2 ± 3,2ჯ/გ

Td(III) = 106^{0}C Q_d(III) = 28,0±2,8ჯ/გ

Q_d(I,II,III)=92,0±9,2ჯ/გ, რაც შეესაბამება ადრე მიღებულ შედეგებს (Monaselidze at. al. 1981., Cavazza at. al. 1991). დაბალტემპერატურული მრუდები, რომელთა გადასვლის ტემპერატურა არის 46±1,0; 55±1,0; 63±1,0^{0}C, ლიტერატურული მონაცემების თანახმად (Cavazza at. al. 1991., Cardellini at. al. 2000., Touchette NA., Cole D. 1985.) შეესაბამება მემბრანების, ბირთვული მატრიქსების და ციტოპლაზმატური სტრუქტურების დანატურაციას. ამრიგად, შეგვიძლია ვთქვათ, რომ როგორც პროსტომაქსის, ისე ვილონის დამატებით მრუდის პროფილი არ იცვლება მნიშვნელოვნად 40-80^{0}C ტემპერატურულ ინტერვალში ე.ი. ისინი არ მოქმედებენ პროტეინ-მემბრანა-კომპლექსების სტაბილურობაზე, მაგრამ მათ აქვთ სპეციფიური გავლენა ქრომატინზე ***in situ*** და იწვევენ უმთავრესად ჰეტეროქრომატინის სტრუქტურის ნაწილობრივ დეკონდენსაციას. რაც გამოიხატება სითბოს გადანაწილებით მე-2 და მე-3 ენდოთერმებს შორის.

ჩვენ მივედით დასკვნამდე, რომ ადამიანის ლიმფოციტების ქრომატინს აქვს ორი თერმული გადასვლა 95^{0}C და 105 ^{0}C-ზე.

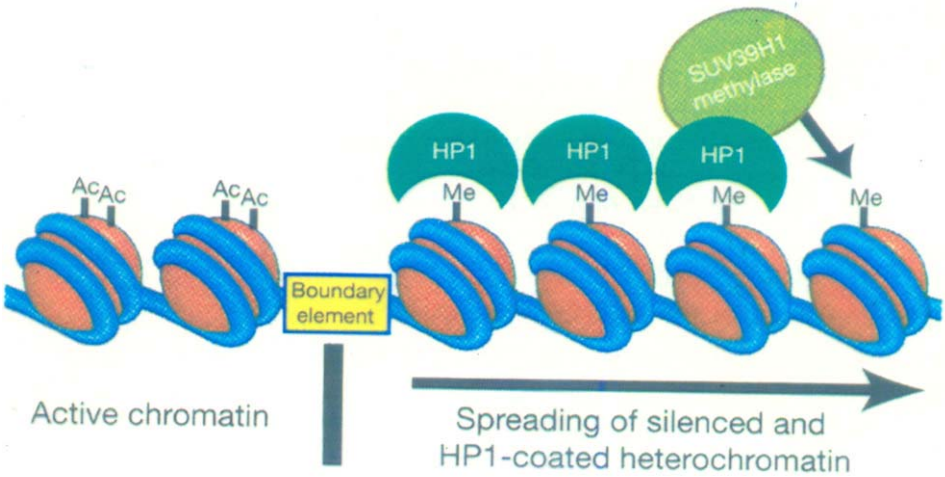


სურ. 7 ქრომატინის კომფორმაციული ცვალებადობა ვოლონის თანაობისას
(- - -) --- ხანდაზმული ადამიანის სისხლის ლიმფოციტები;
(—) – ხანდაზმული ადამიანის სისხლის ლიმფოციტები დამუშავებული ვილონით;
(. . .) – ახალგაზრდა დონორის სისხლის ლიმფოციტები;

ლიტერატურული მონაცემების შესაბამისად (Balbi C. M. L., et. al. 1988., Monaselidze J., et. al. 2002., Cavazza B., et. al. 1991.Touchette NA., Cole D. 1985.) მე-2 და მე-7 ენდოთერმა შეესაბამება ნუკლეოსომის შუაგულში მოთავსებული 10 ნმ-იანი ფიბრილის გახსნას (დენატურაცია 95 ^{0}C) ხოლო მე-3 და მე-8 ენდოთერმა 30ნმ-იან ფიბრილაზე მიმაგრებული ბირთვული მატრიქსის მარყუჟის გახსნას(დენატურაცია 105 ^{0}C), (სურ. 6. სურ. 7) რაც დაკავშირებულია ნაწილობრივ მის დეჰეტეროქრომატინიზაცია-დეკონდენსაციასთან. ვუშვებთ, რომ დამზერილი რელაქსაცია ნაწილობრივ დაკავშირებულია ჰეტეროქრომატინის ცილებში ქრომოდომენების მოცილებასთან, რომლებიც ლოკალიზებულნი არიან ჰეტეროქრომატინულ საიტებზე და გავლენას ახდენენ საილენტურ გენებზე (Eissenberg J. C., et. al. 2000., Zhao T., et. al. 2000., Cardellini et. al. 2000).

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად, სურ. 8 (Bannister A., et. al. 2001), მეთილტრანსფერაზები იწვევენ H3 ჰისტონში მე-9 პოზიციაში მყოფი ლიზინის მეთილირებას, რომელიც არის ნუკლეოსომის გულის შემადგენლობაში. ამის შედეგად ჰეტეროქრომატინში შემავალი პროტეინ 1-ის ქრომატინული დომენი HP1 უკავშირდება მეთილირებულ უბანს კეტავს მას და იწვევს გენების გაჩუმებას. ვფიქრობთ, რომ ვილონი იწვევს მეტილტრანსფერაზებში მეთილის ჯგუფის მოშორებას. ამის შედეგად ჰეტეროქრომატინ პროტეინ-1-ის ქრომოდომენი HP1 ვერ ცნობს ქრომატინზე მიბმულ ბოლოებს და ქრომატინის ეს ნაწილი

რჩება დაუცველი. აქედან გამომდინარე, ხდება ქრომატინის შესაბამისი უბნის გააქტიურება. ეს პროცესი კალორიმეტრულ მრუდზე დაიმზირება ჰეტერექრომატინის დენატურაციის ტემპერატურის და ენტალპიის შემცირებით.



სურ. 8. SUVAR39H1/HP1 კომპლექსით ჰეტეროქრომატინის სტრუქტურიზაციის მოდელი.

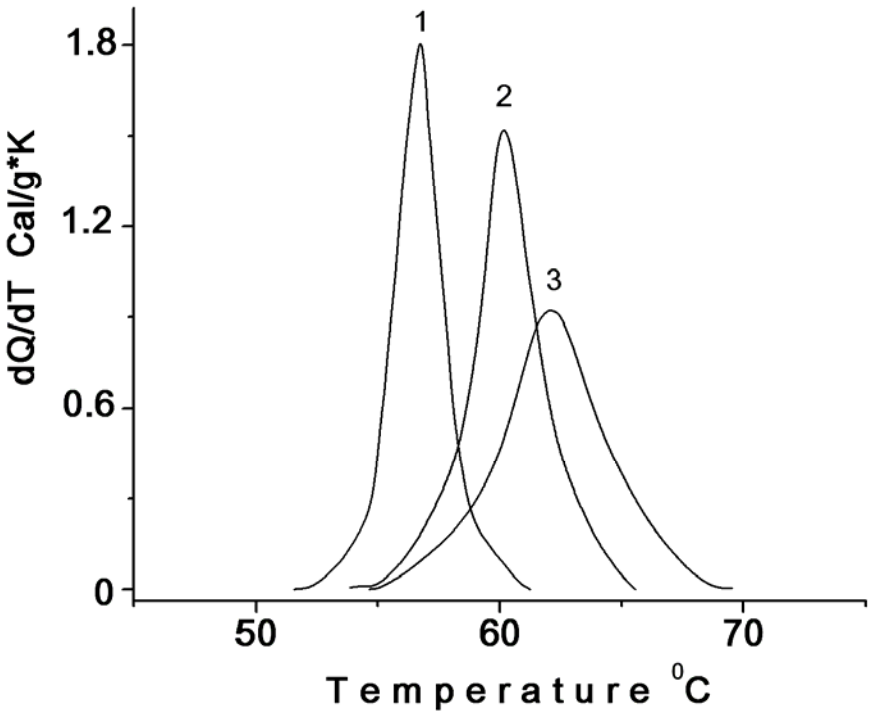
4.2 სინთეზური პოლიმერის poly[d(A-T)d(A-T)]-ს, პოლიმერ-პეპტიდ კომპლექსისა და თიმუსის დნმ-ის თერმოდინამიკური პარამეტრების განსაზრვრა დ.ს.მ მეთოდით(*in vitro)* პეპტიდის ძალზე მცირე კონცენტრაციის თანაობისას

ექსპერიმენტულად დადასტურებულია, რომ ძირითადი ლიგანდები არიან მუტაგენური და კარცეროგენური. ამიტომაც, ყურადღება ექცევა ამ ნაერთების დნმ-ზე მოქმედების მექანიზმების შესწავლას ***in vitro*** და ***in vivo*** **(**Khavinson V., et**.**al**.** 2005). ამ თვალსაზრისით ყურადღების ცენტრში მოექცა (PNA) peptide nucleic acid-ის სინთეზი, რომელიც გამოიყენება კვლევითი, თერაპიული და დიაგნოსტიკური მიზნებისათვის (Uhlmann E. et. al. 1998). შესწავლილი იქნა ამ პეპტიდების და დნმ-ის ურთიერთქმედების ახალი მექანიზმი (Kuhn H., et. al. 1999). ნაჩვენები იქნა, რომ ფსევდო-კომპლემენტარული პეპტიდ-ნუკლეინის მჟავები (pc PNAs), რომლებიც დნმ-ის სპეციფიურ მიმდევრობას უერთდება, იწვევენ 170 ფუძეთა წყვილის სიგრძის მქონე დნმ-ის პატარა მარყუჟების წარმოქმნას ორი მოხრილი ფრაგმენტის დიმერიზაციის საშუალებით (Kuhn H., et. al. 2004). ეს ბუნებრივი პეპტიდები ჩვეულებრივ უერთდება დადებითად დამუხტულ ლიზინის ნაშთს და ზრდის მის ხსნადობის უნერიანობას. უკეთესად უერთდება ნუკლეინის მჟავას გარკვეულ ადგილებში და შედეგად მიიღება PNA-DNA –ს კომპლექსი (Abibi A.et. al. 2004., Khavinson V. Kh. et. al. 2003).

როგორც უკვე ავღნიშნეთ, პეპტიდების მოქმედებით ***in situ*** მცირდება ჰეტეროქრომატინის თერმოდინამიკული სტაბილობა და ის გადადის დეკონდენსირებულ მდგომარეობაში. სავარაუდოა, რომ გააქტიურება დაკავშირებულია ქრომატინზე მოთავსებული პროტეინების ქრომოდომენების კოოპერაციულ მოცილებასთან. მოცილება ხდება იმ ადგილებიდან, სადაც ისინი იწვევენ გენის გაჩუმებას (Bannister A. J., et. al. 2001), მაგრამ არაფერია ცნობილი პეპტიდებისა და დნმ-ის A-T და G-C წყვილების ურთიერთქმედების ხასიათზე. ამისათვის გამოვიყენეთ დ.ს.მ. მეთოდი სინთეზური poly[d(A-T)d(A-T)] სპირალიდან გორგალზე გადასვლის შესასწავლად.

უნდა აღინიშნოს, რომ სუფთა დნმ-ის, მათი სინთეზური ანალოგების და მათი ლიგანდებთან კომპლექსების ლღობის პროცესების თერმოდინამიკური ანალიზი გვაძლევს მნიშვნელოვან ინფორმაციას დნმ-ლიგანდების ურთიერთქმედების მექანიზმზე (Lazurskin Y. S., et. al. 1970., Karapetian A. T., et. al. 1990).

კვლევის მთავარი მიზანი იყო პეპტიტ პროსტომაქსის ენერგეტიკული წვლილის დადგენა poly[d(A-T)d(A-T)-ს ლღობის ენტალპიაში და მოლეკულათშორის კავშირებზე. კერძოდ, ეს აგენტი იწვევს სტაბილიზაციას თუ დესტაბილიზაციას A-T წყვილებისას, ებმევა დნმ-ს კოვალენტურად თუ უფრო სუსტად ჰისტონების და პროტამინების მსგავსად.



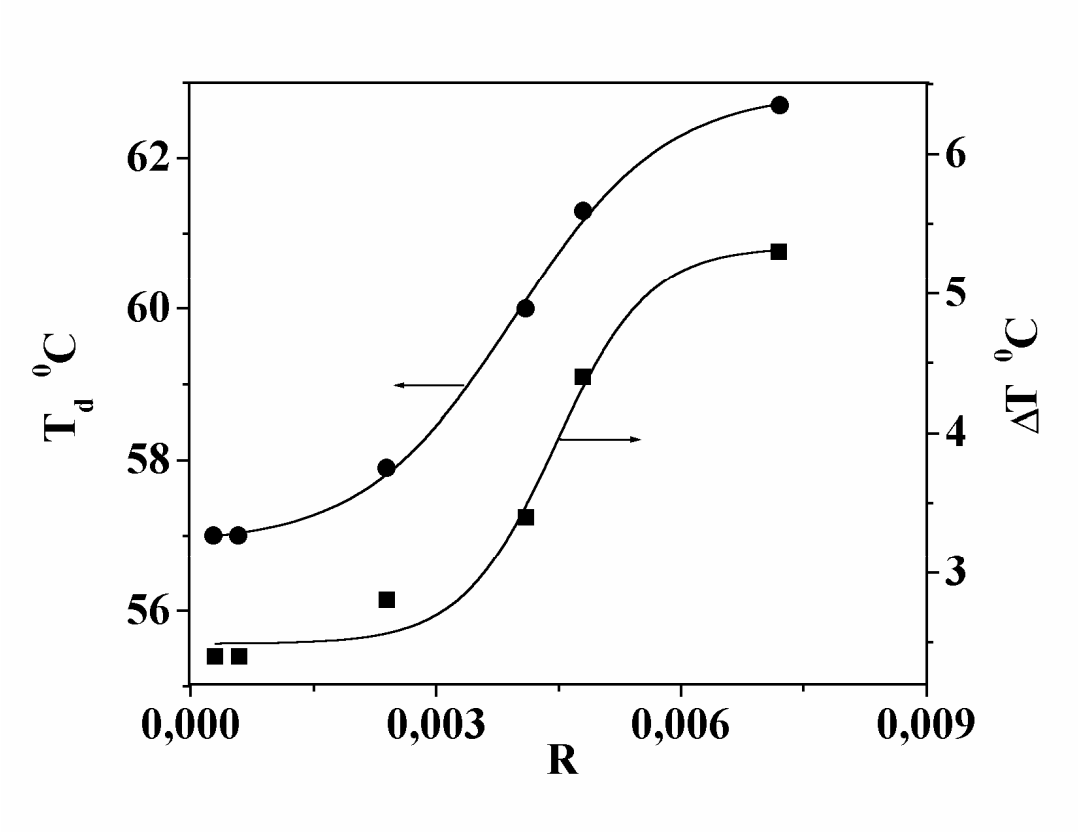
სურ. 9. poly[d(A-T)d(A-T)]-ს განზავებული ხსნარის დნობის მიკროკალორიმეტრული მრუდები, გადათვილილი გრამ მშრალ ბიომასაზე (20 მM ფოსფატურ ბუფერში, pH7.2, C=0.064 %), პროსტომაქსის სხვადასხვა თანაფარდობისას (R). სადაც R არის პროსტომაქსის მოლური თანაფარდობა poly[d(A-T)d(A-T)]-ს ფუძეთა წყვილზე.

(1) R=0; (2) R=2,4x10 $^{-3}$ (3) R=7,2x10^{-3}

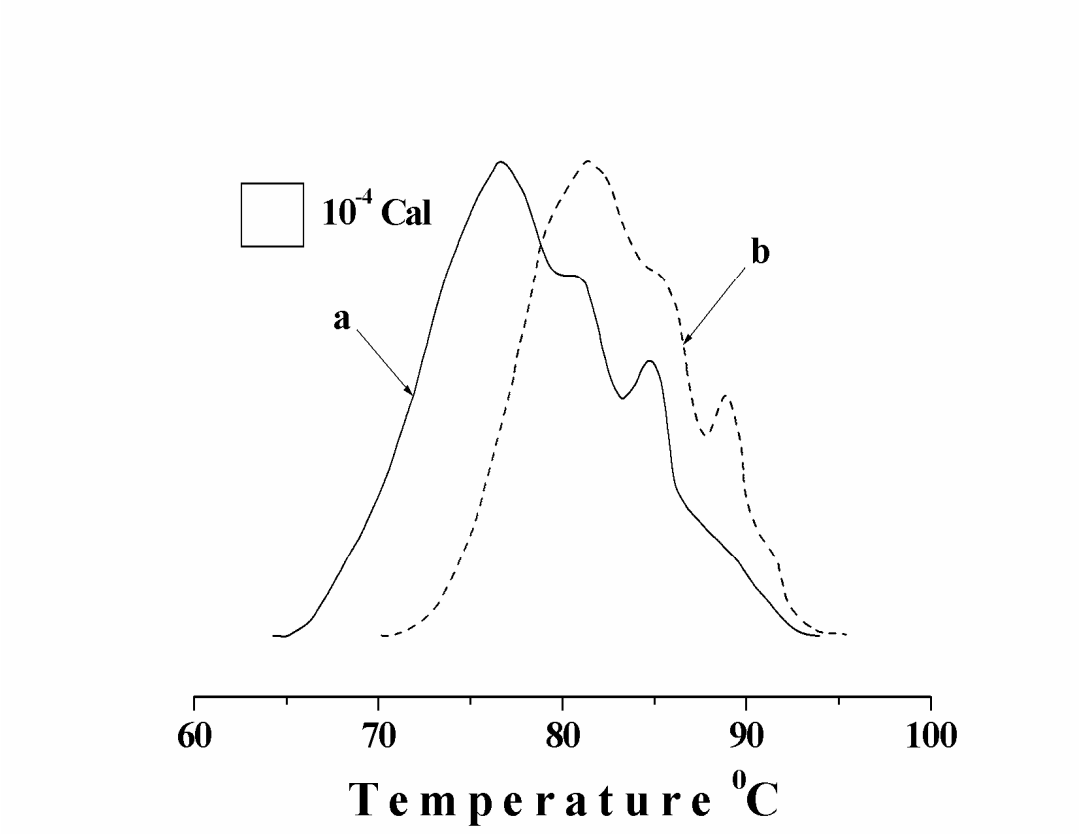
სურ. 9. გვიჩვენებს poly[d(A-T)d(A-T)-ს განზავებული ხსნარის სითბოშთანთქმის მრუდს პროსტომაქსის სხვადასხვა კონცენტრაციის თანაობისას. ჩანს, რომ მისი გადასვლა სპირალური ფორმიდან გორგლოვან ფორმაში ხდება ერთ საფეხურად.

დნობის სითბო, გაანგარიშებულია ბაზისურ ხაზსა და მრუდის ქვეშ არსებული ფართობის მიხედვით და ტოლია 6,4±0,4; 6,9±0,4; 6,7±0,4 კ/გ, რომელიც დადასტურდა poly[d(A-T)d(A-T)-ს დნობის წინათ მიღებული შედეგებიდან (Andronikashvili E., et. al. 1974). პროსტომაქსის კონცენტრაციის გაზრდამ გამოიწვია დნობის მრუდის გადახრა უფრო მაღალ ტემპერატურაზე. ΔT_m გაიზარდა $2,4^0C$-დან $5,6^0C$-დე დნობის მრუდის უმნიშვნელო ცვლილებით. აქედან გამომდინარე poly[d(A-T)d(A-T)-ს დნობის ინტერვალის გაფართოება 100%-ით ზრდის T_m-ს 6^0C-ით, ΔH_m-ის მნიშვნელოვანი ცვლილების გარეშე. მიღებული შედეგები დაიმზირება R-ის მნიშვნელობის შუალედში $2,4x10^{-3}$ დან $7,2\ x10^{-3}$ მოლ პეპტიდამდე ერთ მოლ A-T ფუძეთა წყვილზე გაანგარიშებით. გამოთქმულია მოსაზრება, რომ პროსტომაქსი უკავშირდება poly[d(A-T)d(A-T)-ს მოლეკულას ბოლოებში და წარმოქმნის წრიულ მოლეკულას, რომელიც დნება უფრო მაღალ ტემპერატურაზე და ფართო ტემპერატურულ ინტერვალში, ვიდრე თავისუფალი

poly[d(A-T)d(A-T). ეს მოსაზრება ეთანხმება ოპტიკური მეთოდებით მიღებულ შედეგებს წრიულ დნმ-ზე მისი ლღობისას ფიზიოლოგიურ პირობებში.



სურ. 10. $T_{დნ}$ და $\Delta T_{დნ}$ დამოკიდებულება poly[d(A-T)d(A-T)]-ს და პროსტომაქსის სხვადასხვა თანაფარდობაზე (R).



სურ. 11 თიმუსის დნმ-ის დნობის კალორიმეტრული ჩანაწერი

a – დაუმუშავებელი ვილონით

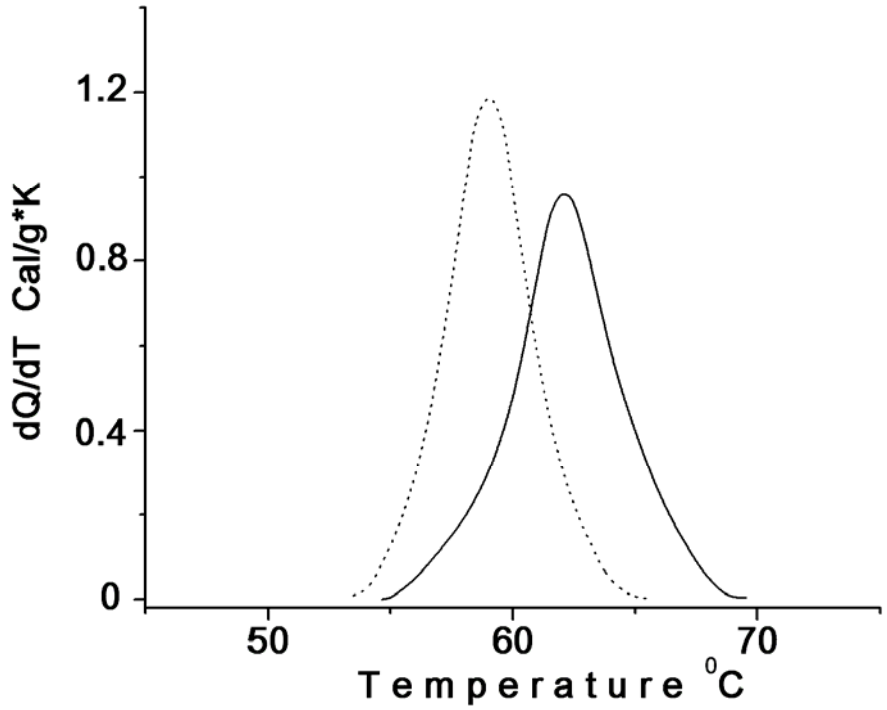
b – დამუშავებული ვილონით

სურ. 10 ასახავს თუ როგორ იზრდება მრუდის გადასვლის ტემპერატურა და ფართოვდება დნობის ინტერვალი პროსტომაქსის კონცენტრაციის გაზრდისას უმნიშვნელოდ.

სურ. 11-ზე ნაჩვენებია ინტაქტური და ვილონით დამუშავებული თიმუსის დნმ-ის სითბოშთანთქმის მრუდი.

მე-12 სურათის მიხედვით შეგვიძლია ვიმსჯელოთ, კავშირი პეპტიდსა და პოლიმერს შორის არის კოვალენტური თუ უფრო სუსტი. უწყვეტი მრუდი შეესაბამება მრუდს, როცა პოლიმერის კონცენტრაცია ხსნარში არის $2x10^{-3}$, ხოლო მოლარული თანაფარდობა პეპტიდ-პოლიმერისა–$7,2x10^{-3}$. შემდეგ იმავე ხსნარში დამატებული იქნა პოლიმერის იგივე რაოდენობა, რამაც გამოიწვია დნობის მრუდის წანაცვლება დაბალი ტემპერატურისაკენ და მოლარული თანაფარდობა ხსნარში პეპტიდ-პოლიმერისა გახდა $2,4x10^{-3}$. ეს ნიშნავს, რომ მათ შორის კავშირი არ იყო კოვალენტური და პოლიმერის კონცენტრაციის გაზრდამ გამოიწვია მათ შორის კავშირის გაწყვეტა და პეპტიდის მოლეკულები გადანაწილდა პოლიმერის მოლეკულებზე.

ჩვენ ვფიქრობთ, რომ პროსტომაქსი ებმის poly[d(A-T)d(A-T)-ს არა კოვალენტური ბმით, წარმოქმნის წრიულ ჩაკეტილ სტრუქტურას, ზრდის თერმოსტაბილურობას და აფართოებს დნობის ინტერვალს.



სურ. 12. poly[d(A-T)d(A-T)]-ს დნობის მიკროკალორიმეტრული მრუდები პოლიმერის კონცენტრაციის ზრდისას

PH=7.2, უწყვეტი მრუდი – R=7,2x10^{-3} წყვეტილი მრუდი - R=2,4x10^{-3}

დ ა ს კ ვ ნ ე ბ ი

1. კალორიმეტრული მეთოდის გამოყენებით განსაზღვრული იქნა ხანში შესული ადამიანის სისხლის ლიმფოციტების მეტაბოლური სითბო, რომელიც ტოლია 13,4±2,0ჯ/გ. ნაჩვენებია, რომ პროსტომაქსი დაბალი კონცენტრაციებისას იწვევს ლიმფოციტების კულტურის სიცოცხლისუნარიანობის დონის გაზრდას 15-20%-ით
2. განსაზღვრულია ხანში შესული ადამიანის სისხლის ლიმფოციტების დენატურაციის სითბო, რომელიც შეესაბამება 26,5±3,0ჯ/გ მნიშვნელობას. ნაჩვენებია, რომ უჯრედული მემბრანები, ციტოპლაზმატური სტრუქტურები და ბირთვული მატრიქსები დენატურირდებიან 40-85^{0}C ტემპერატურულ ინტერვალში, ხოლო გენეტიკური მასალა–ქრომატინი 80-120^{0}C ტემპერატურულ ინტერვალში. კერძოდ, 105^{0}C და 95^{0}C-ზე.
3. პეპტიდების მოქმედებისას ადამიანის სისხლის ლიმფოციტების უჯრედის კულტურაზე არ შეიმჩნევა მასში შემავალი მემბრანების, ციტოპლაზმატური ცილებისა და ბირთვული მატრიქსების სტრუქტურული ორგანიზაციის რაიმე მნიშვნელოვანი ცვლილება, დაიმზირება მხოლოდ სითბოს გადანაწილება ჰეტერო და აქტიური ქრომატინის პიკებს შორის. ეს ცვლილება დაკავშირებულია ქრომატინის ჰეტეროქრომატინიზებული უბნების

დეჰეტეროქრომატინიზაციასთან, რის შედეგადაც ხდება 30ნმ-იანი ფიბრილის დეკონდენსაცია და მისი გადასვლა 11ნმ-იან ფიბრილაში.

4. შემოთავაზებულია პეპტიდების მოქმედების სქემა. კერძოდ, პეპტიდები იწვევენ მეთილის ჯგუფის მოშორებას და ქრომატინის შესაბამისი უბნების გაქტიურებას, რომელიც დეკონდენსირდება და შემდგომში განიცდის დენატურაციას 95^0C-ზე
5. poly[d(A-T)d(A-T)]-პროსტომაქსის და დნმ-ვილონის თერმოდინამიკული პარამეტრების ანალიზის საფუძველზე დადგინდა, რომ პეპტიდები ებმიან დნმ-ის მოლეკულებს და მის სინთეზურ ანალოგს ბოლოებში არაკოვალენტური ბმით და ქმნიან ჩაკეტილ წრიულ სტრუქტურას.

ლიტერატურის სია

- Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М. Медицина, 1990. 384 с.
- Агеев А. К. Гистология вилочковой железы. Л. Медицина, 1973. 128 с.
- Анисимов В. Н., Морозов В.Г., Хавинсон В. Х. Увеличение продолжительности жизни и снижение частоты опухолей у мышей СЗН/ Sn под влиянием полипептидных факторов тимуса и эпифиза // Докл. АН СССР. 1982. Т. 263, №3. С. 1000-1004.
- Анисимов В.Н. Средства профилактики ускоренного старения (геропротекторы) // Успехи геронтол.2000, 4, 55-74.
- Анисимов В., Хавинсон В., Морозов В. Роль пептидов эпифиза в регуляции гомеостаза: двадцатилетний опыт исследования. Успехи соврем. Биол. 1993, т. 113, 6, 752-762.
- Ашмарин И. П., Обухова М. Ф. Регуляторные пептиды , функционально-непрерывная совокупность // Биохимия. 1986. Т. 51, №4. С. 531-545.
- Бабенко А. П., Казанцева С. Т. Возможность модуляции калиевой проницаемости сарколеммы кардиомицитов эндогенными кардиопептидами // Симпозиум: Пептидные биорегуляторы-цитомедины / Воен.- мед. акад. Им. С. М. Кирова. СПб., 1992. С. 15-16.
- Бакрадзе Н. Г., Монаселидзе Д. Р. Прецизионный Дифференциальный Микрокалориметр - Измерительная техника, 2, 58-60, 1971.

- Барта И. Селезенка: анатомия, Физиология, патология и клиника. Будапешт, 1976. 264.с.
- Бахтизина Г. З., Биктимирова Г. А., Варламова Т.И. Применение кардиалина при токсической миокардиодистрафии // Механизмы патологических реакций. Невокузнецк, 1991.С. 112.
- Белокрылов Г.А., Морозов В.Г., Хавинсон В. Х. Влияние веществ полипептидной природы, выделенных из коры головного мозга, на имунный ответ у мышей // Бюл. эксперим. Биологии и медицины. 1978. Т. 68, № 12. С. 703-705.
- Белокрылов Г. А., Хавинсон В. Х., Морозов В.Г., Влияние веществ полипептидной природы, выделенных из тимуса и коры головного мозга, на первичный иммунный ответ у мышей к тимусзависимому и тимуснезависимому антигену // Ж. Микробиол., эпидемиологии и иммунобиологии. 1980. Т. 21, № 3. С. 97-100.
- Беседнова Н. Н. Регуляция имунных процесов пептидами природного происхождения // Антибиотики и химиотерапия. 1999. Т. 44, № 1. С. 31-35.
- Беспалов В. Г., Александров В. А., Анисимов В. Н. . Влияние полипептидных факторов тимуса, эпифиза, костного мозга и переднего гипоталамуса на реализацию трансплацентарного канцерогенеза // Эксперим. онкология. 1984. Т. 6, № 5. С. 27-30.

- Быков Н. М. Геропротекторное действие пептидов в клеточных культурах. - СПб, 2003, - 88 с.
- Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. М. Мир, 1987. 584 с.
- Казакова Т.Б., Буров С. В., Головко О. И. и. др. Биологическая активность аналогов пептидного гормона – люлиберина в регуляции иммунного ответа Т – лимфоцитов // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1996. Т. 122, № 9. С. 334-337.
- Калюнов В. Н. Биология Фактора роста нервной ткани. Минск, Наука и техника, 1986. 208.с.
- Киселева Е. П., Огурцов Р. П., Попова О. Я. И. др. Сравнительная характеристика двух пептидных иммуномодуляторов // Иммунология. 1999. № 2. С. 23-26.
- Кокотов Ю. К., Бубажабон Г. Б., Кузник Б. И. и др. Применение тималина при лечении различных гнойных перитонитов // Хирургия. 1984. Т. 54, № 8. С. 12-15.
- Кокрушко О., Хавинсон В., Бутенко Г., Шатило Б. Пептидные препараты тимуса и эпифиза в профилактике ускоренного старения. СПб, Наука. 2002,204.

- Кузник Б., Морозов В., Хавинсон В. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований. СПб: Наука, 1998, 310 с.
- Линг Н. Р. Стимулация лимфоцитов. Москва. Медицина. 1971. С. 288
- Ломакин М. С., Арцимович Н. Г. Гормоны и другие биологически активные вещества тимуса // Имунология. 1992. № 1. С. 10-15.
- Лопухин Ю. М., Морозов Ю. И. , Петров Р. В. Трансплантация неонатальной вилочковой железы совместно с грудиной при первичной иммунологической недостаточности // Актуальные проблемы пересадки органов. М.. Медицина, 1974. С. 286-301.
- Монаселидзе Д.Р., Бакрадзе Н.Г. Адиабатный Дифференциальный Микрокалориметр – В кн.: Конформаценные изменения биополимеров в растворах – М., Наука, 300-304, 1973.
- Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Характеристика и изучение механизма действия фактора тимуса (тимарина) // Докл. АН СССР. 1978. Т. 240, № 4. С. 1004-1007.
- Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем – цитомедины // Успехи современной биологии. 1983. Т. 96, № 3. С. 339-346.
- Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. Иммунологическая функция тимуса // Успехи соврем. Биологии. 1983. Т. 97, вып. 1. М. 36-49.

- Морозов В. Г., Хавинсон В. Х., Кожемякин А. Л., Кожемякин Л. А. Влияние полипептидного фактора тимуса на систему циклических нуклеотидов иммунокомпетентных клеток // Вопр. Мед. химии. 1982. № 4. С. 114-118.
- Морозов В., Хавинсон В. Роль клеточных медиаторов (цитомединов) в регуляции генетической активности. Изв. АН. СССР. Сер. Биол. 1985, №4, 581-587.
- Морозов В., Хавинсон В., Малинин В. Пептидные тимомиметики. СПб: Наука. 2000, 158 с.
- Морозов В. Г., Хавинсон В.Х.,Писарев О. А. Выделение из тимуса изучение природы фактора, стимулирующего иммуногенез // Докл. АН СССР. 1977. Т. 233, №3. С. 491-494.
- Павленко В. С., Андреева Л.И., Ершов В. И. Взаимосвязь доз и фармакологических эффектов пептида сердца // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1992. Т. 83, № 8. С. 171-173.
- Привалов П. Л., Монаселидзе Дж. Р., Мревлишвили Г. М., Магалдадзе В. Г. Теплота внутримолекулярного плавления макромолекул – ЖЭТФ, 47, 6, (12), 2073-2079, 1964.

- Привалов П. Л., Плотников В.В. Адиабатический дифференциальный микрокалориметр – Авт. Свид. № 328776, заяв. 1970. №1416006/18-10. Опубл. БИ 1974 №25.
- Сапин М. Р., Этинген Л. Е. Иммунная система человека. М. Медицина, 1996. 304 с.
- Саркисов Д. С. Регенерация и ее клиническое значение. М. Медицина, 1970. 310 с.
- Софронов Б. Н., Морозов В. Г., Хавинсон В. Х. И др. Полипептидный фактор тимуса - тималин в эксперименте и клинике // физиология человека. 1984. Т. 23. № 2. С. 229-233.
- Федоров Н. А. Регуляция пролиферации кроветворных клеток. М.. Медицина, 1997. 158 с.
- Филев Л. В., Хавинсон В. Х., Морозов В.Г. Регуляция функциональной активности стволовых клеток – предшественников грануломонопоэза полипептидными факторами тимуса и костного мозга // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1982. № 4. С. 94-95.
- Фриденштейн А. Я., Лурия Е. А. Клеточные основые кроветворного микроокружения. М.. Медицина, 1980. 216 с.

- Хавинсон В. Х. Итоги изучения и применения пептидных биорегуляторов в геронтологии // Геронтологические аспекты пептидной регуляции функций организма. СПб.. Наука, 1996. С. 84-85.
- Хавинсон В. Х. Тканеспецифическое действие пептидов // Бюл. экспер. Биол. мед. 2001. Т. 132, N 8. С. 228-229.
- Хавинсон В. Х., Малинин В. В., Чалисова Н. И., Григорьев Е. И. Тканеспецифическое действие пептидов в культуре тканей крыс разного возраста // Успехи геронтол. 2002. Вып. 9. С. 95-100.
- Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. Имунномодулирующее действие фактора тимуса в патологии // Иммунология. 1981. № 5. С. 483-486.
- Хавинсон В. Х., Морозов В. Г., Кузник Б.И. и др. Влияние полипептидов из предстательной железы на систему гемостаза // Фармакология и токсикология. 1985. № 5. С. 69-71.
- Хавинсон В., Морозов В. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. СПб. 2001, 160 с.
- Хавинсон В., Морозов В. Геропротекторная эффективность тималина и эпиталамина. Успехи геронтологии. 2002, 10, 74-84.
- Хавинсон В., Морозов В., Анисимов В. Влияние эпиталамина на свободнорадикальные процессы у человека и животных. Успехи геронтол. 1999, 3, 133-142.

- Хавинсон В. Х., Морозов В. Г., Кузник Б.И. Цитомедины и их роль в регуляции физиологических функций // Успехи современной биологии. 1985. Т. 115, N 3. С. 353-367.
- Хавинсон В. Х., Чалисова Н. И., Морозов В. Г., Малинин В.В. Роль пептидов тимуса в регуляции роста лимфоидной ткани у крыс разного возраста. Докл. АН. 369 // Докл. АН. 1999. Т. 369, N 5. С. 701-703.
- Хавинсон В. Х., Чалисова Н. И., Окулов В.Б. // Бюлл. Эксперим. биол. и медицины. 1998. Т. 125. N 3. С. 332-336.
- Хавинсон В. Х., Южаков В.В., Кветной И. М., Малинин В.В., Получиев В.В., Фомина Н. К. Иммуногистохимический и морфометрический анализ действия вилона и эпиталона на функциональную морфологию радиочувствительных органов // Бюлл. Эксп. Биол. мед. 2001. Т. 131, № 3. С. 338-346.
- Харинцева С. В. Влияние ретилина на течение экспериментальных тромбозов сосудов коньюнктивы и сетчатой оболочки // Цитомедины: Сб. Науч. Трудов. Вып. Второй / Под ред. Б. И. Кузника; Читин. Мед. академия. Чита, 1996. С. 28-30.
- Хмельницкий о.К., Гринцевич И. И., Григорьева З. Г. И др. Морфофункциональное состояние вилочковой железы морских свинок

при воздейитвии препаратов тимуса и костного мозга // Бюл. эксп.. биол. мед. 1975. Т. 48, № 7. С. 83-86.

- Чалисова Н. И., Журавский С. Г., Пеннияйнен В. А., Завалова Л.Л., Баскова И. П. Стимулирующее влияние лестабилазы, компонента секрета слюнных нейронов в культуре ткани // Цитология. 1999. Т. 41, N 1. С. 47-51.
- Чалисова Н. И., Хавинсон В. Х. Исследование цитокинов в культуре нервной ткани // Российский Физиол. Журн. 1999. Т. 85, N 1. С. 29-36.
- Чалисова Н. И., Хавинсон В. Х., Пеннияйнен В. А., Григорьев Е. И. Влияние полипептидных фракций тимуса на развитие органотипической культуры вилочковой железы и селезенки крысы // Цитология. 1999. Т. 41, № 10. С. 889-894.
- Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И. Ю. Пептидная саморегуляция живых систем (Факторы и гипотезы). СПб: Наука. 2003, 222 с.
- Ярилин А. А., Мирошниченко И. В., Шичкин в.П. Иммунологические функции тимуса // Итоги науки и техники ВИНИТИ Серия Иммунология. 1990. Т. 23. С. 1-192.
- Abibi A., Protozanova E., Demidov V.V., Frank-Kamenetskii M.D. Biophysical Journal. 86. 5. 2004. 3070-3078.

- Adinolfi S., Bagni C., Morelli M. Novel RNA-Binding Motif: the KH Module. Biopolymers (Peptide Sci.), 1999, Vol. 51, No. 2, 153-164.
- Albertis B., Bray D., Lewis J. Molecular Biology of the Cell. 3 rd. ed. New York: Garland Publish, 1994, 1294p.
- Anderson K., Anderson G., Michell R., Jenkinson E., Owen J. 1996. Intracellular Signaling Pathways Involved in the Induction of Apoptosis in Immature Thymic T Lymphocytes. J. Immunol. 156: 4083-4091.
- Andronokashvili E., Monaselidze J., Chanchalashvili Z., Majagaladze G. // Biofizika. 1983. V. 28(3). P. 528-537.
- Andronokashvili E., Mgeladze G., Monaselidze J., Lezius A. Biopolymers, 13, 1974, 1751-1756.
- Anisimov V., Arutjunian A., Khavinson V. Effect of and Pineal Peptide Preparation Epithalamin on Free-Radical Processes in Human and Animals. Neuroendocrinology Lett. 2001, Vol. 22, 9-18.
- Anisimov V., Khavinson V., Morozov V. Twenty Years of Study on Effect of Pineal Peptide Preparation: Epithalamin in Experimental Gerontology and Oncology. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1994, Vol. 719, 483-493.
- Bannister A., Zegerman P., Partridge JF., Miska EA., Thomas JO., Allshire RC., Kouzarides T., Selective Recognition of Methylated Lysine 9

on Histone H3 by the HP1 Chromo Domain, Nature, 410(6824), 120-124, 2001.

- Balbi C. M. L., Abelmosh A., Zunino C., Cunibert B., Cavazza P., Barbazo P., Patzone E. // Biochem. Pharmacol. J. 1988. V. 9. P. 1815-1816.
- Bird A. The Essential of DNA Methylation. Cell. 1992, Vol. 70, 5-8.
- Bloom S., Goodpasture C. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. Hum Genet, 1976; 34: 199-206
- Boguslaw Stec., Robert F., Troxler and Martha M. Teeter. Crystal Structure of C-Phycocyanin from Cyanidium caldarium Provides a New Perspective on Phycobilisome Assembly Biophys J, June 1999, p. 2912-2921, Vol. 76, No. 6.
- Cardellini E., Cinelli S., Gianfranceschi G., Onori G., Santucci A., Urbanelli L. Differential Scanning Calorimetry of Chromatin at Different Level of Condensation. Mol Biol Rep, 2000 **27** (3): 175-180.
- Cavazza B., Brizzolara G., Lazzarini E., Patzone M., Piccardo P., Barboro S., Parodi A., Pasini G., Balbi C. // Biochemistry. 1991. V. 30. P. 9060-9072.

- Claud H. Role of aromatic animo acid residues in the binding of enzymes and proteins to nucleic acids // Nature . New Biol. 1971. Vol. 234, N 47. P. 120-121.
- Dilman V., Anisimov V., Ostroumova M. Increase in Life Span of Rats
- - Following Polypeptide Pineal Extract Treatment. Exp. Pathol. 1979, 17, No. 9, 539-545.
- Dressler K. A., Mathias S., Kolesnick R. N. Tumor necrosis factoralpha activates the sphingomyelin signal transduction pathway in a cell-free system // Science. 1992. Vol. 255, N 5052. P. 1715-1718.
- Eissenberg J. C., Elgin S. C. R. // Curr. Opin. Genet. Dev. 2000. V. 10. P. 204-210.
- Jones D. A., Cowell J. G., Singh P. B. // BioEssays. 2000. V. 22. P. 124-127.
- Geenen V. G. The Neuroendocrine Immune Dialogue in the T- Cell Differentiation // Neuroendocrinology. 1990. Vol. 52, suppl. 1. P. 8-9.
- Gilbert S. biology of development. Moscow, Mir, 1994: 235
- Gill S. J. and Beck K. Differential Calorimeter for Measurements of Heat Transformation of Polymers. – Rev. Sci. Inst., 36, 274-276, 1965.

- Green M. I., Bach B. A. The Physiological Regulation of Immunity: Differential Regulatory Contribution of Peripheral and Central Lymphon Compartments // Cell. Immun. 1979. V. 45, N 2. P. 446-451.
- Hannun Y. A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide // J. Biol. Chem. 1994. Vol. 269, N 5. P. 3125-3128.
- Hippel P. H. von, McGhee J. D. DNA-protein interactions // Annu. Rev. Biochem. 1972. Vol. 41, N 1. P. 231-300.
- Karapetian A. T., Vardevanian P. O., Tarzikian G. A., Frank-Kamenetskii M.D. J. Biol. Str. Duman. 8. 1990. 152-155.
- Kerr F. W. L. Structural and Functional Evidence of Plasticity in Central Nervous System // Exptl Neurrol. 1975. V. 48, № 3 (2). P. 16-31.
- Khavinson VKh., Izmailov DM., Obukhova LK et. al. Effect of Epitalon on the Lifespan increase in Drosophila melanogaster. Mech Ageing Dev 2000; 120: 141-149.
- Khavinson VKh., Goncharova ND., Lapin BA. Synthetic Tetrapeptide Epitalon restores disturbed neuroendocrine regulation in sonescent monkeys. Neuroendocrinol Lett 2001; 22: 251-254.
- Khavinson V. Kh., Malinin V. V., Khavinson V. K., Malinin V. V., Karger S. Pub., April 2005.

- Khavinson V. Kh., Lezhava T. A., Monaselidze J. R., Jokhadze T. A., Dvalishvili N.A., Bablishvili N. K. Neuroendocrinology Lett. 4, 24, 2003, 329-333.
- Khavinson V. Kh. Peptides and Ageing, Neuroendocrinology. **23**, 111 - 144, 2002.
- Khavinson V., Morozov V., Anisimov V. Experimental Studies of the Pineal Gland Preparation Epithalamin. The Pineal Gland and Cancer. 2001, 294-306.
- Khavinson V., Lezjava T., Monaselidze J., Jokhadze T., Dvalishvili N., Bablishvili N., Ryadnova I. Effect of Livagen Peptide on Chromatin Activation in Lymphocytes from Old People. Bull. Exp. Biol. Med. 2002, Oct, 134(4), 389-392.
- Khavinson V., Lezjava T., Monaselidze J., Jokhadze T., Dvalishvili N., Bablishvili N., Trofimova S. Peptide Epitalon Activates Chromatin at the Old Age. Neuroendocrinology Lett. Nos. 3/4, Jun-Aug, Vol. 34, 2003.
- Khavinson VK, Trofimova SV. [The use of Peptide Bioregulators in Ophthalmology (In Russian with English Abstract)]. Vestn Oftalmol 1999; **115**: 42-45.

- Khavinson VK, Morozov VG, Rybnikov VI, Zakutskii NG. [Cortexin Effectiveness in Circulatory Encephalopathy (In Russian with English Abstract)]. Klin Med (Mosk) 1999; **77**: 42-45.
- Khavinson VKh., Trofimova SV. [Bioregulatory Therapy: a New Trend in Treatment of Diabetic Retinopathy (In Russian with English Abstract)]. Mezhdunarodnyi Meditsynskiy Zhurnal 2001; **No 2**: 91-93.
- Korkushko OV., Khavinson VKh., Butenko GM., Shatilo VB. Peptide preparations of Thymus and pineal giand in prevention of accelerated aging. St. Petersburg , Nauka, 2002: 202.
- Kuhn H., Demidov V.V., Frank- Kamenetskii M.D. Angew. Chem. Int. Ed., Engl. 38, 1999, 1446-1449.
- Kuhn H., Cherny D.I., Demidov V.V., Frank- Kamenetskii M.D. PNAS, 101, 20, 2004, 7548-7553.
- Lazurskin Y. S., Frank- Kamenetskii M.D., Trifonov E. N. Biopolymers, 9, 1970, 1253-1306.
- Lezhava T. Human chromosomes in very senile age. Tbilisi State University, 1991; 237.
- Lezhava T. A. Chromosomes in very senile age. 80 years and over. Moscow, Nauka, 1999; 256.

- Lezhava T. A. Chromosome and aging: genetic conception of aging. Biogerontology, 2001; 2: 253-260.
- Lezhava T., Khavinson V., Monaselidze J., Jokhadze T., Dvalishvili N., Bablishvili N., Barbakadze Sh. Bioregulator Vilon-Induced Reactivation of Chromatin in Cultured Lymphocytes from Old People, Biogerontology 5, 73-79, 2004.
- Levi-Montalchini R., Angeletty P. Nerve growth factor. // Physiol. Rev. 1968. Vol. 48. P. 534-569.
- Lepock J. R., Frey H. E., Senisterra G. A., Heynen M. P. // Radiat. Res. 1995. V. 2. P. 1895-1995.
- Liu S., Zhang Y., Mu Y., Su X., Liu J. Thymocyte Apoptosis in Response to Low-Dose Radiation // Mutat. Res. 1996. Vol. 358. P. 185-191.
- Majagaladze G., Monaselidze J., Chikvashvili R. - Author' s Certificate No. 1267175 USSR, 1986.
- Mathias S., Younes A., Kan C. C. et. al. Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell- free system by IL-1 beta // Science. 1993. Vol. 259, N 5094. P. 519-522.
- Miller J. F. The Role of the Thymus in Immunity - Thirty Years of Progress // The Immunologist. 1993. Vol. 1, N 1. P. 9-15.

- Monaselidze J., Barbakadze Sh., Kvirikashvili T., Majagaladze G., Khachidze D., Topchishvili L. // Biomacromolecules. 2002. V. 3, № 4. P. 783-786.
- Monaselidze J. R., Chanchalashvili Z. I., Mgeladze G. N., Majagaladze G.V., Chitadze G. Sh. // J. Polymer Science. 1981. V. 69. P. 17-20.
- Monaselidze J., Kalandadze Ya., Khachidze D. // J. Thermal Analysis. 1996. V. 46. P. 431-440.
- Monaselidze J., Abuladze M., Asatiani N., Kiziria E., Barbakadze Sh., Majagaladze G. Iobadze M., Tabatadze L., Holmanc Hoi- Ying., Sapojnikova N. Characterization of Chromium-Induced Apoptosis in Cultured Mammalian Cells: A Differential Scanning Calorimetry Study Thermochimica Acta, **441,** 8-15, 2006.
- Morozov V.G., khavinson V.Kh. Natural and Sythetic Thymic Peptides as Therapeutics for Immune Disfunction // Int. J. Immunopharmacology. 1997. Vol. 19, N 9 / 10. P. 501-505.
- Morozov V.G., khavinson V.Kh., Malinin VV. Peptide Thymomimetics. St. – Petersburg: Nauka; 2000.
- Piguet, P. F., Irle, C., Vassalli, P. Immunosuppressor Cells from Newborn Mouse Spleen are Macrophages Differentiating *in vitro* from Monoblastic Precursors // Eur. J. Immunol. 1981. V 11, N 1. P. 56-61.

- Rozenfeld SV., Togo EF., Mikhaev VS et. al. Effect of Epitalon on the frequency of chromosome aberrations in mice SAM with accelerated aging. Bull Exp Med, 2002; **133:** 320-322.
- Rybakina E. G., Nalivaeva N. N., Kozinets I. A. et. al. Involvement of the sphingomyelin pathway in interleukin – 1 signalling in murine immunocompetent and nerve calls // Immunol. Lett. 1997. Vol. 56, N 1-3. P. 67.
- Rybakina E. G., Pivanovich I. Yu., Nalivaeva N. N. et. al. IL-1 signalling via the sphingomyelin pathway in murine immune and nerve calls under stress // Neuroimmunomodulation. 1998. Vol. 5. P. 41.
- Sztein M. B., Goldstein A. L. Thymic Hormones: A Clinical Update // Springer Semin. Immunopathol. 1986. V. 9. P. 1-18.
- Topchishvili L. S., Barbakadze Sh. V., Khizanishvili A. I., Majagaladze G. V., Monaselidze J. R. // Biomacromolecules. 2002. V. 3, № 3. P. 415-420.
- Touchette NA., Cole D. Differential Scanning Calorimetry of nuclei reveals the loss of structural features in chromatin by brief nuclease treatment. Natl Acad Sci USA, 1985; **82:** 2642-2646.
- Uhlmann E., Peymann A., Breipohl G., Will D. W. Angew. Chem. Int. Edit. 37, 1998, 2796-2823.

- Zhao T., Heiduk T., Allis C., Eissenberg J. C. // L. Biol. Chem. 2000. V. 278. P. 2832-2838.