

ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტის

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

მარიამ შუბითიძე

G4 დენდრიმერისა და დნმ-ის კომპლექსის სტაბილობის
კალორიმეტრული კვლევები

სამაგისტრო ნაშრომი შესრულებულია ბიოფიზიკის მაგისტრის
აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელები:

თამაზ მძინარიშვილი
სრული პროფესორი,

ეკა შეყილაძე
ბიოფიზიკის დოქტორანტი

თბილისი
2013 წელი

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University

Faculty of exact and natural sciences

Mariam Shubitidze

**Study of stability of G4 Dendrimer and DNA complexes
by calorimetric method**

Master's thesis is performed in order to going Biophysics
master's academic degree

Scientific supervisors:

Tamaz mdzinarishvili

Full Professor

Eka Shekiladze

PhD student

Tbilisi 2013

აბსტრაქტი

შესწავლილი იქნა PAMAM G4 დენდრიმერის და მისი ორჯაჭვიან დნმ-ის მოლეკულასთან ურთიერთქმედების თერმოდინამიკური თვისებები. შესწავლის შედეგად დადგინდა, რომ დნმ-ის მოლეკულა წარმოქმნის კომპლექსს დენდრიმერთან. კომპლექსის წარმოქმნაზე მიუთითებს მიკროკალორიმეტრული მეთოდით მიღებული ექსპერიმენტები. კერძოდ, ნათლად ჩანს, რომ დენდრიმერის დნმ-თან შერევისას დენდრიმერი უპირატესად უკავშირდება დნმ-ის მოლეკულაში გუანინ-ციტოზინ წყვილების მდიდარ უბნებს. ამაზე მიუთითებს დნმ-ის ლლობის მრუდზე შესაბამისი ტემპერატურულ ინტერვალში გუან-ციტოზინის-თვის დამახასიათებელი მცირე ზომის პიკის მნიშვნელოვანი შემცირება, ისე რომ ლლობის მრუდი სხვა ცვლილებას არ განიცდის.

გარდა ამისა შესწავლილი იქნა დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის თვისებები სხვადასხვა მჟავიანობის (pH 4.6-8.0) გარემო პირობებში. მიღებული კვლევები მიუთითებს იმას, რომ pH მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს დნმ-დენდრიმერის კომპლექსზე. კერძოდ, ადგილი აქვს ლლობის კუთრი ენტალპიის მნიშვნელობის ცვლილებას pH მიმართებაში.

Abstract

Were studied PAMAM G4 double circuit and its DNA interaction with the thermodynamic properties of molecules of Dendrimer. As a result of study, has been revealed that DNA molecules form a complex with Dendrimer. About complex formation indicates experiments obtained by micro-calorimetric method. Namely, it is clearly visible that when mixing Dendrimer with DNA molecule, the Dendrimer predominantly is connected with rich areas of pairs of Guanine – Cytosine in DNA molecules. About this fact indicates the DNA melting curve in the temperature interval, significant reduction in small size peak characterized for Guanine – Cytosine, so that the melting curve does not suffer other changes.

In addition was studied DNA - Dendrimer complex features of a variety acidity of (pH 4.6-8.0) environmental conditions. The research shows that pH has a significant influence on DNA - Dendrimer complex. Namely, takes place enthalpy meaning change on pH direction by melting point.

სარჩევი

შესავალი	6
--------------------	---

I თავი. ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1 დენდრიმერების ზოგადი დახასიათება	8
1.1.1 დენდრიმერების სინთეზი	10
1.1.2 PAMAM G4 დენდრიმერი	12
1.1.3 დენდრიმერის თვისებები.	14
1.2 დნმ-ის მოლეკულის დახასიათება	17
1.2.1 დნმ-ის სტრუქტურა	17
1.2.1 დნმ-ის ორმაგ-სპირალური სტრუქტურის მასტაბილიზირებელი ძალები	21
1.2.2. სპეციფიური და არასპეციფიური ურთიერთქმედების სახეები დნმ-ის ჯაჭვთან	22

II თავი. ექსპერიმენტული ნაწილი

2.1 საკვლევი მასალები	24
2.2 ნაშრომში გამოყენებული მეთოდების აღწერა	25
2.2.1 სპექტროფოტომეტრული მეთოდი	25
2.2.2 დიფერენციალური მიკროკალორიმეტრული მეთოდი	26

III ექსპერიმენტული შედეგები და მათი განხილვა

3.1 ჩატარებული ექსპერიმენტები და მიღებული შედეგების ანალიზი.	36
დასკვნები	46
გამოყენებული ლიტერატურა	47

შესავალი

დღეისათვის იზრდება ინტერესი პოლიმერების მოხმარებაზე, რადგან შესაძლებელია ისინი გამოყენებული იყოს როგორც სამკურნალო პრეპარატების ტრანსპორტირების ერთ-ერთი საშუალება. ნანონაწილაკები, მიკროსფეროები, პოლიმერული მიცელები და დენდრიმერები წარმოადგენენ მნიშვნელოვანი პოლიმერულ ნაწილაკების კლასს, რომლებიც გამოიყენება სამკურნალო პრეპარატების, მათ შორის გენის (დნმ-ის უბნის) გადატანისათვის სამიზნე უჯრედებში.

დენდრიმერისა და ბიოლოგიური მემბრანების ურთიერთქმედების შესწავლას ეთმობა ძალიან დიდი ყურადღება, ვინაიდან ამ ურთიერთქმედების შეაწავლა დაგვეხმარება ნანონაწილაკების მეშვეობით წამლის გადატანის მექანიზმის დადგენაში. ამის გამო, დენდრიმერებმა როგორც წამლის გადამტანმა სისტემებმა მიიქცია უამრავი მეცნიერის ყურადღება. დიდი ძალისხმევის მიუხედავად ჯერ ბოლომდე არ არის შესწავლილი დენდრიმერის უჯრედში შესვლის და უჯრედული მემბრანის გადალახვის მექანიზმები.

ასევე მნიშვნელოვანია შეიქმნას უსაფრთხო და ეფექტური პოლიმერული ნაწილაკები, რომლის საშუალებითაც შესაძლებელი გახდება განხორციელდეს ცოცხალ ორგანიზმში სამიზნე უჯრედებამდე საჭირო გენური მასალის დაუზიანებლად გადატანა და მისი უჯრედში შეტანა. ამ შემთხვევაში შესაძლებელია გამოყენებული იყოს ისეთი ნანონაწილაკები, როგორიცაა დენდრიმერები, რომლებიც დნმ-ის გენურ მონაკვეთებთან წარმოქმნის არასპეციფიურ ურთიერთქმედებას (მაგალითად ელექტროსტატიკური სახის) და რაც მთავარია ამ კომპლექსს ექნება უნარი შეაღწიოს უჯრედის შიგნით, სადაც უჯრედის ფერმენტული სისტემის მიერ მოხდება მხოლოდ ნანონაწილაკების დაშლა.

ვინაიდან PAMAM დენდრიმერებს გაჩნიათ უდიდესი პოტენციალი ნანოთერაპიაში, PAMAM დენდრიმერების და მათი ბიომოლეკულებთან კომპლექსის შესწავლა, შეიძლება დაგვეხმაროს მოხდეს ეფექტურად წამლის უჯრედში გადატანა. უარყოფითი ზედაპირული მუხტის დენდრიმერებს შეუძლიათ დადებითად დამუხტული ბიოლოგიურად აქტიური მოლეკულები მიიტანონ მაგალითად, ბაქტერიულ ან სიმსივნურ უჯრედებთან. დენდრიმერის სპეციფიური შენაერთის სამიზნე რეცეპტორებმა შესაძლებელია ხელი შეუშალოს სხვა ნაერთებს, რომელთაც წამალი ზუსტად მიაქვს კონკრეტულ უჯრედთან. შესაბამისად, PAMAM დენდრიმერის და მემბრანის ურთიერთქმედების შესწავლა ხელს შეუწყობს დენდრიმერზე დაფუძნებული ეფექტური ნანოტექნოლოგიების გამომუშავებას. უმეტეს შემთხვევაში, მაკრომოლეკულების და ნანონაწილაკების კომპლექსი უნდა იყოს სტაბილური ფიზიოლოგიურ pH-ზე [11] და შეეძლოს გადალახონ ლიპიდური ბიჰრის ჰიდროფობული ნაწილი.

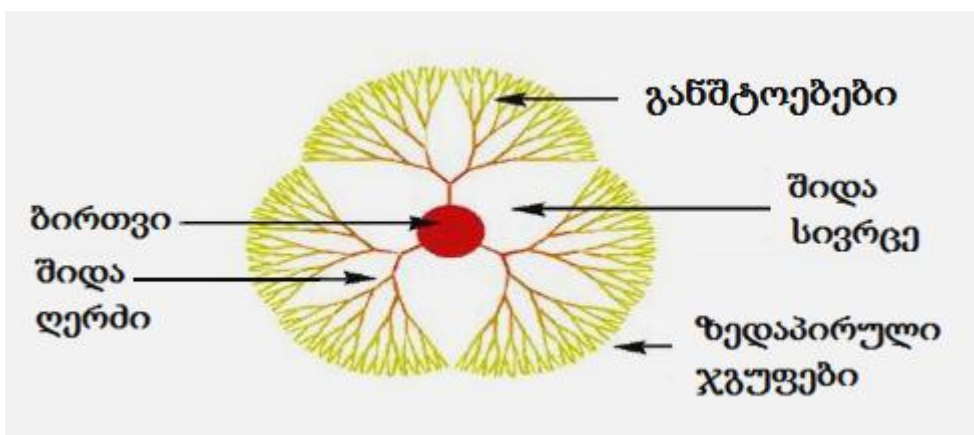
დენდრიმერის უჯრედში შეღწევის მექანიზმი ჯერ კიდევ დასადგენია. წარმოდგენილი იყო რამოდენიმე თეორია, საიდანაც გამოსაყოფია ადსორბციული ენდოციტოზი, რომელიც მოიცავს ამობრუნებული მიცელის და მემბრანული ხვრელის ფორმირებებს. ძირითადი ძალები რომლების გადალახვაც უხდებათ უჯრედში შეღწევად სისტემებს არიან ელექტროსტატიკული და ჰიდროფობული ძალები. ყველაფრის მიუხედავად, ჯერჯერობით გაუგებარია დენდრიმერების უჯრედში შეღწევის მექანიზმი. ეს ფაქტი გვიჩვენებს რომ აუცილებელია მეტი კვლევის ჩატარება *in vitro*-ს პირობებში, სანამ დენდრიმერების გამოყენება მოხდება მედიცინაში.

I თავი. ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1 დენდრიმერების ზოგადი დახასიათება

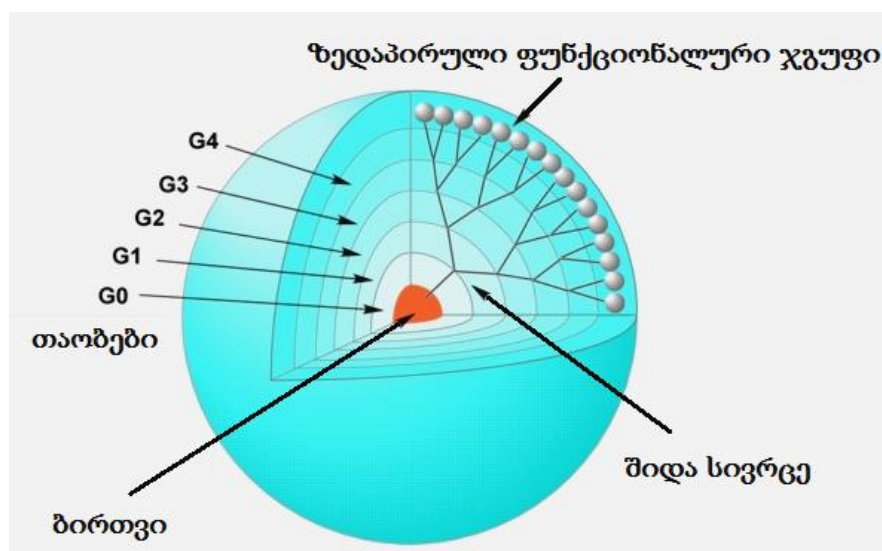
დენდრიმერები სფეროს ფორმის ნანონაწილაკებია, რომლის ზომა 1-10 ნმ რიგისაა, ისინი ჰიპერგანშტოებადი და მონოდისპერსიული სამ გამზომილებიანი მოლეკულებია. დენდრიმერი არის პერსპექტიული როგორც წამლის გადამტანი საშუალება, რადგან მათ აქვთ განსაზღვრული მოლეკულური ზომა და ფორმა, ზედაპირზე აქვთ დიდი რაოდენობით ფუნქციური ჯგუფები და ხასიათდებიან უჯრედში შეღწევადობის მაღალი უნარით. დენდრიმერები შედგება შემდეგი სტრუქტურული კომპონენტისაგან [1]:

1. ინიციატორი ბირთვი.
2. შიდა შრე.
3. შიდა ღერძი.
4. გარეგანი, საბოლოო ფუნქციონალური ჯგუფები. (სურ.1)



სურ.1 დენდრიმერის სტრუქტურა

დენდრიმერის ბირთვის გარშემო ხდება შრეების ეტაპობრივი ზრდა ბირთვის ცენტრიდან ზედაპირისაკენ, რის შედეგადაც იზრდება სივრცეში სეგმენტებს შორის დაშორებათა რაოდენობა [2]. შრეების რაოდენობას, რომელიც მიმდინარეობს დენდრიმერის ცენტრიდან ზედაპირისაკენ დენდრიმერის თაობას უწოდებენ და აღნიშნავენ “G” ასოთი [24]. (სურ.2)



სურ.2 დენდრიმერის სტრუქტურული ერთეულები და თაობები

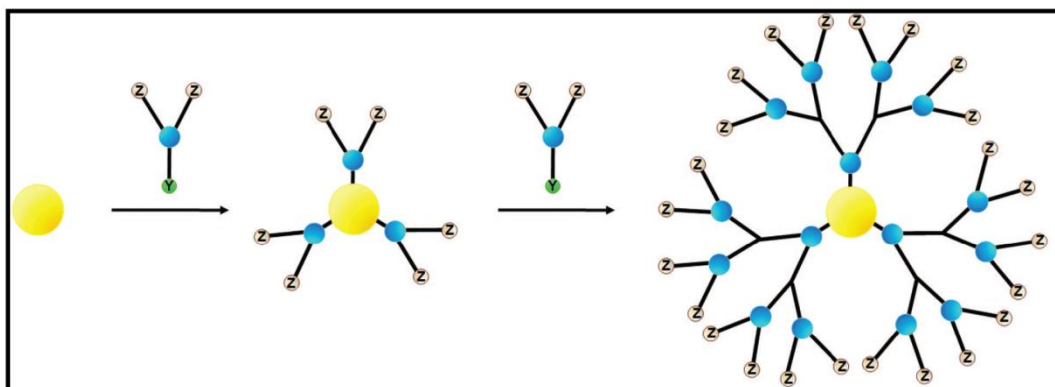
თაობების ზრდა იწვევს დენდრიმერის მოლეკულური წონის, ზომის და ზედაპირზე არსებული ჯგუფების ზრდას. ბოლო 30 წლის განმავლობაში მიმდინარეობს დენდრიმერების სინთეზი სხვადასხვა ქიმიური შედგენილობით, რომლებიც აქტიურად გამოიყენება ბილოგიასა და მედიცინაში, როგორც ქიმიოთერაპიული აგენტი კიბოთი დაავადებული უჯრედების სამკურნალოდ. [3] რეზულტატად აღებულია სფერული მაკრომოლეკულური სტრუქტურები, რომელთა ზომა მსგავსია ალბუმინის და ჰემოგლობინის, მაგრამ უფრო მცირე ვიდრე მულტიმერები.

უმეტეს შემთხვევაში, მაკრომოლეკულები რომლებიც აღწევენ უჯრედში არიან კათიონ აქტიური ფიზიოლოგიურ pH-ზე. ფიზიკო-ქიმიური თვალსაზრისით საინტერესოა ის, რომ შედარებით დიდი და მაღალი მუხტის მქონე მოლეკულებს შეუძლიათ გადალახონ ლიპიდური ბიშრის ჰიდროფობული ნაწილი [11]. დენდრიმერის უჯრედში შეღწევის მექანიზმი ჯერ კიდევ დასადგენია. წარმოდგენილი იყო რამოდენიმე თეორია, ისეთი როგორც: ადსორბციული ენდოციტოზი, ამობრუნებული მიცელის ფორმირება და მემბრანული ხვრელის ფორმირება. ძირითადი ძალები რომლებიც მართავენ ურთიერთქმედებას უჯრედში შეღწევად სისტემებს არიან ელექტროსტატიკული და ჰიდროფობული ძალები, რომლებმაც საბოლოოდ შეიძლება ოსმოსური დისბალანსი გამოიწვიოს[1].

1.1.1 დენდრიმერების სინთეზი

1979 წლიდან დენდრიმერებს ზოგადად ამზადებენ ორი ძირითადი მეთოდით. პირველი დაინერგა ტომალის მიერ და ეწოდებოდა „დივერგენტული მეთოდი“ ანუ განშტოების მეთოდი, რომელშიც ზრდა ხდება ძირითადი საიტიდან.

დივერგენტული სინთეზის დროს ინიციატორი ბირთვიდან პერიფერიებისაკენ მიმდინარეობს შრეების ეტაპობრივი ზრდა. დენდრიმერის მოლეკულის ბირთვი რეაგირებს მონომერულ მოლეკულებთან, რომლებიც დენდრიმერების პირველ თაობაში შეიცავენ ერთ აქტიურ და ორ პასიურ ჯგუფს. დენდრიმერის მოლეკულის თითოეული შრე არის აქტიური ახალ მონომერებთან რეაქციაში შესასვლელად [4]. ეს პროცესი არის განმეორებადი რამოდენიმე თაობისთვის და სწორედ ამიტომ მიმდინარეობს დენდრიმერის ფენა-ფენა აშენება (სურ.3).



სურ.3 დეგრადირებადი მეთოდის სინთეზის სქემა

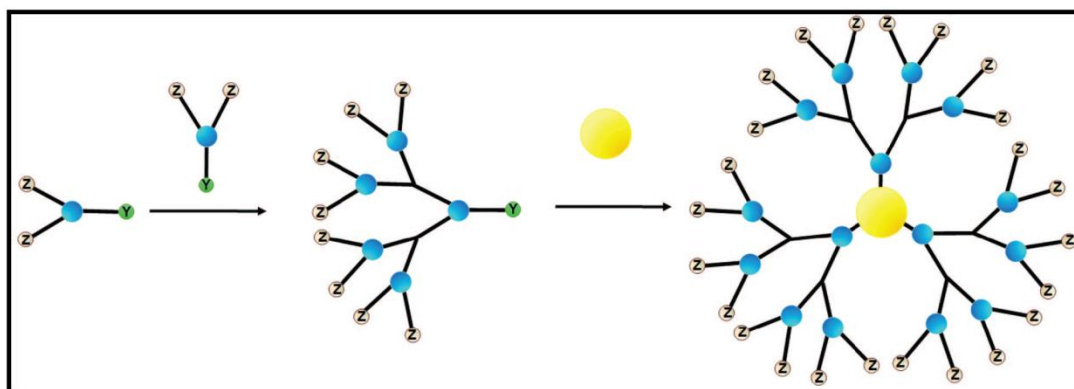
ყვითელი-ბირთვი

მწვანე-ფოკუსური წერტილი

ლურჯი-თაობა

Z-ზედაპირული ჯგუფი

მეორე მეთოდი დაფუძნებულია ჰოუკერის და ფრეჩეტის მიერ, მათ გამოიყენეს „კონვერგენტული ზრდის პროცესი“ ანუ ცენტრისკენ მიმართული, რომელშიც რამოდენიმე დენდრონი რეაგირებს მრავალფუნქციურ ცენტრთან პროდუქტის მისაღებად (სურ.4).



სურ. 4 კონვერგენტული მეთოდის სინთეზის სქემა

ყვითელი-ბირთვი

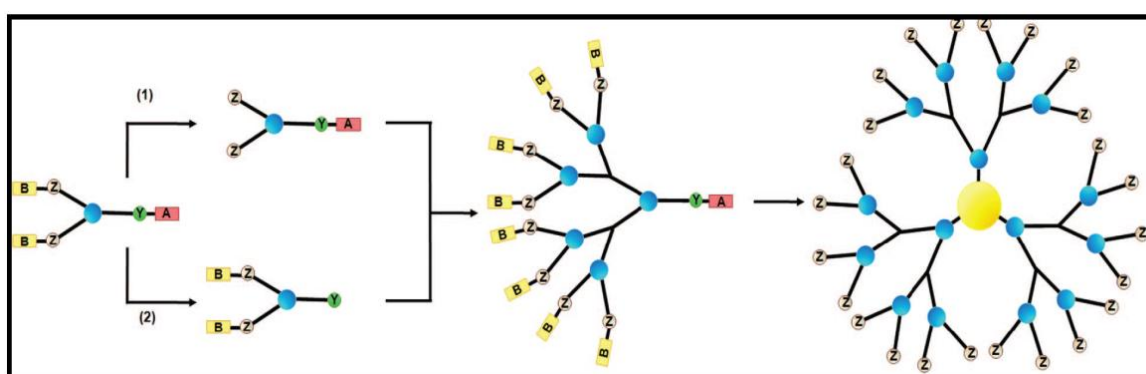
მწვანე-ფოკუსური წერტილი

ლურჯი-თაობა

Z-ზედაპირული ჯგუფი

კონვერგენტული სინთეზის დროს დენდრიმერის თითოეული საბოლოო ჯგუფი უკავშირდება დენდრიმერის თაობებს, როდესაც განშტოება მიაღწევს გარკვეულ ზომას ის უერთდება დენდრიმერის მრავალფუნქციურ ინიციატორულ ბირთვს რათა აწარმოოს სრული დენდრიმერი. [5].

გარდა ამისა ასევე არსებობს კომბინირებული სინთეზი, რომელიც კონვერგენტულ-დივერგენტული სინთეზის სახელითაა ცნობილი (სურ.5).



სურ.5 კონვერგენტულ-დივერგენტული მეთოდის სინთეზის სქემა

ყვითელი-ბირთვი

მწვანე-ფოკუსური წერტილი

ლურჯი-თაობა

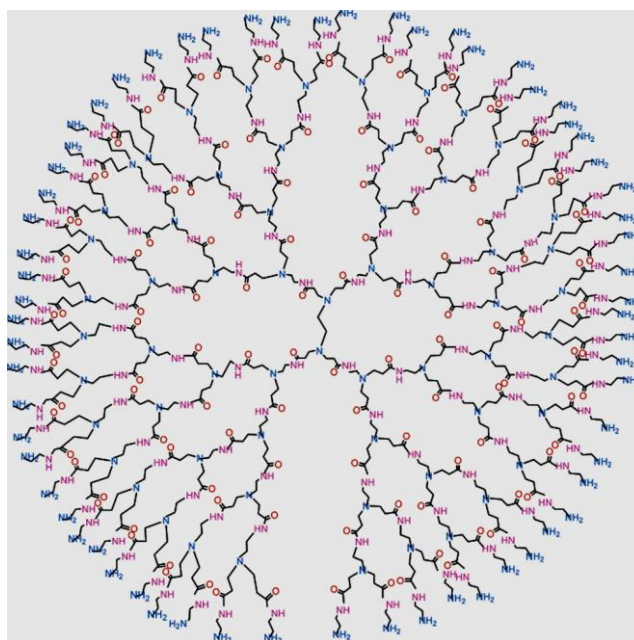
„A“ და „B“- დაცვითი ჯგუფი

Z-ზედაპირული ჯგუფი

დენდრიმერების სინთეზის კონვერგენტულ-დივერგენტული მეთოდის გაერთიანება ყველაზე მნიშვნელოვანი მიდგომა გახდა დენდრიმერების სინთეზის პრაქტიკაში, რომელიც ასევე ორმაგი ექსპონენციალური ზრდის კონცეფციის სახელითაა ცნობილი. ასეთი მიდგომა გვადლევს საშვალებას მივიღოთ მონომერები, როგორც კონვერგენტული ასევე დივერგენტული ზრდით ერთი საწყისი მასალისგან [6].

1.1.2 PAMAM დენდრიმერი

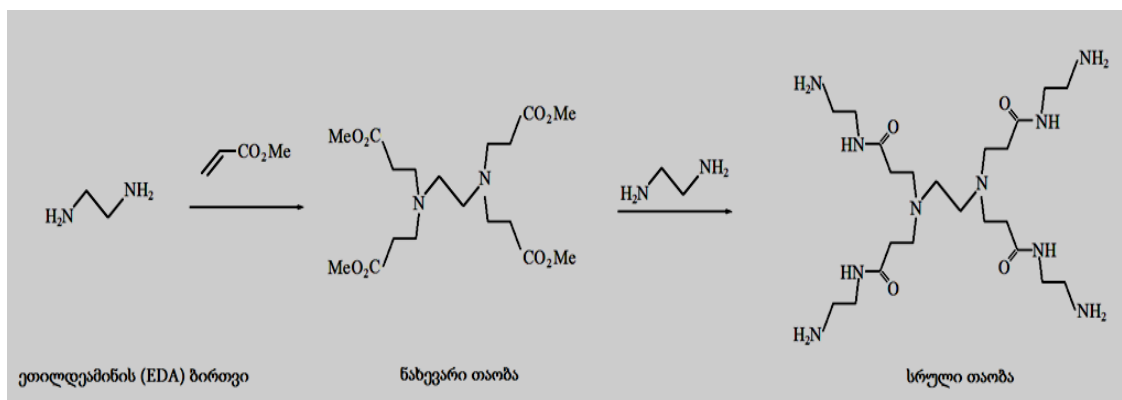
დენდრიმერების რამოდენიმე სახეობა არსებობს, რომლებიც ერთმანეთისაგან განსხვავდებიან ქიმიური შედგენილობით, სტრუქტურული ერთეულებით და შრეების რაოდენობით. მათგან ყველაზე კარგად შესწავლილია პოლიამიდოამინი (PAMAM) დენდრიმერი (სურ.6).



სურ.6 PAMAM G4 დენდრიმერის სტრუქტურა

პოლიამიდოამინი, ანუ PAMAM დენდრიმერების სინთეზი დაფუძნებული არის ბირთვზე და დატოტვილი ერთეულები შეგდებიან აკრილატისაგან და ეთილდეამინისგან, ეგრეთ წოდებული EDA, ამის გამო ყოველი დონე მიიღება ორი ეტაპისაგან. ჯერ ამინოჯგუფები რეაგირებენ მეთილ აკრილატის მონომერებთან და შენმდეგ ემატება ეთილენდიამინი. (სურ.7)-ზე წარმოდგნილია PAMAM G0 თაობის დენდრიმერი სინთეზი დივერგენტული მეთოდით. PAMAM დენდრიმერები ჩვეულებრივ გამოიყენება მეთანოლის

ხსნართან ერთად და ამის გამო ის კარგად იხსნება როგორც წყალში ასევე პოლარულ გამხსნელებში..[7, 8].



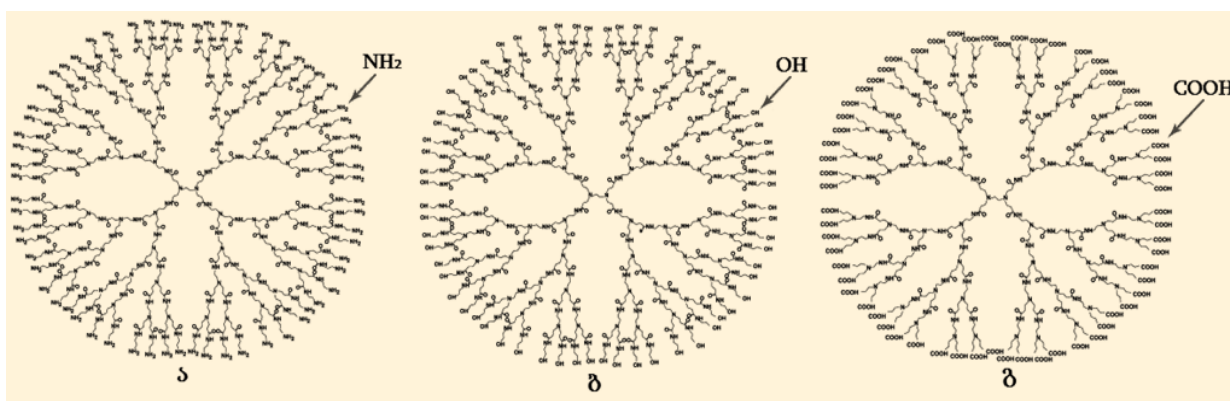
სურ.7 PAMAM G0 დენდრიმერის სინთეზი.

დენდრიმერების მიღებისათვის სინთეზის ამ მეთოდის გამოყენება საშუალებას იძლევა მიღებულ იქნეს ორგანიზებული და შედარებით მონოდისპერსიული პოლიმერები, რომელთა შრეების რაოდენობა, მოლეკულური წონა და დაბოლოებები კონტროლირებადია. ცხრილიცხრილში მოცემულია PAMAM დენდრიმერის G0-დან G9-მდე თაობების ფიზიკური და ქიმიური თვისებები, რომლის ბირთვსაც წარმოადგენს ეთილდამინი ხოლო მისი განშტოებები დაბოლოებულია NH₂ ჯგუფებით (ცხრილი1) [9].

თაობების ნომერი	NH ₂ ჯგუფების რაოდენობა ზედაპირზე	მოლეკულური მასა (Da)	დიამეტრი (nm)
0	4	517	1.4
1	8	1 430	1.9
2	16	3 256	2.6
3	32	6 909	3.6
4	64	14 215	4.4
5	128	28 826	5.7
6	256	58 048	7.2
7	512	116 496	8.8
8	1024	233 383	9.8
9	2048	467 162	11.4

ცხრილი1. PAMAM დენდრიმერის G0-დან G9-მდე თაობები

PAMAM დენდრიმერები ჩვეულებრივ გამოიყენება მეთანოლის ხსნართან ერთად და მიიღება პატარა თაობების გადაკვეთით. PAMAM დენდრიმერის პირველი შრე, ანუ G0 თაობა შეიძლება მიღებული იყოს ეთილდეამინისგან, რომლის ოთხივე განშტოება ბოლოვდება NH_2 ჯგუფით (სურ.8ა). ასევე G0 თაობა შეიძლება მიღებული იყოს ეთანოლამინისგან, რომლის ოთხივე განშტოება ბოლოვდება OH ჯგუფით (სურ.8ბ) და PAMAM დენდრიმერის G0.5 თაობა მიიღება ეთილის საშუალებით, რომლის ოთხივე განშტოება ბოლოვდება COOH ჯგუფებით (სურ.8გ). [25,29]

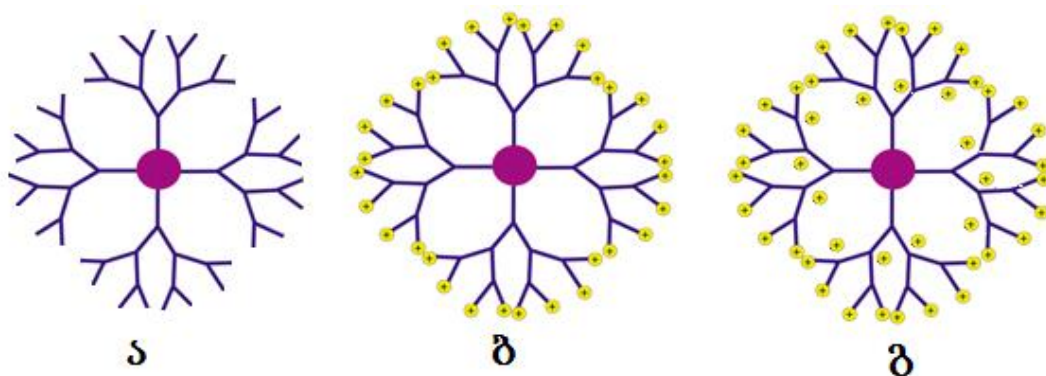


სურ. 8 PAMAM G4 დენდრიმერი ა) NH_2 , ბ) OH და გ) COOH ზედაპირული ჯგუფებით.

ჩვენს ექსპერიმენტებში გამოყენებულია მე-4 თაობის პოლიამიდოამინი დენდრიმერები, რომლებიც არის წყალში ხსნადი. PAMAM G4 დენდრიმერები სფეროს ფორმის ნანონაწილაკებია, რომლის დიამეტრი 4-ნმ რიგისაა, მისი მოლეკულური მასა უდრის 14215 გ/მოლს და ზედაპირი შედგება 64 ამინო ჯგუფისგან. [9,29].

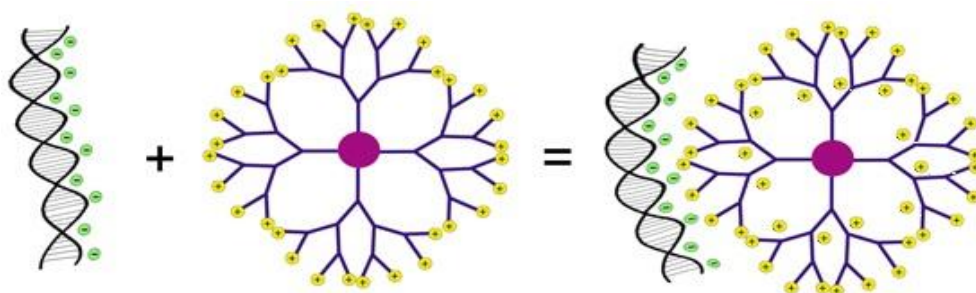
1.1.3 დენდრიმერის თვისებები

დენდრიმერები ხასიათდებიან მნიშვნელოვანი ფიზიკური და ქიმიური თვისებებით, რის გამოც ისინი გამოიყენება სამკურნალო პრეპარატების ტრანსპორტირებისთვის და გენის, (დნმ-ის) გადატანისათვის სამიზნე უჯრედებში. დენდრიმერები ხასიათდებიან შემდეგი თვისებებით: [1, 10].



სურ. 8. დენდრიმერის ზედაპირული ჯგუფები ა) pH 3 ბ) pH 7 გ) pH 10 მნიშვნელობის დროს.

იქიდან გამომდინარე რომ დენდრიმერის ფუნქციონალური ჯგუფები არის pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობაზე დადებითად დამუხტული უარყოფითი მუხტის მქონე დნმ-თან წარმოქმნის კომპლექს, რომელსაც დენდრიპლექსი ეწოდება [12] (სურ.9)



სურ.9 დნმ-დენდრიმერის კომპლექსი

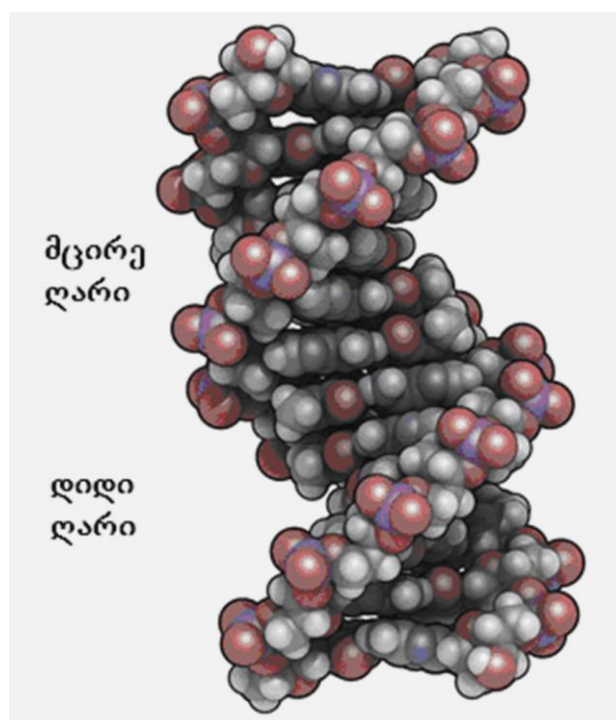
აღმოჩენილი იქნა რომ დნმ, ისევე როგორც რნმ, საგრძნობლად ამცირებს ამინო ჯგუფების მქონე დენდრიმერების ციტოტოქსიურობას. ეს სავარაუდოდ გამოწვეული უნდა იყოს საერთო დადებითი მუხტის შემცირებასთან უარყოფითად დამუხტული დნმ-თან კომპლექსის წარმოქმნის გამო უ-დნმ-ო დენდრიმერთან შედარებით. ეს დენდრიმერ-დნმ კომპლექსი ურთიერთქმედებს და აღწევს მემბრანაში ძირითადად ენდოციტოზის სახით, რაც არა ტოქსიკური მემბრანის განჭოლვაა- ალტერნატიული გზა ციტოტოქსიკური ხვრელების ფორმირებისა, რასაც უჯრედის ლიზისი მოყვება. ტრანსფექცია მექანიზმდება ენდოციტოზით და ენდოსომური გამოთავისუფლებით დენდრიმერ-დნმ-ის კომპლექსით უჯრედში შემდეგი მიწოდებით [12].

1.2 დნმ-ის მოლეკულის დახასიათება

1.2.1 დნმ-ის სტრუქტურა

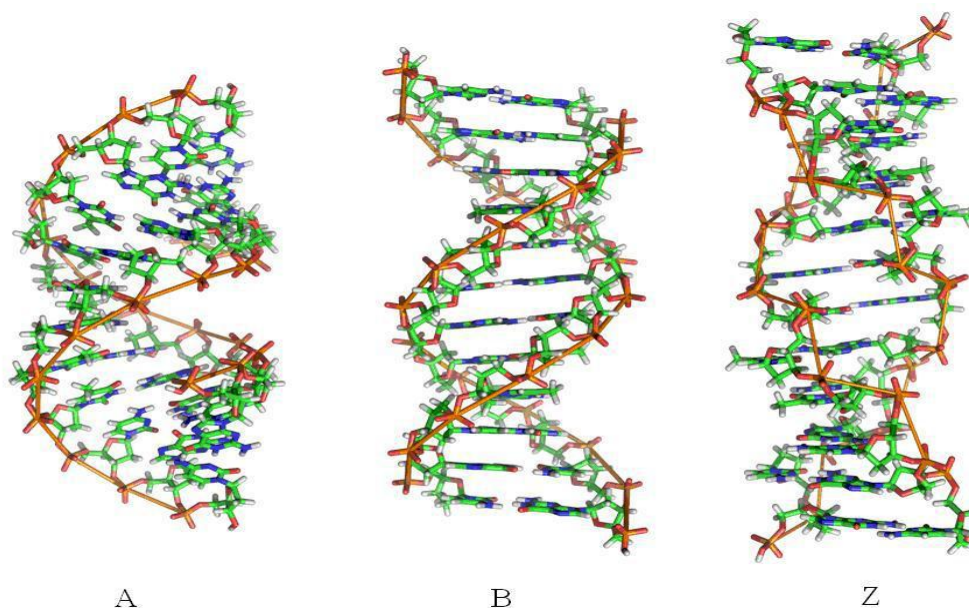
დნმ ცოცხალ ორგანიზმში არსებული ერთ-ერთი უმნიშვნელოვანესი მაკრომოლეკულაა, რომლის ფუნქციას გენეტიკური ინფორმაციის შენახვა და საჭიროების შემთხვევაში მისი გამოყენება წარმოადგენს [13]

1953 წელს უოტსონისა და კრიკის მიერ რენტგენოსტრუქტურულ მონაცემებზე დაყრდნობით შემოთავაზებულ იქნა დნმ-ის ორჯაჭვიანი სპირალური სივრცული სტრუქტურა (სურ. 5), რომლის მიხედვით დნმ-ის მოლეკულა წარმოადგენს წრფივ პოლიმერს და რომლის მონომერს წარმოადგენს ნუკლეოტიდები. ნუკლეოტიდი შედგება 5'- ან 3'- პოზიციაში ფოსფორილირებული შაქრისგან (დეზოქსირიბოზასაგან), რომლის C1- ატომი დაკავშირებულია ერთ-ერთ აზოტოვან ფუძესთან გლიკოზიდური ბმით C1-N. დნმ-ში ჰეტეროციკლურ რგოლებს წარმოადგენენ პურინები: ადენინი (A), გუანინი (G) და პირიმიდინები: ციტოზინი (C), თიმინი (T). 3'-5' ფოსფოდიეთერული კავშირებით ნუკლეოტიდების გადაბმით წარმოიქმნება დნმ-ის ნუკლეოტიდური ჯაჭვი (სურ. 6). როგორც წესი ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობას ჯაჭვში კითხულობენ 5'-დან 3'-მიმართულებით. გენეტიკურად განსაზღვრული ნუკლეოტიდების თანამიმდევრობა გვამღევს ინფორმაციას დნმ-ის მოლეკულის პირველადი სტრუქტურის შესახებ.



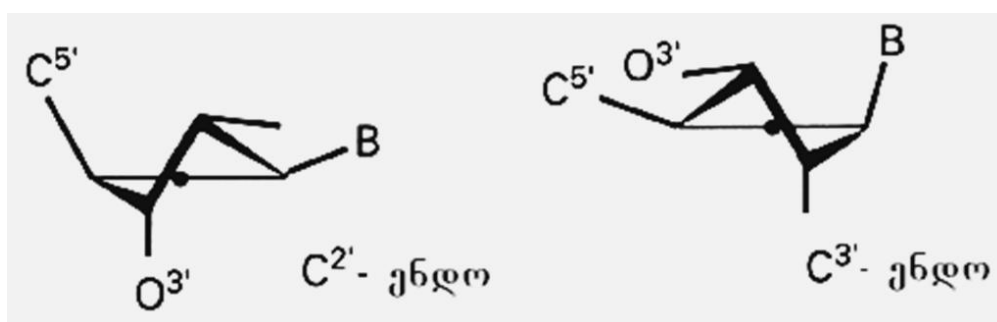
სურ. 5 დნმ-ის ორმაგი სპირალის სივრცული სტრუქტურა

დღეისათვის დნმ-ის სამი ძირითადი ოჯახია ცნობილი: A, B და Z (სურ. 6) [18]. დნმ-ის B-კონფორმაცია ბუნებაში ყველაზე მეტად გავრცელებული ფორმაა. დაბალი ტენიანობის გარემო პირობებში დნმ-ს მოლეკულა B-ფორმიდან A-ფორმაში გადადის. ძირითადი განსხვავება A- და B-ფორმებს შორის არის დეზოქსირიბოზას ციკლური რგოლის განსხვავებული კონფორმაცია, რომელიც B-ფორმაში იმყოფება C2' ენდო კონფორმაციაში, ხოლო A-ფორმაში C3' ენდო მდგომარეობაში (სურ. 7). ამის გამო A-ფორმაში დნმ-ის ჯაჭვის გასწვრივ ნუკლეოტიდებს შორის მანძილი მცირდება 1 ანგსტრემამდე. რაც შეეხება ფუძეებს, A-ფორმაში ისინი ცენტრალური ღერძიდან უფრო მეტად დიდი ღარისაკენ არიან წანაცვლებული.



სურ. 6 დნმ-ის A, B, და Z-ფორმები

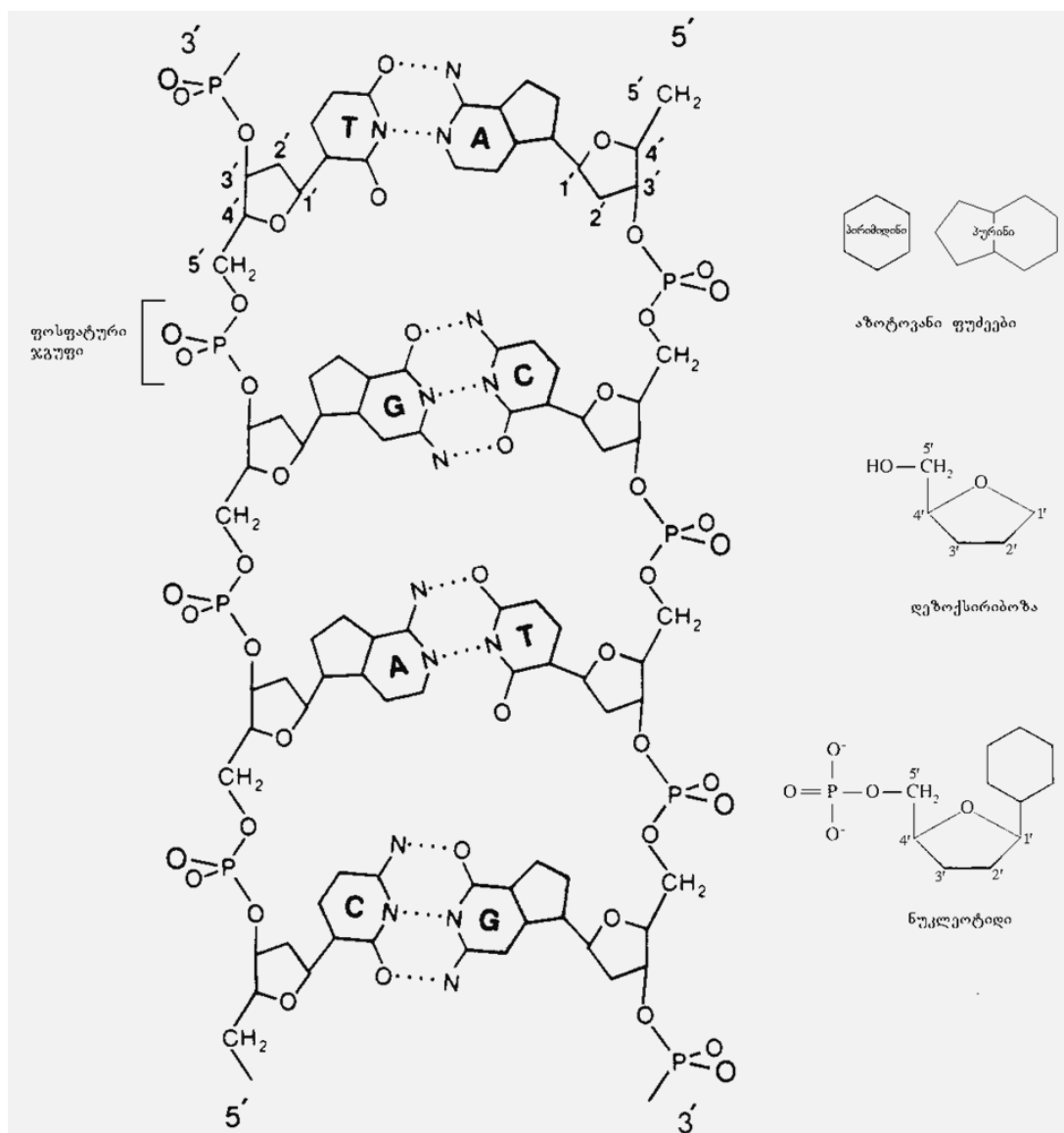
Z-ფორმა, B- და A-ფორმებისგან განსხვავებით, მარცხენა სპირალს წარმოქმნის. მსგავსი სტრუქტურები დამახასიათებელია პურინ-პირიმიდინების მონაცვლეობითი თანამიმდევრობის დროს, მაგ. როგორიცაა GCGCGC [19]. პოლინუკლეოტიდის მოთავსებით $MgCl_2$, NaCl მარილების მაღალი კონცენტრაციის წყალხსნარში ან სპირტში, შესაძლებელი ხდება მარცხენა ორმაგი სპირალის მიღება. დნმ-ის ამ კონფორმაციაში გუანოზინის დეზოქსირიბოზა იმყოფება $C3'$ -ენდო კონფორმაციაში (სურ. 7), ხოლო თვითონ გუანინის ფუძე იმყოფება სინ-კონფორმაციაში, განსხვავებით B და A ფორმებისაგან, სადაც გუანინი ანტი-კონფორმაციაშია.



სურ.7 დეზოქსირიბოზას ციკლურ რგოლში $C2'$ -ენდო კონფორმაციაში და $C3'$ -ენდო მდგომარეობაში

ფიზიოლოგიურ პირობებში დნმ იმყოფება ორმაგსპირალურ მდგომარეობაში. კავშირი ჯაჭვებს შორის ხორციელდება წყალბადური კავშირების საშუალებით აზოტოვან

ფუძეებს შორის კომპლემენტარობის პრინციპზე დაყრდნობით: ყოველი თიმინი კავშირს წარმოქმნის ადენინთან ორი წყალბადური კავშირის საშუალებით, ხოლო ყოველი გუანინი – ციტოზინთან სამი წყალბადური კავშირის საშუალებით (სურ. 8). [14]



სურ.8 დნმ-ის ორმაგი ნუკლეოტიდური ჯაჭვის სქემატური სურათი

1.2.1 დნმ-ის ორმაგ-სპირალური სტრუქტურის მასტაბილიზირებელი ძალები.

დნმ-ის სტრუქტურის მასტაბილიზირებელ ძალებს და ფაქტორებს მიეკუთვნება: წყალბადური კავშირები წყვილებს შორის, სტეკინგ ურთიერთქმედება ნუკლეოტიდურ ჯაჭვში მეზობელი ფუძეების სიბრტყეებს შორის [15], დნმ-ის ფოსფატური ჯგუფების ელექტროსტატიკური ურთიერთქმედება გარემომცველ იონებთან, ფუძეების ჰიდროფობული ბუნება, ბმული წყლის გავლენა. განვიხილოთ თითოეული მათგანი ცალ-ცალკე. საზოგადოდ, როგორც ცნობილია წყალბადური კავშირი ხორციელდება ძლიერ ელექტროუარყოფით ატომთან კოვალენტურად დაკავშირებულ წყალბადის ატომსა და დაახლოებით 0.2 ნმ მანძილზე დაშორებულ სხვა ელექტროუარყოფით ატომს შორის, რომელსაც გააჩნია გაუწყვილებელი ელექტრონი. აზოტოვანი ფუძე წყვილების შემთხვევაში, წყალბადის ატომი კავშირს ახორციელებს ელექტრო-უარყოფით აზოტსა და ჟანგბადს, ან აზოტის ატომებს შორის. წყალბადური ბმის ენერგია, რომელიც დნმ-ში აზოტოვან ფუძე წყვილებს შორის ხორციელდება დაახლოებით 2-7.5 kcal/mol -ია.

დნმ-ის მოლეკულაში აზოტოვანი ფუძეების არომატული რგოლები ერთმანეთის თავზე დნმ-ის ცენტრალური ღერძის მიმართ თითქმის პერპენდიკულარულადაა განლაგებული. მათი ასეთი ურთიერთგანლაგება კი უზრუნველყოფს სტეკინგ ურთიერთქმედებას მეზობელ ფუძეებს შორის, რომელიც დამატებითი მასტაბილიზირებელი ძალაა დნმ-ის ორმაგი სპირალისათვის. ამ ტიპის ურთიერთქმედება მიეკუთვნება არაკოვალენტურ ქიმიურ ბმას. მიუხედავად იმისა, რომ არაკოვალენტური ბმები გაცილებით სუსტია, ვიდრე კოვალენტური ტიპის კავშირები, დნმ-ის ჯაჭვში განხორციელებული სტეკინგ ურთიერთქმედებების ერთობლიობა საბოლოო ჯამში ორმაგი სპირალის მნიშვნელოვან მასტაბილიზირებელ ძალას წარმოადგენს. სტეკინგ ურთიერთქმედების ენერგია სხვადასხვა აზოტოვან ფუძეებს შორის განსხვავებულია (იხ. ცხრილი 2). ამ მონაცემებიდან კარგად ჩანს, რომ ენერგეტიკულად ყველაზე სუსტ კავშირს ($\Delta G = -0.19$ kcal/mol -1) თA ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობა წარმოქმნის, რაც მეტად საყურადღებოა.

ბიჯი	სტეკინგ ურთიერთქმედების ენერგია ΔG / kcal/mol
T A	-0.19
T G ან C A	-0.55
C G	-0.91
A G ან C T	-1.06
A A ან T T	-1.11
A T	-1.34
G A ან T C	-1.43
C C ან G G	-1.44
A C ან G T	-1.81
G C	-2.17

ცხრილი 2

მრავალი ექსპერიმენტული მონაცემებით ნაჩვენებია წყლის განსაკუთრებული როლი ნუკლეინის მჟავების კონფორმაციის ფორმირებაში. მნიშვნელოვანია, ასევე, ცალკეული წყლის მოლეკულის სტრუქტურული როლი დნმ-ზე, რომელიც სხვადასხვა ნუკლეოტიდური თანამიმდევრობისათვის სხვადასხვაგვარად ვლინდება. დნმ-ის კალორიმეტრული კვლევების მიხედვით აღმოჩნდა, რომ AT- წყვილები მეტადაა ჰიდრატირებული, ვიდრე – GC წყვილები. გამხსნელში დნმ-ის მოლეკულა არამდგრადია და მისი სტრუქტურა მუდმივად განიცდის გარკვეულ ფლუქტუაციურ ცვლილებებს. ცნობილია, რომ ასეთ პირობებში დნმ-ში ადგილი აქვს ორმაგი ჯაჭვის დროებით ლოკალურ განცალკევებებს. დნმ-ის მოლეკულა ასევე განიცდის ბრუნვით რხევებსაც, კერძოდ, სუპერსპირალური დნმ-ის კვლევების თეორიულმა ანალიზმა აჩვენა, რომ ჯაჭვის გასწვრივ ორ მეზობელ წყვილებს შორის კუთხის ამპლიტუდის ფლუქტუაცია 50-ს აღწევს [16].

1.2.2. სპეციფიური და არასპეციფიური ურთიერთქმედების სახეები (ტიპები)

დნმ-ის ჯაჭვთან

ძირითადი მაინიცირებელი ძალა სხვადასხვა მაკრომოლეკულების დნმ-თან არასპეციფიური ურთიერთქმედებისა ელექტროსტატიკური ხასიათისაა და ემყარება დნმ-ის უარყოფითად დამუხტულ ფოსფატურ ჯგუფებსა და მასთან ურთიერთქმედ მაკრომოლეკულის დადებითად დამუხტულ ჯგუფებს შორის კავშირის წარმოქმნას. ურთიერთქმედების მსგავსი მექანიზმი უდევს საფუძვლად გენის გადამტანი სხვადასხვა ბიოპოლიმერული ნაწილაკისა და შესაბამისი გენური მასალის კომპლექსის წარმოქმნას. ეს სისტემები (ნანო ზომის ნაწილაკისა და დნმ (გენის) კომპლექსი) უკვე გამოიყენება გენურ თერაპიაში, თუმცა ჯერ კიდევ აქტიურად მიმდინარეობს კვლევები ამ მიმართულებით [17].

გენოთერაპია გულისხმობს ცოცხალი ორგანიზმის უჯრედში ოლიგო- ან პოლინუკლეოტიდური მასალის შეყვანას არასასურველი გენების ფუნქციების დასაბრუნებლად, ან შესაბამისი გენების ექსპრესიის მიზნით, იმისათვის, რომ მოხდეს გამომუშავება არ არსებული, ან არასაკმარისი რაოდენობით მყოფი პროდუქტებისა. ამიტომ საჭირო ოლიგონუკლეოტიდმა უნდა მიაღწიოს განსაზღვრულ ქსოვილებს, ან ორგანოებს, გადაკვეთოს პლაზმატური მემბრანა იმისათვის, რომ უჯრედის შიგნით განსაზღვრულ სამიზნე უბანში (ბირთვში) მოხვდნენ და იპოვნონ ის მ-რნმ-ის, ან ქრომოსომული დნმ-ის უბანი, რომლის წინააღმდეგაც ისინი არიან მიმართულნი. შეყვანილი გენი უნდა შევიდეს მისი პროდუქტის ექსპრესიის უნარის მქონე კონსტრუქციის შემადგენლობაში. რადგანაც გენს, ან ოლიგონუკლეოტიდს თავისთავად ეს თვისებები არ გააჩნიათ, ორგანიზმში შეყვანისას მხოლოდ მათი მცირე რაოდენობა მიაღწევს საჭირო ადგილს.

II თავი. ექსპერიმენტული ნაწილი

2.1 საკვლევი მასალები

დნმ-ის ხსნარის მომზადება

ექსპერიმენტული კვლევის ობიექტად გამოყენებული იყო ხბოს ელენთიდან გამოყოფილი ლიოფილიზირებული დნმ-ი 42 GC % წყვილების შემცველობით, სადაც ცილების შემცველობა არ აღემატებოდა 0.1% და რნმ-ის კონცენტრაცია იყო 5% - ზე ნაკლები. დნმ-ის ხსნარის დასამზადებლად ანალიზური სასწორით (BJP-20 სიზუსტე ~5.10-5გრამი) ხდებოდა ლიოფილიზირებული ნიმუშის აწონვა. დნმ-ის საკვლევი ნიმუშის კონცენტრაციის შემოწმება ხდებოდა სპექტროფოტომეტრულად, რისთვისაც ვიყენებდით HELIOS β, Thermospectronic (Thermo Fisher Scientific, აშშ) და Spectromom 204 (უნგრეთი) სპექტროფოტომეტრებს. დნმ-ის კონცენტრაცია ითვლებოდა იმის გათვალისწინებით, რომ 50 მკგ/მლ კონცენტრაციის დნმ-ის ხსნარის შთანთქმა $\lambda=260$ ნმ სინათლის ტალღის სიგრძის დროს ერთ სანტიმეტრის სისქის კიუვეტაში (ექსტინქციის კოეფიციენტი) შეადგენს შთანთქმის ერთ ერთეულს ($E_{260}=1OD$).

ბუფერების მომზადება

დნმ-ის თერმოდინამიკური კვლევებისათვის გამოყენებული იყო ორი ტიპის ბუფერული ხსნარი: Citrate-Phosphate-ის და PBS ბუფერები.

Citrate-Phosphate-ის ბუფერის მოსამზადებლად ავიღეთ 0,2M Na_2HPO_4 და 0.1M Citric Acid.

ავწონე 5,68 გრამი 0,2M Na_2HPO_4 და გავხსენი 200 მლ დისტილირებულ წყალში, ხოლო 0.1M Citric Acid ავწონე 4,5 გრამი და გავხსენი 200 მლ დისტილირებულ წყალში. pH სხვადასხვა მნიშვნელობის მისაღებად ჩემს მიერ მომზადებული 0,2M Na_2HPO_4 და 0.1M Citric Acid ხსნარებიდან ავიღე შემდეგი თანაფარდობები და შევურიე ერთმანეთს.

pH =4,6-ისთვის 42,1 მლ (Na_2HPO_4) + 55,9 მლ (Citric Acid)

pH =7.0-ისთვის 82,3 მლ (Na_2HPO_4) + 17,7 მლ (Citric Acid)

pH =8,0-ისთვის 95,8 მლ (Na_2HPO_4) + 4,2 მლ (Citric Acid)

PBS ბუფერის მოსამზადებლად ავწონე 2,76 გრამი 0,02M NaH_2PO_4 და 3,56 გრამი 0,02M Na_2HPO_4 , თითოეული ნივთიერება გავხსენი 133,3 მლ დისტილირებულ წყალში ცალ-ცალკე.

(133,3 მლ დისტილირებულ წყალში იმიტომ გავხსენი რომ მომედო PBS ბუფერი, რომლის მოლარობაც იქნება 0,15 M)

pH =7.4-ის მისაღებად ჩემს მიერ მზადებული ხსნარებიდან ავიღე 25,3 მლ (0,02M NaH_2PO_4) და 107,9 მლ (0,02M Na_2HPO_4) და შევურიე ერთმანეთს.

2.2 ნაშრომში გამოყენებული მეთოდების აღწერა

2.2.1 სპექტროფოტომეტრული მეთოდი

დნმ-დენდრიმერის ურთიერთქმედების კვლევებისათვის და დნმ-ის კონცენტრაციის განსაზღვრისათვის გამოყენებულ იქნა სპექტროფოტომეტრული მეთოდი, რისთვისაც გამოვიყენე (HELIOS β -s (Thermospectronic, Thermo Fisher Scientific) რომლის გაზომვის სიზუსტე შეადგენს ± 0.01 OD.

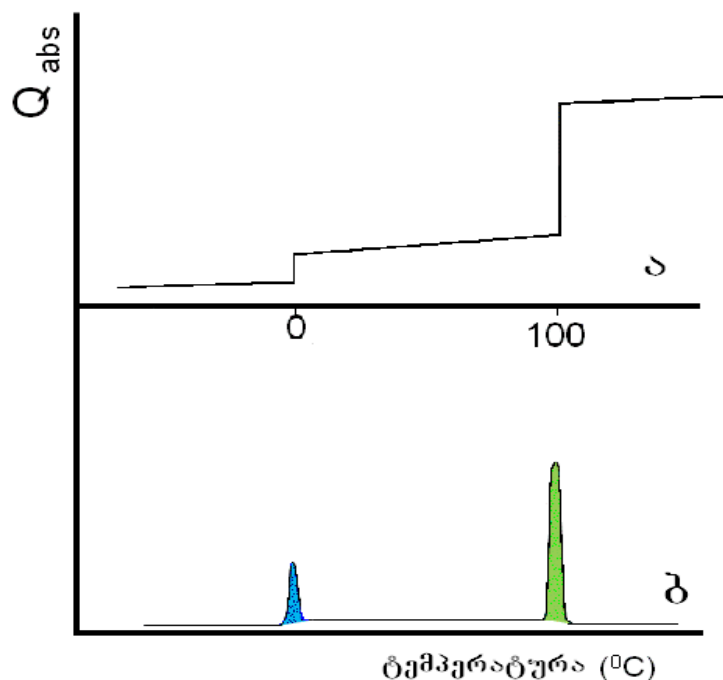
ექსპერიმენტში ასევე გამოყენებული იქნა ელექტრონული მიკრო pH-მეტრები, რომლის გაზომვის სიზუსტე ± 0.1 pH-ის ტოლია.

2.2.2 დიფერენციალური მიკროკალორიმეტრული მეთოდი

დიფერენციალური სკანირებადი მიკროკალორიმეტრია გამოიყენება სხვადასხვა ტიპის ბიოპოლიმერთა შესწავლისათვის, ისეთები როგორებიცაა: გლობულური და ფიბრილარული ცილები, ნუკლეინის მჟავები, ფოსფოლიპიდები, ბიოლოგიური მემბრანები და სხვა.

სხვადასხვა ფაქტორების (ტემპერატურა, PH, იონური ძალა და ა.შ) მოქმედების შედეგად ბიოლოგიური სტრუქტურების დაშლის პროცესის კალორიმეტრული კვლევა განპირობებულია იმით, რომ ეს ერთადერთი პირდაპირი მეთოდია ამ პროცესების ენერგეტიკული პარამეტრების განსასაზღვრავად. ტემპერატურა როგორც, ბიომოლეკულურ სტრუქტურაზე ზემოქმედების ფაქტორი გასხვავდება სხვა ფაქტორებისაგან იმით, რომ ის წარმოადგენს ინტენსიურ პარამეტრს, რომელიც თერმოდინამიკურად შეუღლებულია ენთალპიასთან, რომელიც წარმოადგენს სისტემის ექსტენსიურ პარამეტრს. ეს ნიშნავს, რომ სისტემის მდგომარეობის ყველა ცვლილებას, რომელიც განპირობებულია ტემპერატურის ცვლილებით, თან უნდა ახლდეს ენთალპიის ცვლილება. ასე რომ, სისტემის ენთალპიასა და ტემპერატურას შორის ფუნქციონალური დამოკიდებულება გულისხმობს თერმოდინამიკურ ინფორმაციას იმ მდგომარეობებზე, რომლებიც დასაშვებია სისტემისათვის ტემპერატურათა განხილულ უბანში [20,21].

მაკრომოლეკულური და პოლიმოლეკულური სტრუქტურები ნატიურ მდგომარეობაში დაფიქსირებულია უამრავი სუსტი კავშირებით, რომლებიც გაცხელებისას და გაციებისას დაახლოებით -20°C - 130°C ინტერვალში განიცდიან კონფორმაციულ და/ან ფაზურ გადასვლებს. შესაბამისად, სითბოტევადობის ცვლილების მიხედვით შეიძლება ვიმსჯელოთ მოლეკულის სტრუქტურულ და კონფორმაციულ ცვლილებებზე. ამიტომ, ჩვენს ექსპერიმენტებში სითხეების გამოსაკვლევად ვიყენებთ კალორიმეტრულ მეთოდს, კერძოდ მაღალ მგრძნობიარე დიფერენციალურ სკანირებად მიკროკალორიმეტრს. (სურ. 9) მოცემულია წყლის ფაზური გადასვლა (ა) და მისი შესაბამისი კალორიმეტრული ჩანაწერი (ბ).



სურ. 9 ა. წყლის ფაზური გადასვლა
ბ. კალორიმეტრული მრუდი

ეს მეთოდი საშუალებას გვაძლევს მივიღოთ განსაკუთრებულად მნიშვნელოვანი ინფორმაცია მოლეკული და ბიოლოგიური მემბრანების თერმოდინამიკაზე. მისი დახმარებით არეგისტრირებენ და იკვლევენ ლიპიდების ფაზური მდგომარეობის ცვლილებას და ასევე ახასიათებენ ამ მდგომარეობის დარღვევას ლიპიდების ურთიერთქმედებისას სხვა ნივთიერებებთან (ცილებთან, იონებთან ან პატარა ჰიდროფობურ მოლეკულებთან). დსკ-ს დროს ნიმუშს და ინერტულ სტანდარტს ათბობენ დამოუკიდებლად, ისე რომ მათი ტემპერატურა იყოს ერთიდაიგივე. ამასთან სითბოს რაოდენობა რომელიც საჭიროა ბიშრის ენდოთერმული გადასვლისათვის გელის მდგომარეობიდან თხევადკრისტალურ მდგომარეობაში, აღემატება იმ სითბოს რაოდენობას, რომელიც საჭიროა სტანდარტის შენარჩუნებისათვის იგივე ტემპერატურაზე. შემდგომ აგებენ სითბოს ნაკადების სხვაობის დამოკიდებულებას ტემპერატურაზე. მაღალმგრძნობიარე კალორიმეტრების საშუალებით შეიძლება ჩავატაროთ გაზომვები ლიპიდების განზავებულ წყლიან სუსპენზიებში (1მგ/მლ ნიმუშის სრულ მოცულობაში 1 მლ). ამ მეთოდით განისაზღვრება ჩვეულებრივ შემდეგი პარამეტრები [6]:

1. ფაზური გადასვლის ტემპერატურა T_{fg} (გადასვლის საშუალო წერტილი, რომელსაც ლიტერატურაში ასევე აღნიშნავენ როგორც T_m), შეესაბამება გადასვლის შუა

წერტილს. ორ მდგომარეობას შორის გადასვლისას T_m განისაზღვრება, როგორც წერტილი სადაც $\Delta G^0 = 0$:

$$\Delta G^0 = 0 = \Delta H - T_m \Delta S$$

$$T_m = \Delta H / \Delta S$$

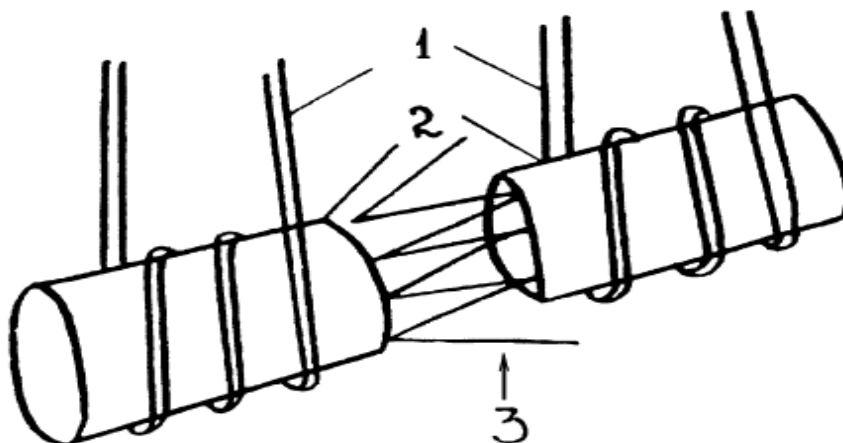
ეს თანაფარდობა შეიძლება გამოვიყენოთ გადასვლის ენტროპიის ΔS -ის მოსაძებნად, T_m -ის და ΔH -ის გაზომვის შემდეგ [23].

.გადასვლის T_c ტემპერატურა , რომელიც შეესაბამება გადასვლის დასაწყისს [22].

3. გადასვლის ენტალპია ΔH - სითბოს რაოდენობა, რომელიც საჭიროა გადასვლის განსახორციელებლად გათვლილი ნივთიერების ერთ მოლზე ან ერთეულ მასაზე [23].

4. სითბოტევადობა C_p - სითბოს რაოდენობა (გადათვლილი ერთ გრამზე ან მოლზე), რომელიც აუცილებელია ნიმუშის ტემპერატურის მოსამატებლად ერთი გრადუსით [23].

განვიხილოთ მისი მოქმედების პრინციპი უფრო დაწვრილებით. დიფერენციალური სკანირებადი კალორიმეტრი შედგება ორი კამერისაგან: (სურ.10) მათგან ერთში თავსდება გამხსნელი, მეორეში – გამხსნელისა და გამოსაკვლევი ნივთიერების ნარევი. ვინაიდან კალორიმეტრის კამერები აბსოლუტურად იდენტური ვერ იქნება, გაზომვის სიზუსტისათვის თავდაპირველად კამერებს ავსებენ ერთი და იგივე სტანდარტული სითხით (გამხსნელით) და იწერენ ე.წ. ბაზისურ ხაზს ტემპერატურის საჭირო ინტერვალში. გასაგებია, რომ ბაზისიური ხაზი გამოდის სწორხაზოვანი.



სურ. 10 DASM 4A კალორიმეტრის კამერა

1. პლატინის კაპილარები
2. უჟანგავი ფოლადის თხელი მილები
3. თერმოზატარეას

როდესაც იწყება კამერებისათვის სითბოს გადაცემა (ტემპერატურის გაზრდისას), კალორიმეტრის კამერებს შორის ტემპერატურული წონასწორობის შესანარჩუნებლად, ნიმუშის კამერას მიეწოდება ნაკლები ან მეტი სიმძლავრე, იმის და მიხედვით პროცესი ენდოთერმულია, თუ ეგზოთერმული, ანუ პროცესი სითბოს შთანთქმით მიმდინარეობს თუ გამოყოფით – ამ პრინციპით კალორიმეტრი ათანაბრებს ტემპერატურებს კამერებში. კალორიმეტრი იწერს იმ ელექტრული სიმძლავრის სიდიდეს, რომელიც მას დასჭირდა გადაეცა ნიმუშის კამერისათვის ტემპერატურული ბალანსის დასამყარებლად. ეს სიდიდე პროპორციულია სითბოტევადობების სხვაობისა კამერებში მოთავსებულ ხსნარებს შორის და წარმოადგენს ტემპერატურის ფუნქციას.

ამ ზოგად პრინციპზე დაყრდნობით არსებობს სხვადასხვა ტიპის კალორიმეტრები. ჩვენ ვიყენებთ DASM 4A (ცხრილი.3) ტიპის მიკროკალორიმეტრს. გარემოსთან სითბოცვლის გამოსარიცხად მისი ორივე კამერა გარშემორტყმულია ადიაბატური გარსით, რომლის ტემპერატურაც კამერების ტემპერატურის ტოლია (სურ. 11, 12). ტემპერატურათა თუნდაც მცირე სხვაობას კალორიმეტრი აღმოაჩენს არა მარტო კამერებს შორის, არამედ გარსსა და კამერას შორისაც, ეს კი ააქტივებს გაცხელების მექანიზმს და აღადგენს ტემპერატურულ ბალანსს ზემოთ აღწერილი პრინციპით. ასეთი სისტემა კიდევ უფრო ზუსტად იცავს ტემპერატურული წონასწორობას.

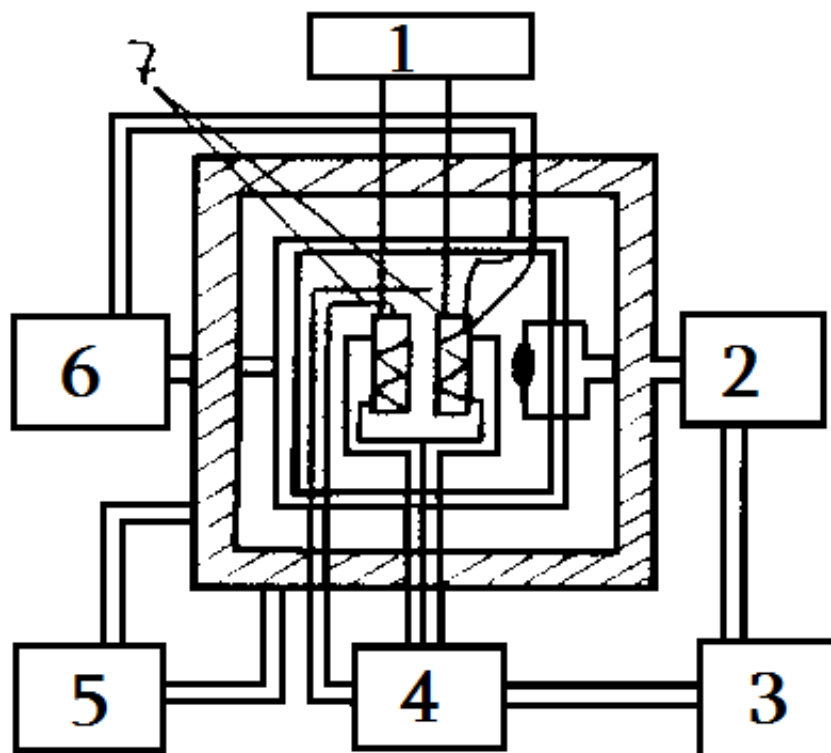
ხმაურის დონე	$5 \times 10^{-7} \text{ W}$
ბაზისური ხაზის განმეორებადობა	$3 \times 10^{-6} \text{ W}$
ბაზისური ხაზის გადახრა სწორი ხაზიდან	$15 \times 10^{-6} \text{ W}$
საშუალო ტემპერატურული ინტერვალი	$0-150^{\circ}\text{C}$
ტემპერატურის გაზომვის აბსოლუტური ცდომილება	$\pm 0.1^{\circ}\text{C}$
კალორიმეტრული უჯრების გაცხელების სიჩქარე	0.125; 0.25; 0.5; 1.0; 2.0; 4.0 $^{\circ}/\text{min}$
სკანირების სიჩქარის ფარდობითი ცდომილება	$\pm 2\%$
წნევა ამპილის თავზე	500-600 კპა
თითოეული კამერის მიცულობა	0.8 ml
სასუალო მოცულობა	0.46 ml
კალიბრების სიმძლავრე	25; 50; 100 μW

ცხრილი #3

DASM 4A კალორიმეტრის ტექნიკური მონაცემები

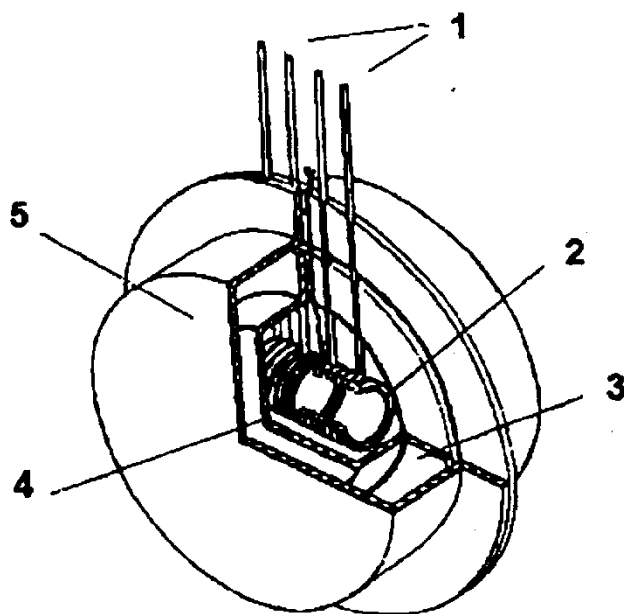
კალიბრებისთვის ერთ-ერთი კამერა აღჭურვილია დამატებითი ელექტრული გამაცხელებლით. ასეთი კალორიმეტრის სიზუსტე საკმაოდ მაღალია (ცდომილება $<0.1\%$). ეს ნიშნავს, რომ ის შეიძლება გამოვიყენოთ განზავებული ხსნარებისთვის, ($<10^{-4} \text{ M}$ ნიმუში), სადაც საჭიროა ჰომოგენურ მაკრომოლეკულებს შორის ურთიერთქმედებების თავიდან აცილება. ასეთი კალორიმეტრი ასახავს მხოლოდ თერმულად ინდუცირებულ მოვლენებს, რომლებსაც ადგილი აქვს ნიმუშში, და არა სხვა პარამეტრებს, მაგ; კამერების არაიდენტური

გათბობა და სხვა. ყველა ზემოთჩამოთვლილი თვისებების გამო საბაზისო ხაზი გამოდის მდგრადი.



სურ. 11. DASM 4A კალორიმეტრის ბლოკ-სქემა

1. მონოსტატი
2. თერმომეტრი
3. თვითმწერი
4. სითბური ეფექტის გამზომი
5. თერმოსტატის თერმორეგულატორი
6. ადიაბატიზირებული გარსის თერმორეგულატორი
7. მიკროკალორიმეტრის გამზომი კამერები



სურ. 12. DASM 4A -ს კალორიმეტრული ბლოკი

- 1- ჩატვირთვის კაპილარები.
- 2- სპირალური კალორიმეტრული კამერა გამახურებლით.
- 3- შიდა ადიაბატური გარსი.
- 4- კამერებს შორის ტემპერატურათა სხვაობის მზომი.
- 5- გარე სითბური ეკრანი (რომელიც აღკვეთს მილის გარე ნაწილის გავლენას კამერაზე).

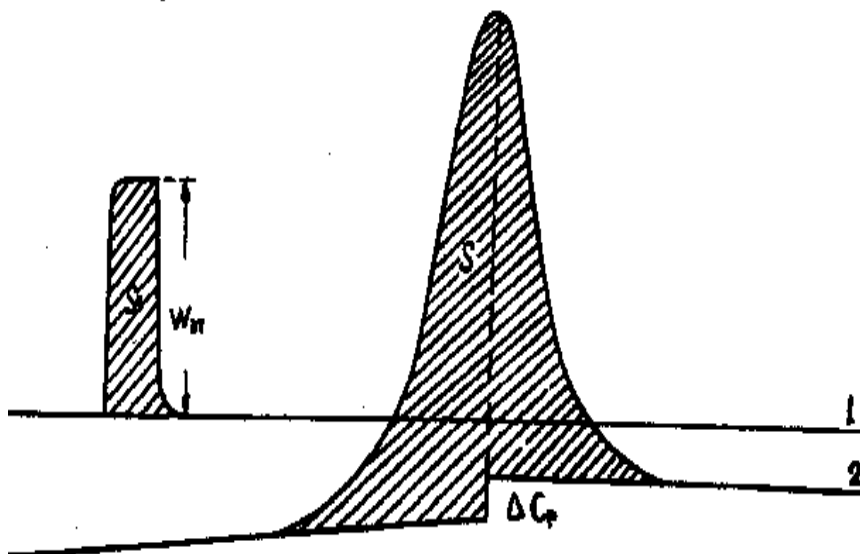
დიფერენციალურ კალორიმეტრთან მუშაობის ერთ-ერთი ყველაზე რთული პრობლემაა კამერების ჩატვირთვა განსაზღვრული, თანაბარი რაოდენობით: კამერებში ნიმუშის რაოდენობის ჩატვირთვის სიზუსტე არ უნდა აღემატებოდეს 10-5-ს. ცხადია, ასეთი სიზუსტის დაცვა ნიმუშების აწონვით შეუძლებელია. გარდა ამისა, არ შეიძლება კამერის ბოლომდე გავსება, რადგან სითხისა და კამერის სითბური გაფართოების კოეფიციენტი სხვადასხვაა. მეორეს მხრივ, თუ კამერაში თავისუფალ მოცულობას დავტოვებთ, მაშინ სითხის გახურებისას ხდება დამატებითი ორთქლწარმოქმნა, რაზეც დამატებითი ენერგია იხარჯება. არსებობს კიდევ ერთი პრობლემა: მიუხედავად იმისა, რომ გამხსნელსა და ხსნარის ზევით ორთქლის დრეკადობა მცირედ განსხვავდება, ორთქლის წარმოქმნის დიდი კუთრი სითბოს გამო, სხვაობრივი სითბური ეფექტი შესამჩნევი ხდება. ამიტომ კამერაში არ უნდა დარჩეს ჰაერის ბუშტუკები.

ამ უზუსტობების თავიდან ასაცილებლად, კამერაში ნიმუში შეჰყავთ კაპილარული მილის საშუალებით ისე, რომ ის ავსებს კამერას. გახურების პროცესში კამერაში ბუშტუკების გამოსარიცხად კაპილარული მილების გარე გამოსასვლელებს მოდებული აქვთ ჭარბი წნევა (რამდენიმე ატმ.). რადგან მოდებული წნევა არც ისე დიდია, იგი არ მოქმედებს ხსნარის სითბურ თვისებებზე. სითხეში არსებული აირის წნევასა და ჭარბ წნევას შორის სხვაობას მონოსტატი არეგულირებს. ასე რომ, ხსნარის შესაძლო გაფართოება, აორთქლება კონდენსაცია გაზომვის პროცესში გავლენას არ ახდენს კუთრი სითბოტევადობის განსაზღვრაზე (ΔC_p).

როგორც ავღნიშნეთ, DASM 4A კალორიმეტრი დიფერენცირებული ტიპის ხელსაწყოა, ანუ ის ზომავს არა აბსოლუტურ სითბოტევადობებს, არამედ კამერებში მოთავსებულ ხსნარებს შორის სითბოტევადობების სხვაობას. თუ კამერებში მოთავსებული სითხეების სითბური თვისებები განსხვავებულია, მათი ერთნაირი სიჩქრით გაცხელებისას წარმოიშვება კამერათა შორის ტემპერატურული სხვაობა. ეს სხვაობა კამერებს შორის.

არსებული თერმოწყვილების მიერ გარდაიქმნება ელექტრულ სიგნალად. მას აძლიერებს გამაძლიერებელი და ხვდება გამახურებლის სქემაში. გამახურებლის სქემა ისე არეგულირებს გახურების დენებს, რომ კამერებს შორის ტემპერატურათა სხვაობა იყოს მინიმალური. მაკომპენსრებელი სიმძლავრის პროპორციული ძაბვა რეგისტრირდება ორკოორდინატიანი თვითჩამწერის ორდინატაზე, ხოლო აბსცისაზე ფიქსირდება ტემპერატურა ტემპერატურის ინდიკაციის ბლოკიდან.

სურ.13-ზე გამოსახულია ტიპური კალორიმეტრული მრუდი, რომელიც მიიღება ბიოპოლიმერების (ცილების, ნუკლეინის მჟავების და ა.შ) ხსნარების გაცხელებისას. პიკი ქვემოდან შემოსაზღვრულია ნატიური და დენატურირებული ბიოლოგიური სტრუქტურის სითბოტევადობების ექსტრაპოლაციური მნიშვნელობებით.



სურ. 13. ტიპური მაკროკალორიმეტრული ჩანაწერი სითბოშთანთქმის პიკით.
 1-საბაზისო ხაზი.
 2-ჩანაწერის მრუდი ნიმუშისათვის.

პიკის ქვეშ მოხვედრილი ფართობის მიხედვით შეგვიძლია დავთვალოთ სითბო, რომელიც გამოიყოფა ან შთაინთქმება მაკრომოლეკულების სტრუქტურული დენატურაციის დროს: $Q = K_1 S$, სადაც Q არის სითბოს რაოდენობა (დენატურაციის სითბო), S - პიკის ფართობი, K_1 - ჩანაწერის ერთეულოვანი ფართობის ფასი ენერგეტიკულ ერთეულებში. $K_1 = W_{et} \cdot t / S_{et}$, W - ეტალონური სიმძლავრე, რომელიც t დროში გადაეცემა ერთერთ კამერას. მრუდის მიხედვით შეგვიძლია დავითვალოთ გახსნილი ნივთიერების პარციალური სითბოტევადობა ნებისმიერ ტემპერატურაზე შემდეგი ფორმულის მიხედვით:

$$-\Delta C = [C]_p^p \cdot m_p - [C]_p^s \cdot \Delta m_s,$$

სადაც $[C]_p^p$ და $[C]_p^s$ გახსნილი ნივთიერების და გამხსნელი ნივთიერებების პარციალური სითბოტევადობებია შესაბამისად. m_p - გახსნილი ნივთიერების მასა კამერის სამუშაო მოცულობაში, ხოლო Δm_s - მის მიერ გამოდევნილი გამხსნელის მასა. ცხადია, $m_s = m_p \frac{[V]^p}{[V]^s}$, აქ $[V]^p$ და $[V]^s$ ნიმუშის და ხსნარის პარციალური მოცულობებია შესაბამისად.

ბოლო ფორმულის გათვალისწინებით,

$$[C]_p^p = [C]_p^s \frac{[V]^p}{[V]^s} - \frac{\Delta C}{m_p}$$

სადაც, $\Delta C = k_2 h$ არის გამხსნელსა და ხსნარს შორის სითბოტევადობების სხვაობა, h – წერტილის გადახრა ბაზისური ხაზიდან ნებისმიერ ტემპერატურაზე, ხოლო k_2 – წრფიდან გადახრის ერთეულის ფასი ჯგ/კმ-ებში.

რადგან, $k_2 = W_{\text{გგ}}/V I_{\text{გგ}}$ სადაც W – კალიბრული სიმძლავრეა, V – გაცხელების სიჩქარე და $I_{\text{გგ}}$ – საკალიბრო ნიშნის გადახრა, საბოლოოდ მივიღებთ:

$$[C]_p^p = [C]_p^s \frac{[V]^p}{[V]^s} - \frac{W_{\text{გგ}} \cdot h}{V_{\text{გგ}} \cdot m_p}$$

კალორიმეტრულ გაზომვებში ბიოპოლიმერების ტემპერატურული გადასვლის სითბურ ეფექტებს განსაზღვრავს ენტალპიის ცვლილება (ΔH), რომელიც თან ახლავს ამ გადასვლებს

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p(T) dT$$

სადაც, $C_p(T)$ – სითბოტევადობა მუდმივი წნევის დროს, იგი ტემპერატურის ფუნქციაა, ხოლო T_1, T_2 – ტემპერატურის შუალედი, რომელშიც ტარდება გაზომვები. სითბური დენატურაციის დროს ნატიურიდან დენატურირებულ მდგომარეობაში გადასვლისას ბიოპოლიმერების სითბოტევადობა იცვლება. ამ გადასვლის ენტალპიის ცვლილება გამოითვლება შემდეგი ფორმულით

$$\Delta H_{\text{den}} = \int_{T_1}^{T_2} C_p^{\text{den}} dT - \int_{T_1}^{T_d} C_p^{\text{n}} dT - \int_{T_d}^{T_2} C_p^{\text{d}} dT = \Delta H_d - \int_{T_1}^{T_d} \Delta C_p dT$$

სადაც, ΔH_d – გადასვლის მოლარული ენტალპიაა; T_d – გადასვლის ტემპერატურა (ლღობის პიკის მაქსიმუმი); C_p^{n} და C_p^{d} – ბიოპოლიმერების პარციალური სითბოტევადობებია შესაბამისად ნატიურ და დენატურირებულ მდგომარეობებში. $\Delta C_p = C_p^{\text{d}} - C_p^{\text{n}}$ არის პარციალური სითბოტევადობების სხვაობა გადასვლის T_d ტემპერატურაზე. ამავე პროცესში ენტროპიის ცვლილება შემდეგი ფორმულით გამოითვლება:

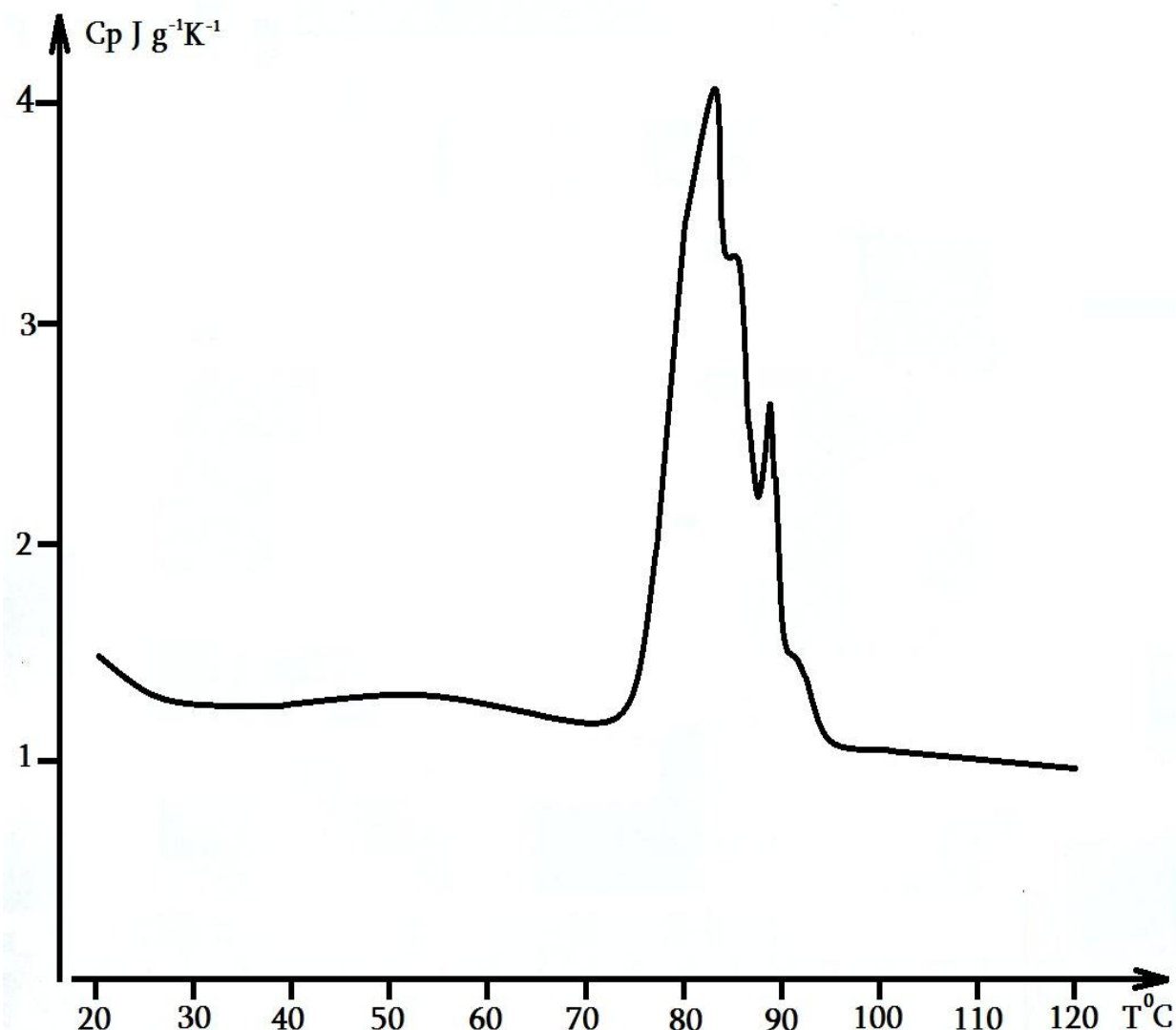
$$\Delta S_{\text{den}} = \int_{T_1}^{T_d} \frac{C_p^{\text{n}}}{T} dT + \frac{\Delta H_d}{T_d} + \int_{T_d}^{T_2} \frac{C_p^{\text{d}}}{T} dT = \frac{\Delta H_d}{T_d} - \int_{T_1}^{T_d} \frac{\Delta C_p}{T} dT$$

III ექსპერიმენტული შედეგები და მათი განხილვა

3.1 ჩატარებული ექსპერიმენტები და მიღებული შედეგების ანალიზი.

დნმ-ისა და დენდრიმერის კომპლექსის კალორიმეტრული ექსპერიმენტებიდან მიღებული თერმოდინამიკური პარამეტრების მნიშვნელობებით და მრუდის ფორმით შესაძლებელია ვიმსჯელოთ მაკრომოლეკულის სტრუქტურის მოწესრიგებულობის ხარისხზე, ასევე მაკრომოლეკულებისა და ნანონაწილაკების მიერ წარმოქმნილ კავშირებზე და მათ თერმოსტაბილობაზე, რასაც წარმოდგენილ ნაშრომში გადამწყვეტი მნიშვნელობა აქვს დნმ-ის სტრუქტურული დინამიზმის თვალსაზრისით. დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის თერმოდინამიკური თვისებები შევისწავლეთ pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობისას.

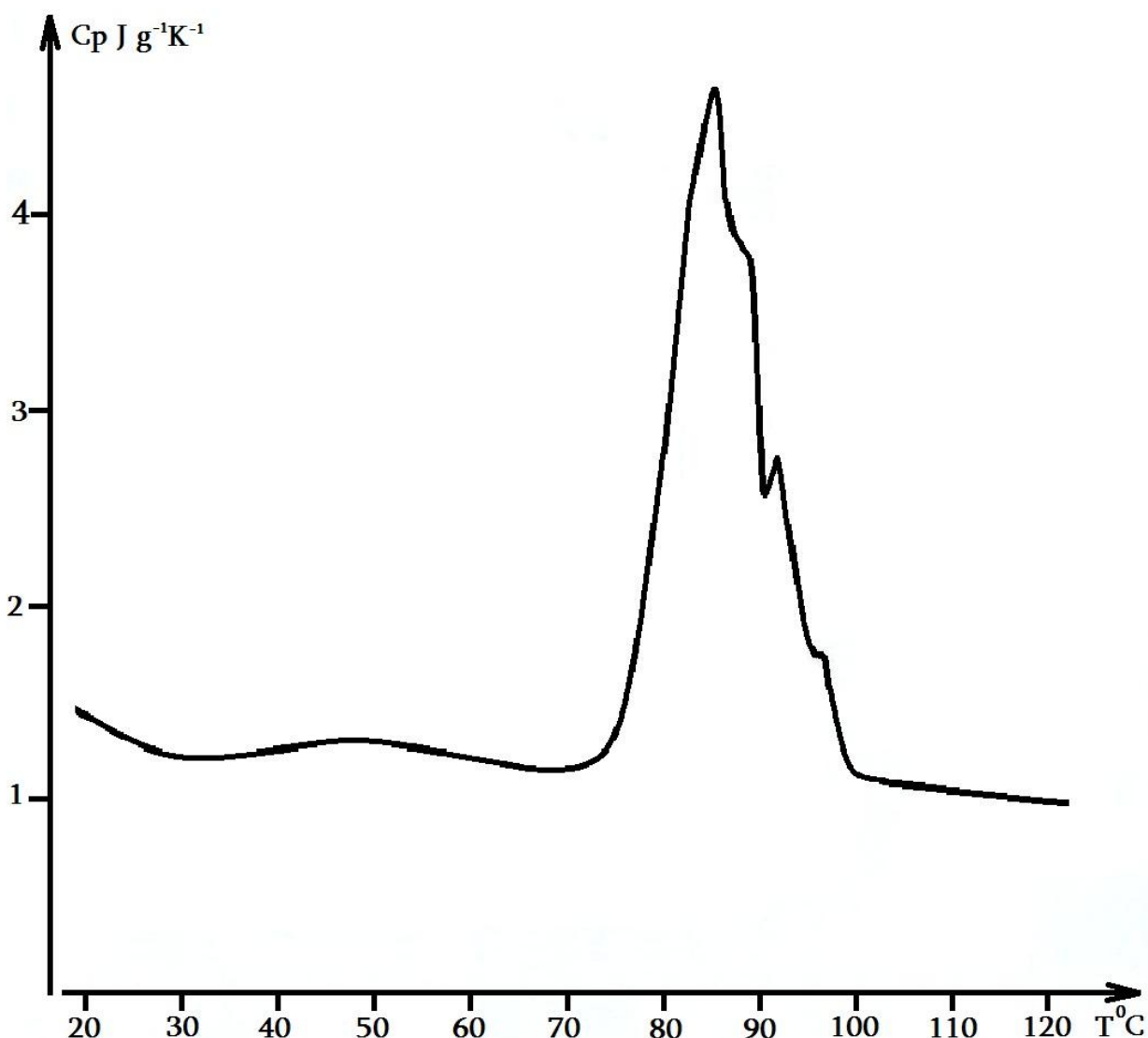
პირველ ნახაზზე მოცემულია დნმ-ის კუთრი სითბოტევადობის დამოკიდებულება ტემპერატურაზე ნეიტრალური pH-ის (pH7.0-ის) პირობებში. ნახაზიდან ჩანს, რომ დნმ-ის დენატურაციის მრუდი ხასიათდება ე.წ. ლღობის ნაზი სტრუქტურით, რაზეც მიგვითითებს ის, რომ სითბოსშთანთქმის პიკი შეიცავს მცირე პიკებს (ნახ. 1)). უნდა ავღნიშნოთ, რომ მიღებული მრუდის ე.წ. ნაზი სტრუქტურა, განპირობებულია დნმ-ის მოლეკულაში მსგავსი თერმოსტაბილობის უბნების არსებობით, რომელიც მიიღება ე.წ. სატელიტური უბნები ლღობის შედეგად.



ნახ.1 დნმ-ის კალორიმეტრული მრუდი (pH7.0)

დნმ-ს მოლეკულაზე 0,5 მლ PAMAM G4 დენდრიმერის დამატებით წარმოიქმნა კომპლექსი. კომპლექსის წარმოქმნაზე მიგვანიშნებს დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის კალორიმეტრული მრუდი. მეორე ნახაზზე მოცემულია დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის კალორიმეტრული ჩანაწერი pH 7.0.-ის მნიშვნელობის დროს. მიღებული მრუდებიდან კარგად ჩანს, რომ დენდრიმერების დამატებით დნმ-ის მოლეკულაზე, დნმ-ის (pH 7.0) ტიპიური კალორიმეტრული მრუდისთვის დამახასიათებელი პატარა პიკები (ლღობის ნაზი სტრუქტურა) თანდათან ქრება, რაც შეიძლება იმით აიხსნას, რომ დენდრიმერები წარმოქმნიან კავშირებს სწორედ სატელიტურ უბნებთან. ასევე ნათლად ჩანს, რომ დენდრიმერის დნმ-თან შერევისას დენდრიმერი უპირატესად უკავშირდება დნმ-ის მოლეკულაში გუანინ-ციტოზინ წყვილების მდიდარ უბნებს (ნახ 2). ამაზე მიუთითებს დნმ-ის ლღობის მრუდზე შესაბამისი ტემპერატურულ ინტერვალში გუან-ციტოზინის-თვის

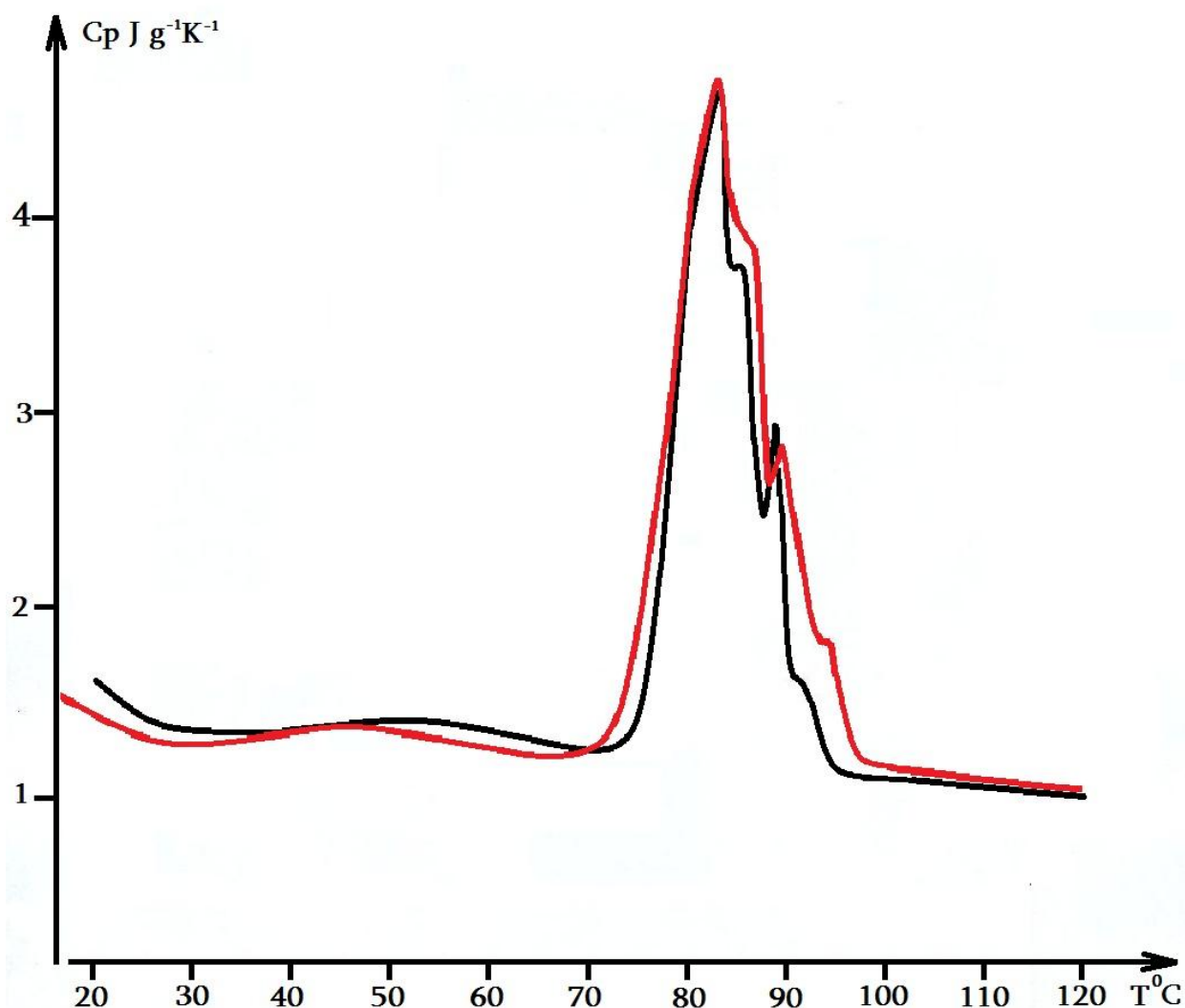
დამახასიათებელი მცირე ზომის პიკის მნიშვნელოვანი შემცირება, ისე რომ ლღობის მრუდი სხვა ცვლილებას არ განიცდის..



ნახ.2 დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის მრუდი (pH7.0)

ჩვენს მიერ დათვლილი იქნა დნმ-ის და აღნიშნული კომპლექსის (დნმ-დენდრიმერის) თერმოდინამიკური პარამეტრები. დნმ-ის შემთხვევაში ფაზური გადასვლის სითბო (ენტალპია) შეადგენს 39 ჯ/გრ. ხოლო დნმ-დენდრიმერის ფაზური გადასვლის სითბო (ენტალპია) არის 44,77 ჯ/გრ (ნახ.3). დენდრიმერის დამატებით დნმ-ი მილეკულაზე გაიზარდა დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის ფაზური გადასვლის სითბო და გუანინ-ციტოზინ წყვილების მდიდარ უბნებსათვის დამახასიათებელი პიკის ფორმა. კალორიმეტრული

ექსპერიმენტები ტარდებოდა ძირითადად 2°K /წთ გაცხელების სიჩქარით. დნმ-ის კონცენტრაცია იყო 1,5 მგ/მლ.



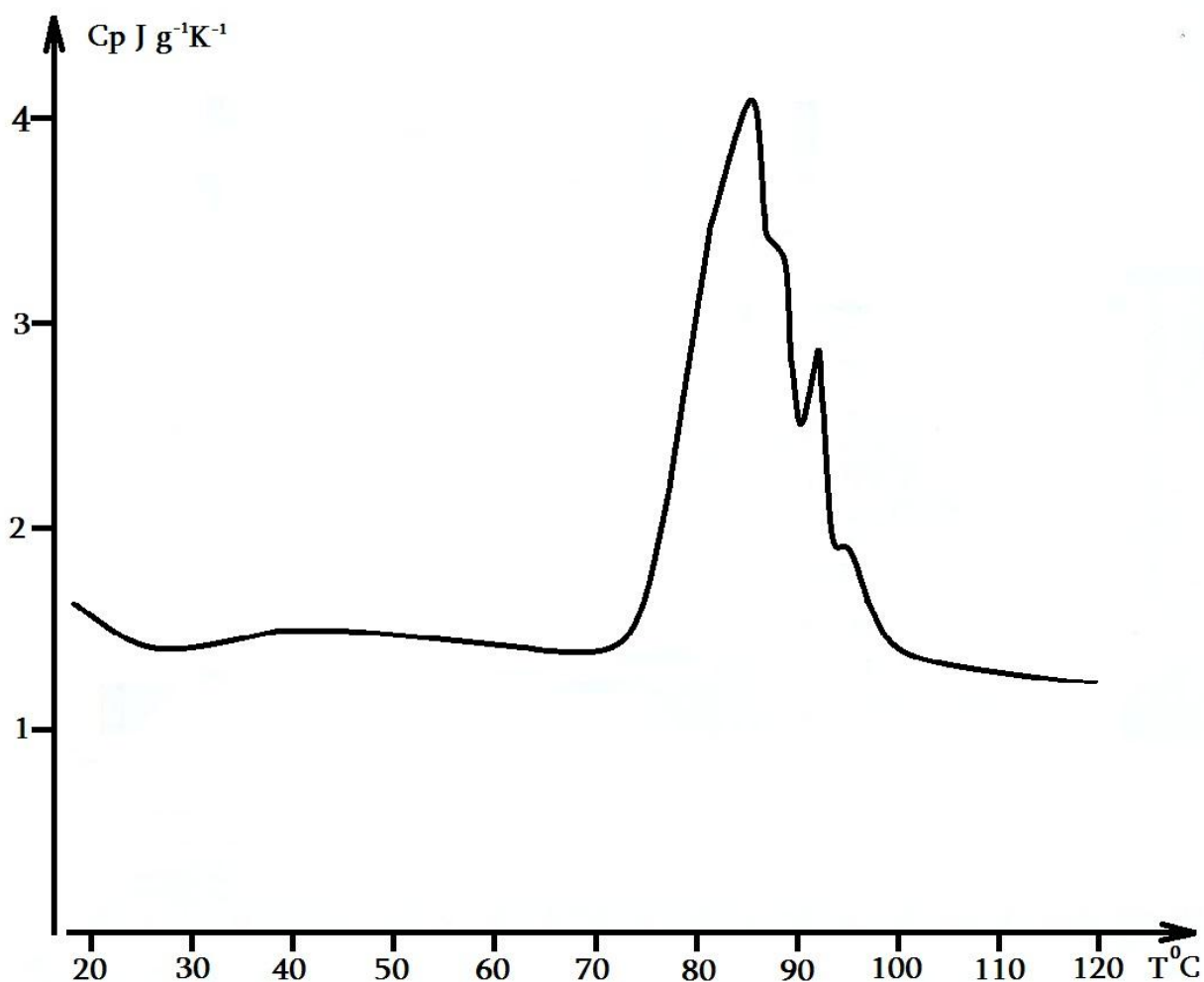
ნახ. 3. დნმ-ის და დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის მრუდები (pH7.0)

შავი მრუდი არის დნმ-ს კალორიმეტრული ჩანაწერი.

წითელი-დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის კალორიმეტრული ჩანაწერი.

დნმ-დენდრიმერის კომპლექსი შევისწავლეთ მჟავე არეში, pH4.6 მნიშვნელობის დროს. ნახ. 4-ზე მოცემულია დნმ-ის კალორიმეტრული მრუდები მჟავე არეში, რომლის მიხედვით ნათლად ჩანს, რომ მჟავიანობის მომატებით, ანუ pH-ის მნიშვნელობის შემცირებით ხდება დნმ-ის ლლობის ტემპერატურის მკვეთრი შემცირება. ამასთანავე, ტემპერატურის შემცირების პარალელურად მცირდება დნმ-ის ლლობის პიკის ფართიც, ანუ

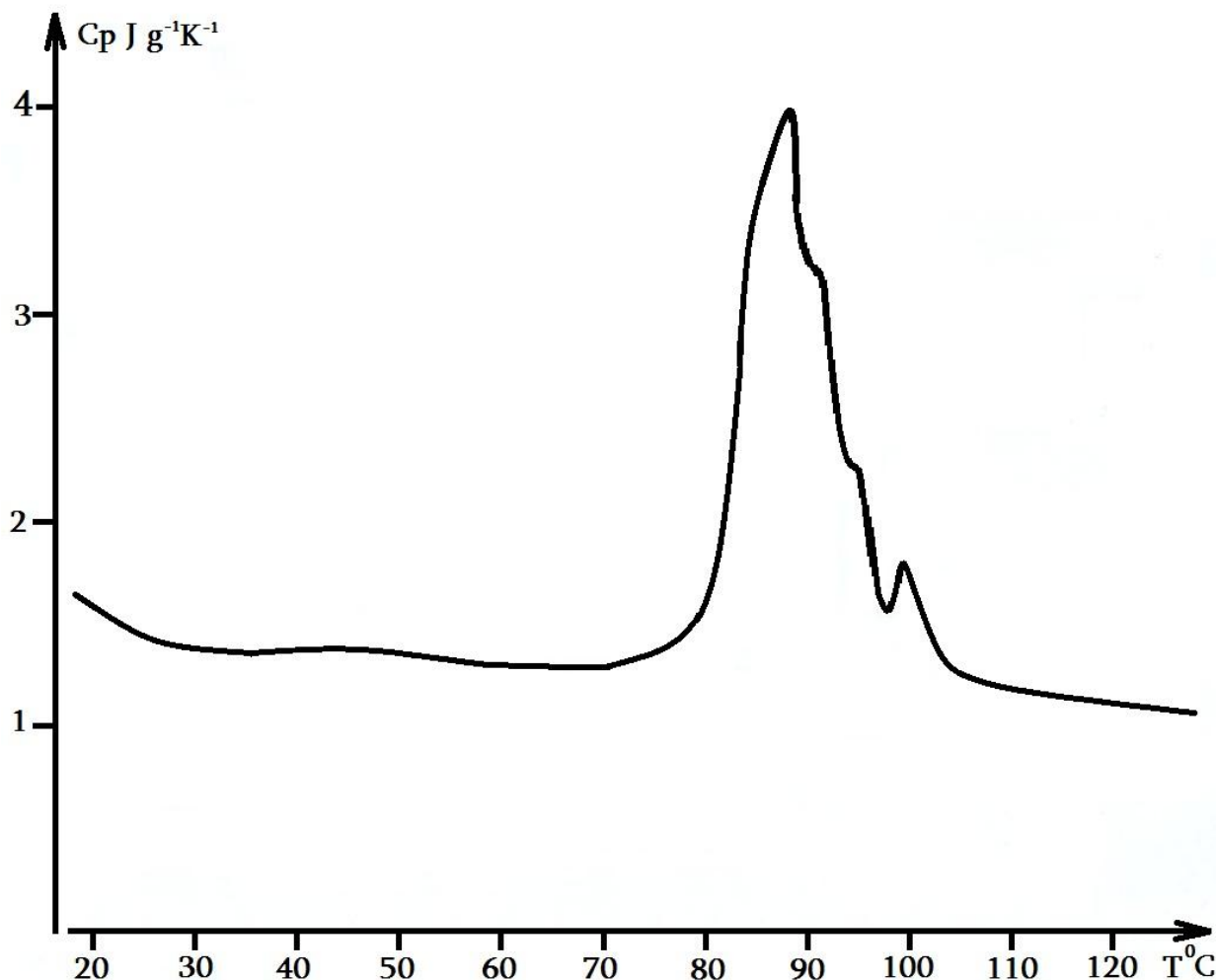
ენტალპიაც. მიღებული მრუდებიდან ასევე კარგად ჩანს, რომ მჟავიანობის მომატებით დნმ-ის (pH 7.0) ტიპური კალორიმეტრული მრუდისთვის დამახასიათებელი პატარა პიკები (ლღობის ნაზი სტრუქტურა) თანდათან ქრება, რაც შეიძლება იმით აიხსნას, რომ გარემოს გარკვეული მჟავიანობის პირობებში დნმ იმყოფება ნაწილობრივ დენატურირებულ მდგომარეობაში, სადაც შედარებით ნაკლებად თერმოსტაბილობილური (AT-წყვილებით მდიდარი) უბნები უკვე განცალკევებულია, ლღობისას შთანთქმული სითბოც (ΔH) შესაბამისად ნაკლებია და ასეთ პირობებში დნმ-ის ლღობის ნაზი სტრუქტურაც იწყებს გაქრობას (ნახ.4).



ნახაზი 4. დნმ-ის კალორიმეტრული მრუდი (pH 4.6)

მე-5 ნახაზზე მოცემულია დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის კალორიმეტრული ჩანაწერი pH 4.6. მიღებული მრუდებიდან კარგად ჩანს, რომ 0.5 მლ დენდრიმერების დამატებით დნმ-ის ხსნარზე pH 4.6-ის დროს, დნმ-ის ტიპური კალორიმეტრული

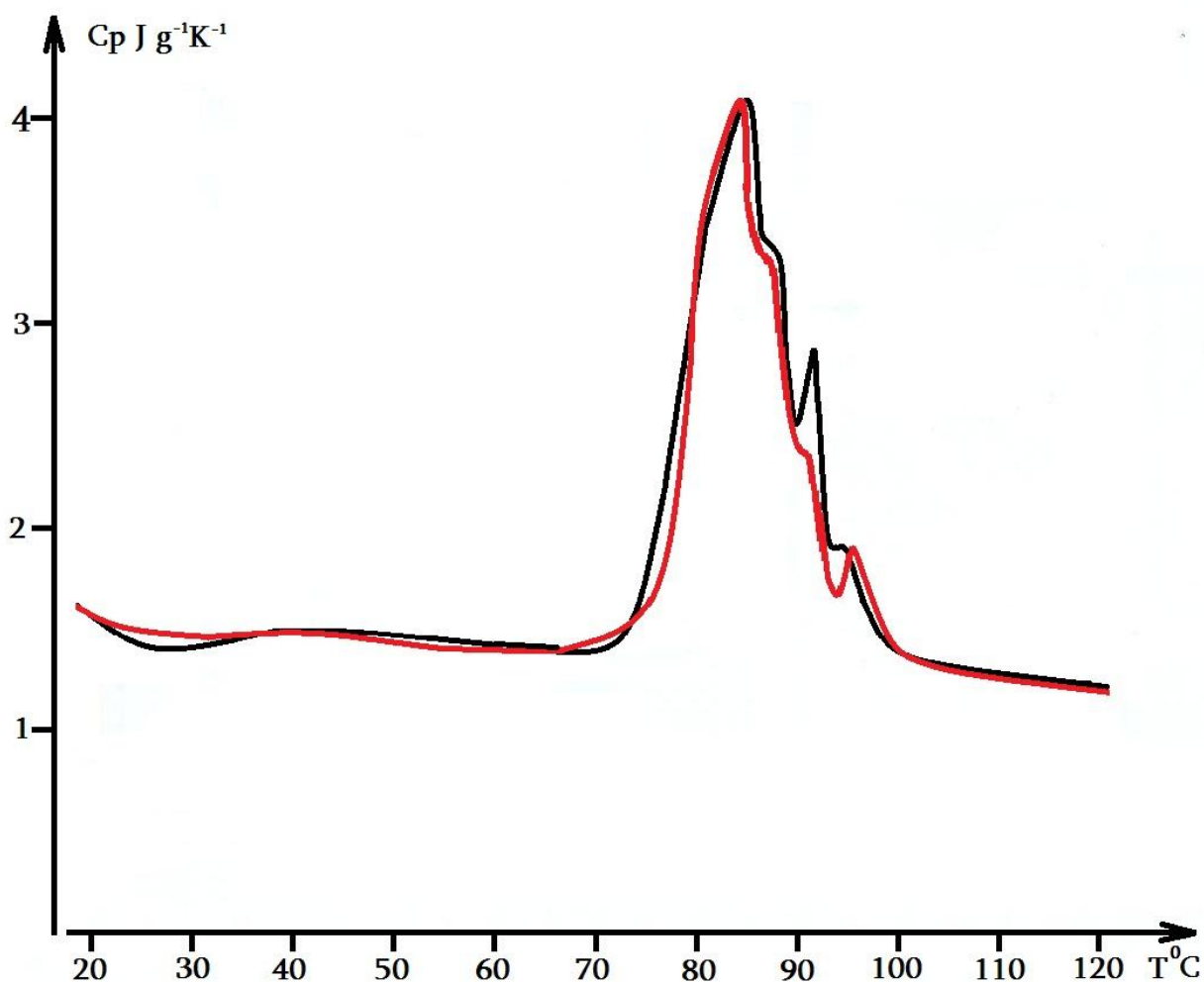
მრუდისთვის დამახასიათებელი პატარა პიკები (ლღობის ნაზი სტრუქტურა) თანდათან ქრება, როგორც pH7.0-ის დროს, რაც შეიძლება იმით აიხსნას, რომ დენდრიმერები წარმოქმნიან კავშირებს სწორედ სატელიტურ უბნებთან და დნმ-ის მოლეკულაში გუანინ-ციტოზინ წყვილების მდიდარ უბნებთან, როგორც წინა შემთხვევაში (ნახ. 5).



ნახ.5. დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის მრუდი (pH 4.6)

ასევე დათვალეთ დნმ-ის და დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის თერმოდინამიკური პარამეტრები pH 4.6 მნიშვნელობის დროს. დნმ-ის შემთხვევაში ფაზური გადასვლის სითბო (ენტალპია) შეადგენს 36,62 ჯ/გრ. ხოლო დნმ-დენდრიმერის ფაზური გადასვლის სითბო (ენტალპია) არის 36,26 ჯ/გრ. უნდა აღინიშნოს რომ pH 4.6 მნიშვნელობისას დენდრიმერის დნმ-ისა და დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის ფაზური გადასვლის სითბო (ΔH) არ იცვლება,

მაგრამ იცვლება დნმ-ის კალორიმეტრული მრუდის ფორმა დენდრიმერის დამატებით (ნახ. 6).

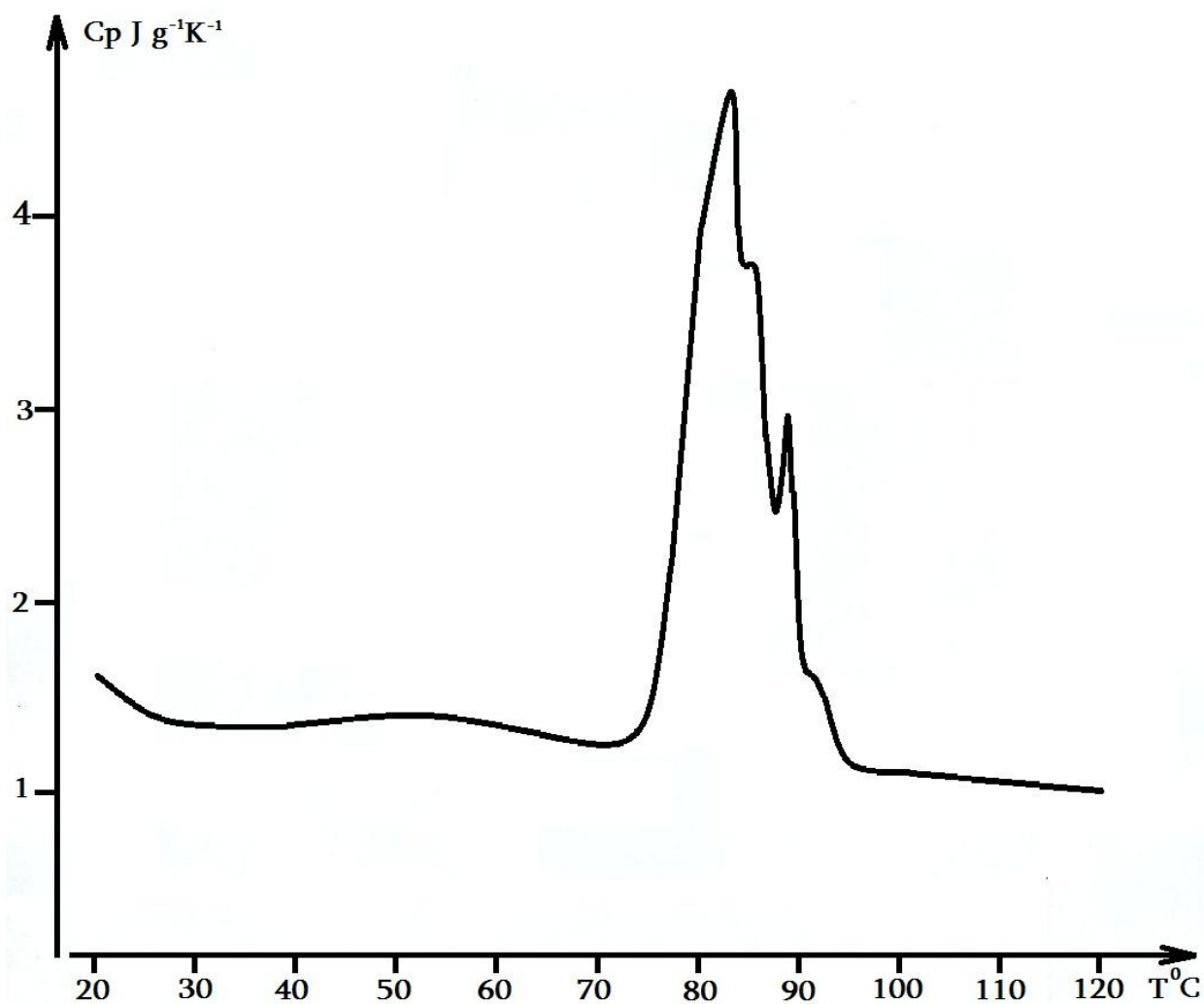


ნახ. 6. დნმ-ის და დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის მრუდები (pH4.6)

შავი მრუდი არის დნმ-ს კალორიმეტრული ჩანაწერი.

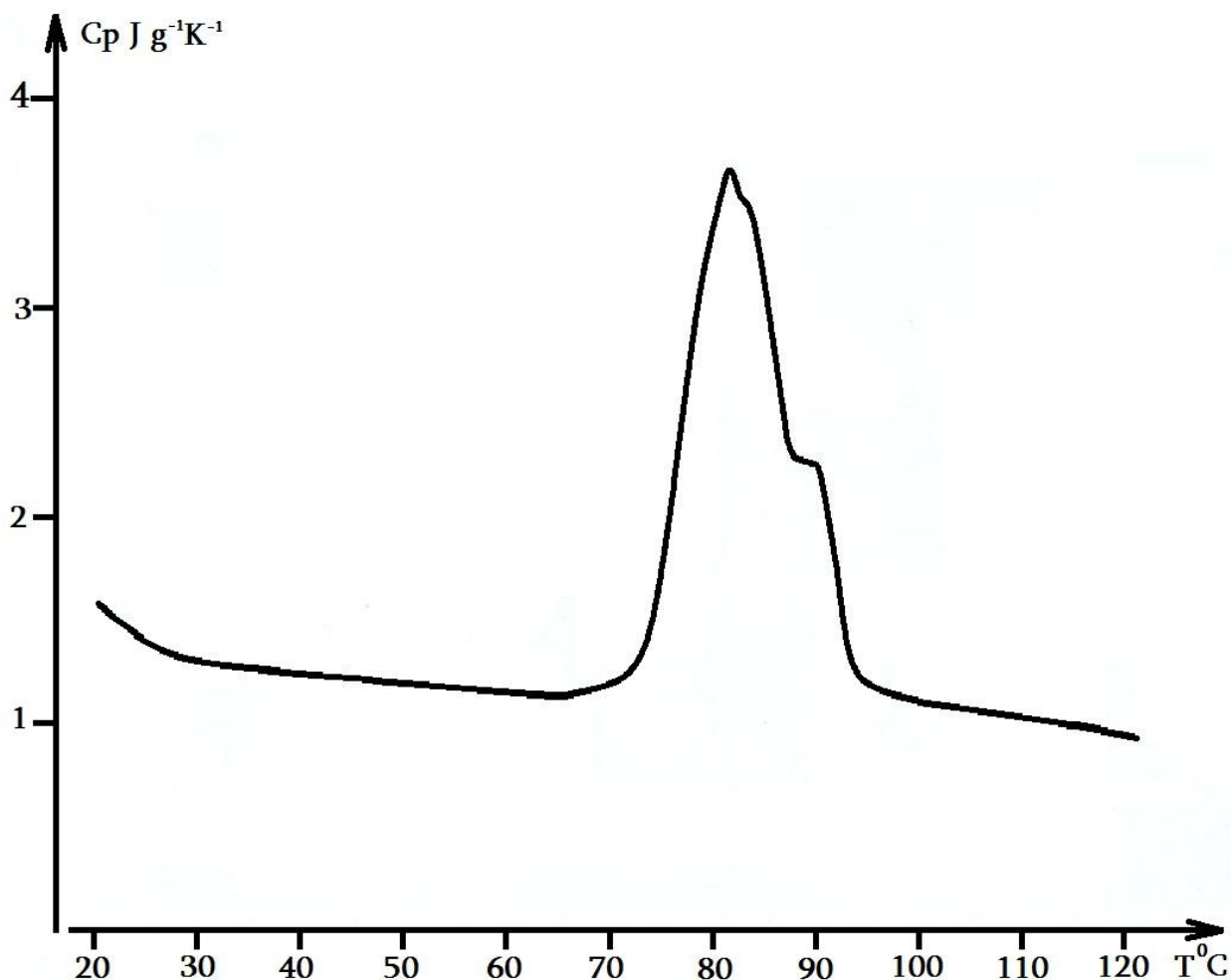
წითელი-დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის კალორიმეტრული ჩანაწერი.

მჟავე არესაგან განსხვავებით დნმ-ის მოლეკულას სრულიად განსხვავებული ყოფაქცევა ახასიათებს ტუტე არეში. ჩვენს მიერ შესწავლილ იქნა მუდმივი იონური ძალის პირობებში დნმ-ის კონფორმაციული ცვლილებები ტუტე არეში pH 8.0-ის დროს (ნახ. 7). დნმ-ის მიკროკალორიმეტრული მრუდი გვიჩვენებს, რომ ტუტი არეში ადგილი აქვს ლლობის ტემპერატურის გაზრდას და ენტალპიის (ΔH) ზრდას.



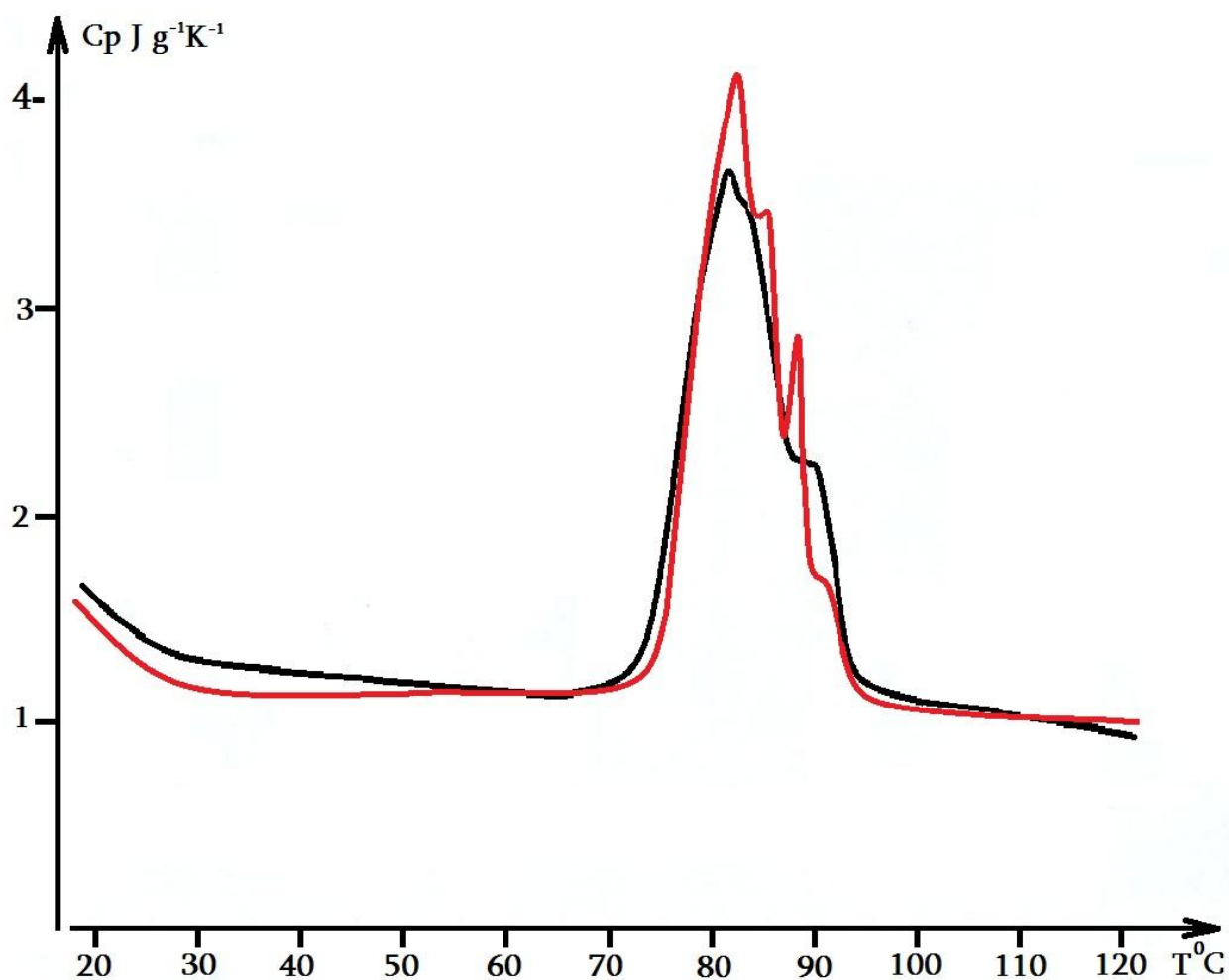
ნახ. 7. დნმ-ის კალორიმეტრული მრუდი (pH 8.0)

დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის კალორიმეტრული ჩანაწერი pH 8.0-ის დროს დენდრიმერების დამატებით დნმ-ის მოლეკულაზე (pH 8.0) ტიპური კალორიმეტრული მრუდისთვის დამახასიათებელი პატარა პიკები თანდათან ქრება, როგორც pH4.6-ის და pH7.0 დროს (ნახ.8).



ნახაზი 8. დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის კალორიმეტრული მრუდი (pH 8.0)

ასევე დათვალეთ დნმ-ის და დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის თერმოდინამიკური პარამეტრები pH 8.0-ის მნიშვნელობის დროს. დნმ-ის შემთხვევაში ფაზური გადასვლის სითბო (ენტალპია) შეადგენს 49,8 ჯ/გრ. ხოლო დნმ-დენდრიმერის ფაზური გადასვლის სითბო (ენტალპია) არის 45,44 ჯ/გრ. pH 8.0 მნიშვნელობისას დენდრიმერის დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის ფაზური გადასვლის სითბო (ΔH) დნმ-ის ფაზური გადასვლის სითბოსთან შედარებით შემცირდა, ასევე შეიცვალა დნმ-ის კალორიმეტრული მრუდის ფორმა დენდრიმერის დამატებით (ნახ. 9).



ნახაზი 9. დნმ-ის და დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის მრუდები ერთად pH8.0

შავი მრუდი არის დნმ-ს კალორიმეტრული ჩანაწერი.

წითელი-დნმ-დენდრიმერის კომპლექსის კალორიმეტრული ჩანაწერი.

კალორიმეტრული ექსპერიმენტები ტარდებოდა ძირითადად 2°K /წთ გაცხელების სიჩქარით. დნმ-ის კონცენტრაცია იყო 1,5 მგ/მლ.

დასკვნები

- I. PAMAM G4 დენდრიმერი დნმ-ის მოლეკულასთან შერევისას წარმოქმნის კომპლექს.
- II. PAMAM G4 დენდრიმერი დნმ-ის მოლეკულასთან შერევისას უპირატესად ურთიერთქმედებს დნმ-ის მოლეკულაში გუანინ-ციტოზინ-ის წყვილების მდიდარ უბნებთან.
- III. pH მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს დნმ-დენდრიმერის კომპლექსზე. კერძოდ, ღლობის კუთრი ენტალპიის მნიშვნელობის დამოკიდებულია გარემოს pH-ზე.
- IV. ნაჩვენებია, რომ ნეიტრალური pH7 -ის დროდ დენდრიმე-დნმ-ის კომპლექსის ღლობის კუთრი ენტალპია გაზრდილია ცალკე აღებულ დნმ-ის კუთრ ენტალპიასთან შედარებით.

გამოყენებული ლიტერატურა:

1. V. Rajesh Babu, V. Mallikarjun, S. R. Nikhat and G. Srikant . “Dendrimers: A New Carrier System For Drug Delivery”. International Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences/1 (1)/ (2010).
2. C. Yiyun, X. Zhenhua, M. Minglu, X. Tonguen. “Dendrimers as Drug Carriers: Applications in Different Routes of Drug”, J.Pharma.Sci., 97(1): 123-143 (2008).
3. Boas, U.; Heegaard, P. M. H. *Chem. Soc. ReV.* (2004), 33, 43.
4. Lee, J. W.; Kim, J. H.; Hee Joo Kim, S.; Han, C.; Kim, J. H.; Shin, W. S.; Jin, S.-H. *Bioconj. Chem.* (2007), 18, 579.
5. Wooley, K. L.; Hawker, C. J.; Frechet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* (1991), 113, 4252.
6. Kawaguchi, T.; Walker, K. L.; Wilkins, C. L.; Moore, J. S. *J. Am. Chem. Soc.* (1995), 117, 2159
7. D. A. Tomalia. Birth of a new macromolecular architecture:dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. *Prog. Polym. Sci* 30 (3–4): 294–324(2005).
8. K. Barbara, B. Maria. “Review Dendrimers: properties and applications”, *Acta Biochimica Polonica* 48 (1): 199–208, (2001).
9. Scott H. Medina and Mohamed E. H. El-Sayed. Dendrimers as Carriers for Delivery of Chemotherapeutic Agents. *Chem. Rev.* (2009).
10. C. Ramaswamy, T. Sakthivel, A. F. Wilderspin, A. T. Florence. Dendriplexes and their characterization, *Int. J. Pharm.* 254:17-21(2003)
11. Inhan Lee,† Brian D. Athey,‡ Arthur W. Wetzel,§ Walter Meixner,‡ and James R. Baker, Jr.*,† “Structural Molecular Dynamics Studies on Polyamidoamine Dendrimers for a Therapeutic Application: Effects of pH and Generation”. *Macromolecules* 35, 4510-4520 (2002).
12. Prabal K. Maiti and William A. Goddard. “ Solvent Quality Changes the Structure of G8 PAMAM Dendrimer, a Disagreement with Some Experimental Interpretations” *ReceiVed: April 12, (2006)*
13. Avery O.T., MacLeod C.M., McCarty M., Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types, *Journal of Experimental Medicine*, , Vol. 79, pp. 137-158 (1944)
14. Langrige R., Wilson H., Hooper C., Wilkins M., Hamilton L., The molecular configuration of DNA. I. X-ray diffraction study of acrySTALLINE form of the lothium salt, *J. Mol. Biol.*, , N 12, pp. 19-33 (1960).
15. Well R.D., Larson J.E., Grant R.G., Cantor C.R., Shorlete B., Physicochemical studies on polydesoxyribonucleotides containing defined repeating nucleotide sequence, *J. Mol.Biol.* Vol. 54, N3, pp. 465-497, (1970),
16. Leslie A. G. W., Arnott S., Chandrasekaran R., Ratliff R.L., Polymorphism of DNA double helices, *J. Mol. Biol.* Vol.143, pp. 49-72, (1980)

17. J. Panyam, V. Labhasetwar, " Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, "Advanced Drug Delivery Reviews, Vol. 55, Issue 3. 329-347, (2003)
18. "Принципы структурной организации нуклеиновых кислот", Зенгер В.В., В кн. Под ред. Вайнштейна М., Мир, (1987)
19. Drew H., Takano T., Tapaka S., Itikura K., Dickerson R., High-salt d(CpCpCpCp):A Left-handed Z-DNA double helix, Nature, Vol. 286, pp. 567-573, (1980).
20. Ландау Л. Д., Лифшиц Е. М., "Стат. физика", Наука, Москва, (1964).
21. Privalov P.L., Plotnikov V.V., Filimonov V.V., Precision Scanning Microcalorimetr for the Study of Liquids., J.Chem.Them., Vol. 7, No 1, pp. 41-47, (1975)
22. Г. Кобринский, Липосомы в Медицине, (2003) <http://n-t.ru/nj/nz/1988/0601.htm>
23. Gennis R.B., "Biomembranes. Molecular structure and Function", Springer-Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, (перевод с английского, Москва, «Мир», (1997)
24. Tomalia, D. A.; Naylor, A. M.; Goddard, W. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* **(1990)**, 29, 138
25. Eichman, J. D.; Bielinska, A. U.; Kukowska-Latallo, J. F.; Baker, J. R. *Pharm. Sci. Technol. Today* **(2000)**, 3, 232.
26. Gillies, E. R.; Frechet, J. M. J. *J. Am. Chem. Soc.* (2002), 124, 14137
27. Ozawa, C.; Katayama, H.; Hojo, H.; Nakahara, Y.; Nakahara, Y. *Org. Lett.* **(2008)**, 10, 3531
28. Andre, S.; Pieters, R. J.; Vrasidas, I.; Kaltner, H.; Kuwabara, I.; Liu, F.-T.; Liskamp, R. M. J.; Gabius, H.-J. *ChemBioChem* (2001), 2, 822.
29. B. Klajnert, L. Stanisławska, M. Bryszewska, B. Pałecz. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, „Interactions between PAMAM dendrimers and bovine serum albumin“ (2003), 115-126.