

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი  
ფიზიკის დეპარტამენტი

ტატიანა ტრეტიაკოვა

სხვადასხვა ტიპის კომპოზიტური გარემოს გავლენის შესწავლა  
გლობულური ცილების და ზოგიერთი მოდელოური სისტემის  
სტაბილობასა და ფუნქციაზე

სადოქტორო დისერტაცია

სადოქტორო პროგრამის ხელმძღვანელები:

ფიზ. მათ მეცნ. დოქტორი

თამაზ მძინარაშვილი

ფიზ. ქიმ. მეცნ. დოქტორი

დიმიტრი ხომტარია

სამეცნიერო ხელმძღვანელი:

ფიზ. ქიმ. მეცნ. დოქტორი

დიმიტრი ხომტარია

თბილისი 2017 წელი

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University

Department of Physics Faculty of Exact and Natural Sciences

**Tatyana Tretyakova**

**Impact of Various Composite Environments on the Stability and  
Function of Representative Globular Proteins and Model Systems**

**Doctoral Thesis**

**Doctorate program supervisors:**

Doctor of Phys-Math

Tamaz Mdzinarashvili

Doctor of Phys.-Chem

Dimitri Khoshtariya

**Scientific supervisor:**

Doctor of Phys.-Chem

Dimitri Khoshtariya

Tbilisi 2017

## აბრევიატურები და შემოკლებები:

[ch][dhp] – ქოლინ დიჰიდროგენფოსფატი

$\alpha$ -CT –  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინი

Ag – ვერცხლი

Ag/AgCl – ვერცხლის ქლორიდის შესადარების ელექტროდი

ATEE – აცეტილ ტიროზინ ეთილ ესთერი

Au/CysSAM/Cu – ოქროს ელექტროდზე დაფენილ ცისტეინის თვითაწყობად მონომრეზე ჩაჭერილი სპილენძის იონები

Au – ოქრო

Au/SAM/Az – ოქროს ელექტროდზე დაფენილ ალკანთიოლების თვითაწყობად SAM – თვითაწყობადი მონომრეზე ჩაჭერილი აზურინი

Az – აზურინი

CV – ციკლური ვოლტამპერომეტრიის მეთოდი

Cys – L-ცისტეინი

DMSO – დიმეთილსულფოქსიდი

Hg – ვერცხლისწყალი

PEG – პოლიეთილენგლიკოლი

PBS – ფოსფატის ბუფერი

Pt – პლატინა

sat KCl – გაჯერებული კალიუმის ქლორიდის ხსნარი

## შინაარსი

	88
<b>შესავალი</b>	3
<b>1 ლიტერატურის მიმოხილვა</b>	
1.1 გლობულური ცილების სტრუქტურა და სტაბილობა	7
1.2 კონფორმაციული მდგომარეობები და ქვემდგომარეობები	12
1.3 გლობულური ცილების მრავალფეროვნება; კავშირი მათ სტრუქტურულ აგებულებას, ფლუქტუაციურ დინამიკასა და ფუნქციურ აქტივობას შორის	16
1.4 ელექტრონების გადასვლები (მიმოცვლა) ბიომოლეკულებში; მათი კინეტიკური გამოვლინებები და დეტალური ფიზიკური მექანიზმები	18
1.5 $\alpha$ -ქიმოტრიპსინი; არსებული მონაცემები მის სტაბილობასა და ფუქციაზე ორგანული დანამატების ზემოქმედების შესახებ	24
1.6 აზურინი, როგორც რედოქს-აქტური ცილა; ვოლტამპერომეტრიის გამოყენება მოდიფიცირებულ ელექტროდებზე იმობილიზებული ელექტრონების გადამტანი ცილების მექანიზმების კვლევებისთვის	32
1.7 L-ცისტეინით მოდიფიცირებული ელექტროდების გამოყენება სპილენძის იონების $Cu^{2+}$ იმობილიზაციისა და შესაბამისი ელექტრონული მიმოცვლის მოდელური (ბიომიმეტიკური) პროცესის შესწავლის მიზნით	37
<b>2 ექსპერიმენტული ნაწილი (პრეპარატები, მეთოდები და კვლევების პირობები)</b>	
2.1 გამოყენებული პრეპარატები და ხსნარების მომზადების წესი	39
2.2 დინამიური პოტენციომეტრია, pH-სტატიკური ტიტრაციის მეთოდი	43
2.3 მიკროკალორიმეტრია. დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრია	50
2.4 სწრაფი სკანირების ციკლური ვოლტამპერომეტრია, როგორც მძლავრი ბიოფიზიკური მეთოდი	57
<b>3 კვლევების შედეგები და მათი განხილვა</b>	
3.1 დიმეთილსულფოქსიდის გავლენა $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის თერმოდინამიკურ სტაბილობასა და კინეტიკურ ქცევაზე (ფუნქციურ აქტივობაზე)	64
3.2 კონფორმაციული დინამიკის გავლენა თვითაწყობად ფირებზე იმობილიზებული აზურინის მექანიზმებზე. გარემოს არაერგოდიული და	75

არაწრფივი როლის გამოვლინებანი	
3.3 L-ცისტეინით მოდიფიცირებული ელექტროდების გამოყენება სპილენძის იონების ( $Cu^{2+}$ ) იმობილიზაციისა და შესაბამისი მოდელური (ბიომიმეტიკური) ელექტრო-მიმოცვლის პროცესის შესწავლის მიზნით	83
4 ძირითადი შედეგები	90
5 ციტირებული ლიტერატურა	93

## შესავალი

ბიომოლეკულების, მათ შორის გლობულური ცილების, სტაბილობას, ფლექსიბილობას და ფუნქციურ აქტივობას შორის ურთიერთკავშირის შესწავლა მნიშვნელოვანია ფუნდამენტური მოლეკულური ბიოფიზიკის და მისი გამოყენებითი ასპექტების განვითარების თვალსაზრისით. შესაბამისად, მოლეკულური ბიოფიზიკის უახლესი წარმოდგენების თანახმად, ცილების ფუნქციონირების მექანიზმების ფუნდამენტური ახსნა მოითხოვს ცილის სტაბილობის და ფლექსიბილობის როლის გათვალისწინებას.

ცოცხალ უჯრედებში მეტად მნიშვნელოვანია ცილების აქტივობის რეგულაცია და მათთვის დამახასიათებელი ნატივური კონფორმაციის შენარჩუნება, რაც გარემოში მყოფი სხვადასხვა იონების და ორგანული ნაერთების მეშვეობით ხორციელდება. თანამედროვე ბიოფიზიკური კვლევების ერთ-ერთი უმთავრესი მიზანია დადგინდეს ამ ბიომრავალფეროვნების ფუნდამენტური ფიზიკური საფუძვლები. ამ მიზნის მისაღწევად მიზანშეწონილია მრავალმხრივი ინტერდისციპლინური კვლევების ჩატარება სხვადასხვა ექსპერიმენტული და გამოთვლითი მეთოდების გამოყენებით, რომლებიც იძლევიან ინფორმაციას როგორც ცილების ფუნქციონირების კინეტიკის, ასევე მათი სტაბილობის და ფლუქტუაციური (კონფორმაციული) ფლექსიბილობის შესახებ, მათ შორის, სხვადასხვა გარემო ფაქტორების ზემოქმედების პირობებში.

მოცემულ ნაშრომში განხილულია ორი განსხვავებული გლობულური ცილის, მათ შორის, ჟანგვა-აღდგენითი ფუნქციის მქონე (ელექტრონის გადამტანი) ცილის, აზურინის და კატალიზური ფუნქციის მქონე ცილის (ჰიდროლიზური ფერმენტის),  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის, სტაბილობისა და ფუნქციური აქტივობის თავისებურებები, შესაბამისად, ხსნარებში სხვადასხვა კონცენტრაციის მასტაბილებელი/ მადესტაბილებელი დანამატის არსებობის, ან მოდიფიცირებულ ელექტროდებთან ძლიერი ურთიერთქმედების პირობებში. კერძოდ, შესწავლილია არასპეციფიური ზემოქმედებოს მქონე, მცირე ორგანული ნაერთის, დიმეთილსულფოქსიდის (DMSO), გავლენა  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის კატალიზურ აქტივობასა, მის სტაბილობასა და ფლექსიბილობაზე. მიკროკალორიმეტრული და დინამიური პოტენციომეტრიის მეთოდების ერთობლივი გამოყენების შედეგად გამოვლინდა DMSO-ს დუალისტური გავლენა  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის სტაბილობასა და ფუნქციურ აქტივობაზე. ეს მოვლენა აიხსნება ნატივური და განხვეული ცილის სოლვატაციის საპირისპირო ბუნებით წყლის და DMSO-ს მიმართ. ასევე, ცილის კომპაქტური ნაწილის და აქტიური ცენტრის

განსხავებული სოლვატური თავისებურებებით.

ასევე შესწავლილია ოქროს ელექტროდზე ალკანთიოლების ფირების საშუალებით იმობილიზებული აზურინის მიერ ელექტრონის გადატანის პროცესის მექანიზმები, განსაკუთრებით, პროტონულ იონურ ლლობილთან ურთიერთქმედების პირობებში. აზურინის შემთხვევაში, ციკლური ვოლტამპერომეტრიის მეთოდის გამოყენებით შესწავლილი იყო ცილის გლობულის შეზღუდვის (როგორც ალკანთიოლის ზედაპირის, ასევე იონური ლლობილის გარემოს საშუალებით) გავლენა ელექტრონის გადატანის სიჩქარეზე, ცილის შინაგანი დინამიკის არსებითი შეზღუდვის გამო, განსაკუთრებით მაღალი წნევის ან/და დაბალი ტემპერატურის პირობებში. ეს იწვევს ელექტრონის გადატანის ადიაბატური მექანიზმის მნიშვნელოვან შეუღლებას არაერგოდულ და არაწრფივ კინეტიკურ ეფექტებთან.

ზემოაღწერილი სისტემატური ფუნდამენტური კვლევის შედეგად მიღებული ინფორმაცია ხელს უწყობს ცილების მუშაობის მექანიზმების ამომწურავ და ჩაღრმავებულ გაგებას და შესაბამისად მათი თვისებების რეგულირების შესაძლებლობას. ეს უკანასკნელი წარმოადგენს საფუძველს ახალი მომიჯნავე მიმართულების - ბიონანოტექნოლოგიის განვითარებისთვის.

აქ წარმოდგენილი სადისერტაციო ნაშრომი შედგება სამი ნაწილისგან. პირველი ნაწილი ეთმობა სამეცნიერო ლიტერატურაში არსებული მონაცემების მიმოხილვას გლობულური ჰიდროლიზური ცილა-ფერმენტის,  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის და ელექტრონის გადამტანი ცილის აზურინის სტაბილობის, ფლექსიბილობის და ფუნქციური აქტივობის ურთიერთკავშირის შესახებ. აქვე აღწერილია ჩვენი კვლევებისთვის რელევანტური თეორიული საფუძველები და თეორიული ანალიზით უკვე გამყარებული წარმოდგენები და განზოგადებები.

დისერტაციის მეორე, „ექსპერიმენტული“ ნაწილი ეხება სამეცნიერო კვლევებში ჩვენს მიერ გამოყენებული პრეპარატების და სამუშაო ხსნარების აღწერას. აქვე მოცემულია გამოყენებული ექსპერიმენტული მეთოდების მოკლე მიმოხილვა და ექსპერიმენტების ჩატარების დეტალური აღწერა. დისერტაციის მესამე ნაწილში მოყვანილია ჩემი სადისერტაციო ნაშრომის ფარგლებში ზემოთ დასახელებული ორი გლობულური ცილის გამოყენებით ჩატარებული სამეცნიერო კვლევების შედეგები და მათი განხილვა. კვლევების მესამე ობიექტს წარმოადგენდა მოდელური სისტემა, რომელიც გამოვიყენეთ აზურინის შესწავლის დროს გამოვლენილი რიგი საინტერესო მოვლენების გამარტივებულ პირობებში მოდელირების მიზნით. აღსანიშნავია რომ, ცილების თვისებებისა და ფუნქციის შესასწავლად, ტრადიციულად მიღებული იყო დაბალი კონცენტრაციების წყალხსნარების გამოყენება, რაც გარკვეულწილად ამარტივებდა მიღებული შედეგების ინტერპრეტაციას.

მაგრამ ბუნებრივ პირობებში ცილა არასდროს არის იზოლირებული: მისი გადატვირთული გარემო და ბმული წყალი თამაშობენ აქტიურ როლს როგორც მის სტაბილიზაციაში, ასევე ფუნქციურ აქტივობაში. ამ ურთიერთკავშირების უფრო ჩაღრმავებული შესწავლა შესაძლებელია მხოლოდ ცილების კომპოზიტურ გარემოში მოთავსების შემთხვევაში. აქედან გამომდინარე, ჩემი დისერტაციო ნაშრომის ფარგლებში დასმული იყო შემდეგი სამი ამოცანა:

ამოცანა 1: დიმეთილსულფოქსიდის (DMSO) მაღალი კონცენტრაციის შემცველი კომპოზიტური ხსნარების გავლენა გლობულური ცილა ფერმენტის  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის თერმოსტაბილობასა და ფუნქციურ აქტივობაზე.  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის კვლევებმა აჩვენა, რომ კომპოზიტურ გარემოში DMSO-ს 0-დან 70%-მდე (v/v) ფარგლებში კონცენტრაციის ვარირებისას  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის თერმოსტაბილობა თავიდან თანაბრად იზრდება და მაქსიმუმს აღწევს 30%-ის პირობებში, ხოლო შემდგომ მცირდება და 70% ადგილი აქვს ე. წ. "მოლტენ-გლობულის" მდგომარეობას. პარალელურად ფუნქციური აქტივობა შენარჩუნებული იყო DMSO-ს კონცენტრაციის მთელ დიაპაზონში, რაც წარმოადგენს ახალ შედეგს და შეიძლება აიხსნას უპირატესი სოლვატაციიდან გამომდინარე.

ამოცანა 2: გავაგრძელეთ კვლევები იმ მიმართულებით, რომლებშიც გამოიყენებოდა კომპოზიტური სისტემები, კერძოდ, ოქროს ელექტროდზე დაფენილი ალკანთიოლის თვითაწყობადი მონოშრეები და მათზე იმობილიზებული რედოქს აქტიური ცილა აზურინი. ამჯერად დამატებული იყო ახალი კომპონენტი, ქოლინ დიჰიდროგენფოსფატი ([ch][dhp]), რომელიც ანიჭებს ცილას მინის წარმომქმნელ თვისებებს ოთახის ტემპერატურის პირობებში. [ch][dhp]-ის სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში ნიმუშის ტემპერატურის და წნევის გარკვეული ვარირებისას გამოვლენილ იქნა რიგი ახალი კანონზომიერებები. კერძოდ, მინის წარმომქმნელი გარემოს დამახასიათებელი ნიშნები: არაწრფივი და ჰისტერეზისული მოტივები, ხოლო [ch][dhp]-ის მაქსიმალური (90 mas. %) კონცენტრაციისას უკვე მიიღწეოდა ვიზუალურად მინისებური მდგომარეობა, რომელშიც აზურინი ხასიათდებოდა საკმაოდ მაღალი სტაბილობით და რედოქს აქტივობით.

ამოცანა 3. დაგეგმილი იყო მოდელური კომპოზიტური სისტემის, კერძოდ, ოქროს ელექტროდზე დაფენილი ცისტეინის თვითაწყობადი ფირის და მასში „ჩაჭერილი“ სპილენძის იონის როგორც სპილენძის შემცველი ცილის აზურინის მოდელის ელექტრონის გადასვლების ფიზიკური მექანიზმების შესწავლის მიზნით. კვლევებმა გვაჩვენა რომ რეალურად მოცემული სისტემა, კერძოდ, ცისტეინის ფირი, როგორც რეაქციის გარემო იქცევა ამოცანა 2-ის ფარგლებში შესწავლილი სისტემის (მინის წარმომქმნელი ზებლანტი



გარემო) მსგავსად. ანუ, ტემპერატურის და წნევის გარკვეული ვარიაციებისას ავლენს არაწრფივ და ჰისტერეზისულ მოტივებს.

სადისერტაციო ნაშრომის ფარგლებში მიღებული მასალა გამოქვეყნებულია სამი სამეცნიერო სტატიის სახით მაღალი იმპაქტ-ფაქტორის მქონე საერთაშორისო სამეცნიერო ჟურნალებში, ასევე თავის სახით საერთაშორისო კრებულში (ხოლო მეორე თავი საერთაშორისო კრებულში წარდგენილია დასაბეჭდად). მასალა ასევე პირადად ჩემს მიერ წარდგენილია როგორც ორი სასტენდო მოხსენება საერთაშორისო კონგრესებზე, ხოლო კიდევ ორი სასტენდო მოხსენება წარდგენილია სხვა ავტორების მიერ ჩემი თანაავტორობით. შესაბამისი თეზისები აგრეთვე არის გამოქვეყნებული საერთაშორისო სამეცნიერო ჟურნალში.

კვლევითი სამუშაო შესრულებულია შოთა რუსთაველის სამეცნიერო ფონდის (საქართველო) და ფოლცვაგენის ფონდის (გერმანია) საგრანტო პროექტების მხარდაჭერით თბილისში, თსუ ფიზიკის დეპარტამენტის და ი. ბერიტაშვილის ექსპერიმენტული ბიომედიცინის ცენტრის ბაზაზე და ასევე გერმანიაში ერლანგენ-ნიურნბერგის უნივერსიტეტში FAU.

სადისერტაციო ნაშრომი შედგება შესავლისგან, ლიტერატურის მიმოხილვისგან, ორი ექსპერიმენტული ნაწილისგან, ძირითადი შედეგების ჩამონათვალისგან და ციტირებული ლიტერატურის ნუსხისგან, რომელშიც შედის 217 ნაშრომი. დისერტაცია მოიცავს 106 ნაბეჭდ გვერდს, მათ შორის 7 ცხრილს და 38 სურათს.

## თავი 1. ლიტერატურის მიმოხილვა

### 1.1 გლობულური ცილების სტრუქტურა და მისი სტაბილობის განმსაზღვრავი მაღლები

ცილები - რთული იერარქიული სტრუქტურის მქონე მაღალმოლეკულური ორგანული ნაერთებია, რომლებიც ქმნიან ცოცხალი ბუნების ერთერთ ყველაზე გავრცელებულ და მრავალფეროვან მოლეკულათა კლასს. ისინი უამრავ ბიოქიმიურ ფუნქციას ასრულებენ ყველა ცოცხალ ორგანიზმში. ცილების ერთ-ერთი ყველაზე დამახასიათებელი უნარია ფერმენტული კატალიზი, მაგრამ გარდა ამისა ისინი ასრულებენ სამარაგო, შემკუმშავ, საყრდენ, რეცეპტორულ, სატრანსპორტო, იმუნურ და მრავალ სხვა ფუნქციას. ფუნქციების ამ მრავალფეროვნებას ბუნებრივად შეესაბამება ცილის ფორმის და ზომების მრავალფეროვნება [1-3]. ცილების მოლეკულური წონა მერყეობს საკმაოდ ფართო ფარგლებში და შესაძლოა იყოს  $10^3$ - $10^6$  Da რიგის, ხოლო ფორმის მიხედვით, განასხვავებენ გლობულურ, ფიბრილურ, მემბრანულ და ბუნებრივად განხვეულ ცილებს. გლობულურ ცილებს ახასიათებს კომპაქტური, ბურთულის მსგავსი სტრუქტურა და მაღალი წყალხსნადობა, ხოლო ფიბრილური ცილა წარმოადგენს არაწყალხსნად მოგრძო, ძაფისებრ მოლეკულას. მემბრანული ცილები არ იხსნება წყალში, როგორც წესი, შედგება რამდენიმე დომენისგან და მთლიანად ან ნაწილობრივ ჩაშენებულია უჯრედულ მემბრანაში.

**ცილების სტრუქტურის იერარქიული დონეები.** ყველა ცილა შედგება კოვალენტური პეპტიდური ბმებით დაკავშირებულ ამინომჟავათა თანამიმდევრობებისგან, რომლებიც, თავის მხვრივ, ქმნიან წყალბადურ, ჰიდროფობურ, ელექტროსტატიკურ და ვან-დერ-ვაალსის ურთიერთქმედებებით დასტაბილებულ სპეციფიკურ სამგანზომილებიან სტრუქტურას, ანუ კონფორმაციას. ამ პეპტიდურ თანამიმდევრობას, რომელიც რეგულირდება გენეტიკურად და აეწეობა 20 ე.წ. სტანდარტული ამინომჟავის კომბინაციით, უწოდებენ ცილის პირველად სტრუქტურას. მასში შემავალ ამინომჟავათა გვერდითი ჯგუფების თვისებები განსაზღვრავენ როგორც ცილების სტრუქტურულ მრავალფეროვნებას, ასევე მათი ბიოლოგიურ როლს [4, 5]. აღსანიშნავია, რომ ცილის სინთეზის დროს მის სტრუქტურაში ასევე შესაძლოა ჩაერთოს სხვადასხვა არაამინომჟავური ბუნების მქონე პროსთეტიური ჯგუფები, მაგალითად, მეტალის იონები, შაქრები, ლიპიდები, პორფირინები და სხვა.

შემდეგ იერარქიულ დონეზე პოლიპეპტიდურ ჯაჭვს ახასიათებს სამი ტიპის წყობა,

რომელიც განსხვავებული პროპორციით მეორდება სხვადასხვაგვარ ცილებში:  $\alpha$ -სპირალი,  $\beta$ -ნაკვეთები და მათ შორის განლაგებული მოუწესრიგებელი ხვეულები, რომელთა ერთობლიობა წარმოადგენს ცილის მეორეულ სტრუქტურას [6, 7]. ამ ელემენტების წარმოქმნა უმეტეს წილად განპირობებულია პეპტიდურ ჯგუფებს შორის წყალბადური ბმების სწორი წარმოქმნით. მაგრამ ზოგიერთი ამინომჟავის გვერდითი ჯგუფი ხელს უწყობს  $\alpha$ -სპირალის წარმოქმნას (Ala, Gly, Met), ხოლო არომატული (Trp, Phe) ან  $C_{\beta}$  ატომთან განშტოებული გვერდითი ჯგუფები (Val) ასტაბილებენ  $\beta$ -ნაკვეთებს და არღვევენ  $\alpha$ -სპირალს [8]. ცილების უმრავლესობა ნაწილობრივ შეიცავს ორივე ტიპის სტრუქტურულ ელემენტებს (მაგალითად, ქიმოტრიპსინი და აზურინი), მაგრამ არსებობს როგორც მთლიანად  $\alpha$ -სპირალური (ციტოქრომი c ან T4 ენდონუკლეაზა V) [9], ასევე მთლიანად  $\beta$ -ნაკვეთიანი ცილები ( $\gamma$ -კრისტალინი, HRV2 2A პროტეაზა) [10].

მოცემული პოლიპეპტიდური ჯაჭვის მეორეული სტრუქტურის მახასიათებელ სივრცულ განლაგებას ცილის მესამეულ სტრუქტურას უწოდებენ. ის იქმნება გვერდით ჯგუფებს შორის ახლო და შორეული რიგის ჰიდროფობული ურთიერთქმედებით, ელექტროსტატიკური ბმებით და ასევე ერთადერთი ძლიერი ურთიერთქმედებით, დისულფიდური ხიდაკებით, რომელიც წარმოადგენს კოვალენტურ დისულფიდურ ბმას ორ ცისტეინის ნაშთს შორის [11]. მიუხედავად მათი შედარებით იშვიათობისა, ჯაჭვებს შორის არსებული ერთი ან რამდენიმე დისულფიდური კავშირები შესამჩნევად ზღუდავს გლობულის შესაძლო კონფორმაციებს. დიდი ზომის ცილების სტრუქტურა (მაგალითად, კინაზები, დეჰიდროგენაზები, პაპაინი, თერმოლიზინი და სხვა) გართულებულია იმით, რომ ისინი შედგებიან ორი ან რამდენიმე სუბერთეულისაგან - დომენებისაგან, რომლებიც შეერთებულია პოლიპეპტიდური ჯაჭვის ერთი ან ორი მოქნილი არასტრუქტურირებული ჭიმით. აღსანიშნავია, რომ ფერმენტებში დომენებს შორის ხშირად განლაგებულია კატალიზური ცენტრი. თითოეული მათგანი შეიძლება შეიცავდეს 40-დან 400-მდე ამინომჟავურ ნაშთამდე [12].

მთელ რიგ ცილებს ასევე გააჩნია მეოთხეული სტრუქტურა, რომელიც წარმოადგენს ცილის გლობულაში რამდენიმე ერთჯაჭვიანი პოლიპეპტიდის ურთიერთგანლაგებას. უმაღლესი რიგის გლობულა, ოლიგომერი, წარმოიქმნება დამოუკიდებელი მონომერების დაკავშირებით სუსტი ურთიერთქმედებების ან დისულფიდური ხიდაკების მეშვეობით. სუბერთეულების განლაგება ოლიგომერში შეიძლება იყოს როგორც სიმეტრიული, ისე არასიმეტრიული. აღსანიშნავია, რომ გლობულური ცილების ორგანიზაციის იერარქიული დონეები ხშირად დაკავშირებულია მათი ფუნქციური აქტივობის რეგულაციასთან. მაგალითად, ფოსფორგლიცერინის ალდეგიდის ფერმენტი დეჰიდროგენეზა კარგავს აქტიურობას,

როდესაც ცილის ორი მოლეკულა შეერთდება, ფერმენტი ტუტე ფოსფატაზა კი, პირიქით, კარგავს აქტიურობას სუბერთეულებად დაყოფისას [13-16].

### **ცილის გლობულის სტაბილობის განმსაზღვრელი შიდამოლეკულური ურთიერთქმედებები.**

როგორც უკვე აღინიშნა, გარემო პირობების გათვალისწინებით ცილის გლობულის ენერგეტიკულად ხელსაყრელი სამგანზომილებიანი კონფორმაცია და მისი სტაბილობა განისაზღვრება შიდამოლეკულური წყალბადური ბმებით, ვან-დერ-ვალსის ძალებით, კულონური (ელექტროსტატიკური) და ჰიდროფობული ურთიერთქმედებით. ასეთი მრავალფეროვნება განპირობებულია იმით, რომ გვერდითი ჯგუფის მიხედვით ამინომჟავები შეიძლება იყოს არაპოლარული, უმუხტო პოლარული, უარყოფითად ან დადებითად დამუხტული (მუხტის ტიპი განისაზღვრება pH7-ის პირობებში).

ცილის გლობულის სტაბილობის შენარჩუნებაში ერთ-ერთი ყველაზე დიდი წვლილი მიუძღვის ჰიდროფობულ ურთიერთქმედებას. ცილის მოქნილი პოლიპეპტიდური ჯაჭვი პირველ მიახლოებაში ისეთი კონფორმაციის მიღებას ცდილობს, რომელშიც არაპოლარული ნაშთების წყალთან არასასურველი კონტაქტები მინიმალურია, ხოლო პოლარული ნაშთები განლაგებულია გლობულის ზედაპირზე და წარმოქმნის წყალბადურ ბმებს გამხსნელის მოლეკულებთან [17]. მაგრამ შიდა ურთიერთქმედების ნამდვილი სურათი გაცილებით რთულია, რის გამო გარდაუვალია ზედაპირზე პოლარულ ჯგუფებთან ერთად გარკვეული რაოდენობის არაპოლარული ჯგუფების განლაგება. აღსანიშნავია, რომ მცირე ზომის ცილებში არაპოლარული ჯგუფების რაოდენობა ზედაპირზე ზოგჯერ აღემატება კიდევ მათ რიცხვს ცილის შიგნით (მაგალითად, ლიზოციმში მათი რიცხვი არის, შესაბამისად, 32 და 16) [18]. მაგრამ როგორც წესი არაპოლარული ნაშთების ძირითადი რაოდენობა გლობულის შიგნით იმყოფება და ძალზე კომპაქტურ ჰიდროფობულ ბირთვის ქმნის [8].

ცილის ჰიდროფობული ბირთვის აწყობაში მნიშვნელოვანია ჰიდროფობული, ჰიდროფილური და ნეიტრალური ჯგუფების ურთიერთგანლაგება, გლობულის ზედაპირზე ან მის შიგნით ჯგუფის გადაადგილების თავისუფალი ენერგია და ასევე არაპოლარული ნაშთების ჰიდროფობულობის რაოდენობრივ ხარისხს, რომელიც მათი წყლისადმი თავისუფალი ზედაპირის პროპორციულია [19]. გარდა ამისა ჰიდროფობული ნაშთების ურთიერთქმედება დამატებით ხელს უწყობს ისედაც თერმოდინამიკურად ხელსაყრელი  $\alpha$ -სპირალების და  $\beta$ -სტრუქტურების წარმოქმნას მთელი რიგი ამინომჟავებისათვის წყალბადური ბმების გაჯერების გამო. ხოლო თუ არაპოლარული ჯგუფები წარმოქმნიან მთელ ჰიდროფობულ უბნებს  $\alpha$ -სპირალებისა და  $\beta$ -სტრუქტურების ზედაპირზე, გამოდის

რომ მეორეული სტრუქტურა სტაბილდება ცილის სივრცითი სტრუქტურით. პტიცინის მოდელზე დამყარებული სტერეოქიმიური მოსაზრებებიდან გამომდინარე მოცემული  $\alpha$ -სპირალის ან  $\beta$ -ნაკვეთვანი სტრუქტურის ჰიდროფობული ჯგუფები ერთმანეთს შორის შუალედებში შეიცავენ სხვა უბნების ჰიდროფობულ ჯგუფებს, რითაც ქმნიან ცილის მჭიდრო ჰიდროფობულ ბირთვს [20, 21]. ეს ბირთვი ეკრანირდება წყლისაგან და სტაბილდება ჰიდროფობული უბნის ნაპირებზე განლაგებული გრძელი ჰიდროფობული ჯგუფებით, ხოლო იქვე განლაგებული მოკლე პოლარული უბნები, პირიქით, ახდენენ ამ სტრუქტურების დესტაბილიზაციას.

შიდამოლეკულური ელექტროსტატიკური ურთიერთქმედება წარმოადგენს საპირისპიროდ დამუხტული ჯგუფების ელექტროსტატიკურ მიზიდულობას. უშუალოდ მისი წვლილი ცილის გლობულის სტაბილიზაციის თავისუფალ ენერგიაში გარემოს ნეიტრალური pH-ის დროს და იზოელექტრული წერტილების ახლოს საკმაოდ მცირეა [22, 23], ხოლო დაბალი ან მაღალი pH-ის პირობებში, ის იწვევს ცილის დესტაბილიზაციას მუხტების განზიდვის მზარდი ძალის გამო. მაგრამ ცილებში ელექტროსტატიკური ბმების წარმოქმნას თან სდევს იმ წყლის მოლეკულების ორიენტირება, რომლებიც გარემოცავენ დამუხტულ ჯგუფებს. ამის შედეგად ხდება ელექტროსტატიკური ბმების დასტაბილება და წყლის ენტროპიის გაზრდა, რაც ენერგეტიკურად უფრო მნიშვნელოვანია, ვიდრე უშუალოდ მუხტების კულონური ურთიერთქმედება [24].

ვან-დერ-ვალსის ძალები განპირობებულია დიპოლ-დიპოლური ურთიერთქმედებით მუდმივი, ინდუცირებული და ოსცილირებადი დიპოლების მონაწილეობით და მოქმედებს ერთმანეთთან ახლოს მყოფ ორ ატომსა ან ორ მოლეკულას შორის. ის მიახლოებით აღიწერება ლენარდ-ჯონსის პოტენციალით, ანუ, უაღრესად არის დამოკიდებული ატომებს შორის მანძილზე [25]. ვან-დერ-ვალსის ურთიერთქმედებაში მონაწილე ატომები ახლო მანძილებზე განიცდიან განზიდვას, ხოლო საშუალოდ 2-3 ანგსტრემის რიგის მანძილების ზემოდ მიზიდვას. კომპაქტურად დახვეულ ცილაში ატომებს შორის საშუალო მანძილი თითქმის უცვლელია, მაგრამ ის საკმაოდ იცვლება ცილის გაშლის დროს, რადგან დახვეული ცილის შიგთავსს აქვს საკმაოდ მჭიდრო წყობა [24, 26].

ვან-დერ-ვალსის სტაბილიზაციის მეტად მნიშვნელოვანი ენერგია განპირობებულია ამინომჟავათა ნაშთებს შორის შორეული რიგის კონტაქტების ქსელით. მის წარმოქმნას ხელს უშლიან ცილის არაერთგვაროვნება და ენტროპიული ფაქტორი, რომელიც ესწრაფვის ჯაჭვის სიხისტის შესუსტებას. მაგრამ საერთო ჯამში ის ძლიერი ზემოქმედება უნდა მოახდინოს

გლობულის დახვევაზე, რადგან სტაბილური ნატივური კონფორმაციის მჭიდრო ბირთვი აეწყობა მხოლოდ ახლო და შორეული კონტაქტების მაქსიმალური რეალიზაციით [25].

კიდევ ერთი შიდამოლეკულური ურთიერთქმედების ტიპი, წყალბადური ბმა, ჩნდება მაშინ, როდესაც წყალბადის ატომი მდებარეობს ერთ ხაზზე ორ ელექტროუარყოფით ატომს შორის. მას აქვს რთული ბუნება: ელექტროსტატიკურ და ვან-დერ-ვალსის ურთიერთქმედებასთან ერთად, მის ენერგიაში წვლილი შეაქვს ორი ელექტრონის და მეორე ელექტროუარყოფითი ატომის ელექტრონების გაუყოფელი წყვილის ენერგიას. აღსანიშნავია, რომ წყალბადურ ბმაში მონაწილე ელექტროუარყოფით ატომებს შორის მანძილი იგივე ატომების ვან-დერ-ვალსის რადიუსებზე დაახლოებით 0.04 ნმ-ით ნაკლებია და მისგან განსხვავებით ძალიან მგრძნობიარეა ატომების სივრცული ორიენტაციის მიმართ.

წყალბადურ ბმებს არსებითი როლი უკავია როგორც მეორეული სტრუქტურის წარმოქმნაში [27], ასევე ცილის გლობულის დახვევასა და სტაბილიზაციაში [28-30]. ტრანსლაციური და როტაციული ენტროპიის ნაკლები დანაკარგის გამო წყალბადურ ბმებს დახვეულ ცილაში უპირატესობა ენიჭება გაშლილ ჯაჭვსა და წყალს შორის წარმოქმნილ ბმებთან შედარებით [31]. გლობულის შიგნით არსებული წყალბადური ბმები თითქმის მუდმივია [25], ხოლო მის ზედაპირზე წყალთან წარმოქმნილი წყალბადური ბმები არსებობენ მხოლოდ დროის მცირე მონაკვეთში. მიუხედავად ამისა მათ აქვთ განსაკუთრებით დიდი მნიშვნელობა ცილის სტაბილიზაციაში [32, 33]. თანამედროვე წარმოდგენების თანახმად, გლობულური ცილების უნიკალური ნატივური კონფორმაცია განუყოფლად დაკავშირებულია არა მხოლოდ შიდამოლეკულურ ურთიერთქმედებებზე, არამედ ცილის გარემოცვაზე [32, 33]. ფურიე-გარდაქმნის ინფრაწითელი დიფერენციული სპექტროსკოპიის გამოყენებით ჩატარებულმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ ცილის ზედაპირული დამუხტული ჯგუფები მათთან დაკავშირებულ წყლის ფენასთან ქმნიან ძლიერი წყალბადური ბმების ბადას, რომელთა ენერგია ბევრად აღემატება საშუალო წყალბადური ბმის ენერგიას სუფთა წყალში [34]. ამ წყლის ფენის, ე.წ. ბმულ წყლის, ცილის ზედაპირიდან მოშორება იწვევს მისი სტრუქტურის დაშლას. ამრიგად, ცილის სტაბილობის შესწავლისას აუცილებელია ამ წყლის თვისებების გათვალისწინება. აღსანიშნავია, რომ ცილა-წყალის ურთიერთქმედება გართულებულია წყალში გახსნილი დანამატებით, რომლებიც ცვლიან როგორც თვით წყლის სტრუქტურას წყალბადური ბმების გადანაწილების ხარჯზე, ასევე ცილის ზედაპირთან ურთიერთქმედების სურათს.

## 1.2 ცილის კონფორმაციული მდგომარეობები და ქვემდგომარეობები

ყველა ცილას აქვს თავისი ფუნქცია და მუშაობის ოპტიმალური პირობების ფარგლები, რომლებშიც ის იმყოფება კომპაქტურ მდგომარეობაში და ახორციელებს მაღალ ფუნქციურ აქტივობას. ასეთ პირობებში მყოფ ცილას ახასიათებს უნიკალური მაკროსკოპული კონფორმაცია, რომელიც დიდ წილად დამოკიდებულია მის პირველად სტრუქტურაზე [5, 8]. მიკროსკოპული თვალსაზრისით კი ასეთი კონფორმაცია შეიძლება განხორციელდეს მსგავს მიკრომდგომარეობათა შეზღუდული ერთობლიობის ხარჯზე. ასეთ კონფორმაციათა ანსამბლს უწოდებენ ცილის ნატივურ მდგომარეობას. მრავალგანზომილებიან კონფორმაციულ (კონფიგურაციულ) სივრცეში ნატივურ მდგომარეობას შეესაბამება თავისუფალი ენერჯის ზედაპირის გლობალური მინიმუმის უბანი (სურ. 1) [35, 36, 37]. მაგრამ განსაკუთრებით უნდა აღინიშნოს, რომ ნატივური მდგომარეობა იკავებს თავისუფალი ენერჯის მინიმუმს მხოლოდ მოცემული ცილისათვის დამახასიათებელი ფიზიოლოგიური პირობების ფარგლებში.

ნატივურ მდგომარეობაში მყოფ გლობულურ ცილას აქვს მეტად კომპაქტური სტრუქტურა, მჭიდროდ ჩალაგებული ჰიდროფობული ბირთვი და პოლარული გარსები, ხასიათდება დაბალი ენტროპიით [24, 38]. მაგრამ ნატივურ მდგომარეობას ასტაბილებს სხვადასხვა, ხშირად ურთიერთსაწინააღმდეგო ძალების სუსტი ბალანსი: მის შესანარჩუნებლად საჭიროა საკმაოდ ვიწრო ფარგლებში იყოს დაცული გარემოს მთელი რიგი პარამეტრები (ტემპერატურა, pH, ოსმოლიტები და ა.შ.), რომელთა ცვლილებების შემთხვევაში იწყება ცილის დენატურაცია, ანუ ლღობა. დენატურაციის შედეგად ცილა კარგავს დადგენილ სივრცით სტრუქტურას და გადადის განხვეულ მდგომარეობაში, რომელსაც აქვს მაქსიმალური ენტროპია [8]. ფიზიოლოგიურ პირობებში გაშლილი დენატურიებული კონფორმაციები იკავებენ ენერგეტიკული ზედაპირის ყველაზე არახელსაყრელ ზედა უბანს (სურ. 1) [35-37].

გაშლილი მდგომარეობის სტრუქტურები მკვეთრად განსხვავდება ნატივური მდგომარეობის სტრუქტურებისაგან და არაა კარგად შესწავლილი თექნიკური შეზღუდვების გამო. თანამედროვე მოსაზრებებიდან გამომდინარე, გაშლილი მდგომარეობის თვისებები განისაზღვრება არა მხოლოდ ამინომჟავების თანამიმდევრობით, მაგრამ ასევე დიდწილად დამოკიდებულია მის გამომწვევ პირობებზე [39]. დენატურიებული მდგომარეობა წარმოადგენს დინამიკურად ცვალებად მოუწესრიგებელ კონფორმაციათა განაწილებას,

რომლებიც ახორციელებენ ურთიერთგადასვლებს ფლუქტუაციების ხარჯზე [40-41].

აღსანიშნავია, რომ მცირე ზომის ცილებისათვის და ასევე დიდი ცილების ცალკეული დომენებისათვის დამახასიათებელია საკმაოდ კოოპერატიული დენატურაციული გადასვლა, რაც ნიშნავს, რომ ამ პროცესში ჩართულია ამინომჟათა უმრავლესობა. მადესტაბილუბელი გარემოდან ნატივური მდგომარეობის შესაბამის პირობებში დაბრუნებისას ზოგიერთი ცილისათვის შესაძლებელია კომპაქტური ნატივური კონფორმაციის სპონტანური აღდგენა დენატურაციის შემდეგ. ცილის რენატურაციას, ანუ აღდგენას, ეწინააღმდეგება მოლეკულათაშორისი ან შიდამოლეკულური აგრეგაცია, ამიტომ ის ძირითადად მიიღწევა მცირე ზომის ცილებისათვის და საჭიროებს ექსპერიმენტული პირობების საგულდაგულო შერჩევას. მოცემული ცილისათვის დიდი მნიშვნელობა ენიჭება მის კონცენტრაციას, პოლიპეპტიდური ჯაჭვის ამინომჟავურ შემადგენლობას, მადესტაბილუბელი ფაქტორის ხასიათს ან ხსნარში აღმდგენი დანამატების არსებობას [41-43].

ცილის ნატივურსა და დენატურირებულ მდგომარეობის გარდა არსებობს კიდევ ერთი სტაბილური მდგომარეობის ტიპი, რომელსაც მოლტენ-გლობულას, ანუ გამლღვალ გლობულას უწოდებენ [44]. მრავალგანზომილებიან კონფორმაციულ სივრცეში მოლტენ-გლობულის ტიპის მდგომარეობები იკავებენ თავისუფალი ენერჯის ზედაპირის ენერგეტიკული პროფილის შუალედურ უბანს ნატივურსა და განხვეულ მდგომარეობებს შორის [35]. კუვაიმამ თანამშრომლებთან ერთად [45] პირველად აღმოაჩინა, რომ  $\alpha$ -ლაქტალბუმინი დაბალი pH-ისა და მარილის გარკვეული კონცენტრაციის დროს ქმნის საკმაოდ სტაბილურ კონფორმაციას, რომელსაც ახასიათებს ნაკლები კომპაქტურობა და მეორეული სტრუქტურის ისეთივე რაოდენობა, როგორც ნატივურ ცილას, მაგრამ სპეციფიკური მესამეული ურთიერთქმედება მასში დარღვეულია. მოგვიანებით, ოგუშიმ და ვადამ მსგავსი მდგომარეობა მიიღეს ციტოხრომ c-სათვის და უწოდეს მოლტენ-გლობულა [44]. ამას მოყვა მოლტენ-გლობულის ტიპის მდგომარეობის მიღება უამრავი ცილისათვის და ამ ცნების გაფართოება. თანამედროვე განსაზღვრებით, გალმღვალი გლობულა არის ცილის თერმოდინამიკურად სტაბილური მდგომარეობა, რომლის რეალიზაცია ხდება რბილ დენატურირებად პირობებში და თავისი თვისებებით შუალედურია ნატივურ და მთლიანად გაშლილ მდგომარეობებს შორის. აღსანიშნავია, რომ ცილა გალმღვალი გლობულის მდგომარეობაში მეტად განიცდის პროტეოლიზს, ვიდრე ნატივურ მდგომარეობაში, მაგრამ არსებითად ნაკლებად, ვიდრე მთლიანად გაშლილ ფორმაში [46].

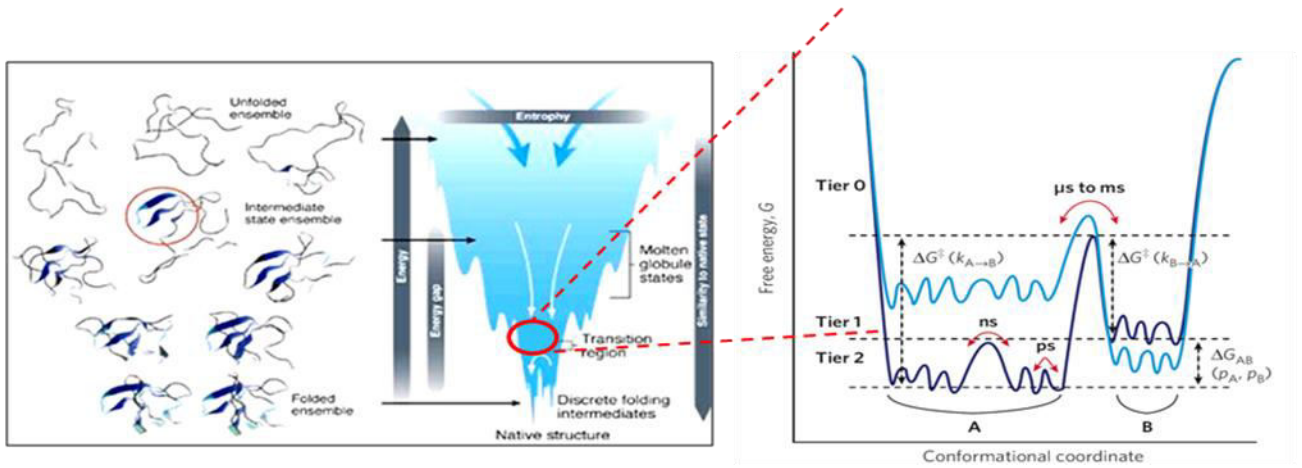
გალმღვალი გლობულის მდგომარეობა ენერგეტიკულად ნატივურზე ნაკლებად



ხელსაყრელია, სამაგიეროდ უფრო ხელსაყრელია ენტროპიულად [48]. ვინაიდან მოლტენ-გლობულის მსგავს მდგომარეობაში ვან-დერ-ვალსის ურთიერთქმედება უკვე დარღვეულია, ამ მდგომარეობაში მყოფი ცილა შეიძლება იმყოფებოდეს როგორც ნატივურის მსგავს კომპაქტურ კომფორმაციაში, რომელსაც აქვს მეტად გაზრდილი ლაბილობა (ფლექსიბილობა), ასევე ნაწილობრივად განხვეულიც კი, რაც განპირობებულია ცილის ჰეტეროგენული სტრუქტურით [46-48]. ცილის ლაბილობა იმდენად იზრდება, რომ ხდება გვერდითი ჯაჭვების მჭიდრო წყობის მოშლა. ხოლო ნატივურის მსგავსი სტრუქტურის შენარჩუნების რაოდენობრივი ხარისხი დამოკიდებულია არა მხოლოდ პოლიპეპტიდური ჯაჭვის ამინომჟავურ შემადგენლობაზე, არამედ დენატურანტის ხასიათზე. ამის გათვალისწინებით შეიძლება ითქვას, რომ გაღმდვალ გლობული არის ინტენსიურად ფლუქტუირებადი მესამეული სტრუქტურის მქონე კომპაქტური გლობულა [47]. კომპაქტურობის ფაქტი დასტურდება დამახასიათებელი სიბლანტის გაზომვის მეშვეობით [47], ხოლო რიგი ცილებისათვის დადგენილია გამოკვეთილი მესამეული სტრუქტურის მოშლა, მაგრამ მეორეული სტრუქტურის შემცველობა ნატივურ მდგომარეობის მსგავსია [46, 48, 49].

გაღმდვალ გლობულის მდგომარეობის სტაბილიზაციაში დიდ როლს ასრულებს ჰიდროფობული ურთიერთქმედება. გოტომ და თანაავტორებმა [50, 51] დაადგინეს, რომ მჟავით დენატურირებული ცილის კონფორმაციას განსაზღვრავს კომპაქტური მდგომარეობის ხელშემწყობი ჰიდროფობული ურთიერთქმედების და პროტონირებულ ჯგუფებს შორის ელექტროსტატიკური განზიდვის ძალის ფაქიზი ბალანსი. ამრიგად, მოლტენ-გლობულის მდგომარეობის სტაბილიზაციაში ელექტროსტატიკური განზიდვის როლი ნატივურისგან განსხვავდება და მისი სტაბილიზაციის მექანიზმი გაცილებით უფრო მარტივია, ვიდრე ნატივური მდგომარეობის შემთხვევაში [52].

ზემოდ განხილულ სამ სტაბილურ მდგომარეობასთან ერთად ასევე უნდა აღინიშნოს მეტასტაბილური მდგომარეობა, რომელსაც აქვს დიდი მნიშვნელობა ზოგიერთი ცილის ფუნქციური აქტივობის შესრულებისათვის და აგრეთვე მისი რეგულაციისათვის [53, 54]. იმის გათვალისწინებით, რომ ცილის ენერგეტიკული ზედაპირი არ არის გლუვი (სურ. 1.1), არსებობს იმის ალბათობა, რომ ფუნქციურად აქტიური მდგომარეობა მოხვდეს კინეტიკურ ხაფანგში და თავისუფალი ენერჯის გლობალური მინიმუმის მაგივრად დაიკავოს უფრო მაღალი, კინეტიკურად მისაღწევი ენერჯის მეტასტაბილური მდგომარეობა, მაშინ როდესაც გლობალურ მინიმუმში აღმოჩნდება კომპაქტური, მაგრამ არააქტიური ფორმა [55].



სურათი 1.1. ცილის გლობულის ენერგეტიკული ზედაპირი მრავალგანზომილებიან კონფორმაციულ სივრცეში

### 1.3 გლობულური ცილების მრავალფეროვნება; კავშირი მათ სტრუქტურულ აგებულებას, ფლუქტუაციურ დინამიკასა და ფუნქციურ აქტივობას შორის

ცილის გლობულას, რომელიც წარმოადგენს შეზღუდული ფლუქტუაციური შესაძლებლობების მქონე კომპაქტურ რეგულარულ სტრუქტურას, ახასიათებს აპერიოდული კრისტალის თავისებურებები [24]. ეს ნიშნავს, რომ რთულად ორგანიზებულ ცილის გლობულებში შიდა გლობულური კონტაქტების მაღალი სპეციფიურობის მიუხედავად, შესაძლებელია გლობულად დახვეული პოლიპეპტიდური ჯაჭვის ცალკეული სეგმენტების სივრცითი გადაადგილება, რომელიც საჭიროა ცილის ბიოლოგიური ფუნქციონირებისათვის [56].

მრავალგანზომილებიან კონფორმაციულ სივრცეში ცილის ენერჯის გლობალური მინიმუმის უბანს გააჩნია ბევრი ენერგეტიკულად ახლო მდგომი ქვემდგომარეობა, რომლებსაც თავის მხრივ, აქვთ კიდევ უფრო ნატიფი სტრუქტურა (სურ. 1ბ). ეს გამომდინარეობს იმიდან, რომ ნატივური მდგომარეობა წარმოადგენს ერთმანეთთან ახლოს მყოფი კონფორმაციული მიკრომდგომარეობების ერთობლიობას, რაც გლობულის ლაბილურობის, ანუ ფლუქტუაციური ძვრადობის შედეგია [36, 57, 58]. ნატივური კონფორმაციის ფარგლებში მიკროკონფორმაციების საკმაოდ დიდი რაოდენობა განაპირობებს ენერჯის ლოკალური მინიმუმების ასევე დიდ რაოდენობას. გლობალური მინიმუმის პირობებში სხვადასხვა ქვემდგომარეობებში გადასვლის უნარი, ანუ ცილების ფლექსიბილობა, აუცილებელია იმისათვის, რომ მათ შეასრულონ თავისი ფუნქცია [57]. ელექტრონის გადატანა, ფერმენტული კატალიზი და სხვა პროცესები, რომლებიც ბუნებაში ცილების მეშვეობით ხორციელდება, წარმოადგენენ მრავალსტადიურ პროცესებს, შემდგარს ელემენტარული კონფორმაციული და ქიმიური გარდაქმნებისაგან. ქიმიური გარდაქმნების კოორდინატები განუყოფლად შეუღლებულია კონფორმაციულ გარდაქმნებთან. აქედან გამომდინარე, იმისათვის, რომ ბიომოლეკულური პროცესი ფიზიკურ დონეზე აღვწეროთ, ჩვენ უნდა განვიხილოთ მთელი სარეაქციო სისტემის თავისუფალი ენერჯია, როგორც შესაბამისი თავისუფლების ხარისხების ფუნქცია.

მრავალგანზომილებიან კონფორმაციულ სივრცეში მოლტენ-გლობულის ტიპის მდგომარეობები იკავებენ თავისუფალი ენერჯის ზედაპირის ენერგეტიკული პროფილის შუალედურ უბანს ნატივურსა და განხვეულ მდგომარეობებს შორის [58]. ამ ტიპის მდგომარეობებში მიკროსკოპული მახასიათებლები, როგორცაა ატომების კოორდინატები

მათი სითბური რხევების სიხშირე და ა.შ., არსებითად განსხვავდება ნატივურისაგან [48]. გარდა ამისა გალმდვალ გლობულა შესაძლოა ძალზე განსხვავდებოდეს ნატივური ცილისაგან თავისი ქიმიური თვისებებით, მაგალითად, კატალიზური უნარით, რომელიც რიგ შემთხვევებში მკვეთრად არის შემცირებული [59].

ამრიგად, ცილის ნაწილობრივ დახვეული მდგომარეობა წარმოადგენს პრინციპულად ახალ თერმოდინამიკურ შუალედურ მდგომარეობას, რომლის არსებობით აიხსნება ცილის დახვევის გამოცხადებული სიჩქარე და ეფექტურობა. სავარაუდოდ, ეს მდგომარეობა მნიშვნელოვნად ზღუდავს კონფიგურაციულ სივრცეში ხელმისაწვდომი კოორდინატების ათვისებას, რითაც აიხსნება ლევიტალის პარადოქსი და რიგი სხვა პრობლემები [57, 60]. მოლტენ გლობულის წონასწორული ფორმები ძალზე ჰგავს ცილის დახვევის კინეტიკურ ინტერმედიატებს და გამოთქვა ვარაუდი, რომ მოლტენ-გლობულას შეუძლია არსებითი როლი შეასრულოს ცოცხალ უჯრედში ცილების სინთეზის დროს. გარდა ამისა დიდი ინტერესი ცილის მოლტენ-გლობულის მდგომარეობის ფიზიკო-ქიმიური პარამეტრების კვლევის მიმართ გამოწვეულია იმით, რომ ზოგიერთი ცილისათვის ეს მდგომარეობა მნიშვნელოვან როლს თამაშობს მათი რეგულაციაში და ფუნქციის შესრულებაში [61-63].

რაც შეეხება დენატურირებულ მდგომარეობას, ცილების უმრავლესობისათვის განხვეულ ფორმაში გადასვლა გულისხმობს ფუნქციური აქტივობის დაკარგვას. მაგალითად, ფერმენტების შემთხვევაში დენატურაციით გამოწვეული კონფორმაციული ცვლილებების გამო შეუძლებელი ხდება სუბსტრატის გამოცნობა და შემდგომი გარდაქმნა. მაგრამ ცილების უმრავლესობისგან განსხვავებით, მთელი რიგი ცილებისა, რომლებიც მიეკუთვნებიან ბუნებრივად განხვეულ ცილებს, კომპაქტური კონფორმაციის არქონის მიუხედავად ინარჩუნებენ ფუნქციურ აქტივობას [65]. გარდა ამისა, ასეთი ცილა იძენს კომპაქტურ სტრუქტურას სპეციფიური სუბსტრატის მიერთებისას და სუბსტრატის გარეშე არის ინაქტივირებულ განხვეულ მდგომარეობაში [66].

#### 1.4 ელექტრონების გადასვლები (მიმოცვლა) ბიომოლეკულებში; მათი კინეტიკური გამოვლინებები და დეტალური ფიზიკური მექანიზმები

ელექტრონის გადატანა არის ერთ ერთი ყველაზე გავრცელებული ფუნდამენტური მოვლენა ფიზიკურ, ბიოლოგიურ და ქიმიურ სისტემებში. ცოხალ ბუნებაში ელექტრონის გადატანა მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ბიოლოგიური ობიექტების ფუნქციონირებაში ნანოსკოპურ დონეზე [67-70]. მისი მონაწილეობით ხორციელდება უამრავი მნიშვნელოვანი ბიოქიმიური პროცესი, მათ შორის ფოტოსინთეზი [71, 72] და სუნთქვითი ჯაჭვის ჟანგვა-აღდგენითი რეაქციები, რომლების დანიშნულება არის სხვადასხვა ტიპის ცოცხალი უჯრედების ენერგიით უზრუნველყოფა [73, 74]. ვინაიდან ცოცხალ ბუნებაში ყველა ბიოქიმიური რეაქცია მიდის უჯრედის კონდენსირებულ გარემოში, ჟანგვა-აღდგენითი პროცესების კინეტიკის თანამედროვე კვანტური თეორია მოითხოვს გამხსნელის, ანუ გარემოს, დინამირური გავლენის გათვალისწინებას ელექტრონის გადატანის პროცესის კინეტიკურ პარამეტრებზე [75, 76].

პრინციპული გარღვევა ელექტრონის გადატანის პროცესის შესწავლაში მოახდინა ვ. ლიბიმ, რომელმაც პირველად შეაფასა სოლვატაციის როლი ელექტრონის გადატანაში და გამოიყენა ვერტიკალური გამოსხივებითი გადასვლის შემთხვევაში მოქმედი ფრანკ-კონდონის პრინციპი არაგამომსხივარი ჰორიზონტალური ელექტრონის გადატანის პროცესისთვის [77]. იზოტოპური გაცვლითი რეაქციების შემთხვევაში (self-exchange reaction), როდესაც ელექტრონის გადატანა ხდება ორ ერთნარი მეტალის იონებს შორის (მაგალითად,  $Fe^{2+}$  და  $Fe^{3+}$ ) დამზერილი იყო ე. წ. სოლვატაციური ენერგეტიკური ბარიერი. ლიბის დასკვნით, ეს ბარიერი გამომდინარეობს ბირთვების და დიპოლური გარემოს ელექტრონის გადასვლასთან შედარებით უფრო ნელი გადაწყობიდან. ამრიგად იმისათვის, რომ ელექტრონის გადასვლისას შეიცვალოს ბირთვული და დიპოლური კოორდინატები საჭიროა გარკვეული ენერგია, რომელიც აისახება ამ ბარიერში. შემდგომ ეს იდეა განავითარა რ. მარკუსმა და დაამტკიცა, რომ დამატებითი ენერგია, რომელიც საჭიროა გარემოს რეორგანიზაციისათვის, რათა ელექტრონის გადასვლა მოხდეს ენერგეტიკული ცვლილებების გარეშე (ასევე როგორც გარემოს შემდგომი რელაქსაცია ახალი წონასწორების დამყარებისათვის), ხდება ფლუქტუაციის ხარჯზე [78-80].

მარკუსის ფორმულიდან გამომდინარე ელექტრონის გადასვლის სიჩქარის კონსტანტა უდრის

$$k_{ET}^o = \frac{h\nu}{k_B T} \exp\left(-\frac{(\lambda + \Delta G_0)^2}{4\lambda k_B T}\right) \quad (1.1)$$

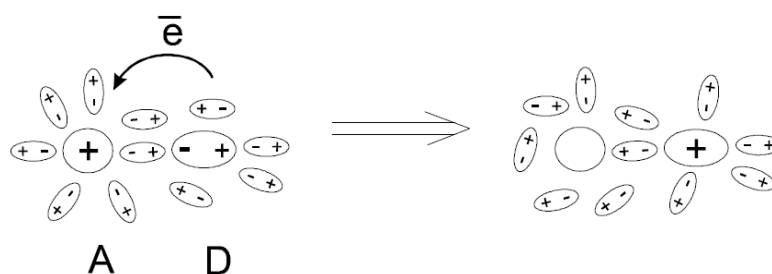
სადაც  $\Delta G_0$  არის,  $\lambda$  - გარემოს რეორგანიზაციის ენერგია,  $h$  - პლანკის კონსტანტა,  $\nu$  - სიხშირე,  $k_B$  - ბოლცმანის კონსტანტა,  $T$  - აბსოლუტური ტემპერატურა.

ელექტრონის გადასვლა სრულად აღიწერება მარკუსის თეორიის ფარგლებში, თუ დაცულია შემდეგი პირობები [78-80]:

1) ყოველი ბირთვული კოორდინატა არის კლასიკური და, ამრიგად, შეიძლება ელექტრონის გადასვლის დროის მონაკვეთში რეაგენტების შიდა საკოორდინაციო სფეროს პარამეტრების ცვლილების უგულვებელყოფა.

2) საწყისი დონორ-აქცეპტორული წყვილი იმყოფება წონასწორულ მდგომარეობაში, ელექტრონის გადასვლა არის გაცილებით სწრაფი ბირთვული კოორდინატების ცვლილებასთან შედარებით. ამიტომ არც დიფუზიური კომპონენტი და არც ვიბრაციული და ნორმალური რხევები არ განიხილება.

3) პოტენციური ენერგიის ზედაპირი არის პარაბოლური, რაც ნიშნავს, რომ აქტივაციის ენერგიის სიდიდე დამოკიდებულია დიპოლური გარემოს პოლარიზაციაზე, ანუ გამხსნელის დიპოლური მოლეკულების ორიენტაციაზე. გარდა ამისა იგულისხმება, რომ გარემოს ორიენტაციული პოლარიზაცია ყველა წერტილში წრფივად არის დამოკიდებული ველის დაძაბულობაზე  $\sim eE$  (სურ. 1.1).



სურათი 1.1. გარემოს დიპოლური მოლეკულების ორიენტაცია რეაგენტების გარშემო.

თანამედროვე მოსაზრებებიდან გამომდინარე ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტა და, საზოგადოდ, მექანიზმი არსებითად არის დამოკიდებული დონორსა და აქცეპტორს შორის მანძილზე. მაგრამ ზოგად ფორმაში სიჩქარის კონსტანტა შეიძლება ავსახოთ შემდეგნაირად [81-83]:

$$k_{et}^o = \frac{(H_{if})^2}{\hbar} \frac{\rho_m}{1+g} \left( \frac{\pi^3 RT}{\lambda} \right)^{1/2} \exp\left(-\frac{\Delta G_a}{RT}\right) \quad (1.2)$$

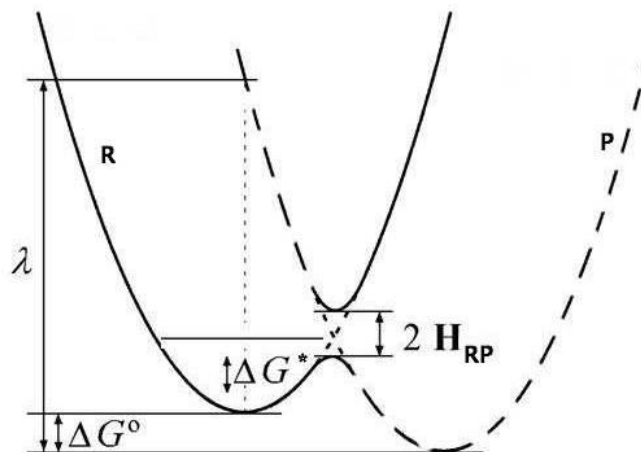
სადაც  $\rho_m$  არის ელექტროდის ელექტრონული მდგომარეობის სიმკვრივე,  $H_{if}$  - ელექტრონული ურთიერთქმედების მატრიცული პარამეტრი,  $\Delta G_a$  - რეაქციის აქტივაციის ენერგია,  $\lambda$  - რეორგანიზაციის თავისუფალი ენერგია,  $R$  - უნივერსალური გაზური კონსტანტა,  $\hbar$  - პლანკის კონსტანტა,  $T$  - აბსოლუტური ტემპერატურა (სურ. 1.2). ხოლო  $g$  არის ადიაბატურობის პარამეტრი, რომელიც განსაზღვრავს ელექტრონის გადატანის ერთ-ერთი რეჟიმის განხორციელების ალბათობას და გამოისახება შემდეგი ფორმულით:

$$g = \frac{\pi^3 RT (H_{if})^2 \rho_m}{\hbar v_{eff} \lambda} \quad (1.3)$$

სადაც  $v_{eff}$  არის სარეაქციო გარემოში მყოფი გამხსნელის დიპოლების რელაქსაციის ეფექტური სიხშირე. თუ  $g \gg 1$ , ელექტრონის გადატანის პროცესი არის ადიაბატური, ხოლო როცა  $g \ll 1$ , ის არაადიაბატურ რეჟიმში მიმდინარეობს. აქედან გამომდინარე, ელექტრონის გადასვლის რეჟიმის ტიპი დამოკიდებულია გარემოს რელაქსაციის დროსა, პროცესის რეორგანიზაციის ენერგიასა და მატრიცული ელემენტის სიდიდეზე, რომელიც განსაზღვრავს დონორსა და აქცეპტორს შორის ურთიერთქმედების სიძლიერის.

არაადიაბატური ელექტროდული რეაქციის შემთხვევაში ელექტრონის გადასვლის სიჩქარე აღიწერება შემდეგი ფორმულით [81, 84]:

$$k_{et(NA)}^o = \frac{(H_{if})^2}{\hbar} \rho_m \left( \frac{\pi^3 RT}{\lambda} \right)^{1/2} \exp\left(-\frac{\Delta G_a^*}{RT}\right) \quad (1.4)$$



სურათი 1.2. რეაგენტების და პროდუქტების პოტენციური ენერჯიის ზედაპირების სქემატური გამოსახულება.

ანუ, სიჩქარის არაადიაბატური კონსტანტა ელექტრონული ურთიერთქმედების მატრიცული ელემენტის პროპორციულია  $k_{et} \propto (H_{if})^2$ , რომელიც თავის მხრივ გამოისახება შემდეგი ფორმულით [69, 81, 85-95]:

$$H_{if} = H_{if}^o \exp \left( -\frac{\beta}{2} R_e \right) \quad (1.5)$$

სადაც  $H_{if}^o$  არის მატრიცული პარამეტრის მნიშვნელობა დონორსა და აქცეპტორს შორის მინიმალური მანძილის შემთხვევაში, ხოლო

$$\beta = -d(\ln k_{et}) / dx \quad (1.6)$$

ელექტრონის ტუნელირების კოეფიციენტი, რომლის მნიშვნელობა დამოკიდებულია დონორსა და აქცეპტორს შორის მყოფი გარემოს ელექტროგამტარობის უნარზე.

ფორმულა (1.1)-ის თანახმად, არაადიაბატური პროცესის კონსტანტა ასევე დამოკიდებულია აქტივაციის ენერჯიაზე:

$$k_{et} \propto \exp \left[ -\frac{\Delta G_a}{RT} \right] \quad (1.7)$$



თავის მხრივ აქტივაციის ენერგია გამოისახება ფორმულით [69, 78, 85, 86, 93-97]:

$$\Delta G_a = \frac{(\lambda - \Delta G_o)^2}{4 \lambda} - H_{if} \quad (1.8)$$

ანუ, როცა  $\Delta G_o=0$  და  $H_{if}$ -ის მნიშვნელობა მცირეა (რასაც ადგილი აქვს დიდ მანძილებზე, იხილე ფორმულა (1.5), მაშინ  $\Delta G_a \approx 1/4 \lambda$ . იმ შემთხვევაში თუ  $\lambda$  და  $H_{if}$ -ის სიდიდეები ერთმანეთის შესადარისია და  $\Delta G_o=0$ , მაშინ ე.წ 1/4-ის წესი აღარ მოქმედებს.

მარკუსის მოდელის თანახმად, შინაგანი რეორგანიზაციის ენერგია  $\lambda$ , რომელიც განაპირობებს აქტივაციის ენერგიას  $\Delta G_a$  (ფორმულა 1.8), ორი ნაწილისაგან [69, 78, 93-98]:

$$\lambda = \lambda_{(IS)} + \lambda_{(OS)} \quad (1.9),$$

სადაც შიდასფერული რეორგანიზაციის ენერგია  $\lambda_{(IS)}$  მოცემულია ფორმულით [69, 78, 93-98]:

$$\lambda_{(IS)} = \sum_j \frac{f_j^R f_j^P}{f_j^R + f_j^P} (\Delta q_j) \quad (1.9)$$

სადაც  $f_j^R$  და  $f_j^P$  არის, შესაბამისად, რეაგენტისა და პროდუქტის j-ური ძალოვანი კონსტანტები და  $\Delta q_j$  - j-ური კოორდინატის წონასწორული ცვლილება. ხოლო გარესფერული  $\lambda_{(OS)}$  დიელექტრულ გარემოში მოთავსებული სფერული რეაქტანტის შემთხვევაში, ასახავს აქტივირებული კომპლექსის სოლვატაციურ ეფექტებს და აღიწერება შემდეგი ფორმულით [69, 78, 93-98]:

$$\lambda_{(OS)} = \frac{(\Delta e)^2 N_A}{4\pi \epsilon_o} \left( \frac{1}{\epsilon_{op}} - \frac{1}{\epsilon_s} \right) \left( \frac{1}{2a} - \frac{1}{4R_e} \right) \quad (1.10)$$

სადაც  $\Delta e$  არის გადატანილი ელექტრონული მუხტი,  $N_A$  - ავოგადროს მუდმივა,  $\epsilon_o$  - ვაკუუმის შეღწევადობა,  $\epsilon_s$  - ხსნარის სტატიკური შეღწევადობა,  $\epsilon_{op}$  - ხსნარის ოპტიკური შეღწევადობა,  $a$  - სფერული რეაქტანტის რადიუსი, ხოლო  $R_e$  - მანძილი დონორსა და აქცეპტორს შორის.

იმ შემთხვევაში, როდესაც ელექტრონის გადატანა ხორციელდება ადიაბატურ რეჟიმში [81, 84, 100], სიჩქარის კონსტანტა აღიწერება შემდეგი ფორმულით [84]:

$$k_{et(A)}^o = v_{eff} \left( \frac{\lambda}{\pi^3 RT} \right)^{1/2} \exp\left(-\frac{\Delta G_a^*}{RT}\right) \quad (1.11)$$

სადაც  $v_{eff}$  არის სარეაქციო გარემოს რელაქსაციის ეფექტური სიხშირე, რომელიც დაკავშირებულია ელექტრონის გადასვლასთან. დეზის ტიპის გამხსნელებისათვის

$$v_{eff} = \left( \frac{\epsilon_s}{\epsilon_\infty} \right) \frac{RT}{3\eta V_m} \quad (1.12)$$

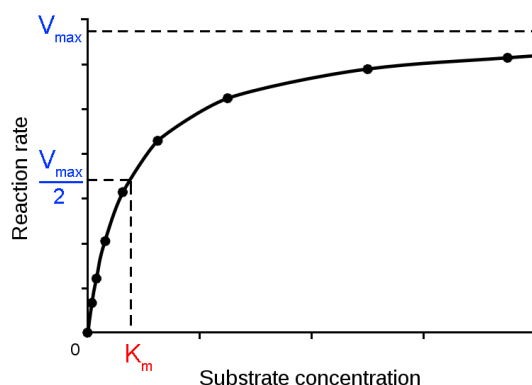
სადაც  $\eta$  არის გამხსნელის სიბლანტე,  $\epsilon_s$  და  $\epsilon_\infty$  - სტატიკური და უსასრულო სიხშირის დროს შესაბამისი დიელექტრიკულ კონსტანტები, ხოლო  $V_m$  არის მოლარული მოცულობა [81, 84, 100].

ფორმულა (1.11)-დან ჩანს, რომ ადიაბატური სიჩქარის კონსტანტა არაადიაბატურისგან განსხვავებით არ არის დამოკიდებული რეაგენტებს შორის მანძილზე  $H_{if}$ -ის ხარჯზე, მაგრამ დამოკიდებულია გამხსნელის რელაქსაციის დროზე  $k_{et} \propto v_{eff} \propto \tau^{-1}$  და შესაბამისად გამხსნელის სიბლანტეზე  $\eta$  [81].

### 1.5 ფერმენტული კატალიზი. $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის სტრუქტურა და ფუნქცია. ლიტერატურული მონაცემები ორგანული დანამატების ზემოქმედების შესახებ მის თერმოდინამიკურ და კინატიკურ მახასიათებლებზე

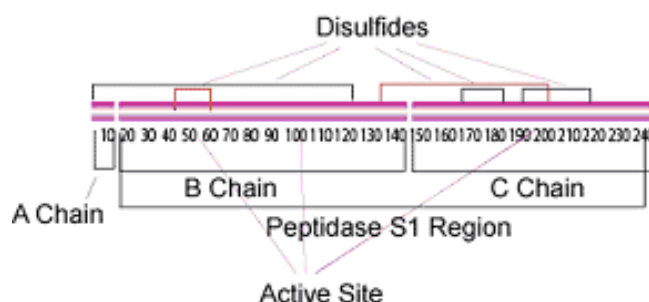
ფერმენტული კატალიზი წარმოადგენს ბიოქიმიური პროცესების მეტად ეფექტური დაჩქარების ფენომენს, რომელიც ცოცხალ სისტემებში ძირითადად გლობულური ცილების საშუალებით ხორციელდება. ფერმენტები თამაშობენ კატალიზატორების როლს ბიოქიმიური პროცესების უმრავლესობაში, რაც მილიონობით ჯერ ზრდის მათ სიჩქარეს, გარდა რეაქციების დაჩქარების საოცარი უნარისა, ფერმენტებს გააჩნიათ სხვა მნიშვნელოვანი თვისებები – თავისი სუბსტრატების მიმართ მაღალი სპეციფიურობა და ფუნქციური აქტივობის მეტად ეფექტური რეგულაციის უნარი [101, 102]. სპეციფიურობა მიიღწევა სუბსტრატისა და ფერმენტის აქტიური ცენტრის კომპლემენტარობით, რომელიც უზრუნველყოფს რეაქციაში შემავალი ჯგუფების დაახლოებას და ელექტრონულად ხელსაყრელ განლაგებას. ფერმენტთა უმრავლესობა შესაბამისი სუბსტრატების გამოცნობას ინდუცირებული თავსებადობის პრინციპით ახერხებს, ანუ ფერმენტის გლობულაში მცირე კონფორმაციული რეორგანიზაციის შედეგად, სუბსტრატი სტერიულად ზუსტად ერგება აქტიურ ცენტრს. ამის გამო არაკოვალენტური ფერმენტ-სუბსტრატული დაკავშირების მომდევნო ქიმიური გარდაქმნების შესაბამისი ენტროპიული ბარიერი მნიშვნელოვნად მცირდება. გარდა ამისა, ქიმიური გარდაქმნების პროცესი, როგორც წესი, ხდება მრავალსტადიური, რაც ხელს უწყობს აქტივაციის ენერჯის (ანუ, ენტალპიის) შემცირებას. რაც შეეხება ფერმენტული აქტივობის რეგულაციას, უჯრედულ პირობებში ის ხორციელდება გარემოში არსებული სპეციალური ფუნქციების მქონე მოლეკულების - აქტივატორების და ინჰიბიტორების მეშვეობით [101].

ფერმენტული რეაქციის სიჩქარის დამოკიდებულება სუბსტრატის კონცენტრაციაზე წარმოადგენს ფერმენტული კატალიზის ერთერთ მნიშვნელოვან თვისებურებას. სუბსტრატის კონცენტრაციის გაზრდისას კატალიზური რეაქციის სიჩქარე ჯერ თანდათან იზრდება, ხოლო შემდგომ ასიმპტოტურად უახლოვდება გაჯერების პლატოს (სურ. 1.3). ამ პლატოს შესაბამის სიჩქარეს მაქსიმალურ სიჩქარეს უწოდებენ. მსგავსი ქცევა ახასიათებს ფერმენტების უმრავლესობას და აიხსნება მიხაელის მენტენის თეორიის ფარგლებში [101, 102].



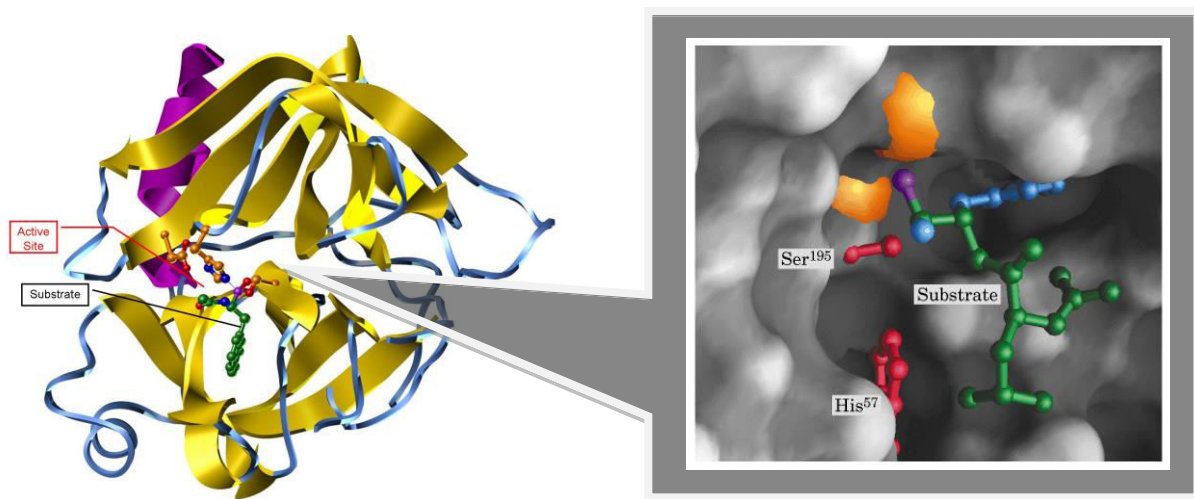
სურათი 1.3. რეაქციის სიჩქარის დამოკიდებულება სუბსტრატის კონცენტრაციის მიმართ.

$\alpha$ -ქიმოტრიპსინი არის მოდელური ჰიდროლიზური ფერმენტი, რომელიც მიეკუთვნება სერინის პროტეაზების ოჯახს. ის მონაწილეობს საჭმლის მონელების პროცესში წვრილი ნაწლავების ღრუში და ახორციელებს ცილების და პეპტიდების დაშლას. მისი სინთეზი და შენახვა ხორციელდება კუჭქვეშა ჯირკვალში არააქტიური პრეკურსორის, ქიმოტრიპსინოგენის სახით. მისი აქტივაციის პირველ ეტაპზე მონაწილეობს სხვა პროტეოლიზური ფერმენტი, ტრიპსინი, რომელიც კატალიზურად ყოფს ქიმოტრიპსინოგენის მოლეკულას ორ  $\pi$ -ქიმოტრიპსინის მოლეკულაზე. ამის შემდეგ აქტიური, მაგრამ არასტაბილური  $\pi$ -ქიმოტრიპსინის მოლეკულები ავტოლიზის შედეგად იშორებენ ორ დიპეპტიდს და იქმნება სტაბილური ფორმა,  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინი [101]. აქტიური  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინი 24.5 KDa მასის მქონე საშუალო ზომის ცილაა, რომელიც შედგება ერთმანეთთან დისულფიდური ხიდაკებით დაკავშირებულ სამ პოლიპეპტიდურ ჯაჭვისაგან და შეიცავს 241 ამინომჟავათა ნაშთს (სურ. 1.4). ყველაზე მოკლე A ჯაჭვი 13 ამინომჟავათა ნაშთისგან შედგება, ხოლო B და C-ჯაჭვი შეიცავენ, შესაბამისად 131 და 97 ნაშთს [102, 103].



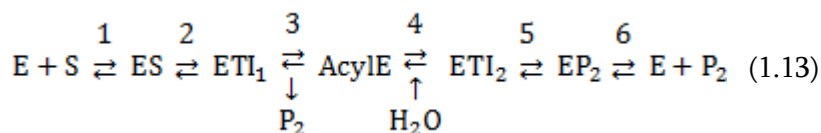
სურათი 1.4.  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის ამინომჟავური თანმიმდევრობა პოლიპეპტიდური ჯაჭვების მიხედვით. აქტიური ცენტრის და ჯაჭვებს შორის დისულფიდური კავშირების განლაგება.

$\alpha$ -ქიმოტრიპსინს გააჩნია ბევრი სტრუქტურული მსგავსება სხვა სერინის პროტეაზებთან, როგორებიცაა ტრიპსინი და ელასტაზა. ისინი მცირედ განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან პირველადი, მეორეული და მესამეული სტრუქტურის დონეებზე და შედგებიან ორი ნაწილისაგან (დომენისაგან), რომლების შუაში არის განლაგებული კატალიზური ტრიადის – სერინის, ჰისტიდინის და ასპარაგინის შემცველი აქტიური ცენტრი (სურ. 1.5). სხვა სერინის პროტეაზებთან განსხვავებით, გარდა კატალიზური ტრიადისა  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის აქტიური ცენტრი შეიცავს ე.წ. „ჰიდროფობულ ჯიბეს“ - არომატული რგოლის შემცველი ამინომჟავების (ტიროზინის, ტრიპტოფანის და ფენილალანინის) კომპლემენტარულ ღრმულს. ამის გამო  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინი წყვეტს პოლიპეპტიდებს შესაბამისი ამინომჟავების შემცველ უბნებში.  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინი მაქსიმალურად აქტიურია pH7-8-ზე, სავარაუდოდ, იმის გამო, რომ ამ პირობებში აქტიურ ცენტრში შემავალი His-57-ის იმიდაზოლის რგოლი დეპროტონირებულია, ანუ მას შეუძლია პროტონის აქცეპტორის როლის შესრულება, რაც აუცილებელია კატალიზის განხორციელებისათვის.

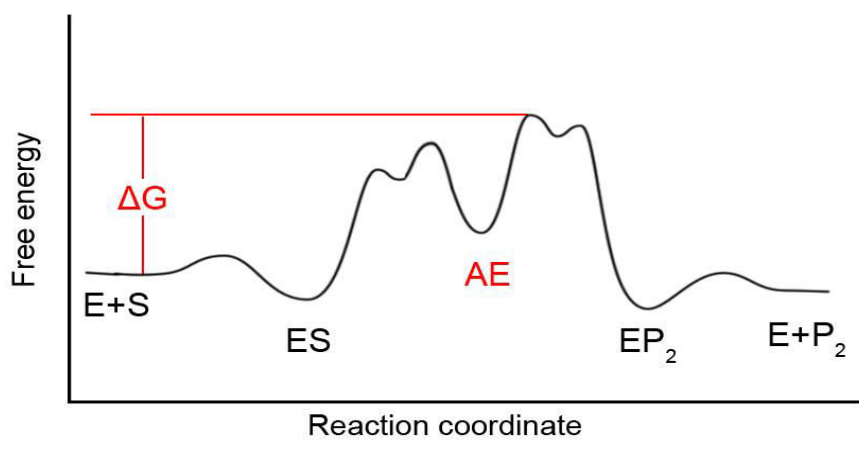


*სურათი 1.5. რენტგენოსტრუქტურული ანალიზის მეშვეობით მიღებული  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის სამგანზომილებიანი მოდელი და აქტიური ცენტრის აგებულების სქემატური გამოსახულება.*

$\alpha$ -ქიმოტრიპსინისათვის დამახასიათებელი ჰიდროლიზის რეაქცია მრავალსტადიურია (სურ. 1.6), შედგება მინიმუმ ექვსი ელემენტარული სტადიისაგან და აღიწერება:



სხვა სერინის პროტეაზების ანალოგიურად, ჰიდროლიზის პროცესი ხორციელდება ე. წ. პინგ-პონგის მექანიზმით და მოიცავს როგორც ნუკლეოფილურ, ასევე ჟანგვა-აღდგენით კატალიზურ ნაწილს.  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის მიერ სპეციფიური სუბსტრატის ჰიდროლიზის პროცესი იწყება ფერმენტისა და პოლიპეპტიდური სუბსტრატის არაკოვალენტური დაკავშირებით, რომელიც უზრუნველყოფს სუბსტრატის ენერგეტიკილად ხელსაყრელ ორიენტირებას [101, 104-106]. პირველ სტადიაზე სუბსტრატში არსებული არომატული გვერდითი ჯგუფი ჰიდროფობულ ჯიბეში უკავშირდება, რაც ხელს უწყობს გასახლეჩი პეპტიდური ბმის Ser-195-ის ჯანგბადის ატომთან ახლოს განთავსებას. ამის შემდეგ Ser-195-ის ჰიდროქსილის ჯგუფის პროტონი გადადის His-57-ის იმიდაზოლის რგოლზე. გათავისუფლებული ჯანგბადი ახორციელებს ნუკლეოფილურ შეტევას გასახლეჩ პეპტიდურ ბმაში მონაწილე ნახშირბადაზე და შეიქმნება პირველი ტეტრაედრული ინტერმედიატი, რომელიც გარდამავალ მდგომარეობად მიიჩნევა (სურ. 1.7ა).



სურათი 1.6. ATEE-ს ჰიდროლიზის პროცესის თავისუფალი ენერგია.

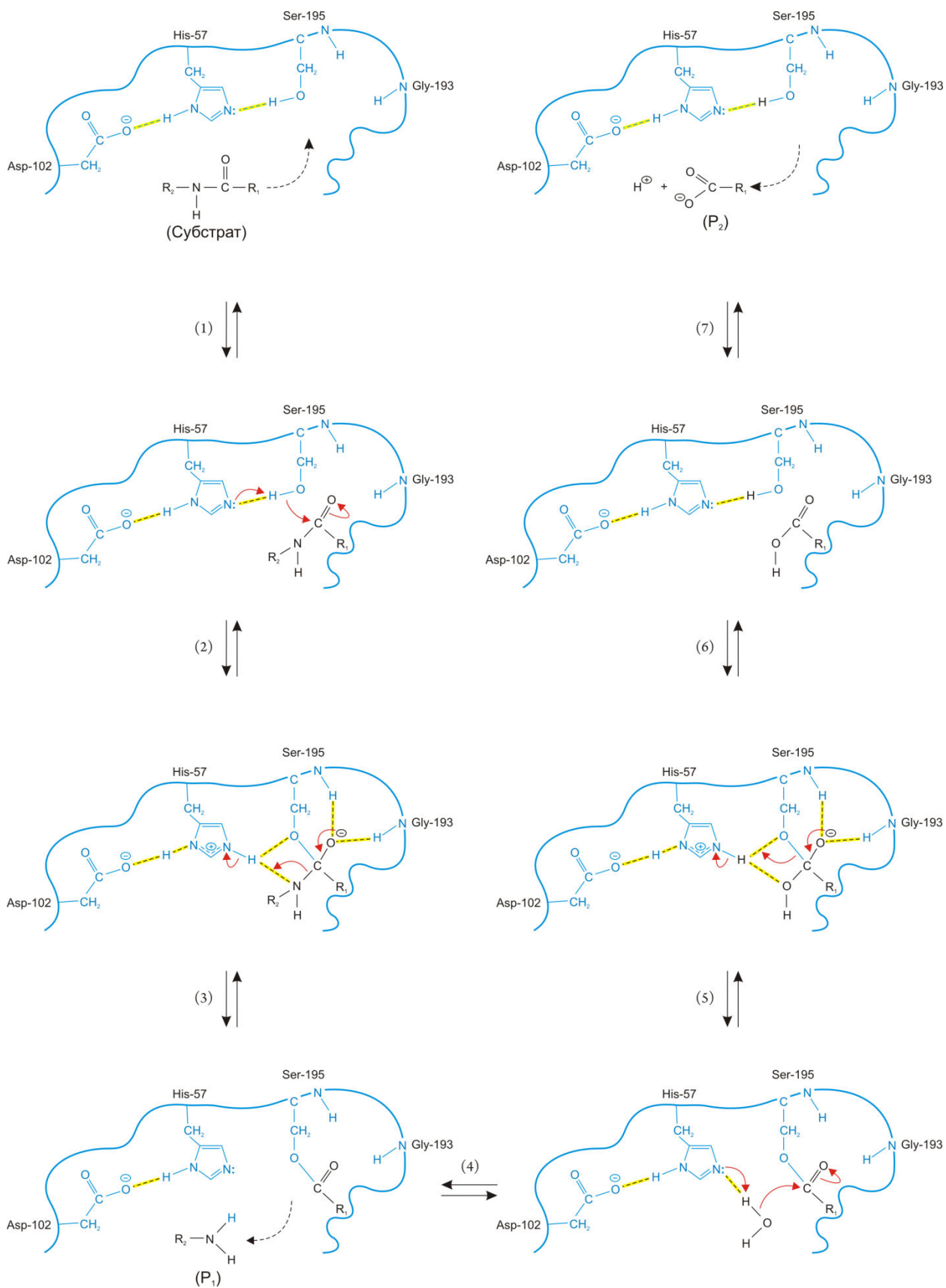
მეორე სტადიაზე სუბსტრატის C=O ორმაგი კავშირი გარდაიქმნება დაგრძელებულ ერთმაგ კავშირად და უარყოფითად დამუხტული ჟანგბადის ატომი (ოქსანიონი) აღწევს ამ დრომდე

დაუკავებელ ოქსანიონის ღრმულში, სადაც ქმნის წყალბადურ ბმებს Ser-195 და Gly-193-თან, ხოლო His-57 და Asp-102-ს უზნდებათ განზოგადოებული პროტონი. შემდეგ ეტაპზე ჰისტიდინის ნაშთის იმიდაზოლის ჯგუფი გადასცემს პროტონს სუბსტრატის პეპტიდური ბმის აზოტის ატომზე და ახორციელებს მის გაწყვეტას, ხოლო სუბსტრატის კარბონილის ჯგუფი კოვალენტურად უკაშირდება ფერმენტს და ქმნის შუალედურ კოვალენტურ ინტერმედიატს - აცილფერმენტს (სურ. 1.7ბ).

მესამე სტადიაზე ხდება პირველი პროდუქტის აქტიური ცენტრიდან ხსნარში გამოსვლა და გამხსნელი წყლის მოლეკულის შესვლა (სურ. 1.7გ). მეოთხე სტადია, რომელიც წარმოადგენს აცილფერმენტის დაშლის პირველ ეტაპს, ანუ მეორე ტეტრაედრული ადუქტის წარმოქმნას, პეპტიდების შემთხვევაში არის ყველაზე ნელი და ამიტომ განსაზღვრავს მთელი რეაქციის სიჩქარეს. ამ სტადიაზე მონაწილეობს ხსნარიდან შემოსული წყლის მოლეკულა, რომელიც გადასცემს ერთ-ერთ პროტონს ჰისტიდინის ნაშთის იმიდაზოლის ჯგუფზე, რის შედეგადაც წარმოიშობა ოქსანიონური ღრმულით დასტაბილებული გარდამავალი მდგომარეობა – ე.წ. ტეტრაედრული ადუქტი, უკვე მეორედ მთელი პროცესის მსვლელობაში (სურ. 1.7დ).

აცილფერმენტის დაშლის მეორე ეტაპზე, ანუ მთელი პროცესის მეხუთე სტადიაზე His-57 ისევ გადასცემს ერთ პროტონს, რაც იწვევს მეორე ტეტრაედრული ადუქტის დაშლას და მეორე პროდუქტის ჩამოყალიბებას (სურ. 1.7ე). საბოლოო, მეექვსე სტადიაზე კი, რომელიც მცირე ენერგეტიკური ბარიერით ხასიათდება, ხდება მეორე პროდუქტის ხსნარში გამოთავისუფლება (სურ. 1.7ვ).

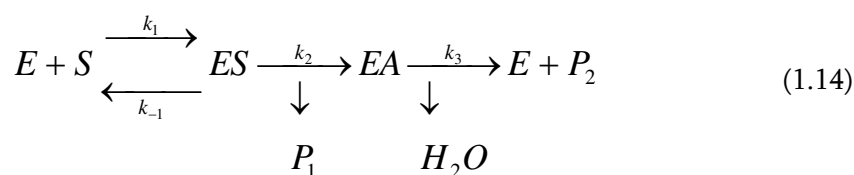
როგორც პროტეაზების უმრავლესობას,  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინსაც შეუძლია ესთერული ბმების გაწყვეტა, რაც ექსპერიმენტში გვამღევს ისეთი ხელოვნური ესთერული სუბსტრატების გამოყენების საშუალებას, როგორიცაა N-აცეტილ-L-ტიროზინის ეთილ-ესთერი ან ATEE. ამ შემთხვევაში ნახშირბად-აზოტის კოვალენტური პეპტიდური ბმის ნაცვლად ხდება ნახშირბად-ჟანგბადის ესთერული ბმის გაწყვეტა, კატალიზის მექანიზმი კი არსებითად არ იცვლება. ATEE-ს ჰიდროლიზის რეაქციის რაოდენობრივი დახასიათებისათვის გამოიყენება გამარტივებული მოდელი, რომელიც ითვალისწინებს მხოლოდ ენერგეტიკულად ტევად, და ამრიგად, ყველაზე ნელ სტადიებს. ამ მოდელის თანახმად, ჰიდროლიზის პროცესი შეიძლება გაიყოს სამ ნაწილად, კერძოდ, არაკოვალენტური ფერმენტ-სუბსტრატული კომპლექსის წარმოქმნის, ნუკლეოფილური კოვალენტური კატალიზის და ე. წ. „ზოგადი ფუძე-მჟავა“ კატალიზის (general acid-base catalysis) ეტაპებზე. თავიდან ხდება სუბსტრატის არაკოვალენტური მორგება ფერმენტის აქტიურ ცენტრში, მეორე ეტაპზე ადგილი აქვს



სურათი 1.7. α-ქიმოტრიფსინისათვის დამახასიათებელი პეპტიდის ჰიდროლიზის რეაქციის ელემენტარული სტადიები.



ფერმენტის აცილირებას, ანუ სუბსტრატის კარბოქსილის ჯგუფი კოვალენტურად უკავშირდება ფერმენტს, რასაც მოყვება დეაცილირება, ანუ ამ ჯგუფის გადატანა გამხსნელი წყლის მოლეკულაზე [101, 106]. შემდეგი ეტაპი, რომელიც შეიცავს ყველაზე ნელ სტადიას და არის სიჩქარის განსაზღვრელი, სტაციონარულ რეჟიმში აკმაყოფილებს მიხაელის-მენტენის კინეტიკის ფორმალიზმს, აქედან გამომდინარე თუ მთელ ჰიდროლიზის პროცესს შემდეგნაირად ავსახავთ



ამ კატალიზური პროცესის შესაბამისი თავისუფალი ენერგია მოცემულია სურ. 4-ზე. მიხაელის-მენტენის თეორიის თანახმად, კატალიზური რეაქციის სიჩქარე აღიწერება შემდეგი განტოლებით:

$$v = \frac{k_{cat} [S]_0 [E]_0}{[S]_0 + K_{M(app)}} \quad (1.15)$$

ხოლო 
$$k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad K_{M(app)} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3} = K_S \cdot \frac{k_3}{k_2 + k_3} \quad (1.16)$$

სადაც E აღნიშნავს ფერმენტს, S – სუბსტრატს, ES – არაკოვალენტურ ფერმენტ-სუბსტრატულ კომპლექსს, EA – აცილფერმენტს, P<sub>1</sub> და P<sub>2</sub> – სუბსტრატის ჰიდროლიზის პროდუქტებს, ხოლო k<sub>1</sub>, k<sub>-1</sub>, k<sub>2</sub> და k<sub>3</sub> – ფერმენტული კატალიზის შესაბამისი სტადიების სიჩქარის კონსტანტებს, K<sub>M(app)</sub> – ე.წ. ეფექტური მიხაელისის კონსტანტა, k<sub>cat</sub> – კატალიზური კონსტანტა, [E]<sub>0</sub> – ფერმენტის კონცენტრაცია და [S]<sub>0</sub> – სუბსტრატის საწყისი კონცენტრაცია. რეაქციის მაქსიმალური (გაჯერების) სიჩქარე კი, რომელიც მიიღწევა როდესაც [S]<sub>0</sub> → ∞ (თუ [S]<sub>0</sub> >> K<sub>M</sub>), უდრის

$$v_{\max} = k_{\text{cat}} \cdot [E]_0, \quad (1.17)$$

ცნობილია, რომ ATEE-ს ჰიდროლიზის შემთხვევაში  $k_2 \gg k_3$  და  $k_{-1} \gg k_2$ , აქედან გამომდინარე

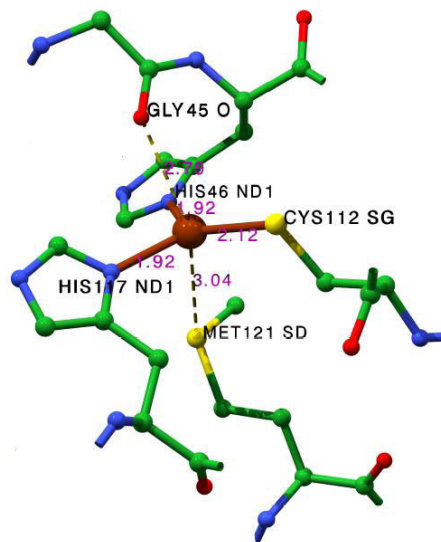
$$k_{\text{cat}} \approx k_3 \text{ და } K_M \approx K_S \cdot (k_3/k_2), \quad (1.18)$$

სადაც  $K_S$  არის არაკოვალენტური ფერმენტ-სუბსტრატული კომპლექსის დისოციაციის წონასწორული კონსტანტა. თუ ექსპერიმენტში  $k_{\text{cat}} = \text{const}$  და ადგილი არ აქვს კონკურენტულ ინჰიბირებას, შესაძლებელია  $K_{M(\text{app})}$  და, შესაბამისად,  $K_S$  სიდიდეების გამოყენება აქტიური ცენტრის ფლექსიბილობის შესაფასებლად. (იხ. §3.1)

ვინაიდან  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის სტრუქტურა და კატალიზური პროცესი საგულდაგულოდა არის შესწავლილი სტანდარტულ პირობებში, ამ ცილას ფართოდ იყენებენ კვლევებში, რომლის მიზანია ცილების გარემოს გავლენის შესწავლა სტაბილობის [107, 108] და ფუნქციური აქტივობის ასპექტებზე [109-111]. ამისათვის გამოიყენება როგორც მხოლოდ წყალხსნადი მცირე ორგანული დანამატები [107-111], ასევე მათი ნარევეები ქიმიურ მოდიფიკაციასთან და იმობილიზაციასთან ერთად [112]. ასეთი ტიპის კვლევები მეტად მნიშვნელოვანია იმ პირობების მოდელირების თვალსაზრისით, რომლებშიც იმყოფება ყველა გლობულური ცილა უჯრედის შიგნით. რადგან უჯრედში არსებული ოსმოლიტები და შაპერონები მიიჩნევა როგორც ცილის მასტაბილუბელი აგენტები, ასევე მათი ფუნქციური აქტივობის რეგულატორი, კვლევებში მასტაბილუბელი დანამატების გარდა (მაგალითად, PEG) გამოიყენება ასევე მადესტაბილუბელი (შარდოვანა) და დუალისტური ბუნების მქონე დანამატები (DMSO). თანამედროვე წარმოდგენებიდან გამომდინარე, გლობულური ცილების, და განსაკუთრებით ფერმენტების, მოქმედების მექანიზმი, განუყოფლად დაკავშირებულია კონფორმაციულ დინამიკასთან [113, 114], ამრიგად განსაკუთრებით დიდი ფუნდამენტური და გამოყენებითი ინტერესი ფასეულობა აქვს კომპლექსურ კვლევებს, რომლებიც სხვადასხვა მეთოდების ერთობლივი გამოყენებით დაადგენენ ცილის სტაბილობის, ლაბილობის და ფუნქციური აქტივობის ურთიერთკავშირს მისი გარემოს გავლენის გათვალისწინებით [116-119].

## 1.6 აზურინი, როგორც ელექტრონის გადამტანი გლობულური ცილა. თვითაწყობადი მონოშრეების გამოყენება აზურინის და სხვა ცილების იმობილიზაციის და მათი ფუნქციის შესწავლის მიზნით. იონური ლობილები.

აზურინის სტრუქტურა და ფუნქცია. სადისერტაციო ნაშრომში წარმოდგენილი კვლევის ერთერთი ობიექტი არის ცისფერი სპილენძის შემცველი ცილა აზურინი. ეს არის ბაქტერია *Pseudomonas aeruginosa*-დან გამოყოფილი მცირე ზომის ჟანგვა-აღდგენითი ცილა, რომელიც მიეკუთვნება ელექტრონის გადამტანი ცილების, კუპრედოქსინების ოჯახს და მოიპოვება ბაქტერიული უჯრედების პერიპლაზმურ სივრცეში. აზურინის ბიოლოგიური ფუნქციები ჯერჯერობით არ არის ბოლომდე შესწავლილი, მაგრამ ცნობილია, რომ აზურინი მონაწილეობს უჯრედში ელექტრონის გადამტანის პროცესში ოქსიდატიური სტრესის დროს. კერძოდ, დადგენილია, რომ აზურინი ციტოხრომ c551-თან ერთობლიობაში ასრულებს ელექტრონის დონორის როლს ნიტრატ რედუქტაზასთვის დენიტრიფიკაციის რეაქციაში [120] და ასევე ასრულებს ელექტრონის დონორის ფუნქციას სასუნთქ ჯაჭვებში ციტოხრომ c პეროქსიდაზასთან ურთიერთქმედებაში [121].



*სურათი 1.8.* აზურინის აქტიური ცენტრი. წითლად არის ნაჩვენები სპილენძის იონი და მისი ლიგანდები. იისფრად მოცემულია მანძილები სპილენძის იონისა და ლიგანდებამდე ანგსტრემებში.

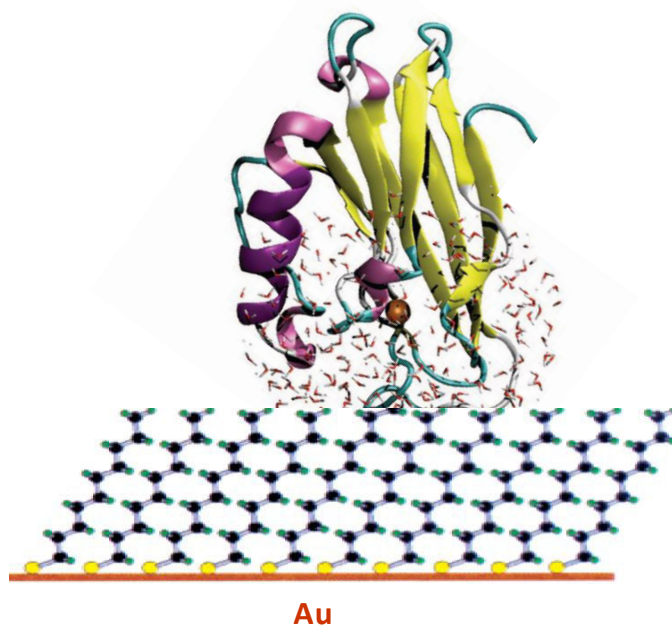
აზურინი შედგება ერთი 148 ამინომჟავიანი ჯაჭვისაგან, რომელიც ქმნის ერთ  $\alpha$ -სპირალს და რვანაკეციან  $\beta$ -სტრუქტურას [122, 123]. მის აქტიურ ცენტრში (სურ. 1.8) განთავსებულია სპილენძის იონი  $\text{Cu}^{1+}/\text{Cu}^{2+}$ , რომელიც კოორდინირებულია ტრიაგონალურ ბიპირამიდულ სტრუქტურაში His46-ის და His117-ის იმიდაზოლური რგოლებით, Cys112-ის თიოლის

ჯგუფით და ორი შედარებით სუსტი აქსიალური ლიგანდით, კერძოდ, Met121-ის გოგირდის ატომით და Gly45-ის კარბონილური ჯგუფით [122, 124, 125]. სპილენძის იონის ასეთი განლაგების გამო  $Cu^{1+}/Cu^{2+}$  გადასვლა არის სწრაფი პროცესი და არ მოითხოვს მნიშვნელოვან კონფორმაციულ ცვლილებებს [126, 127].

ცნობილია, რომ სპილენძის იონს დიდი წვლილი შეაქვს აზურინის გლობულის სტაბილობაში [123, 128]. მიუხედავად ამისა, თუ სპილენძი ცინკის იონით არის ჩანაცვლებული, ან თუნდაც არც ერთი მათგანი არ იმყოფება აქტიურ ცენტრში (აპო-აზურინი), ცილის სამგანზომილებიანი სტრუქტურა რჩება ტოპოლოგიურად უცვლელი [129, 130]. რაც შეეხება თერმოდინამიურ სტაბილობას, ის მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული მეტალის ბუნებაზე.  $Cu^{2+}$ -ფორმა მაქსიმალური სტაბილობით ხასიათდება, მისი დენატურაციის ენტალპია შეადგენს 52 kJ/mol, აპო-აზურინი არის ყველაზე არასტაბილური (29 kJ/mol), ხოლო Zn- და  $Cu^{1+}$ -ფორმების ენტალპია შეადგენს, შესაბამისად, 39 და 40 kJ/mol [131-133]. აღსანიშნავია, რომ ორივე იონი იმდენად ძლიერად უკავშირდება აზურინის პოლიპეპტიდურ ჯაჭვს, რომ არ შორდება მას ცილის დენატურაციის შემდეგ [134]. მაგრამ აზურინის ფოლდინგის პროცესი სამი რიგით სწრაფად მიმდინარეობს, თუ მეტალის ლიგანდებთან დაკავშირება ხდება პოლიპეპტიდის დახვევამდე და არა მის შემდეგ, როცა აზურინის გლობულამ უკვე მიიღო დამახასიათებელი კონფორმაცია [135].

**აზურინის იმობილიზაცია ალკანთიოლების თვითაწყობადი მონოშრეების გამოყენებით.** ელექტრონის გადატანის პროცესის მექანიზმის შესასწავლად მოცემულ სადისერტაციო ნაშრომში აზურინი დამაგრებული იყო ოქროს ელექტროდზე ალკანთიოლების თვითაწყობადი მონოშრეების ანუ SAM-ების საშუალებით (სურ. 1.9). მსგავს ფირებს ფართოდ იყენებენ როგორც ფუნდამენტური კვლევების დროს [136-140], ასევე სხვადასხვა ნანოტექნოლოგიური მიზნებისთვის [141, 142]. SAM (self assembled monolayer) წარმოადგენს სხვადასხვა ტიპის ორგანული მოლეკულების მოწესრიგებულ ფირს, რომელიც სპონტანურად იქმნება ზედაპირზე და შედგება მხოლოდ ერთი მოლეკულის სისქის შრისგან [140, 142], რაც განპირობებულია ამ მოლეკულების ტერმინალური ჯგუფების ზედაპირისკენ მაღალი სწრაფვით (სურ. 1.10). ყველა SAM შედგება ერთნაირად ორიენტირებული მოლეკულებისგან და შეიძლება იყოს როგორც ერთ- ასევე მრავალკომპონენტიანი. ამ მოლეკულებს აქვთ ტერმინალური ჯგუფები (-CH, -S-, S-S), რომლებიც უერთდებიან ელექტროდს, შუალედური ნაწილი (ძირითადად, ალკანის ჯგუფებისაგან [-CH<sub>2</sub>-]) და

ხსნარში მიმართული ფუნქციონალური ჯგუფები, ბოლოები, ( $\text{OH}^-$ ,  $\text{COOH}^-$ ,  $\text{CH}_3$ ,  $\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$  და სხვა). შუალედური ნაწილის სიგრძის, ანუ ამ ჯგუფების რაოდენობის შერჩევით შესაძლებელია SAM-ის სტრუქტურის და სისქის რეგულირება მოლეკულურ დონეზე [143-144], ხოლო ფუნქციონალური ჯგუფების საშუალებით ხდება შესასწავლი ობიექტის ზედაპირზე დამაგრება.

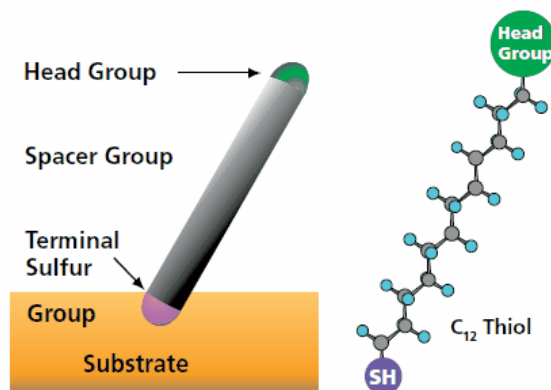


**სურათი 1.9.** ალკანთიოლებით მოდიფიცირებულ ოქროს ელექტროდზე დამაგრებული აზურინის სქემატური გამოსახულება.

*a* – იონური ლობილის, ქოლინდიჰიდროგენფოსფატის ბუფერული წყალხსნარი, *b* – იმობილიზებული აზურინი (დეტალურად ტექსტში), *c* - სპილენძის ატომი აზურინის აქტიურ ცენტრში, *d* – 1-პენტანთიოლების ( $n=4$ ) თვითაწყობადი მონოშრე (SAM), *e* - ოქროს ელექტროდი.

თვითაწყობადი მონოშრეების მისაღებად საჭიროა ელექტროდის მოთავსება SAM-ის კომპონენტების ხსნარში, მათი ტერმინალური ჯგუფები უკავშირდებიან ელექტროდის მეტალის ატომებს და იქმნება ერთი მოლეკულის სისქის მქონე ფირი. SAM-ები კარგად ჯდება მეტალის (Au, Pt, Ag, Hg) ნებისმიერი ზომის და ფორმის ელექტროდებზე, დაწყებული მაკროელექტროდებიდან და დამთავრებული ულტრა-მიკროელექტროდებით. ადსორბციისათვის საჭიროა ნებისმიერი სიგლუვის მქონე ზედაპირი, რომელიც კარგად გაწმენდილია ოქსიდებისაგან [143, 144]. ალკანთიოლების ელექტროდთან მიერთებისას თიოლი კარგავს წყალბადს, ხოლო დისულფიდი განიცდის გახლეჩას და წარმოიშობა ზედაპირული თიოლატი. სხვადასხვა მეტალების მიმართ მაღალი სწრაფვის გამო გოგირდი

მჭიდროდ უკავშირდება ელექტროდის ზედაპირს და ამრიგად ელექტროდთან გოგირდის საშუალებით დაკავშირებული SAM-ები მდგრადია პოტენციალის ცვლილების საკმაოდ ფართო ფარგლებში ( $\pm 0.8$  V Ag/AgCl/sat KCl) [143, 144]. ზედაპირიდან მათი დესორბცია ხდება მხოლოდ ძლიერ ტუტე ხსნარებში ან მაღალი უარყოფითი პოტენციალების მიწოდების დროს [143, 144].



*სურათი 1.10. ალკანთიოლების თვითაწყობადი მონიშრების (SAM-ების) ზედაპირზე აწყობის პრინციპი.*

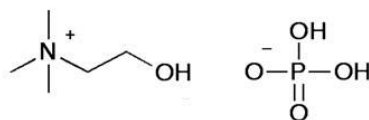
ალკანთიოლების მონომრე ქმნის ზედაპირის მიმართ  $\leq 30^\circ$ -ით დახრილ ჰექსაგონალურ სტრუქტურას, სადაც მეზობელ ალკანთიოლების ჯაჭვებს შორის მანძილი საშუალოდ შეადგენს  $5.0 \text{ \AA}$  [144], ხოლო მანძილი ნახშირბადის ორ ატომს შორის შეადგენს  $1.54 \text{ \AA}$  [144, 145]. ამრიგად მონომრის სისქე  $d$  დამოკიდებულია მისი შემადგენელი მოლეკულების ჯაჭვის სირძეზე და განისაზღვრება შემდეგი ფორმულით [145]:

$$d = 1.90 + 1.12 n \quad (\text{\AA}) \quad (1)$$

სადაც  $n$  არის ალკანთიოლის ჯაჭვში მეთილენის რგოლების ( $-\text{CH}_2-$ ) რიცხვი, ხოლო  $1.9 \text{ \AA}$  არის გოგირდის ატომის რადიუსი [143-145]. ანუ, ყოველი ალკანის ჯგუფის დამატებით SAM-ის სისქე იზრდება  $1.12 \text{ \AA}$ , რაც ექსპერიმენტში გვამღევეს იმის საშუალებას, რომ დიდი სიზუსტით ვცვალოთ ელექტრონის გადატანის მანძილი ელექტროდსა და ჟანგვა-აღდგენით ცენტრს შორის და მთელი კომპოზიტური სისტემის თვისებების შეცვლის საშუალებას [137-139].

მიუხედავად იმისა რომ SAM-ის კომპონენტების საწყისი ადსორბცია ხდება ძალიან სწრაფად, მონოშრის საბოლოო სტრუქტურის დახვეწას შეიძლება დაჭირდეს დრო ან პოტენციალის ციკლირება [143, 146, 147]. მაგრამ მაინც არ არის გამორიცხული თვითაწყობის პროცესში სხვადასხვა ტიპის დეფექტების წარმოშობა. მაგალითად, მეტალის ზედაპირზე შეიძლება დარჩეს დაუფარავი ადგილები ან ელექტროდის გარკვეულ ადგილებზე ალკანეთიოლი შეიძლება ნაწილობრივ ან მთლიანად "დაწვეს" ზედაპირზე. თუ დეფექტების რაოდენობა არის დიდი, მაშინ შეიძლება მოხდეს მონოშრის მთლიანობის დარღვევა და შედეგად მისი დამცავი თვისებების შესუსტება. მაგრამ საბედნიეროდ SAM-ის დეფექტები ადვილად იჩენენ თავს ექსპერიმენტის დროს დაბალ სიჩქარეებზე გადაღებულ ვოლტამოგრამებზე [144, 148].

**იონური ლღობილები.** ბიოლოგიურ სისტემებში ელექტრონის გადატანის ბლანტი გარემოს მოდელირების მიზნით გამოიყენება მთელი რიგი ბლანტი გამხსნელები, მათ შორის იონური ლღობილები (ionic liquid). იონურ ლღობილს (იონურ სითხეს) უწოდებენ ორგანული მარილების დაბალტემპერატურულ ლღობილებს [149]. ანუ, ეს არის სითხე, რომელიც ოთახის პირობებში შედგება რომელიმე ორგანული მარილების იონებისგან. პროტონულ იონურ ლღობილებს, რომლებსაც აქვთ დისოცირებადი პროტონები, ახასიათებს მაღალი იონური გამტარობა და ბიომოლეკულების დასტაბილების უნარი [150-152], რაც მნიშვნელოვანია როგორც ელექტრონის გადატანის მექანიზმების ფუნდამენტურ კვლევაში [152, 153], ასევე გამოყენებით სფეროშიც [154, 155]. აზურინის სტაბილობასა და ფუნქციურ აქტივობას შორის ურთიერთკავშირის შესასწავლად მოცემულ ნაშრომში გამოყენებული იყო ერთ-ერთი პროტონული იონური ლღობილი, ქოლინ დიჰიდროგენფოსფატი [ch][dhp] (სურ, 1.11), რომელიც გვამღებავს აზურინის ბუნებრივი გარემოს პირობების საკმაოდ ზუსტი მიახლოებით მოდელირებას და ამავედროულად მნიშვნელოვნად ზრდის სისტემის მდგრადობას სხვადასხვა მადესტაბილებელ ფაქტორების მიმართ [156, 157].



**სურათი 1.11.** იონური ლღობილის ქოლინდიჰიდროგენფოსფატის ([ch][dhp]) მოლეკულური სტრუქტურა.

### 1.7 L-ცისტეინით მოდიფიცირებული ელექტროდების გამოყენება სპილენძის იონების $\text{Cu}^{2+}$ იმობილიზაციისა და შესაბამისი ელექტრონული მიმოცვლის მოდელური (ბიომიმეტიკური) პროცესის შესწავლის მიზნით

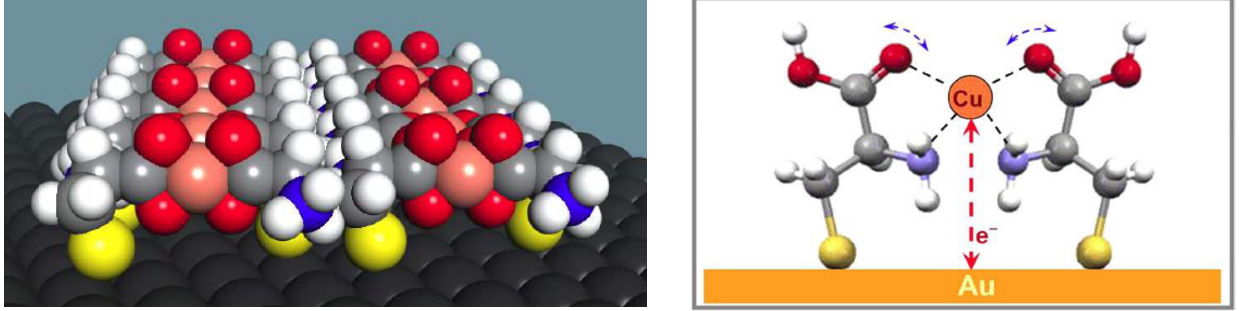
სტანდარტული ამინომჟავა L-ცისტეინი, ასევე როგორც მისგან წარმოებული ნაერთები (N-აცეტილ-L-ცისტეინი და ჰომოცისტეინი), აქტიურად გამოიყენება ინდუსტრიაში და ნანოტექნოლოგიაში [158, 159] და, შესაბამისად, იწვევს ინტერესს ფუნდამენტურ კვლევებშიც [160, 161]. გოგირდის ატომის შემცველობის გამო L-ცისტეინს ახასიათებს მეტალის ელექტროდების მიმართ მაღალი სწრაფვა, ამიტომ მას აქტიურად იყენებენ ოქროს ან სხვა მეტალის ზედაპირზე მოკლე თვითაწყობადი მონოშრებების მისაღებად.

გარდა SAM-ების ერთ-ერთი ძირითადი დანიშნულებისა, საკვლევი ობიექტის დაცვის მეტალის ელექტროდთან დამაზიანებელი კონტაქტისაგან, ზოგიერთ შემთხვევაში მათი გამოყენება ასევე მიზანშეწონილია ბიომიმეტიკური სისტემების შესაქმნელად. იმ შემთხვევაში, როდესაც შესწავლის ობიექტი შეიცავს საკმაოდ მოქნილ ჟანგვა-აღდგენით ცენტრს, ხისტი მოდელური სისტემების გამოყენება არ იძლევა პირველი საკოორდინაციო სფეროს ზუსტი მოდელირების საშუალებას [162, 163]. აზურინის შემთხვევაში აქტიურ ცენტრში მყოფი სპილენძის იონი  $\text{Cu}^{2+}$  უშუალოდაა დაკავშირებული ცილის პოლიპეპტიდურ ჯაჭვთან, ამიტომ მოსალოდნელია, რომ რიგ პირობებში ფლექსიბილური აქტიური ცენტრის შენელებული თავისუფლების ხარისხების წვლილი იმდენად გაიზარდოს, რომ მოხდეს მინისებურ მდგომარეობაში გადასვლა [162, 163]. ამ მდგომარეობაში კი იზრდება ისეთი ანომალიების დამზერის ალბათობა, როგორცაა გარემოს არაწრფივი პოლარიზაცია და სისტემის არაერგოდული ქცევა. ეს მოვლენები საკმაოდ ართულებს ექსპერიმენტს, მაგრამ დიდ ინტერესს იწვევს როგორც თანამედროვე თეორიული სამუშაოების ექსპერიმენტული შეფასებისათვის [139, 164-166], ასევე სხვადასხვა სახის ბიონანოტექნოლოგიური ინტერესებიდან გამომდინარე [158, 159]. ამრიგად, L-ცისტეინის SAM-ის გამოყენება მიზანშეწონილია როგორც აზურინის აქტიურ ცენტრში განლაგებული სპილენძის იონის ფლექსიბილური პოლიპეპტიდური გარემოს მოდელირებისათვის. სპილენძის იონების ყველაზე ალბათური განლაგება SAM-ში ასახულია სურ. 1.12-ზე [158, 167].

აღსანიშნავია, რომ მკაფიო ვოლტამპერომეტრული სიგნალის მისაღებად საკმარისია ხსნარში ძალიან მცირე რაოდენობის სპილენძის არსებობა (თუნდაც უმნიშვნელო მინარევის სახით)



[158, 167]. ამიტომ გარდა ფუნდამენტური გამოყენებისა, L-ცისტეინის მონომერებს გააჩნია პრაქტიკული გამოყენება მეტალის ელექტროდის ზედაპირზე სპილენძის იონების „ჩამჭერი“ სენსორის სახით [158, 167].



**სურათი 1.12.** ა. სპილენძის იონების სავარაუდო განლაგება  $Au/L-cys/Cu^{2+}$  ნანოსკოპურ კვაზი-2D-განზომილებების კომპაქტურ კლასტერში. ატომების ფერადი აღნიშვნები : მუქი ნაცრისფერი (Au), ყვითელი (S), ნაცრისფერი (C), წითელი (O), ლურჯი (N) თეთრი (H), სპილენძისფერი ( $Cu^{2+}$ ).

ბ. სქემატურად ასახული სპილენძის იონის ჩამჭერი ცენტრი. ლურჯი ისრებით ნაჩვენებია ცისტეინის მოლეკულების ფლუქტუაციური მოძრაობა, ხოლო წითელით ელექტრონის მიმოსვლა ჩაჭერილ სპილენძის იონსა და ოქროს ელექტროდს შორის.

## თავი 2. ექსპერიმენტული ნაწილი (პრეპარატები, მეთოდები და კვლევების პირობები)

### 2.1 გამოყენებული პრეპარატები და ხსნარების მომზადების წესი

1. **α-ქიმოტრიპსინი.** კალორიმეტრული და პოტენციომეტრული კვლევების დროს გამოყენებული იყო ფირმა Fluka Chemie-ის (შვეიცარია) α-ქიმოტრიპსინი, მისი ხელოვნური ესთერული სუბსტრატი ATEE (Acros Organics, აშშ), Lugal-ის (უკრაინა) დიმეთილსულფოქსიდი (DMSO), რომელიც შეიცავს 1%-მდე წყალს მინარევის სახით, ხოლო მაღალი სისუფთავის მარილები და ბუფერების კომპონენტები წარმოებულია Reakhim-ის (რუსეთი) მიერ. ყველა პრეპარატი გამოყენებულია შემდგომი გასუფთავების გარეშე, ხსნარების მოსამზადებლად გამოყენებული იყო ბიდისტილირებული წყალი.

კალორიმეტრულ ექსპერიმენტში გამოყენებული α-ქიმოტრიპსინის კონცენტრაცია შეადგენდა 1-2 მგ/მლ, ხოლო გამხსნელად გამოყენებული იყო  $5 \times 10^{-2}$  M NaCl შემცველი  $10^{-2}$  M კონცენტრაციის ფოსფატის (pH 2.6) და ბორატის (pH 8.1) ბუფერები. 0-დან 70%-მდე მოცულობითი კონცენტრაციის დიმეთილსულფოქსიდის ხსნარები მიიღებოდა წინასწარ მომზადებული სტანდარტული (0% DMSO) და მაქსიმალური კონცენტრაციის (70% DMSO) ხსნარების შერევით, საბოლოო pH-ის მიყვანა ხორციელდებოდა კონცენტრირებული HCl-ის საშუალებით. DMSO-ს სხვადასხვა კონცენტრაციის ხსნარების თანაობისას α-ქიმოტრიპსინის დენატურაციის კალორიმეტრული კვლევა ჩატარებული იყო DASM-4A (Биоприбор, რუსეთი) ადიაბატური დიფერენციული მასკანირებელი მიკროკალორიმეტრის გამოყენებით. ყველა ექსპერიმენტი ჩატარებული იყო გაცხელების სიჩქარეზე 2 K/min, ხოლო გაცივების სიჩქარე იყო 1 K/min. კალორიმეტრული მრუდები ჩაწერილი იყო ანალოგური თვითჩამწერის მეშვეობით, მრუდების შემდგომი დამუშავება ხორციელდებოდა კომპიუტერულად სპეციალურად შექმნილი კომპიუტერული პროგრამის და Origin-ის გამოყენებით. (დეტალებისათვის იხ. §2.3).

პოტენციომეტრული ტიტრაციის ექსპერიმენტისათვის, რომელიც ტარდებოდა pH-სტატიკურ რეჟიმში, 1 მგ/მლ კონცენტრაციის მქონე α-ქიმოტრიპსინის საწყისი ხსნარები მომზადებული იყო  $10^{-3}$  M HCl-ში (pH 3.0) ყოველი ექსპერიმენტის დაწყების წინ. 5 ml მოცულობის სამუშაო ხსნარი შეიცავდა  $5 \times 10^{-2}$  M NaCl (ბუფერის გარეშე) და ATEE-ს სხვადასხვა კონცენტრაციებს ( $10^{-3}$ -დან  $10^{-2}$  M-მდე). კატალიზური რეაქციის ინიცირების მიზნით, ხდებოდა α-

ქიმოტრიპსინის საწყისი ხსნარიდან 5  $\mu\text{l}$  რაოდენობის პორციების შეყვანა წინასწარ მომზადებულ, სტანდარტულ ( $25^{\circ}\text{C}$ ) ტემპერატურაზე თერმოსტატირებულ სამუშაო ხსნარში, ამრიგად, სამუშაო ხსნარში  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის კონცენტრაცია პრაქტიკულად მუდმივი იყო და შეადგენდა  $10^{-8}$  M. ყველა კინეტიკური ექსპერიმენტი ჩატარებული იყო Radiometer Automatic Titration System RTS-822-ის გამოყენებით, pH-სტატურ რეჟიმში pH 8.4-ის და  $25^{\circ}\text{C}$  პირობებში, ტიტრანტის სახით გამოყენებული იყო  $10^{-2}$  M NaOH. მუშა ელექტროდს წარმოადგენდა კომბინირებული მინა-კალომელის ელექტროდი PHC-4406, ხოლო თერმოსტატირებადი უჯრედის ტემპერატურის რეგულირება ხორციელდებოდა U-2 თერმოსტატის გამოყენებით (უჯრედის წყლის პერანგის და ლაბორატორიული თერმომეტრის მეშვეობით). კინეტიკური მრუდები ჩაწერილი იყო Radiometer Servograph REC-80 თვითჩამწერის საშუალებით, მრუდების შემდგომი დამუშავება ხორციელდებოდა კომპიუტერულად. გრაფიკებზე დატანილი თითოეული ექსპერიმენტული წერტილი მიღებულია 5 დამოუკიდებელი ექსპერიმენტის სერიის შედეგების გასაშუალებით.

**2. აზურინის შემცველი კომპოზიტური სისტემა.** აზურინის შემსწავლელ ვოლტამპერომეტრულ ექსპერიმენტებში გამოყენებული იყო ფირმა Sigma-ს მიერ წარმოებული აზურინი *P. Aeruginosa*-დან, ფირმა Ionic Liquid Technologies (Iolitec, GmbH) ორგანული იონური ნაერთის, ქოლინ დიჰიდროგენ ფოსფატის, [ch][dhp]-ის, კომპონენტი და უმაღლესი სისუფთავის ალკანთიოლის SAM-ების კომპონენტი - ფირმა Acros-ის 1-პენეტანთიოლი. 5 M ამონიუმის ბუფერი, რომელიც გამოყენებული იყო სხვადასხვა კონცენტრაციის იონური ლობილის ბუფერული წყალხსნარების მისაღებად, მზადდებოდა ფირმა Fluka-ს უმაღლესი სისუფთავის ამონიუმის აცეტატსა და 70%  $\text{HClO}_4$ -ის (ქლორმჟავის) გამოყენებით. ყველა პრეპარატი გამოყენებულია შემდგომი გასუფთავების გარეშე; ხსნარების მოსამზადებლად მოვიხმარდით ბიდისტილირებულ წყალს.

ოქროს მუშა ელექტროდზე ალკანთიოლების მონომრის თვითაწყობის და მომდევნო სტადიაზე მასზე აზურინის ფირის დატანის წინ, მეტალის სამუშაო ზედაპირი საფუძვლიანად მუშავდებოდა ალუმინის ფხვნილის სუსპენზიით, რის შემდეგ ირეცხებოდა ბიდისტილირებული წყლის ჭავლით და თავსდებოდა ე.წ. „ულტრაბგერით აბაზანაში“ 3 წუთის განმავლობაში. შემდგომ ეტაპზე ელექტროდი გადიოდა ელექტროქიმიურ გასუფთავებას, რაც წარმოადგენს ელექტროდული პოტენციალის 0.1 V/s სიჩქარით თანმიმდევრულ ციკლირებას  $-0.35$ -დან  $1.4$  ვოლტამდე ინტერვალში (პოტენციალი ყველგან მოყვანილია შედარების სტანდარტული ელექტროდის, Ag/AgCl/3 M NaCl მიმართ),  $0.5$  M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ხსნარში, (მინარევეული ადსორბანტებისგან სუფთა ოქროს) მდგრადი ვოლტამოგრამის

მიღებამდე (დაახლოებით, 1 საათის განმავლობაში). ელექტროქიმიურად გასუფთავებული ელექტროდი ირეცხებოდა ბიდისტილირებული წყლის ჭავლით და შემდგომ ეთანოლის ჭავლით, რის შემდეგ 24 საათით თავსდებოდა  $5 \times 10^{-3}$  M ალკანთიოლების სპირტხსნარებში (SAM-ების თვითაწყობისთვის). აზურინის დატანის წინ ელექტროდი ირეცხებოდა ეთანოლით, წყლით და შემდეგ ბუფერით, ხოლო ამის შემდეგ, 2 წუთით თავსდებოდა  $140 \mu\text{M}$  აზურინის ბუფერულ ხსნარში ( $5 \text{ mM NH}_4\text{Ac}$ ,  $\text{pH } 4.6$ ).

ვოლტამპერომეტრულ ექსპერიმენტში გამოყენებული სამელექტროდიანი კონფიგურაციის ელექტროქიმიური უჯრედი წარმოადგენდა ერთგვარ ჭიქას, რომლის თავსახურში ჩასმული იყო სამი ელექტროდი (მუშა, შედარების, და დამხმარე ელექტროდები). მუშა ელექტროდის სახით უჯრედი შეიცავდა ტეფლონის ცილინდრში მოთავსებულ  $1.6 \text{ მმ}$  დიამეტრის ოქროს დისკს (Bioanalytical Systems, Inc.), ზემოაღწერილი პროცედურის გამოყენებით ცილის ნიმუშით (SAM-ის მონოშრით და ზედ დატანილი აზურინის ფირით), ასევე პლატინის მავთულს, როგორც დამხმარე ელექტროდს და ვერცხლის მავთულს შედარების ელექტროდის სახით. მუშა ელექტროდიტის ხსნარი წარმოადგენდა [ch][dhp]-ის ძალიან მაღალი კონცენტრაციის, და ასევე ბუფერის/წყლის კომპონენტის შემცველ ბლანტ და ზებლანტ (მინისწარმოქმნელ) ხსნარებს. მაღალი წნევის ექსპერიმენტში (რომლებიც ტარდებოდა პარტნიორი დაწესებულების, გერმანიის ქ, ერლანგენის უნივერსიტეტის ექსპერიმენტული ბაზის გამოყენებით), ტეფლონის უჯრედში ჩამაგრებული ელექტროდების სისტემა თავსდებოდა სპეციალურად გამოჩარხულ მეტალის ბუდეში, რომელშიაც წნევის სიდიდე რეგულირდებოდა ასევე სპეციალური კონსტრუქციის მაღალი წნევის აპარატიდან მოწოდებული სითხეების (ზეთი და ჰექსანი) კასკადის მეშვეობით და მანომეტრების სისტემის გამოყენებით (რომლებიც უზრუნველყოფდნენ შესაბამისი გაზომვების სიზუსტეს  $\pm 10 \text{ MPa}$  ფარგლებში); ხოლო ტემპერატურის მნიშვნელობა რეგულირდებოდა დამატებითი წყლის პერანგის, ციფრული თერმომეტრის და ახალი თაობის თერმოსტატის გამოყენებით (რომლებიც უზრუნველყოფდნენ შესაბამისი გაზომვების სიზუსტეს  $\pm 0.1^\circ\text{C}$  ფარგლებში). აღსანიშნავია, რომ [ch][dhp]-ის ბუფერული წყალხსნარების შემთხვევაში, მათი ზემოაღწერილი სიბლანტიდან და ელექტროქიმიური უჯრედის კონსტრუქციის თავისებურებიდან გამომდინარე, უჯრედის სამუშაო ხსნარით გავსება ხორციელდებოდა მაღალ ტემპერატურაზე ( $50\text{--}70^\circ\text{C}$ ), რადგან ასეთ პირობებში ექსპერიმენტში გამოყენებული ყველა [ch][dhp]-ის ბუფერული წყალხსნარი წარმოადგენს საკმარისად დენად სითხეს.

ყველა ვოლტამპერომეტრული ექსპერიმენტი ჩატარებული იყო Autolab Electrochemical Analyzer PGSTAT 30 პოტენციოსტატ/გალვანოსტატის გამოყენებით, რომელიც იმართებოდა

პროგრამით General Purpose Electrochemical System software for Windows (GPES, v.4.9). მისი მეშვეობით ჩაწერილი პირველადი მონაცემების დამუშავებისათვის გამოყენებული იყო ამსპეციალური, ე.წ. კომპიუტერული „ფიტინგის“ პროცედურა, როდესაც ხდება კონკრეტული ექსპერიმენტული მონაცემების შედარება (ზედდება) გარკვეული თეორიული მოდელის (ამ შემთხვევაში მარკუს-დოლონაძის მოდელის) ფარგლებში შედგენილი ტრანსცენდენტური განტოლებების ციფრული ამონახსნების სიმრავლესთან, და შესაბამისი „სწორი“ ამონახსნების, ანუ რეალურად დამზერილი სარეაქციო ფიზიკური პარამეტრების, დადგენა (დეტალებისთვის იხ. §3.2).

**3. ცისტეინის შემცველი კომპოზიტური სისტემა.** L-ცისტეინის ამინომჟავური კომპონენტებისგან თვითაწყობილი, სპილენძის იონის შემცველი კომპოზიტური სისტემა, ელექტრონების მიმოცვლის უნარის მხრივ, გარკვეულწილად წარმოადგენს ამავე იონის შემცველი რედოქს-აქტიური ცილების ერთგვარ მოდელს. მის ასაწყობად ვიყენებდით უმაღლესი სისუფთავის L-ცისტეინს (Sigma Aldrich), ხოლო სპილენძის იონების ბუნებრივ წყაროს წარმოადგენდა Sigma Aldrich-ის ტრის-ბუფერის (Tris-HCl, 98%) გამოყენებით დამზადებული ელექტროლიტის ხსნარი (აღნიშნულ პრეპარატში  $\text{Cu}^{2+}$  იონები გვხვდება 0.001 %-იანი მინარევის სახით). შედარებით ექსპერიმენტებში (რომლებშიც მიიღებოდა მხოლოდ ფონური ვოლტამპერომეტრული სიგნალი) ვიყენებდით  $\text{Cu}^{2+}$  იონებისგან პრაქტიკულად თავისუფალ, Suprapur® ხარისხის 99.995% ფოსფატის ბუფერის კომპონენტებს,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  და  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ს. ელექტროდსა და  $\text{Cu}^{2+}$  იონებს შორის ელექტრონის მიმოცვლის ვოლტამპერულ სიგნალზე წნევის და ტემპერატურის ვარიაციების შესწავლისას, ექსპერიმენტების სერიები ტარდებოდა Sigma Aldrich-ის ტრის-ბუფერის (Tris-HCl, 98%) გამოყენებით (რათა ადგილი ჰქონოდა  $\text{Cu}^{2+}$  იონების L-ცისტეინის მატრიცაში „ჩაჭერას“ და რედოქს-ფუნქციონალიზაციას). ხსნარების მოსამზადებლად გამოყენებული იყო ბიდისტილირებული წყალი.

ყველა ვოლტამპერომეტრული ექსპერიმენტი ტარდებოდა აზურინის შემთხვევაში გამოყენებული ზემოაღწერილი მეთოდოლოგიის გამოყენებით. (დეტალები იხ. §2.1, ნაწილი 2), იმ განსხვავებით, რომ სათანადოდ მომზადებული, გასუფთავებული Au ელექტროდი L-ცისტეინის დანაფარის (SAM-ის) მიღების მიზნით 12 საათით თავსდებოდა 2-20 mM L-ცისტეინის წყალხსნარში, ხოლო სპილენძის იონების ადსორბცია SAM-ზე ხდება სპონტანურად, ექსპერიმენტულ უჯრედში მყოფი შესაბამისად შერჩეული ბუფერის (იხ. ზევით) ხსნარიდან.

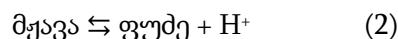
## 2.2 დინამიური პოტენციომეტრია, pH-სტატიკური ტიტრაციის მეთოდი

დინამიური პოტენციომეტრიის მეთოდს, რომელსაც ასევე უწოდებენ ავტომატური ტიტრაციის მეთოდს, ფართოდ იყენებენ როგორც ქიმიური პროცესების კინეტიკის შესასწავლად, ასევე ანალიზური მიზნებისათვის. ეს მეთოდი დაფუძნებულია საკვლევ ხსნარსა და ელექტროდს შორის პოტენციალთა სხვაობის გაზომვაზე, ამრიგად იძლევა ისეთი სისტემების რაოდენობრივი ან/და თვისობრივი დახასიათების საშუალებას, რომლებშიც ქიმიური რეაქციის დროს ხდება პროტონების შთანთქმა ან გამოყოფა, ანუ ხსნარის pH-ის ცვლილება.

ხსნარის pH განისაზღვრება, როგორც წყალბადის იონების აქტივობის უარყოფითი ლოგარითმი:

$$\text{pH} \equiv -\lg A_{\text{H}^+} = -\lg f_{\text{H}^+} m_{\text{H}^+} \quad (1),$$

სადაც  $A_{\text{H}^+}$  – არის წყალბადის იონის აქტივობა,  $f_{\text{H}^+}$  – წყალბადის იონის აქტივობის კოეფიციენტი,  $m_{\text{H}^+}$  – მისი მოლალობა. ნებისმიერი ტემპერატურის წყალხსნარებისათვის შეიძლება ჩაითვალოს, რომ  $f_{\text{H}^+}=1$  [168]. თუ გავითვალისწინებთ, რომ ნებისმიერი მჟავა არის წყალბადის იონების დონორი (შესაბამისად, ტუტე წარმოადგენს წყალბადის იონების აქცეპტორს), ექსპერიმენტში pH განსაზღვრავს ხსნარების მჟავიანობას



თუ ხსნარში მიმდინარე ქიმიურ რეაქციას თან ახლავს პროტონების გამოყოფა ან შთანთქმა, მათი რაოდენობის ცვლილებით შესაძლებელია რეაქციის სიჩქარის შეფასება. ასეთი ტიპის რეაქციების შესასწავლად ფართოდ გამოიყენება დინამიური პოტენციომეტრიის მეთოდი pH-სტატირების რეჟიმში. პროტონების გამოყოფის/ შთანთქმის შედეგად მომხდარი სამუშაო ხსნარის pH-ის ცვლილების კომპენსირება შესაძლებელია ცნობილი კონცენტრაციის რომელიმე ტიტრანტის დამატებით. თუ რეაქციის შედეგად ხდება პროტონების გამოყოფა, ტიტრანტის სახით გამოიყენება ტუტე, ხოლო პროტონების შთანთქმის შემთხვევაში მჟავა. ექსპერიმენტის ჩატარებამდე საჭიროა სამუშაო pH-ს მნიშვნელობის დაყენება, რის შემდეგ

მთელი ექსპერიმენტის მსვლელობისას ხელსაწყოს pH-მეტრი მუდმივად ადარებს ხსნარის pH-ს წინასწარ დაყენებულ მნიშვნელობას და წანაცვლების შემთხვევაში ხდება ტიტრანტის მცირე პორციების ავტომატური დამატება სამუშაო ხსნარში. ამრიგად, სამუშაო ხსნარის pH-ის მუდმივობისათვის დახარჯული ტიტრანტის მოცულობის გაზომვით შესაძლებელია რეაქციის სიჩქარის განსაზღვრა.

ხელსაწყოს მაღალი მგრძობელობის უზრუნველსაყოფად მეტად მნიშვნელოვანია, რომ ხსნარში დამატებული ტიტრანტის რაოდენობა ზუსტად შეესაბამებოდეს გამოყოფილი პროტონების რაოდენობას. ამისათვის საჭიროა მოცემული სისტემისთვის დასამატებელი ტიტრანტის ისეთი რაოდენობის შერჩევა, რომ სისტემა ასწრებდეს რეაგირებას ხსნარში მიმდინარე ცვლილებებზე, განსაკუთრებით პროცესის საწყის ეტაპზე, რომელიც ყველაზე მაღალი სიჩქარით ხასიათდება. ამავდროულად, არ უნდა ხდებოდეს ე.წ. გადატიტრვა, რომელიც აისახება მიღებული მრუდების სიგლუვეზე და შესაბამისად გამოსათვლელი პარამეტრების სიზუსტეზე. გარდა ამისა, სარეაქციო ხსნარის შესამჩნევი განზავების თავიდან ასარიდებლად საჭიროა ტიტრანტის რაც შეიძლება მცირე პორციების დამატება, ანუ მაღალი კონცენტრაციის ტიტრანტის გამოყენება. ამრიგად, ტიტრანტის მოცულობის და კონცენტრაციის შერჩევისას გასათვალისწინებელია ორივე ზემოდ ხსენებული პირობის დაკმაყოფილება.

ასევე აღსანიშნავია, რომ ამ მეთოდის გამოყენებისას მიღწეული ხსნარის pH-ის მუდმივობა, ანუ გაზომვების ჩატარება pH-სტატირების რეჟიმში, მეტად მნიშვნელოვანია pH-ზე დამოკიდებული რეაქციის სიჩქარის ზუსტი გაზომვისათვის, მაგალითად ფერმენტული კატალიზის შემთხვევაში. რეაქციის სიჩქარე, ასევე როგორც ხსნარის pH დამოკიდებული არის გარემოს ტემპერატურაზე, რის გამო ექსპერიმენტს ატარებენ თერმოსტატირებად უჯრედში.

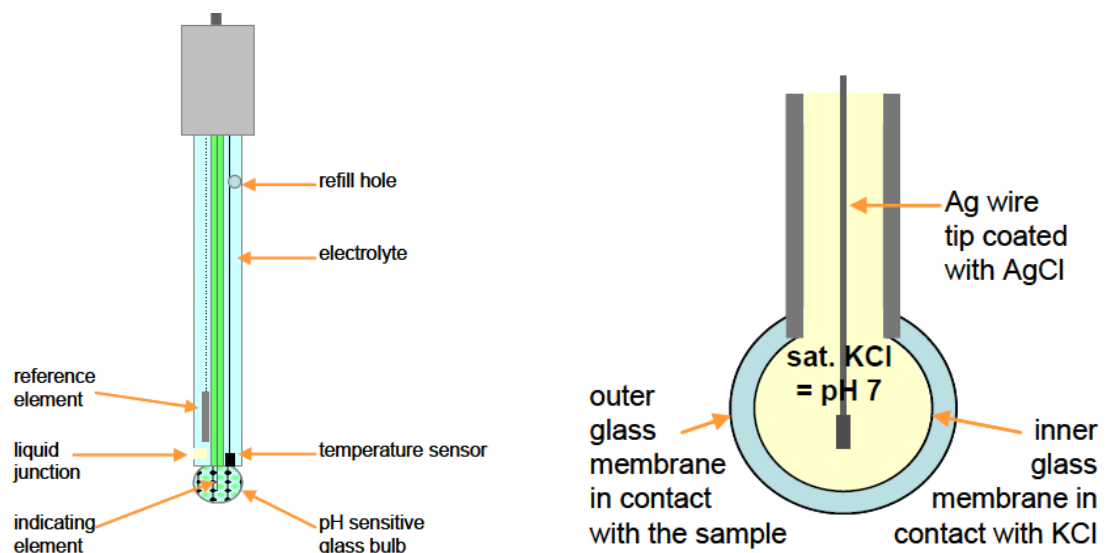
ყველა ავტომატური ტიტრაციული დანადგარის უჯრედი შეიცავს სარეველას, ხსნარის ერთგვაროვნების უზრუნველსაყოფად, რაც განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ბლანტ გარემოში მიმდინარე პროცესების შესასწავლად. გარდა ამისა სარეველას გამოყენება ხელს უშლის ხსნარში არსებული მოლეკულების ელექტროდის ზედაპირზე ადსორბირებას, რომელიც იწვევს უზუსტობას პოტენციალთა გაზომვაში. ხოლო ატმოსფერული აირების, კერძოდ, ჟანგბადის, ან ნახშირორჟანგის გავლენის თავიდან ასაცილებლად გამოიყენება ინერტული აირების ატმოსფერო (არგონი, აზოტი და სხვა). ამრიგად, ზუსტი მონაცემების მისაღებად ყველა ტიტრაციული საჭიროებს ტემპერატურის დაყენების, pH-ის მიყვანის და

მგრძობელობის ვარიაციების საშუალებას. ასევე აუცილებელია საკალიბრო pH-ის დაყენება ტემპერატურის გათვალისწინებით. როგორც წესი, ტიტრატორის დაკალიბრებისათვის გამოიყენება ორი სხვადასხვა pH-ის მქონე სტანდარტ-ტიტრი ცნობილ ტემპერატურაზე (ტუტე და მჟავე არეში).

პოტენციური მეთოდების გამოყენებისას pH-ის გაზომვისას ხდება ხსნარში ჩაშვებული ელექტროდების ჯაჭვის პოტენციალის გაზომვა და მისი შედარება ცნობილი pH-ის მქონე ბუფერში წინასწარ მიღებულ ეტალონურ პოტენციალთან შემდეგი ფორმულის თანახმად:

$$\text{pH}(X) = \text{pH}(S) + (E(X) - E(S))/R'T \quad (2.1),$$

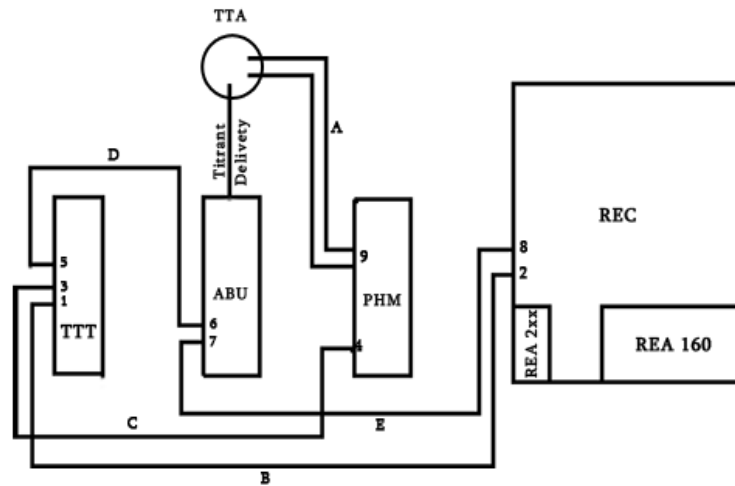
სადაც  $\text{pH}(X)$  და  $\text{pH}(S)$  არის, შესაბამისად, ხსნარის და ბუფერის pH,  $E(X)$  და  $E(S)$  – ხსნარის და ბუფერის პოტენციალები,  $R'T$  – ნერნსტის ფაქტორი ( $R'=R*\ln 10/F$ ). თანამედროვე pH-მეტრების მიერ პოტენციალებს შედარება და ხსნარების pH-ის განსაზღვრა ხდება ავტომატურად. ხოლო ყველაზე გავრცელებული ელექტროდების სისტემა, რომელიც გამოიყენება პოტენციოსტატებში, წარმოადგენს კომბინირებულ მინის ელექტროდს, მასში ჩაშენებულ შედარების ელექტროდთან და კონცენტრირებული KCl-ის შემცველ კალიომელის ელექტროდს (სურ. 2.1ა).



სურათი 2.1. pH-ის გასაზომი კომბინირებული მინის ელექტროდი.



$\alpha$ -ქიმიტრიკსინის მიერ, მისთვის სპეციფიკური სინთეზური სუბსტრატის, აცეტილ-ტირიზინის ეთილ ესთერის (ATEE-ს) ჰიდროლიზის პროცესის კინეტიკის შესასწავლად გამოყენებული იყო “რადიომეტრის” ავტომატური ტიტრაციული დანადგარი Radiometer Automatic Titration System RTS-822, რომელიც უშუალოდ ზომავს ფერმენტული რეაქციის სიჩქარეს. მისი პრინციპული სქემა მოცემულია სურ. 2.2, ხოლო ძირითადი პარამეტრები ცხრილში 2.1. ელექტროდის სახით გამოყენებული იყო მინა-კალომელის ელექტროდი PHC3306-9 (Radiometer Analytical, საფრანგეთი), მისი ტექნიკური მონაცემები მოცემულია ცხრილში 2.2).



**სურათი 2.2.** პოტენციოსტატის PHC3306-9 (Radiometer Analytical) პრინციპული სქემა: TTT - ტიტრატორის სამართავი ბლოკი, ABU - ტიტრანტის ავტომატური მიწოდების ბლოკი (ბიურეტი), TTA - ტიტრაციული დანადგარი (უჯრედი), PHM - pH-მეტრი, REA2xx - , REA 160 - თვითჩამწერის დამატებითი მოდული, REC - თვითჩამწერი, A-E - კაბელები, 1-9 - კაბელების შეერთების წერტილები.

**ცხრილი 2.2.** PHC3306-9 (Radiometer Analytical) კომბინირებული ელექტროდის ტექნიკური მონაცემები

pH-ის გაზომვის დიაპაზონი	0-12 pH ერთეული
ტემპერატურული დიაპაზონი	0-80 °C
შედარების სისტემა (reference system)	Ag/ AgCl
დიაფრაგმის ტიპი	ფოროვანი კონტაქტი
მგრძნობელობა pH7.000 და pH10.012, 25 °C	> 97%
ნულოვანი წერტილი pH <sub>0</sub> , 25 °C	pH6.65 ± 0.5
რეაგირების დრო, pH(7.000 ± 0.030)-მდე pH10.012-დან მიყვანისას, 25 °C	≤ 15 sec
რეაგირების დრო, pH(7.000 ± 0.010)-მდე pH10.012-დან მიყვანისას, 25 °C	≤ 60 sec

ცხრილი 2.1. პოტენციოსტატის RTS-822 (Radiometer, Copenhagen) ტექნიკური მონაცემები

პარამეტრი	სიდიდე	ცდომილება
pH-ის გაზომვის დიაპაზონი	0-15 pH ერთეული	±0.01 pH ერთეული
pH-ის ტემპერატურული წანაცვლება	<0.002 pH/ °C	
ტემპერატურული წანაცვლების კომპენსირება	მექანიკური, 0-100 °C ფარგლებში	±3%
მგრძობელობა	90-დან 120%-მდე	±1%
სამუშაო pH-ის დაყენების დიაპაზონი	0-დან 15-მდე pH ერთეული	±0,02 pH ერთეული
ტიტრატორის სიზუსტე	0.7 მკლ	±0.3%
ტიტრირების სიჩქარე	0.0125-დან 40 მლ/წ-მდე	
სიმძლავრე	130 ვტ	

სარეაქციო ხსნარი, რომელიც შეიცავს სუბსტრატსა და ფონურ ელექტროლიტს, თავსდება ხელსაწყოს თერმოსტატირებად ტიტრაციულ უჯრედში. შემდგომ მუდმივი მორევის რეჟიმში ხდება ცილის შემცველი ხსნარის მცირე მოცულობა და პოტენციოსტატი მაშინვე იწყებს ტიტრანტის ავტომატურ დამატებას. ავტომატური ტიტრაციის რეჟიმში ჩაწერილი  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის ATEE-ს ჰიდროლიზის პროცესი სიჩქარე სუბსტრატის სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში განისაზღვრება შემდეგი ფორმულით:

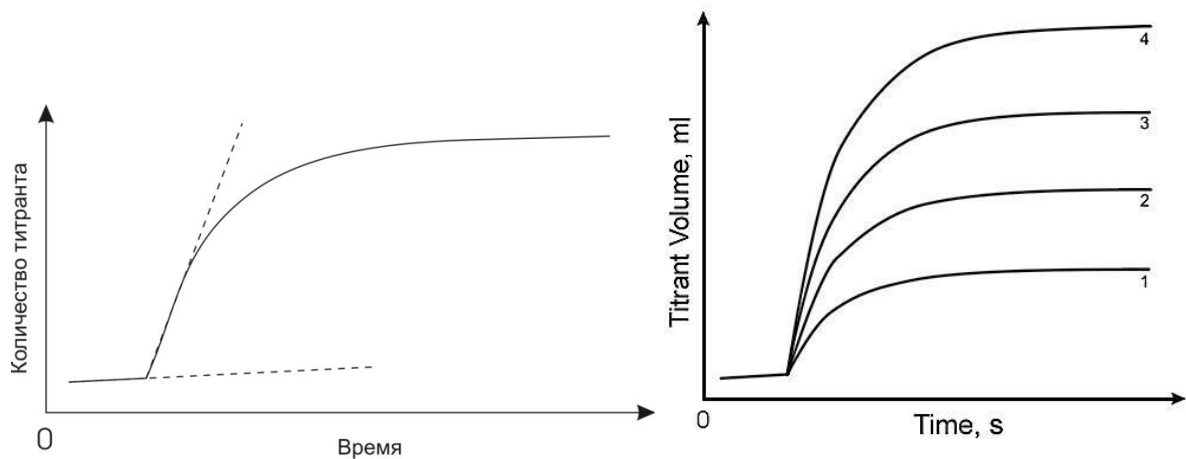
$$v = -\frac{d[S]}{dt} = \frac{[Titrant]}{V_0} \frac{dV_{titr}}{dt} \quad (2.2)$$

სადაც  $v$  არის კატალიზური რეაქციის სიჩქარე,  $[S]$  – სუბსტრატის კონცენტრაცია,  $t$  – დრო,  $[Titrant]$  – ტიტრანტის კონცენტრაცია,  $V_0$  – სამუშაო ხსნარის მოცულობა (რომელიც მნიშვნელოვნად არ იცვლება ტიტრანტის დამატებით),  $V_{titr}$  – არის დამატებული ტიტრანტის მოცულობა [118].

მიღებული კინეტიკური მრუდების დამუშავების შედეგად ჩვენ შეგვიძლია განვსაზღვროთ ფერმენტული კატალიზის პარამეტრები, კერძოდ, მიხაელისის კონსტანტა  $K_M$  და კატალიზური კონსტანტა  $k_{cat}$  [169, 170]. მიხაელისის კონსტანტა ახასიათებს ფერმენტის და სუბსტრატის არაკოვალენტური ურთიერთქმედების ეფექტურობას, ხოლო კატალიზური კონსტანტა ახასიათებს ფერმენტული ბიოქიმიური გარდაქმნის კატალიზურ ეფექტურობას.

მრუდების დამუშავების მეთოდოლოგიური პროცედურა არის შემდეგი: სუბსტრატის მოცემული კონცენტრაციის პირობებში ტიტრატორის მიერ ჩაწერილი მრუდების საწყისი

უბნების დახრილობა იძლევა კატალიზური პროცესის საწყის სიჩქარეს (სურ. 2.3ა). ფერმენტის დამატებამდე ჩაწერილი მცირე დახრილობის და სიმრუდის მქონე უბანი შეესაბამება ხსნარში მიმდინარე ფონურ პროცესებს და მათი წვლილის გამოსარიცხად საჭიროა ამ უბნის შესაბამისი დახრილობის გამოკლება. სუბსტრატის სხვადასხვა კონცენტრაციებისათვის მიღებული ასეთი ტიპის მრუდები მარაოს ფორმის შესაბამისად ლაგდებათ (სურ. 2.3ბ) და მათი სიმრუდე მატულობს სუბსტრატის კონცენტრაციასთან. სუბსტრატის სხვადასხვა კონცენტრაციების და შესაბამისი რეაქციის სიჩქარეების შებრუნებული სიდიდეების დამოკიდებულება ლაინუივერ-ბერკის კოორდინატებში წარმოადგენს სწორ ხაზზე დალაგებულ წერტილებს (სურ. 2.4).

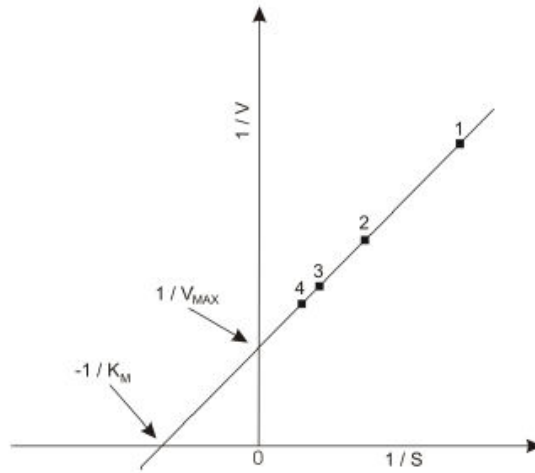


**სურათი 2.3.** ფერმენტული კატალიზის ტიპური მრუდები (სუბსტრატის კონცენტრაცია მატულობს 1-დან 4-მდე).

შესასწავლი კატალიზური პროცესის მახასიათებელი პარამეტრები, კერძოდ, მიხაელისის კონსტანტა და კატალიზური კონსტანტა განისაზღვრება გრაფიკული მეთოდის გამოყენებით (სურ. 2.4). მიხაელისის კონსტანტა გამოითვლება მიღებული სწორი ხაზის და აბსცისების ღერძის გადაკვეთის წერტილის კოორდინატის მნიშვნელობიდან და წარმოადგენს მის შებრუნებულ სიდიდეს. ანალოგიურად ორდინატების ღერძის გადაკვეთის წერტილის კოორდინატიდან მიიღება მაქსიმალური სიჩქარე. ხოლო კატალიზური კონსტანტა გამოითვლება შემდეგი ფორმულით:

$$k_{cat} = v_{max} / [E_0] \quad (2.3)$$

სადაც  $[E_0]$  არის ფერმენტის საწყისი კონცენტრაცია მოლ/ლიტრში [170, 171].



**სურათი 2.4.** შეზღუდულ ლაინუივერ-ბერკის კოორდინატებში აგებული რეაქციის სიჩქარის დამოკიდებულება სუბსტრატის კონცენტრაციაზე.

### 2.3 მიკროკალორიმეტრია. დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრია

ბიოლოგიური მაკრომოლეკულების და მათი კომპლექსების სტაბილობის შესასწავლად ფართოდ გამოიყენება რიგი კალორიმეტრული მეთოდები, მათ შორის დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრია. სხვა მეთოდებისგან განსხვავებით, კალორიმეტრიის გამოყენებით შესაძლებელია საკვლევი სისტემის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი პარამეტრის, ენტალპიის, და მისი ტემპერატურაზე დამოკიდებულების უშუალო გაზომვა [172]. მაკრომოლეკულურ სისტემაზე ზემოქმედების ზოგიერთ სხვა ფაქტორებისგან განსხვავებით, ტემპერატურა წარმოადგენს ინტენსიურ პარამეტრს, რომელიც თერმოდინამიურად შეუღლებულია ექსტენსიურ (ადიტიურ) პარამეტრთან, ენტალპიასთან. ანუ სისტემის მდგომარეობის ტემპერატურით გამოწვეულ ყოველ ცვლილებას თან ახლავს მისი ენტალპიის ცვლილებაც. შესაბამისად, ნიმუშის ენტალპიის ტემპერატურაზე დამოკიდებულება ტემპერატურების განსახილველ ინტერვალში სისტემისათვის ყველა ხელმისაწვდომი მდგომარეობის სრული თერმოდინამიური დახასიათების საშუალებას იძლევა [173-175]. გლობულური ცილების შემთხვევაში, დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრიის მეთოდით შესაძლებელია ისეთი მახასიათებლების შესწავლა და შეფასება, როგორც არის დენატურაციის პროცესის შექცევადობა, გადასვლის ბუნება, შუალედური მდგომარეობების არსებობა და მათი ხასიათი; დომენური ან სუბდომენური ერთეულების არსებობა და მათ შორის ურთიერთქმედების ტიპი; ცილის მუტაციური და ქიმიური მოდიფიკაციის წვლილი კონფორმაციის შენარჩუნებაში და სხვა [176-178].

ცილების, ასევე როგორც სხვა ბიომოლეკულების თერმოდინამიური კვლევა დაფუძნებულია გამარტივებულ მოდელზე, რომელიც საკმაოდ ზუსტია მცირე ზომის ცილების შემთხვევაში. მის ფარგლებში ბიომოლეკულების ნატივურიდან დენატურირებულ მდგომარეობაში გადასვლა განიხილება, როგორც ორ მდგომარეობიანი მონომოლეკულური რეაქცია:



ამ გადასვლით გამოწვეული სითბური ეფექტების შესაბამისი ენტალპიური ცვლილება კირხჰოფის განტოლების თანახმად უდრის

$$\Delta H = \int_{T_1}^{T_2} C_p(T) dT \quad (2.5),$$

სადაც  $C_p(T)$  - ეფექტური სითბოტევადობა მუდმივი წნევის დროს,  $T_1, T_2$  - ტემპერატურის ინტერვალი, რომელშიც ტარდება გაზომვები.

გადასვლის შესაბამისი ენტალპიის ცვლილების გამოსათვლელად აუცილებელია იმის გათვალისწინება, რომ დენატურაციის ჯამურ სითბურ ეფექტში გარდა ნატივურიდან დენატურირებულ მდგომარეობაში გადასვლის შესაბამისი ენტალპიის ცვლილებისა შედის ტემპერატურის მოცემულ ინტერვალში ნატივურ და დენატურირებულ მდგომარეობაში მყოფი მოლეკულების მიერ შთანთქმული სითბოს ფონური რაოდენობაც. ანუ უშუალოდ გადასვლის შესაბამისი ენტალპიის ცვლილების მისაღებად დენატურაციის ენტალპიიდან უნდა გამოკლებული იყოს იმ მოლეკულების ენტალპიური წვლილები, რომლებიც იმყოფებიან ნატივურ მდგომარეობაში ( $T_1; T_d$ ) ინტერვალში და დენატურირებულ მდგომარეობაში ( $T_d; T_2$ ) ინტერვალში [179-181]:

$$\Delta H_{den} = \int_{T_1}^{T_2} C_p dT - \int_{T_1}^{T_d} C_p^n dT - \int_{T_d}^{T_2} C_p^d dT = \Delta H_d - \int_{T_1}^{T_d} \Delta C_p dT \quad (2.6),$$

სადაც  $\Delta H_d$  - გადასვლის მოლარული ენტალპია;  $T_d$  - გადასვლის ტემპერატურა (ლღობის პიკის მაქსიმუმი);  $C_p^n, C_p^d$  - ბიოპოლიმერის კუთრი სითბოტევადობები ნატივურ და დენატურირებულ მდგომარეობებში შესაბამისად.  $\Delta C_p = C_p^d - C_p^n$  - პარციალური სითბოტევადობების სხვაობა გადასვლის  $T_d$  ტემპერატურაზე. ხოლო ამ პროცესში ენტროპიის და გიბსის თავისუფალი ენერჯიის ცვლილება შემდეგი ფორმულებით გამოითვლება:

$$\Delta S_{den} = \int_{T_1}^{T_d} \frac{C_p^n}{T} dT + \frac{\Delta H_d}{T_d} + \int_{T_d}^{T_2} \frac{C_p^d}{T} dT = \frac{\Delta H_d}{T_d} - \int_{T_1}^{T_d} \frac{\Delta C_p}{T} dT \quad (2.7),$$

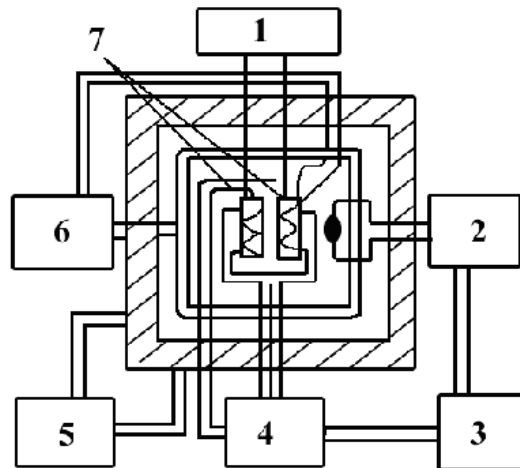
$$\Delta G_{den} = \Delta H_{den} - T_1 \Delta S_{den} = \Delta H_d - T_1 \frac{\Delta H_d}{T_d} - T_1 \int_{T_d}^{T_2} \frac{\Delta C_p}{T} dT + \int_{T_1}^{T_d} \frac{\Delta C_p}{T} dT = \Delta H_d \frac{T_d - T_1}{T_d} - \int_{T_1}^{T_d} \frac{T - T_0}{T} \Delta C_p dT \quad (2.8)$$

ბიომაკრომოლეკულების ენტალპიის გაზომვა არის დაკავშირებული მთელ რიგ ტექნიკურ სირთულეებთან, რომლების გადაჭრა შესაძლებელი გახდა პირველი პრეცედიული დიფერენციული მასკანირებელი მიკროკალორიმეტრების მეშვეობით [174]. თანამედროვე

კალორიმეტრები განსხვავდება მათგან უმეტეს წილად მონაცემების მიღება დამუშავების კომპიუტერიზაციით, ხოლო ძირითადი პრინციპები ისევ აქტუალურია [174, 175, 183]. ხსნარებისათვის განკუთვნილი მიკროკალორიმეტრების მახასიათებლებს შორის უნდა აღინიშნოს ტემპერატურის სკანირების უნარი, კამერების მცირე ზომა და გაზომვის დიფერენციული პრინციპი. დიფერენციულ კალორიმეტრებში აბსოლუტური სიდიდის მაგივრად იზომება ორ იდენტურ კამერას შორის სითბოტევადობის სხვაობა. ერთ-ერთ მათგანში ჩატვირთულია მხოლოდ გამხსნელი, მეორეში კი მასში გახსნილი შესწავლის ობიექტი. ტემპერატურის სკანირება გულისხმობს კამერებში მყოფი ნიმუშის მუდმივი სიჩქარით უწყვეტ (არა დისკრეტულ) გაცხელებას ან გაცივებას და, შესაბამისად, სითბოტევადობის უწყვეტად გაზომვას, რაც შესაძლებელი გახდა მცირე ზომის ადიაბატული კამერების გამოყენებით. კამერების ადიაბატიზაცია ერთდროულად უზრუნველყოფს გარემოს სითბური ზეგავლენის თავიდან აცილებას და აგრეთვე ნიმუშის გარდაქმნებით გამოწვეულ შიდა ტემპერატურული გრადიენტების მინიმუმამდე დაყვანას. ხოლო კამერების ზომის შემცირებამ, პირველ რიგში, გამორიცხა მექანიკური სარეველას გამოყენების საჭიროება და ასევე შეამცირა პრეპარატების რაოდენობა რაოდენობა.

მაგრამ უპირატესობებთან ერთად გაჩნდა რამდენიმე არსებითი სირთულე, როგორცაა კამერების ზუსტად განსაზღვრული თანაბარი რაოდენობის ნივთიერებებით დატვირთვა, რომელიც თავისი სიმცირის გამო მიუღწეველია ჩასახმელი ხსნარის აწონვით. გარდა ამისა შეუძლებელი გახდა მთლიანად ავსებული ჰერმეტიკული კამერების გამოყენება სითხის და კამერების მასალის განსხვავებული სითბური გაფართოების კოეფიციენტების გამო, ასევე როგორც თავისუფალი მოცულობის დატოვება წყლის ძალიან მაღალი კუთრი ორთქლწარმოქმნის სითბოს გამო [175]. ზემოდ ჩამოთვლილი პრობლემების გადაჭრა შესაძლებელი გახდა კამერის სახით ისეთი კაპილარული მილის გამოყენებით, რომელიც ბოლოვდება ადიაბატური ეკრანის გარეთ [175]. მილი ივსება მთლიანად, ამრიგად სითხის საერთო მოცულობა განისაზღვრება კამერის ზომით, ხოლო სამუშაო მოცულობა შემოსაზღვრულია ადიაბატური გარსით, რაც გამორიცხავს გაფართოებისას სამუშაო მოცულობიდან გარეთა ნაწილში გამოდევნილი სითხის სითბურ გავლენას მის შიდა ნაწილზე. განზავებულ ხსნარებში ხსნარისა და გამხსნელის სითბური გაფართოების კოეფიციენტების უმნიშვნელო განსხვავების გამო გაცხელების პროცესში, ორივე კამერის სამუშაო მოცულობიდან გადმოდის სითხის თითქმის ერთნაირი რაოდენობა, ამიტომ გამოდევნილი ნიმუშის მასა ასევე არ ახდენს გავლენას სხვაობითი სითბოტევადობის გაზომვის შედეგზე. აღსანიშნავია, რომ კაპილარული მილის გარეთა ნაწილს ადებენ

რამდენიმე ატმოსფეროს წნევას სითხის გაცხელების დროს ბუმტუკების წარმოქმნის გამოსარიცხად. გარდა ამისა ექსპერიმენტში ჭარბი წნევის ქვეშ მატულობს შესასწავლი სითხის დუდილის ტემპერატურა, ამიტომ შესაძლებელი ხდება ტემპერატურული დიაპაზონის ზედა ზღვარის აწევა.



*სურათი 2.5. DACM-4A ტიპის დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრის სქემა. 1) მანოსტატი, 2) თერმომეტრი, 3) თვითმწერი, 4) სითბური ეფექტის გამზომი მოწყობილობა, 5) თერმოსტატი, 6) ადიაბატიზირებული გარსის თერმორეგულატორი მოწყობილობა, 7) მიკროკალორიმეტრის გამზომი კამერები.*

ექსპერიმენტულ კვლევებში გამოყენებული იყო რუსული წარმოების დიფერენციული მასკანირებელი ადიაბატური მიკროკალორიმეტრი DASM-4A. მისი ბლოკ-სქემა მოცემულია სურ. 2.5-ზე, ხოლო კალორიმეტრის ტექნიკური მონაცემები მოყვანილია ცხრილ 2.3-ში.

DASM-4A კალორიმეტრს აქვს ორმაგი ადიაბატური გარსით გარშემორტყმული ორი იდენტური კალორიმეტრული კამერა, რომელიც წარმოადგენს სრულიად გამჭოლ სპირალურად დახვეულ პლატინის კაპილარს (სურ. 2.6). ამპულების ასეთი კონსტრუქცია იძლევა რიგ უპირატესობებს: პირველ რიგში, გაადვილებულია მათი გარეცხვა და ავსება ნიმუშით ისე, რომ ამ პროცედურების ჩატარება არ საჭიროებს მათ დაშლას და ასევე იძლევა შესაძლებლობას ამპულებზე განხორციელდეს გარკვეული წნევა. მეორე – კაპილარის მცირე დიამეტრის და მისი მაღალი სითბოგამტარობის გამო არ ხდება სითხეში ტემპერატურის გრადიენტების წარმოქმნა, აქედან გამომდინარე, ასეთ კალორიმეტრულ კამერაში ტემპერატურათა ველი ერთგვაროვანია და შეიძლება მათი გახურება საკმაოდ დიდი სიჩქარით, რაც, თავის მხრივ, ნიშნავს ხელსაწყოს მგრძნობელობის გაზრდას. როდესაც



კამერებში მოთავსებულია განსხვავებული თერმული თვისებების მქონე სითხეები, გაცხელების შედეგად მათ შორის წარმოქმნილი ტემპერატურათა სხვაობა თერმოწყვილების მეშვეობით გარდაიქმდება სიგნალში, რომელიც ძლიერდება, მიეწოდება გაცხელების და კომპენსაციის პლატას და ახდენს ამ სხვაობის მინიმუმადე დაყვანას კამერების გარსებზე მიწოდებული დენების რეგულირების გზით. კომპენსაციის სიმძლავრის პროპორციული ძაბვა შემდგომ მიეწოდება თვითჩამწერს როგორც ტემპერატურის ფუნქცია.

**ცხრილი 2.3** მიკროკალორიმეტრ DACM-4A-ს ტექნიკური მონაცემები

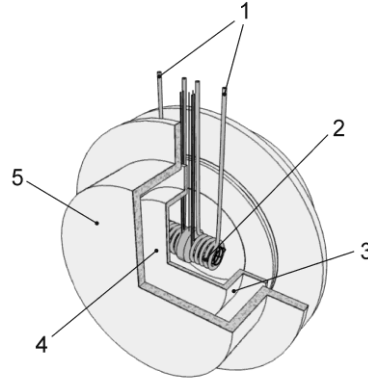
სითბოტევადობათა სხვაობის გაზომვა	მაქსიმალურიდან (-0.32 J/K-დან +0.32 J/K-მდე) მინიმალურამდე (-0.005 J/K-დან +0.005 J/K-მდე)
ხმაურის დონე 1 K/მინ სიჩქარის დროს	$5 \cdot 10^7$ W
ბაზისური ხაზის განმეორებადობა	$3 \cdot 10^6$ W
ბაზისური ხაზის გადახრა სწორი ხაზიდან	$15 \cdot 10^6$ W
C <sub>p</sub> სხვაობის მაჩვენებლის დაფიქსირების დრო	არაუმეტეს 40 წმ
სამუშაო ტემპერატურული ინტერვალი	0 - 150°C
ტემპერატურის გაზომვის აბს. ცდომილება	$\pm 0.1$ °C
კალორიმეტრის უჯრედის გაცხელების სიჩქარე	0.03; 0.06; 0.125; 0.25; 0.1; 1.0; 2.0; 4.0 K/min
გაცივების სიჩქარე	0.5 და 1K/min
სკანირების სიჩქარის ფარდობითი ცდომილება	$\pm 2$ %
წნევა ამპულის თავზე	500-600 kPa
თითოეული კამერის მოცულობა	0.8 ml
კამერის სამუშაო მოცულობა	0.46 ml
კალიბრების სიმძლავრე	25; 50; 100 $\mu$ W

კალორიმეტრულ ექსპერიმენტში ბიოლოგიური მაკრომოლეკულების გაცხელების შედეგად მიღებული ტიპური მრუდების დამუშავების მეთოდოლოგია არის შემდეგნაირი. დენატურაციული მრუდის გარდა ასევე იწერება ბაზისური ხაზი, რომელიც შეესაბამება გამხსნელი-გამხსნელის სკანირებას, და ცნობილი სიმძლავრის მქონე საკალიბრო ნიშნული (სურ. 2.7). დენატურაციული პიკისა და საბაზისო ხაზის მიერ შემოფარგლური ფართობიდან საკალიბრო ნიშნულის პარამეტრების გათვალისწინებით ბიომაკრომოლეკულური დენატურაციის სითბო შეიძლება განისაზღვროს ფორმულით

$$Q=k_1S \quad (2.9),$$

სადაც Q – დენატურაციული სითბოს რაოდენობაა, S – სითბოს შთანთქმის პიკის ფართობი, ხოლო k<sub>1</sub> – ჩანაწერის ერთეულოვანი ფართობის ფასი ენერგეტიკულ ერთეულებში (k<sub>1</sub> =

$W_{et} \cdot t / S_{et}$ , რღე  $W_{et}$  – ეტალონური სიმძლავრე, რომელიც  $t$  დროში გადაეცემა ერთერთ კამერას და  $S_{et}$  – საკალიბრო ნიშნულის ფართობი).



**სურათი 2.6** დიფერენციული მასკანირებელი მიკროკალორიმეტრ DACM-4A-ს კალორიმეტრული ბლოკი. 1 - პლატინის კაპილარები, 2 – სპირალური კალორიმეტრული კამერები და მათი გამაცხელებელი, 3 – შინაგანი ადიაბატური გარსი, 4 – კამერებს შორის ტემპერატურული სხვაობის გამზომი მოწყობილობა, 5 – გარე ადიაბატური გარსი.

ექსპერიმენტული მრუდებიდან მიღებული გახსნილი ნივთიერების კუთრი სითბოტევადობა ნებისმიერ ტემპერატურაზე ყოველთვის უარყოფითია, ვინაიდან მაკრომოლეკულების ხსნარების სითბოტევადობა ყოველთვის აღემატება იგივე მოცულობის გამხსნელის სითბოტევადობას (სურ. 2.7) და განისაზღვრება შემდეგნაირად:

$$-\Delta C = [C]_p^p \cdot m_p - [C]_p^s \cdot \Delta m_s \quad (2.10),$$

სადაც  $[C]_p^p$  და  $[C]_p^s$  – გახსნილი ნივთიერების და გამხსნელის კუთრი სითბოტევადობებია, შესაბამისად,  $m_p$  – კამერის სამუშაო მოცულობაში გახსნილი ნივთიერების მასაა, ხოლო  $\Delta m_s$  – მის მიერ გამოდევნილი გამხსნელის მასაა, რომელიც უდრის

$$\Delta m_s = \Delta m_p \frac{[V]^p}{[V]^s} \quad (2.11)$$

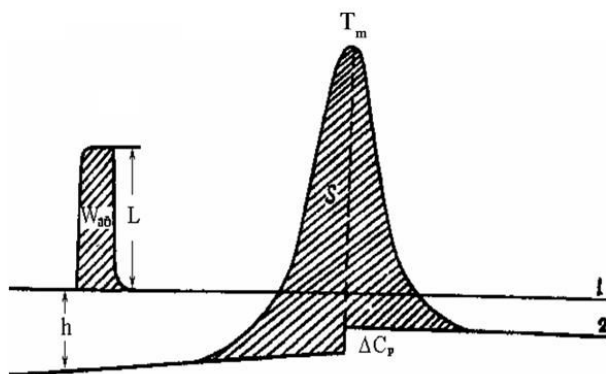
სადაც  $[V]^p$  და  $[V]^s$  – გახსნილი ნივთიერების და გამხსნელის კუთრი მოცულობებია [174, 175]. აქედან

$$[C]_p^p = [C]_p^s \frac{[V]^p}{[V]^s} - \frac{\Delta C}{m_p} \quad (2.12),$$

სადაც  $\Delta C = k_2h$  - გამხსნელის და ხსნარის კუთრი სითბოტევადობების შორის სხვაობა,  $h$  - წერტილის გადახრა ბაზისური მრუდიდან ნებისმიერ ტემპერატურაზე, ხოლო  $k_2$  - წრფიდან გადახრის ერთეულის ფასი, რომელიც იზომება  $J/K \cdot cm$ -ში და უდრის  $k_2 = W_{et}/V \cdot l_{et}$ , სადაც  $W_{et}$  - საკალიბრო სიმძლავრე,  $V$  გაცხელების სიჩქარე,  $l_{et}$  - საკალიბრო ნიშნულის წრფიდან გადახრა. ამის გათვალისწინებით, საბოლოო ფორმულა არის

$$[C]_p^p = [C]_p^s \frac{[V]^p}{[V]^s} - \frac{W_{et} \cdot h}{V \cdot l_{et} \cdot m_p} \quad (2.13)$$

მიღებული კალორიმეტრული მრუდების დამუშავება, რომელიც გვაძლევს საკვლევი ბიოობიექტის კუთრი სითბოტევადობის დამოკიდებულებას ტემპერატურაზე, ხორციელდება ამ ფორმულის გამოყენებით ციფრულ ფორმატში სპეციალური კომპიუტერული პროგრამის მეშვეობით [182]. ენტალპიის გამოსათვლელად პიკის ფართობი გამოთვლილი იყო Origin-ის გამოყენებით.



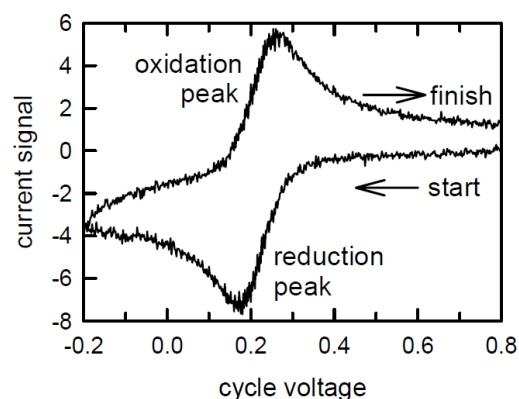
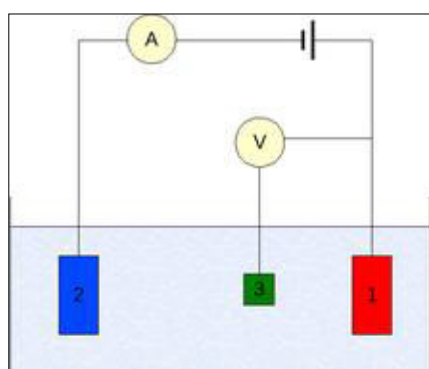
სურათი 2.7 ბიომაკრომოლეკულების ლღობის მახასიათებელი ტიპური კალორიმეტრული მრუდი.

## 2.4 სწრაფი სკანირების ციკლური ვოლტამპერომეტრია, როგორც მძლავრი ბიოფიზიკური მეთოდი

ციკლური ვოლტამპერომეტრიის მეთოდი (CV) არის სწრაფი, მეტად მძლავრი და ყველაზე გავრცელებული მეთოდი სხვა ელექტროქიმიურ მეთოდებთან შედარებით. ის ფართოდ გამოიყენება როგორც ანალიზურ, ასევე ფუნდამენტურ კვლევებში ჟანგვა-აღდგენითი პროცესების ანალიზურ (კონცენტრაციები), კინეტიკურ (რეაქციის სიჩქარის კონსტანტები), თერმოდინამიკურ (ჟანგვა-აღდგენითი პოტენციალები, წონასწორული კონსტანტები) და მექანიკურ თავისებურებათა შესასწავლად [184]. ვოლტამპერომეტრულ ექსპერიმენტში ფართოდ გამოიყენება ე. წ. სამელექტროდიანი სისტემა, რომელიც წარმოადგენს ელექტროლიტში ჩაშვებულ სამი სპეციფიური ელექტროდის სისტემას (სურ. 2.8ა). ელექტროლიტის ძირითადი დანიშნულება არის საკმარისი გამტარობის უზრუნველყოფა. ასეთ სისტემებში დენი გადის მუშა და დამხმარე ელექტროდებს შორის, ხოლო მუშა ელექტროდის პოტენციალი იზომება შედარების ელექტროდის მიმართებაში. ამრიგად შესაძლებელია მუშა ელექტროდზე მიმდინარე პროცესის შესაბამისი პოტენციალის გაზომვა ცნობილი პოტენციალის მქონე შედარების ელექტროდის მიმართ, მასში დენის გატარების გარეშე და ამიტომ ძაბვის ვარდნის გავლენა მნიშვნელოვნად მცირდება [184, 185].

მუშა ელექტროდი, რომელზეც მიმდინარეობს შესასწავლი ჟანგვა-აღდგენითი პროცესი, ხშირ შემთხვევაში წარმოადგენს ოქროს, პლატინის, ვერცხლის ან გლასი-კარბონის მცირე ზომის დისკს, თუმცა არსებობს უამრავი სხვა ფორმის მუშა ელექტროდებიც. შედარების ელექტროდის სახით გამოიყენება ისეთი ელექტროდები, რომლის პოტენციალი ზუსტად არის განსაზღვრული და, რაც მთავარია, არის სტაბილური. ძირითადად პოტენციალის სტაბილობა მიიღწევა გაჯერებული რედოქს სისტემების გამოყენებით. წყალხსნარებში მიმდინარე პროცესების შესასწავლად ყველაზე გავრცელებული შედარების ელექტროდებია წყალბადური (სტანდარტული, ნორმალური და სხვა), გაჯერებული კალომელის ელექტროდი, ვერცხლის ელექტროდი (Ag/AgCl) და სხვა. აღსანიშნავია, რომ მთელ რიგ ორგანულ გამხსნელებში შედარების ელექტროდთა უმრავლესობა იცვლის პოტენციალის სტანდარტულ მნიშვნელობას. ასეთ პირობებში პრაქტიკაში მიღებულია ე.წ. კვაზი-შედარების ელექტროდების გამოყენება, რომელთა პოტენციალი არ არის მუდმივი, მაგრამ ექვემდებარება გამოთვლას მოცემული ექსპერიმენტული პირობების ფარგლებში. სამელექტროდიანი სისტემის მესამე, დამხმარე ელექტროდი, რომელშიც გადის დენი,

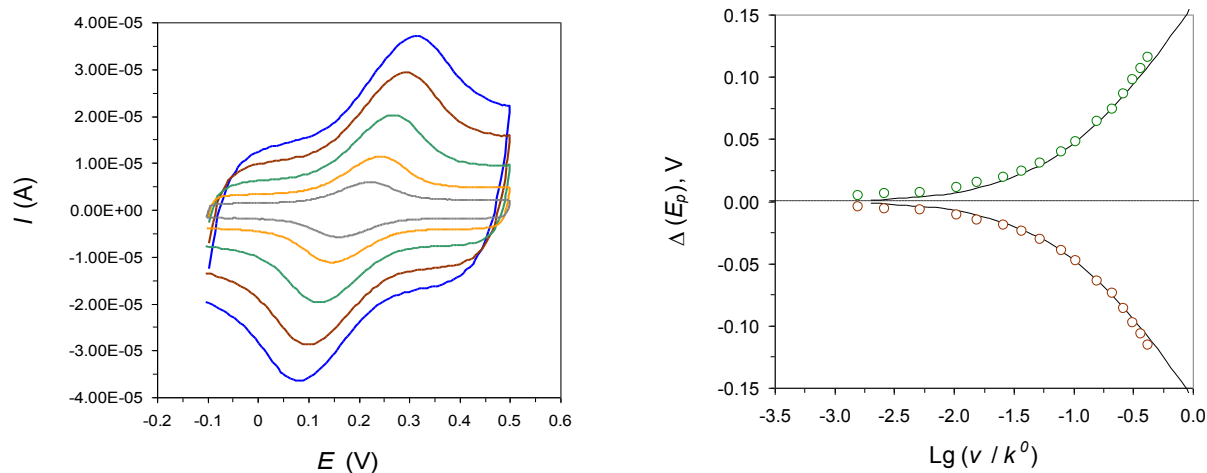
მზადდება ინერტული გამტარი მასალებისგან (ოქრო, პლატინა, კარბონი), რადგან ისინი არ წარმოქმნიან ელექტროლიზურ პროდუქტებს, რომლებსაც შეუძლია მუშა ელექტროდზე შემფოთების გამოწვევა. მიუხედავად ამისა, ზოგ შემთხვევაში მიღებულია დამხმარე ელექტროდის იზოლირება დანარჩენი ორი ელექტროდისაგან. მისი პოტენციალი იცვლება მუშა ელექტროდზე მიმდინარე პროცესის შესაბამისად და, როგორც წესი, არ ხდება მისი გაზომვა. ასეთი სისტემის გამოყენება უზრუნველყოფს შედარების ელექტროდის საშუალებით მუშა ელექტროდის პოტენციალის გაზომვას ისე, რომ შედარების ელექტროდი დაცული იყოს დენით გამოწვეული დესტაბილიზაციისაგან.



**სურათი 2.8.** სამელექტროდიანი ვოლტამპერომეტრული უჯრედის სქემატური აგებულება (ა) და ტიპური ვოლტამპერომეტრული სიგნალი (ბ). 1 - მუშა ელექტროდი; 2 - დამხმარე ელექტროდი; 3 - შედარების ელექტროდი; 4 - კვების წყარო.

ციკლური ვოლტამპერომეტრულით მიიღება ფარადეის დენი მუშა და დამხმარე ელექტროდებს შორის, როგორც ციკლურად ცვლადი პოტენციალის ფუნქცია. მუშა ელექტროდის პოტენციალი წრფივად იცვლება დროში გარკვეული მნიშვნელობების ფარგლებში და შემდგომ ხდება მისი ინვერსია. ასეთი ციკლები მეორდება და მათი სიხშირე განსაზღვრავს პოტენციალთა სკანირების სიჩქარეს. ამ დროს პოტენციოსტატი ზომავს დენს, რომელიც გადის მუშა და დამხმარე ელექტროდს შორის. შექცევადი რედოქს-წყვილების შემთხვევაში დენის დამოკიდებულება პოტენციალზე წარმოადგენს ორ პიკს, რომელთა მაქსიმუმები შეესაბამება რედოქს-წყვილის დაჟანგვის და აღდგენის პოტენციალებს (სურ. 2.8ბ). პოტენციალის სკანირების სიჩქარის ზრდასთან ერთად იზრდება ანოდური და კათოდური პიკების გაგანიერება, რომელიც საშუალებას იძლევა მონაცემთა სტანდარტული დამუშავების მეთოდის (სურ. 2.9) გამოყენებით გამოითვალოს სიტემის ძირითადი მახასიათებელი პარამეტრები (მაგალითად, რეაქციის სიჩქარის კონსტანტა, ჟანგვა-

აღდგენითი პოტენციალი, წონასწორული კონსტანტები, რეორგანიზაციის ენერგია და სხვა) (დეტალურად იხ. ქვევით) [137-139, 186-189].



**სურათი 2.9.** (a) Au/SAM/Az სისტემაში ელექტრონის გადატანის შესაბამისი ვოლტამოგრამები. 70% [ch][dhp], pH 4.6,  $T = 20^\circ C$ ,  $P = 0.1 MPa$ , პოტენციალის სკანირების სიჩქარეები: 10, 20, 40, 60 და  $80 V s^{-1}$ . (b) მიღებული პიკების დაშორებების როგორც სკანირების სიჩქარის ფუნქციის ფიტინგი მარკუსის მოდელის მიხედვით. მიღებული პარამეტრები  $k^0 = 190 s^{-1}$ ,  $\lambda = 0.3 eV$ .

ციკლური ვოლტამპერომეტრიის მეთოდით ჟანგვა-აღდგენითი პროცესების შესწავლა შესაძლებელია ორი რეჟიმის საშუალებით: როდესაც შესწავლის ობიექტი თავისუფლად დიფუნდირებს ხსნარში ან შეუქცევადად დამაგრებულია (იმობილიზებული) მუშა ელექტროდზე. ხშირ შემთხვევაში იმობილიზაცია ხორციელდება თვითაწყობადი მონოშრებების, ანუ SAM-ების საშუალებით, მათი თვისებების მიმოხილვა მოცემულია §1.6-ში. თუმცა მსგავს ფირებს ფართოდ იყენებენ თავისუფლად დიფუნდირებადი ობიექტების შემთხვევაშიც ძირითადად მეტალის დამაზიანებელი კონტაქტისგან დასაცავად [137-139, 187]. ელექტროდის დანაფარი (ზედაპირული კონცენტრაცია) ელექტროქიმიურად აქტიური მოლეკულების ფენით  $\Gamma$  განისაზღვრება ფორმულით:

$$\Gamma = \theta / (n F S v) \tag{2.14},$$

სადაც  $\theta$  - არის ვოლტამპერული პიკების ფართობი,  $n$  - გადატანილი ელექტრონების რაოდენობა,  $F$  - ფარადეის რიცხვი,  $S$  - ელექტროდის გეომეტრიული ფართობი,  $v$  - სკანირების

სიჩქარე [184, 187]. აღსანიშნავია, რომ დაფარვის ხარისხი დამოკიდებულია როგორც გარემოს პირობებზე, ასევე სკანირების სიჩქარეზე და უარესდება დროში.

მოკლე SAM-ებზე დამაგრებული რედოქს-მოლეკულების შემთხვევაში ანოდური და კათოდური პიკების მაქსიმუმის შესაბამისი პოტენციალები ერთნაირია სკანირების დაბალ სიჩქარეებზე, ხოლო ელექტრონის გადატანის მანძილის ან სკანირების სიჩქარის ზრდასთან ერთად ხდება მათი დაშორება [187-190]. ანოდური და კათოდური პიკების სიმაღლის დამოკიდებულება სკანირების სიჩქარეზე  $i_p(V)$  იმობილიზებული რედოქს-მოლეკულების შემთხვევაში სწორხაზობრივია და წარმოადგენს კოორდინატა ცენტრიდან დაწყებულ ორ სიმეტრიულ ხაზს. ასეთი ტიპის დამოკიდებულება ცალსახად მიუთითებს იმაზე, რომ რედოქს-აქტიური მოლეკულა დამაგრებულია ელექტროდზე, რაც აქტიურად გამოიყენება პრაქტიკაში იმობილიზაციის ფაქტის დასადასტურებლად. ასეთი სურათი გამომდინარეობს ლავრონისა ფორმულიდან [186] და ცალსახად მიუთითებს იმაზე, რომ რედოქს-მოლეკულები მიმაგრებულია ელექტროდზე და არ დიფუნდირებს ხსნარში [187, 188].

ელექტრონის გადატანის უფრო ზოგადი, მარკუსის თეორის გამოყენებით, თუ  $e\xi \ll \lambda$ ,  $k_B T \ll \lambda$ , სადაც  $\lambda$  - არის რეორგანიზაციის ენერგია და  $\xi$  - გადაძაბვა [69, 70, 187, 191], იმობილიზებული მოლეკულების მიერ ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტის გამოსათვლელად გამოიყენება ლავრონის ფორმულა:

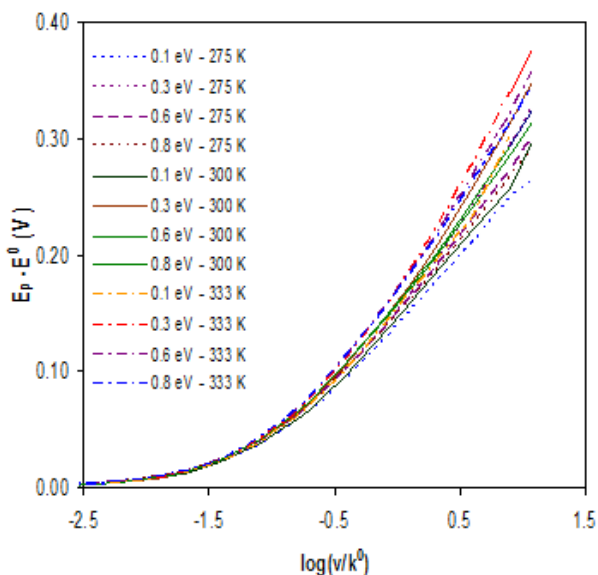
$$\log k_{ET}^o = \alpha \log(1-\alpha) + (1-\alpha) \log \alpha - \log \left( \frac{RT}{nFv} \right) - \frac{\alpha(1-\alpha)nF\Delta E_p}{2.3RT} \quad (2.15),$$

სადაც  $\alpha$  - არის მუხტის გადატანის კოეფიციენტი,  $n$  - გადატანილი ელექტრონების რაოდენობა,  $R$  - უნივერსალური გაზური მუდმივა,  $T$  - ტემპერატურა,  $F$  - ფარადეის მუდმივა,  $v$  - სკანირების სიჩქარე და  $\Delta E_p$  - მანძილი ანოდურსა და კათოდურ პიკებს შორის.

ვებერის და თანაავტორების მიერ შემუშავებული იყო სიჩქარის სტანდარტული კონსტანტის და რეორგანიზაციის ენერგიის ერთდროული გამოთვლის მეთოდი, რომელიც დაფუძნებულია კათოდური და ანოდური პიკების პოტენციალების სკანირების სიჩქარეზე დამოკიდებულებაზე. გარდა ამისა ამ მოდელის ფარგლებში შესაძლებელია მეტალის ელექტროდში ფერმის დონის მახლობლად ელექტრონული მდგომარეობების განაწილების განსაზღვრა [192, 193]:

$$k_{ET} \propto \int_{-\infty}^{\infty} f(\varepsilon) \exp\left[-\frac{(e\xi + \varepsilon_F \pm \lambda)^2}{4\lambda RT}\right] d\varepsilon \quad (2.16),$$

სადაც  $f(\varepsilon)$  არის ფერმი-დირაკის განაწილების ფუნქცია, ხოლო  $\varepsilon_F$  - ფერმის ენერგია. დევისის და ვალდეკის მიერ მიღებული რეორგანიზაციის ენერგიისა და ტემპერატურის სხვადასხვა მნიშვნელობების შესაბამისი ფიტინგის მოდელური მრუდები მოცემულია სურ. 2.10 [147]. ეს მრუდები შემდგომში გამოიყენება ექსპერიმენტული წერტილების შესაბამისი სიჩქარის კონსტანტისა და რეორგანიზაციის ენერგიის მისაღებად (სურ. 2.9).



**სურათი 2.10.** რეორგანიზაციის ენერგიისა და ტემპერატურის სხვადასხვა მნიშვნელობების შესაბამისი ფიტინგის მოდელური მრუდები (დევისის და ვალდეკის გამოუქვეყნებელი მასალა).

აღსანიშნავია, რომ რიგ შემთხვევაში ექსპერიმენტული წერტილები სრულად არ ჯდება არც ერთი რელაქსაციის ენერგიის შესაბამის თეორიულ მრუდზე. ექსპერიმენტის გარკვეულ პირობებში (მაგალითად, ელექტროლიტის დაბალი კონცენტრაცია, დიდი მანძილი მუშა და შედარების ელექტროდებს შორის და სხვა) ხდება ვოლტამპერომეტრული სურათის დამახინჯება და, შედაგად, მცდარი კონსტანტების მიღება, რაც მარტივად გამოსწორებადია IRs-კორექციის შედეგად. მონაცემების ასეთი დამახინჯება განსაკუთრებით თვალსაჩინოა მაღალი სკანირების სიჩქარეების პირობებში, რადგან იწვევს პიკების დიდ დაშორებას და, შესაბამისად, სიჩქარის კონსტანტების რეალურზე უფრო დაბალ მნიშვნელობას. თუ



შეუძლებელია მაღალი წინაღობის თავიდან აცილება, როგორც ეს ხდება, მაგალითად, იმობილიზებული რედოქს-მოლეკულების შემთხვევაში  $\Gamma$ -ას მაღალი მნიშვნელობების დროს, გამოიყენება ე. წ. IRs-კორექცია. თუ ელექტროდის აქტიურ ზედაპირს აქვს დისკის ფორმა, ხსნარის წინაღობა მუშა და შედარების ელექტროდებს შორის  $R_s$  გამოითვლება ფორმულით

$$R_s = \frac{\arctan(r_r/r_w)}{2\pi r_w \kappa} \quad (2.17),$$

სადაც  $r_w$  - არის მუშა ელექტროდის რადიუსი,  $\kappa$  - გარემოს წინაღობა,  $r_r$  - მანძილი ელექტროდებს შორის [84, 194]. აღსანიშნავია, რომ ექსპერიმენტული წერტილების არასრულყოფილი ფიტინგი ასევე შეიძლება იყოს გამოწვეული სხვა მიზეზებით, როგორცაა შესასწავლი სისტემის მარკუსის თეორიის საფუძვლების არ დაკმაყოფილება.

სადისერტაციო ნაშრომში წარმოდგენილ ვოლტამპრულ ექსპერიმენტებში გამოყენებული იყო Autolab-ის პოტენციოსტატ-გალვანოსტატი PGSTAT 30, პროგრამული ინტერფეისით GPES (General Purpose Electrochemical System), რომლის ძირითადი მახასიათებლები მოცემულია ცხრილში 2.4, ხოლო დამატებითი ინფორმაცია შესაბამისი უჯრედების აგებულების შესახებ მოცემულია §2.1-ში.

**ცხრილი 2.4.** პოტენციოსტატ-გალვანოსტატი PGSTAT 30-ის (Autolab) ძირითადი მახასიათებლები.

მაქსიმალური გამომავალი დენი	$\pm 2$ A
მაქსიმალური გამავალი ძაბვა	$\pm 30$ V
პოტენციალის მიწოდების და გაზომვის დიაპაზონი	$\pm 10$ V
პოტენციალის მიწოდების მაქსიმალური ცდომილება	$\pm 0.2\%$ , $\pm 2$ mV
პოტენციალის გარჩევის უნარი	150 mkV
გასაზომი პოტენციალის გარჩევადობა	30 mkV
დენის დიაპაზონები	10 nA - 1 A, 9 დიაპაზონი
დენის გაზომვის ცდომილება	$\pm 0.2\%$
დენის გარჩევის უნარი	დენის დიაპ. 0.03%
გასაზომი დენის გარჩევადობა	დენის დიაპ. 0.0003%
მინიმალური გაზომვადი დენი 10 nA დიაპაზონში	30 fA
IR-კომპენსაცია დიაპაზონების მიხედვით	1 A პირობებში 0 -20 $\Omega$
	10 nA პირობებში 0 -200 M $\Omega$ -მდე
გარჩევადობა	0.025%
ელექტროდების რაოდენობა უჯრედში	2, 3, 4

### თავი 3. შედეგების განხილვა

#### 3.1 დიმეთილსულფოქსიდის გავლენა $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის თერმოდინამიკურ სტაბილობასა და კინეტიკურ ქცევაზე (ფუნქციურ აქტივობაზე)

ცილა-ფერმენტის თერმული სტაბილობის და კატალიზური აქტივობის დამახასიათებელი, შესაბამისად, თერმოდინამიკური და კინეტიკური პარამეტრების ერთობლივი შესწავლა გვაძლევს საშუალებას, რომ დავადგინოთ ის შინაგანი ფიზიკური ატომურ-მოლეკულური ფაქტორების (მაგალითად, ცილების ფლუქტუაციურ-კონფორმაციული ლაბილობის), როლი რომლებიც რეალურად განსაზღვრავენ ფერმენტების უაღრესად მაღალ კატალიზურ ეფექტურობას. ექსპერიმენტულ კვლევაში  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის მიერ ATEE-ს ჰიდროლიზის პროცესის კინეტიკის შესასწავლად გამოვიყენეთ პოტენციომეტრული მეთოდი, რომლის საშუალებით შესაძლებელია ფერმენტული კატალიზის დამახასიათებელი პარამეტრების განსაზღვრა სარეაქციო გარემოს მახასიათებლების მნიშვნელობების ვარიაციების პირობებში (მაგალითად, ბიოლოგიურად აქტიური დანამატების სახეობისა და კონცენტრაციის, ტემპერატურის, წნევის, იონური ძალის და სხვა). ამასთან ერთად, ქიმოტრიპსინის გლობულის თერმული სტაბილობის პარალელური შესწავლა დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრიის მეთოდის გამოყენებით (კინეტიკური ექსპერიმენტის პირობებთან მაქსიმალურად დაახლოებულ პირობებში) საშუალებას იძლევა ე.წ. “მაგიური სამკუთხედის“, ანუ ცილა-ფერმენტის გლობალური სტაბილობის, კონფორმაციული ფლექსიბილობის და კატალიზური აქტივობის შინაგანი ურთიერთკავშირის ჩადრმავებულად შესასწავლად,

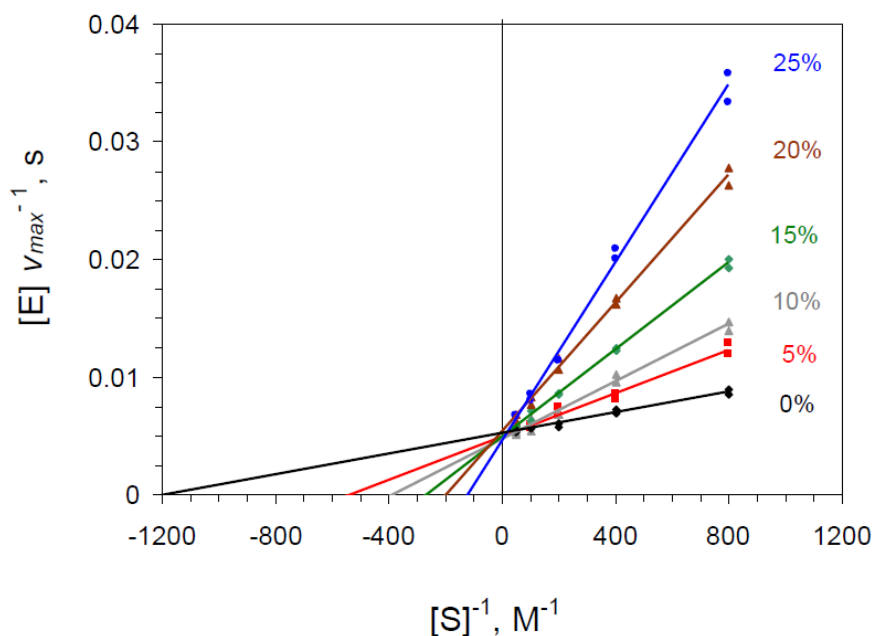
ზემოაღწერილი კომპლექსური კვლევების მიზნით, ჩვენს მიერ შესწავლილი იყო ბიოსამედიცინო ლიტერატურაში უკვე საკმაოდ ცნობილი, მაგრამ ცილებთან ატომარულ დონეზე ზემოქმედების თვალსაზრისით ჯერჯერობით არასაკმარისად გამოკვლეული, არასპეციფიკური (ანუ, ზოგადი) ზემოქმედების მქონე მცირე ორგანული დანამატის დიმეთილსულფოქსიდის (DMSO) გავლენა როგორც  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის ფერმენტულ აქტივობაზე, ისე მის თერმულ სტაბილობაზე. კვლევა ჩატარდა DMSO-ს კონცენტრაციის ფართო ფარგლებში, როდესაც, სავარაუდოდ, შესაძლებელი იყო ამ დანამატის როგორც მასტაბილებელი, ისე მადესტაბილებელი ხასიათის გამოვლენა. ავტომატური ტიტრაციის

მეთოდის საშუალებით შესწავლილი იყო  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის მიერ სპეციფიური ესთერული სუბსტრატის, ATEE-ს, ჰიდროლიზის პროცესის დამახასიათებელი პარამეტრები ხსნარში DMSO-ს 0 დან 70% მოცულობითი კონცენტრაციის თანაობისას, გარემოს pH 8.4 პირობებში, 0.05M NaCl თანაობისას, ბუფერის გარეშე, რაც გამომდინარეობს მოცემული მეთოდოლოგიის ფარგლებში ინსტრუმენტული გაზომვების არსებითი მოთხოვნებიდან. pH 8.4 კინეტიკური კვლევებისთვის შერჩეული იყო იმ გარემოების გათვალისწინებით, რომ ATEE-ს ფერმენტული ჰიდროლიზის, კინეტიკური კონსტანტა pH 8.0 დან pH 8.8 ფარგლებში არ იცვლება და აღწევს თავის მაქსიმალურ მნიშვნელობას.

მიღებული კინეტიკური მრუდების ცნობილი მეთოდოლოგიური პროცედურების საშუალებით დამუშავების შედეგად (იხ. §2.2) შესაძლებელია ფერმენტული კატალიზის პარამეტრების, კერძოდ, მიხაელისის  $K_M$  და კატალიზური კონსტანტის  $k_{cat}$ , განსაზღვრა [118, 169]. მიხაელისის კონსტანტა ახასიათებს ფერმენტის და სუბსტრატის არაკოვალენტური ურთიერთქმედების ეფექტურობას, ხოლო კატალიზური კონსტანტა ახასიათებს ფერმენტული ბიოქიმიური გარდაქმნის კატალიზურ ეფექტურობას. DMSO-ს 25-30% ფარგლებში მიხაელისის კონსტანტა სისტემატურად იზრდება, კატალიზური კი უცვლელია (სურ. 3.1, ცხრ. 3.1). ეს ნიშნავს, რომ ფერმენტ-სუბსტრატული შუალედური კომპლექსის სტაბილობა კლებულობს, მაგრამ კატალიზური ეფექტურობა ქიმიური გარდაქმნების თვალსაზრისით, მოცემულ ფარგლებში, რჩება უცვლელი. DMSO-ს კონცენტრაციის შემდგომი გაზრდისას მიხაელისის კონსტანტის სიდიდე მონოტონურად იზრდება, ხოლო კატალიზური კონსტანტა იწყებს შემცირებას (ცხრ. 3.1). დაახლოებით 70% DMSO-ს პირობებში ორივე კონსტანტა აღარ ექვემდებარება გაზომვას, ვინაიდან გამხსნელის თვისებების ცვლილება მნიშვნელოვნად ზრდის გაზომვის ცდომილებას.

აღსანიშნავია, რომ ლაინუივერ-ბერკის კოორდინატებში აგებული DMSO-ს სხვადასხვა კონცენტრაციების პირობებში ATEE-ს ჰიდროლიზის კინეტიკური მრუდების განლაგება გავს კონკურენტული ინჰიბირების შემთხვევას (სურ. 3.1). კონკურენტული ინჰიბირების მექანიზმი გულისხმობს, რომ ინჰიბიტორი უკავშირდება ფერმენტის აქტიურ ცენტრს, რომელიც ამის გამო სუბსტრატისათვის მიუწვდომელი ხდება.  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის შემთხვევაში მიხაელისის კონსტანტა  $K_M$  არაკოვალენტური ფერმენტ-სუბსტრატული კომპლექსის დისოციაციის წონასწორული კონსტანტის  $K_s$  პროპორციულია [105, 195, 196]. კონკურენტული ინჰიბირებისას  $K_s$  (და, შესაბამისად,  $K_M$ ) მონოტონურად იზრდება ინჰიბიტორის კონცენტრაციის ზრდასთან ერთად, ხოლო  $k_{cat}$  უცვლელი რჩება. კონსტანტების ასეთი დამოკიდებულება ხსნარში DMSO-ს კონცენტრაციაზე ფორმალურად მიუთითებს

კონკურენტული ტიპის ინჰიბირებაზე [111, 118]. მაგრამ წინა სერიის სამუშაოს [118, 119] შედეგების გათვალისწინებით და  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის პოლიპეპტიდურ ინჰიბიტორებთან ურთიერთქმედების და პოლიპეპტიდური სუბსტრატების ჰიდროლიზის სხვა ნაშრომების მონაცემებიდან [197, 198] გამომდინარე ცხადია, რომ DMSO არ წარმოადგენს ამ ფერმენტის კონკურენტულ ინჰიბიტორს. DMSO-ს გავლენა ATEE-ს ჰიდროლიზის პროცესზე ძალიან გავს შარდოვანას გავლენას, რომელიც შესწავლილია წინა სერიის სამუშაოში [118, 119]. კერძოდ, ლაინუივერ-ბერკის კოორდინატებში აგებული ის მონაცემები, რომელიც მიღებულია DMSO-ს 0–25% კონცენტრაციების პირობებში (რაც შეესაბამება 0–3.75 M), 0-6 M შარდოვანას პირობებში მიღებული მონაცემების ანალოგიურია. შარდოვანა კი ცნობილია, როგორც არასპეციფიური დენატურანტი, რომელიც ახდენს  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის [118] და სხვა გლობულური ცილების [199, 200] დესტაბილიზაციას კონცენტრაციების მთელ ინტერვალში. ყოველივე ეს, იმ გარემოებასთან ერთად, რომ ორი ჰიდროფობული  $-CH_3$  ჯგუფის მქონე DMSO-ისგან განსხვავებით, შარდოვანას მოლეკულა არის პოლარული (შესაბამისად, ჰიდროფილური), მიუთითებს იმაზე, რომ DMSO-ს  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინთან ურთიერთქმედება ასევე არის არასპეციფიური და მრავალწერტილოვანი.



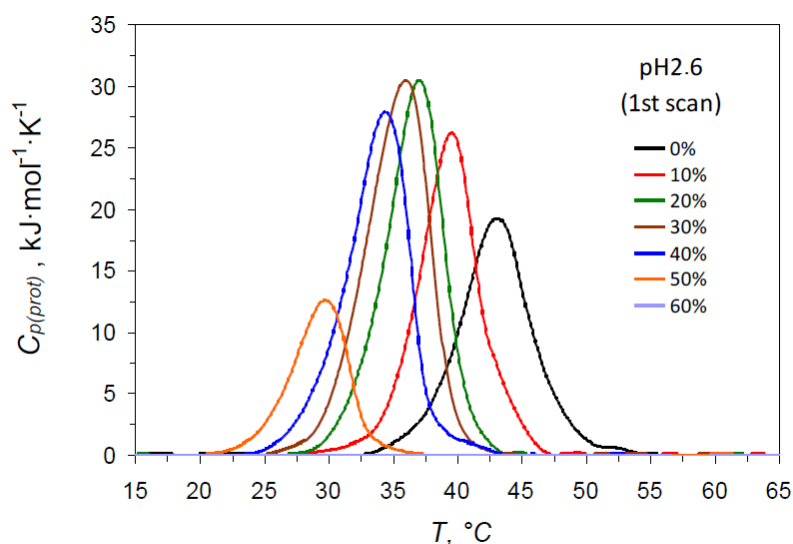
**სურათი 3.1.** ლაინუივერ-ბერკის კოორდინატებში აგებული  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის ATEE-ს ჰიდროლიზის კინეტიკური მრუდები სტანდარტულ პირობებში და ხსნარში DMSO-ს სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში (0.05 NaCl, pH 8.5).

**ცხრილი 3.1**  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის მიერ ATEE-ს ჰიდროლიზის კინეტიკური მახასიათებლები ხსნარში DMSO-ს სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში, (pH 8.5, 0.05 M NaCl).

[DMSO], vol %	[DMSO], mol/l	$K_m, M^{-1}$	$K_{cat}, s^{-1}$
0	0	$8.2 \times 10^{-4}$	205
10	1.5	$2.4 \times 10^{-3}$	210
20	3.0	$5.4 \times 10^{-3}$	200
30	4.5	$1.5 \times 10^{-3}$	150
40	6.0	$2.2 \times 10^{-2}$	136
50	7.5	$2.0 \times 10^{-2}$	44
60	9.0	$1.5 \times 10^{-2}$	36
70	10.5	-	-

რენტგენოსტრუქტურულ კვლევებზე დაყრდნობით [197, 198] და იმის გათვალისწინებით, რომ  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინი არის ენდოპეპტიდაზა, რომელიც *in vivo* ახორციელებს გრძელი პოლიპეპტიდების გაწყვეტას, ცხადია, რომ გრძელი პოლიპეპტიდის ჰიდროლიზის შემთხვევაში გასაწყვეტი ბმის ორივე მხარეს მყოფი სუბსტრატის ნაწილები ქმნიან ანტიპარალელურ  $\beta$ -სტრუქტურებს აქტიური ცენტრის ღარში მოთავსებულ შესაბამის ჯგუფებთან. ეს ენერგეტიკულად ხელსაყრელი მრავალწერტილოვანი ურთიერთქმედება ხორციელდება როგორც ღარში განთავსებული პოლიპეპტიდური ჯაჭვების შემადგენელი პეპტიდური ბმების და სუბსტრატის პოლარულ ჯგუფებს შორის წყალბადური ბმების მექანიზმით, ასევე ღარში მყოფი ჰიდროფობული საიტების და სუბსტრატის არაპოლარული ჯგუფების ჰიდროფობული ურთიერთქმედების ხარჯზე.  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის აქტიური ცენტრის ღარში არსებობს არა უმეტეს 7 ჰიდროფობული საიტისა, შესაბამისად, გრძელი პოლიპეპტიდის ჰიდროლიზის შემთხვევაში  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის კატალიზური ეფექტურობა იზრდება კოოპერატიული ზემოქმედების შედეგად მიღწეული ინდუცირებული მორგების ("induced fit") ხარჯზე. მაგრამ ATEE-ს ჰიდროლიზის შემთხვევაში დაკავებულია მხოლოდ 3 მათგანი [111] და, ამრიგად, დანარჩენი საიტები დაკავებულია წყლის ან ორგანული დანამატის მოლეკულებით. იმ ზედაპირული წყლისგან განსხვავებით, რომელიც უკავშირდება ცილის გლობულის კომპაქტურ ნაწილს, აქტიურ ცენტრში განთავსებული ბმული წყალი არ ქმნის ძლიერი წყალბადური ბმებით შეკრულ მდგრად სტრუქტურას. ეს აუცილებელია აქტიური ცენტრის ფლექსიბილობის შენარჩუნებისათვის და ასევე სუბსტრატის დაკავშირების ენერჯის მინიმიზაციის თვალსაზრისით. ამრიგად, ხსნარში

მყოფ მცირე ზომის ორგანულ დანამატებს (როგორც DMSO-ს, ასევე შარდოვანას), რომლებსაც ახასიათებთ ზემოდხსენებული საიტების მიმართ უფრო დაბალი სწრაფვა წყლის მოლეკულებთან შედარებით, არ გააჩნიათ კონკურენტული ურთიერთქმედების უნარი. გრძელი სუბსტრატის შემთხვევაში მისი სიგრძე თვითონ არის მასტაბილური ფაქტორი, რომელიც ზრდის კატალიზურ ეფექტურობას, ხოლო მოკლე სუბსტრატის ჰიდროლიზის შემთხვევაში ადგილი აქვს ორგანული დანამატის მიერ აქტიური ცენტრის დესტაბილიზაციას სუსტი კოოპერატიული ურთიერთქმედების ხარჯზე. სწორედ ამ სუსტი ცილა-დანამატის ურთიერთქმედებით, რომელიც ახდენს ლოკალურ დესტაბილიზაციას, ანუ ზრდის აქტიური ცენტრის ფლექსიბილობას, აიხსნება მიღებული კინეტიკური ქცევა.



**სურათი 3.2.** პირველი სკანირების შედეგად მიღებული  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის თერმული ლლობის (დენატურაციის) კალორიმეტრული მრუდები ხსნარში DMSO-ს 0-დან 60-მდე მოცულობით %-ის პირობებში (ფოსფატის ბუფერი, pH 2.6, 0.05 NaCl).

დიფერენციული მასკანირებელი მიკროკალორიმეტრიის მეთოდით შესწავლილი იყო  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის თერმული ლლობის დამახასიათებელი პარამეტრები ორი სხვადასხვა pH-ის პირობებში ხსნარში DMSO-ს 0-დან 70%-მდე კონცენტრაციების ინტერვალში. კალორიმეტრული სურათი, ერთი შეხედვით, უფრო რთულია და თითქოს მნიშვნელოვნად განსხვავდება კინეტიკური ექსპერიმენტიდან მიღებული შედეგებისაგან. მყავე არეში, pH 2.6-ის პირობებში (რომელშიც მიღებულია ცილების სტაბილობის შეფასება, თუმცა  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინი არ არის კატალიზურად აქტიური), ხსნარში DMSO-ს კონცენტრაციების მთელ

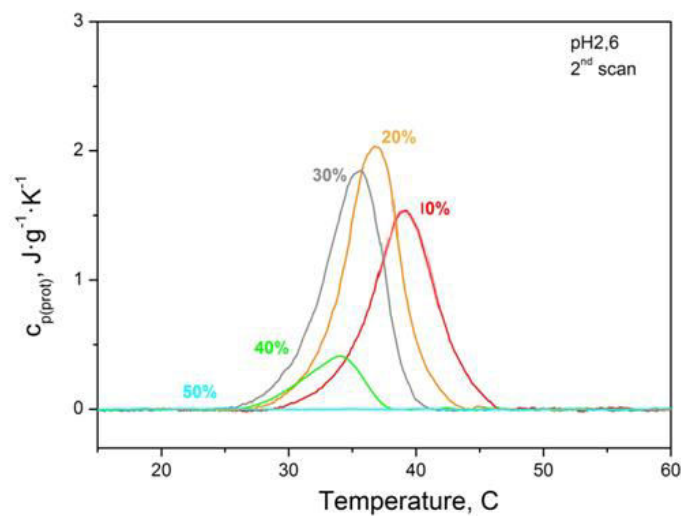
ინტერვალში გადასვლის ტემპერატურა  $T_m$  მონოტონურად მცირდება პიკის გაქრობამდე DMSO-ს 60%-ის პირობებში (ცხრ. 3.2, სურ. 3.2 და 3.5ბ). ამავდროულად, გადასვლის ენტალპია  $\Delta H_{cal}$  იზრდება DMSO-ს 25%-მდე, რის შემდეგ მონოტონურად იკლებს DMSO-ს შესწავლილი ინტერვალის ბოლომდე (ცხრ. 3.2, სურ. 3.2 და 3.5ა). თერმოდინამიური პარამეტრების მსგავსი ცვლილება მიღებულია ლიზოციმისთვისაც DMSO-ს ბუფერულ წყალხსნარებში სხვადასხვა pH-ის პირობებში, იმ განსხვავებით, რომ გადასვლის ტემპერატურა სწორხაზობრივად არის დამოკიდებული ხსნარში DMSO-ს კონცენტრაციაზე, ხოლო ენტალპიის სუსტად გამოხატული მაქსიმუმი მიიღება DMSO-ს იგივე კონცენტრაციაზე, რაც  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის შემთხვევაში [201].

**ცხრილი 3.2.**  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის დამახასიათებელი კინეტიკური და თერმოდინამიკური პარამეტრები ხსნარში DMSO-ს სხვადასხვა კონცენტრაციის პირობებში.

[DMSO], vol %	[DMSO], mol/l	pH 8.1		pH 2.6, 1st scan		pH 2.6, 2st scan	
		$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{cal}, \text{kJ mol}^{-1}$	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{cal}, \text{kJ mol}^{-1}$	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta H_{cal}, \text{kJ mol}^{-1}$
0	0	46.7	251	43.4	144	43.3	78
10	1.5	51.4	264	39.7	190	39.8	149
20	3.0	52.6	279	37.4	219	37.6	164
30	4.5	51.5	274	36.3	213	36.5	144
40	6.0	48.4	255	34.7	171	34.5	33
50	7.5	41.5	205	30.0	69	-	0
60	9.0	-	135	-	0	-	0
70	10.5	-	0	-	0	-	0

აღსანიშნავია, რომ pH 2.6-ის პირობებში ადგილი აქვს  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის აღდგენას დენატურაციის შემდეგ, ანუ ცილის გლობულის თერმული ლლობის პროცესი არის დიდწილად შექცევადი (იხ. ცხრ. 3.2, სურ. 3.3). საგულისხმოა, რომ ცილის აღდგენის უნარი მნიშვნელოვნად გაზრდილია ხსნარში DMSO-ს 30%-მდე თანაობისას. პირველი სკანირების შემდეგ ნიმუშის თანაბარი სიჩქარით გაცივების და განმეორებითი სკანირების შედეგად მიღებული პიკის ფართობის, ანუ ენტალპიის, შეფარდება ხსნარში ნებისმიერი კონცენტრაციის DMSO-ს თანაობისას მეტია, ვიდრე სტანდარტულ პირობებში (DMSO-ს გარეშე) (ცხრ. 3.2). მაგალითად, ენტალპიის მაქსიმუმის პირობებში, ანუ ხსნარში DMSO-ს

20%-ის თანაობისას აღინიშნება 75%-იანი აღდგენა, რაც დაახლოებით 20%-ით მეტია, ვიდრე სტანდარტულ პირობებში. გარდა ამისა მეტად მნიშვნელოვანია, რომ ამ პირობებში აღდგენის უნარი შენარჩუნებული იყო 6 განმეორებითი სკანირების შედეგად დღეღამის განმავლობაში. ასეთი ქცევა, რომელიც არ აღინიშნება ფიზიოლოგიურ პირობებში, მიუთითებს იმაზე, რომ მჟავე pH-ის პირობებში 0-30%-ის კონცენტრაციების თანაობისას DMSO მოლეკულები ასრულებენ ე.წ. “ქიმიური შაპრონების“ როლს (ანუ შინაგანი აგრეგაციის გამომწვევი არასწორი ურთიერთქმედებებისგან დამცველი სარქველების).

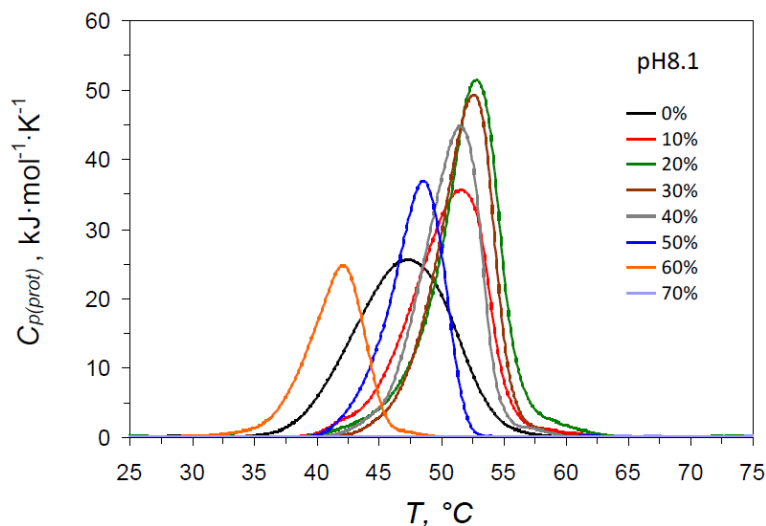


**სურათი 3.3.** გამეორებული სკანირების შედეგად მიღებული  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის თერმული ლღობის კალორიმეტრული მრუდები ხსნარში DMSO-ს სხვადასვა კონცენტრაციის პირობებში (ფოსფატის ბუფერი, pH 2.6, 0.05 NaCl).

ასევე ჩატარებული იყო შედარებითი ხასიათის კალორიმეტრული ექსპერიმენტების სერია ტუტე არეში, pH 8.1-ის პირობებში, რომლებიც შეესაბამება  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის მაქსიმალური კატალიზური აქტივობის ფარგლებს. მჟავე არეში ჩატარებული კვლევის ანალოგიურმა სერიამ გამოავლინა  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის საკმაოდ განსხვავებული ქცევა DMSO-ს იგივე კონცენტრაციების ზემოქმედების ქვეშ. მჟავე არეში მიღებულ შედეგებისგან განსხვავებით, გადასვლის ტემპერატურას და ენტალპიას გააჩნია სუსტი მაქსიმუმი DMSO-ს 20-30% მიდამოში (სურ. 3.4). გარდა ამისა, არ ხდება ცილის აღდგენა დენატურაციის შემდეგ არც სტანდარტულ პირობებში და არც DMSO-ს დამატებისას. გადასვლის ტემპერატურის მაქსიმუმის არსებობა მიუთითებს იმაზე, რომ ენტალპიურ სტაბილიზაციისთან ერთად, რომელსაც აქვს ადგილი DMSO-ს 30%-მდე დანამატების პირობებში ორივე pH-ის



შემთხვევაში, ტუტე გარემოში მცირდება ენტროპიული დესტაბილიზაცია, რაც აისახება გადასვლის ტემპერატურის ზრდაში ხსნარში DMSO-ს 30%-მდე დანამატების თანაობისას.

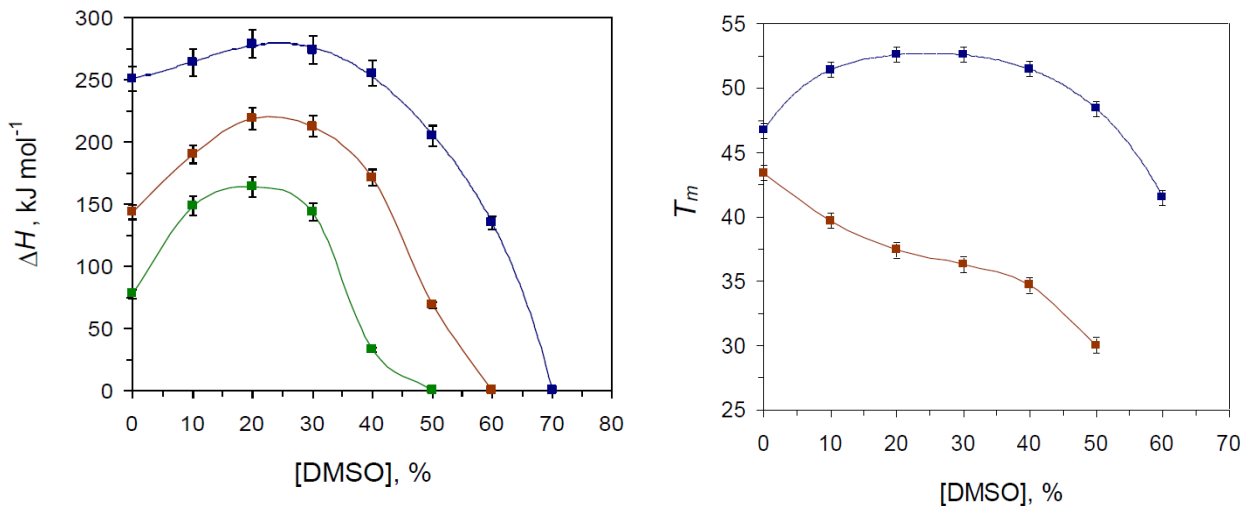


**სურათი 3.4.**  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის თერმული ლლობის კალორიმეტრული მრუდები ხსნარში 0-70% DMSO-ს კონცენტრაციის პირობებში (ბორატის ბუფერი, pH 8.1, 0.05 NaCl).

ასეთი განსხვავება  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის თერმოდინამიკურ ქცევაში მყავე და ტუტე გარემოში მიუთითებს იმაზე, რომ არსებობს DMSO-ს და ცილის გლობულის ურთიერთქმედების ორი სახეობა. ერთ-ერთი მათგანი, იწვევს ცილის სტაბილიზაციას, რაც თერმოდინამიური პარამეტრების სუსტ მაქსიმუმებში აისახება, მეორე კი დესტაბილიზაციას (სურ. 3.5). არაკავას და თანავტორების მიერ [202] ასევე ნაჩვენები იყო, რომ ქიმოტრიპსინოგენის და ლიზოციმის შემთხვევაში, ხსნარში DMSO-ს კონცენტრაციების 0-50%-ის პირობებში ადგილი აქვს გამხსნელი წყლის მიერ DMSO-თან შედარებით უპირატეს სოლვატაციას, რომელსაც აქვს სუსტი მაქსიმუმი DMSO-ს 25-30%-ის უბანში. ამ შემთხვევაში ხდება ბმული წყლის სტრუქტურის გაძლიერება, რაც იწვევს ენტალპიურ სტაბილიზაციას. DMSO-ს 50%-ზე უფრო მაღალი კონცენტრაციებისას იწყება DMSO-ს მოლეკულების მიერ უპირატესი სოლვატაციის უბანი, სადაც ადგილი აქვს ჯერ ცილის მოლტენ-გლობულის მდგომარეობაში გადასვლას, ხოლო შემდეგ მის დენატურაციას. მსგავსი მექანიზმი აღინიშნება ასევე სხვა ჰიდროფობული ორგანული, მაგალითად სპირტების, დანამატების პირობებში [203].

სპექტროსკოპული [204, 205] და გამოთვლითი [206] მეთოდებით მიღებული შედეგების თანახმად, DMSO-ს კონცენტრაციების 0-50%-ის პირობებში შესწავლილი ცილების

უმრავლესობა ინარჩუნებს კომპაქტურ ნატივურის მსგავს კონფორმაციას. როგორც ჩანს, DMSO-ს კონცენტრაციების ამ უბანში, გამხსნელი წყლის უპირატესი სოლვატაციის შედეგად ხდება ცილა-წყლის და ბმული წყლის წყალბადური ბმების გაძლიერება, რაც ცილის გლობულის სტაბილიზაციის ზრდაში აისახება. DMSO-ს კონცენტრაციის შემდგომი ზრდის პირობებში კი ცილა განიცდის დესტაბილიზაციას, რაც აიხსნება DMSO-ს მიერ უპირატესი სოლვატაციით წყლის მიმართ. უპირატესი სოლვატაციის ცვლილებას მოყვება თერმოდინამიკური პარამეტრების მკვეთრი შემცირება და შემდგომი გადასვლის პიკის გაქრობა 60-70% DMSO-ს პირობებში (სურ. 3.1-4.3, ცხრ. 3.2). ვინაიდან ამ შემთხვევაში უპირატესი სოლვატაციის სიდიდე დამოკიდებულია ცილის ბუნებაზე [202], შეიძლება ვივარაუდოთ, რომ DMSO-ს საკმარისად მაღალი კონცენტრაციების პირობებში იწყება ცილის ზედაპირზე ბმული წყლის მოლეკულების ჩანაცვლება DMSO-ს მოლეკულებით. რადგან DMSO-ს მოლეკულა დიდ წილად ჰიდროფობულია, ის ძირითად უკავშირდება თერმული ლლობის შედეგად ხსნარში გამოსულ ცილის ჰიდროფობულ ჯგუფებს და, ამრიგად, ასტაბილებს დენატურირებულ მდგომარეობას. ამ მოსაზრებით აიხსნება არა მხოლოდ 50%-ზე მაღალი DMSO-ს კონცენტრაციების მადესტაბილელი ეფექტი, არამედ დენატურაციის შემდგომი ცილის აღდგენის უნარის გაძლიერება მჟავე არეში.



**სურათი 3.5** თერმული დენატურაციის ენტალპიის და ტემპერატურის დამოკიდებულება ხსნარში DMSO-ს კონცენტრაციაზე pH-ის ორი სხვადასხვა მნიშვნელობის დროს (შესაბამისად, pH 2.6 და 8.1); pH 2.6-ის შემთხვევაში გადასვლის ენტალპიები ნაჩვენებია პირველი და გამეორებული სკანირების შემთხვევებში.

სავარაუდოდ, pH 2.6-ზე, რომელიც საკმაოდ დაშორებულია  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის იზოელექტრული წერტილისგან [105], ცილის აღდგენის უნარი განპირობებულია მის ზედაპირზე მყოფი უარყოფითად დამუხტული კარბოქსილის ჯგუფების უმრავლესობის განეიტრალებით, რაც იწვევს დადებითად დამუხტული ზედაპირული ჯგუფების ურთიერთგანზიდვას და, ამის შედეგად, ბმული წყლის სტრუქტურის დარღვევას და ცილის ჰიდროფობული ბირთვის გაშიშვლებას. DMSO-ს მიერ აღდგენის უნარის გაუმჯობესების ეფექტი შეიძლება აიხსნას იმით, რომ ასეთ პირობებში DMSO-ს მოლეკულები ადვილად უკავშირდებიან ხსნარში გამოსულ ჰიდროფობულ ჯგუფებს, რაც დამატებით იცავს ცილას აგრეგაციისგან. ცხადია, რომ DMSO-ს კონცენტრაციების 50–70%-ს ინტერვალში მნიშვნელოვნად იზრდება როგორც DMSO-ს იმ მოლეკულების რაოდენობა, რომლებიც უკავშირდებიან  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის ზედაპირს, ასევე ხსნარში გამოსულ ჰიდროფობულ ჯგუფებთან დაკავშირებულ DMSO-ს მოლეკულების რაოდენობა, რაც იწვევს ცილის დესტაბილიზაციას. სავარაუდოდ, pH 2.6-ზე 60% DMSO-ს, ხოლო pH 8.1-ზე 70%-ის პირობებში, ცილა შესაძლოა იყოს მთლიანად დენატურირებული ოთახის ტემპერატურაზეც კი. სუსტ ტუტეში კი, როდესაც pH ახლოსაა  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის იზოელექტრულ წერტილთან [105], ზედაპირული ჯგუფების უმრავლესობა არის დამუხტული, რაც ხელს უწყობს უფრო ძლიერი წყალბადური ბმების შექმნას, როგორც ბმული წყლის მოლეკულებს შორის, ასევე ცილის ზედაპირულ ჯგუფებსა და წყლის მოლეკულებს შორის. ვინაიდან წყალბადური ბმების გაძლიერება ხდება დენატურირებულ მდგომარეობაში მყოფი ცილის შემთხვევაშიც, ადგილი აქვს ჰიდროფობული ჯგუფების უფრო ინტენსიურ აგრეგაციას მაშინაც კი, როცა ცილა იმყოფება ხსნარში მაღალი კონცენტრაციის DMSO-ს პირობებში.

ასევე გასათვალისწინებელია, რომ როდესაც იწყება DMSO-ს მიერ დადებითი უპირატესი სოლვატაციის უბანი, ცილის გლობულა შესაძლოა იმყოფებოდეს არა სრულად დენატურირებულ, არამედ მოლტენ-გლობულის ტიპის მდგომარეობაში. DMSO-ს მაღალი კონცენტრაციების (50-70%) ასეთი ზეგავლენა ლიზოციმის კონფორმაციულ მდგომარეობაზე დამზერილი იყო რიგ სპექტროსკოპულ კვლევებში [201, 205]. მოლტენ-გლობულის ტიპის მდგომარეობებში მყოფი ცილა კომპაქტური ნატიურის მსგავსი სტრუქტურის შენარჩუნების მიუხედავად, ხდება უფრო ლაბილური, რაც გამოიხატება გადასვლის ტემპერატურის შემცირებაში [118, 119, 206]. აღსანიშნავია, რომ რიგ შემთხვევაში მოლტენ-გლობული ტიპის კონფორმაციები დაიშორება კალორიმეტრული პიკის სრული გაქრობის პირობებშიც.

სავარაუდოდ, DMSO-ს ზეგავლენის ქვეშ ცილის მოლტენ-გლობულის მდგომარეობაში გადასვლა განპირობებულია იმით, რომ DMSO-ს მოლეკულები იწყებენ ზედაპირული წყლის მოლეკულების ჩანაცვლებას, რაც არღვევს წყალბადური ბმების ბადეს და იწვევს ბმული წყლის სტრუქტურის მოშლას.

რაც შეეხება DMSO-ს მიერ ლოკალურ დესტაბილიზაციას, ანუ აქტიური ცენტრის ფლექსიბილობის გაზრდას, ის სრულიად არ ეწინააღმდეგება კალორიმეტრულ გლობულური სტაბილიზაციის სურათს. როგორც ჩანს, ისედაც საკმაოდ ლაბილური აქტიური ცენტრის დესტაბილიზაციას, რომელიც დაიმზირება DMSO-ს 0-30%-ის დანამატების თანაობისას და პოტენციომეტრულ ექსპერიმენტში აისახება მიხაელისის კონსტანტის ზრდაში, შესამჩნევი წვლილი არ შეაქვს მთლიანი გლობულის სტაბილობის დამახასიათებელ თერმოდინამიურ პარამეტრებში, რასაც ადასტურებს რიგი რენტგენოსტრუქტურული [207] და სხვა ტიპის კვლევა [105, 118, 119, 208, 209]. ამ კონცენტრაციების პირობებში აქტიური ცენტრის ფლექსიბილობა, სავარაუდოდ, არის გამოწვეული მრავალწერტილოვანი DMSO-ცილის სუსტი ურთიერთქმედებებით. ასეთი დასკვნა ეთანხმება ტიმაშევის და თანამშრომლების მიერ მიღებულ შედეგებს სხვადასხვა გლობულური ცილების შარდოვანასა [199] და DMSO-თან [202] ურთიერთქმედებების პრეფერენციულ ხასიათზე. შარდოვანას მიერ ცილების პრეფერენციული სოლვატაცია დაიმზირება მისი კონცენტრაციების მთელ ინტერვალში [199], მაშინ, როდესაც DMSO-ს პრეფერენციული სოლვატაცია უარყოფითია DMSO-ს 0-50%-ის პირობებში და ხდება დადებითი მხოლოდ მისი კონცენტრაციის შემდგომი გაზრდისას [202]. მაგრამ მიუხედავად ამისა, ეს არ ნიშნავს, რომ ყველა DMSO-ს მოლეკულა არის გამოდევნილი ცილის ზედაპირიდან წყლის მოლეკულების მიერ. ქიმოტრიპსინოგენის შემთხვევაში დადასტურებულია, რომ მცირე DMSO-ს კონცენტრაციების პირობებშიც კი ყოველთვის არსებობს DMSO-ს მოლეკულები, რომლებიც უკავშირდებიან ცილის ზედაპირს, განსაკუთრებით აქტიური ცენტრის მახლობლად განლაგებულ, როგორც პოლარულ ასევე ჰიდროფობულ საიტებზე თავისი არაცალსახა პოლარულობის გამო [206]. აქედან გამომდინარე, ტუტე გარემოში ჩატარებულ კალორიმეტრულ ექსპერიმენტში დამზერილი  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის კომპაქტური ნაწილის სტაბილიზაციის და მისი აქტიური ცენტრის დესტაბილიზაციის ფაქტები ერთმანეთს არ ეწინააღმდეგება და აიხსნება DMSO-ს მოლეკულების დუალისტური ზემოქმედებით ცილის სხვადასხვა ნაწილებზე.

### 3.2 კონფორმაციული დინამიკის გავლენა თვითაწყობად ფირებზე იმობილიზებული აზურინის მექანიზმებზე; გარემოს არაერგოდიული და არაწრფივი როლის გამოვლინებანი

ბიოლოგიურ სისტემებში ელექტრონის გადატანის პროცესები მიმდინარეობს უშუალოდ მემბრანაში ან უჯრედის შიგნით საკმაოდ ბლანტ, თითქმის მყარი მდგომარეობის, მაგრამ მოქნილი მატერიის (soft matter) პირობებში. ამიტომ ექსპერიმენტში ჩვეულებრივი თხევადი ელექტროლიტების გამოყენებისას შეუძლებელია ელექტრონის გადამტანი ცილების ბუნებრივი გარემოს ზუსტი იმიტაცია. მაგრამ რეალურთან მიახლოებული პირობების შექმნა ყოველთვის იყო დაკავშირებული ტექნიკურ სირთულეებთან, როგორცაა, მაგალითად, ბლანტი ელექტროლიტების დაბალი ელექტროგამტარობა (იონური ელექტროგამტარობის საკმარისი დონე ტექნიკურად არის აუცილებელი ყველა სახის ვოლტამპერომეტრული მეთოდის გამოყენების კუთხით), ან ძვირადღირებული დაბალტემპერატურული დანადგარების გამოყენების აუცილებლობა (რაც, ცხადია, მაინც ვერ უზრუნველყოფს ბიოგარემოს სათანადო მოდელირებას). მაგრამ აღმოჩნდა, რომ რიგ პროტონულ იონურ კრისტალებსა და მათი ლლობილებს გააჩნია იონური გამტარობა და, რაც მთავარია, კარგი ბიოთავსებადობა. ერთ-ერთი მათგანი, ქოლინ დიჰიდროგენფოსფატი ([ch][dhp]), ასევე, როგორც მისი წყალნარევი, არა მხოლოდ გადადის მინისებურ მდგომარეობაში ოთახის პირობებთან ახლოს, არამედ ასტაბილებს მასში მოთავსებულ ცილებს და უზრუნველყოფს ვოლტამპერომეტრული მეთოდის გამოყენებისთვის აუცილებელ გამტარობის დონეს [150-153].

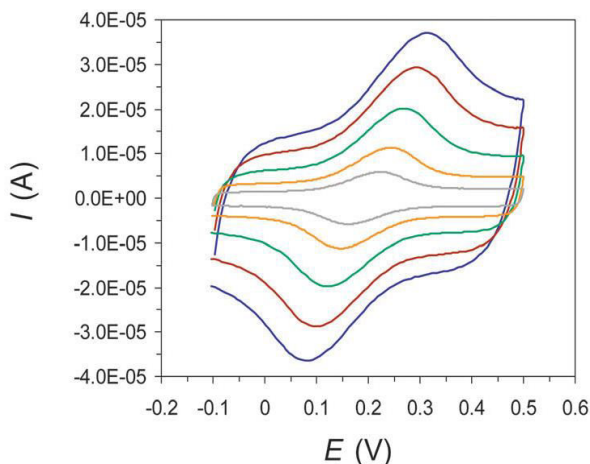
მოცემულ პარაგრაფში განხილულია ოქროს ელექტროდზე იმობილიზებული აზურინის Az მიერ ელექტრონის გადატანის მახასიათებლები იონური დანამატის, [ch][dhp]-ის ზემოქმედებით კონცენტრაციის ბუფერულ წყალხსნარებთან კონტაქტის პირობებში. ამისათვის გამოყენებული იყო მოკლე ალკანთიოლების თვითაწყობადი მონომერები (SAM-ის მეთილენის ჯგუფების რაოდენობით  $n=4$ ). შესაბამისად აწყობილ ნანოსისტემაში Au/SAM/Az (იხ. §2.1) ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტის და რეორგანიზაციის ენერჯის გამოსათვლელად გამოყენებული იყო სწრაფი სკანირების ციკლური ვოლტამეტრიის მეთოდი. გაზომვები ჩატარდა ტემპერატურის და წნევის ფართო ინტერვალში ( $2-80^{\circ}\text{C}$  და  $0.1-150\text{ MPa}$ , შესაბამისად), იონური ლლობილების 50-დან 90% წონითი კონცენტრაციების ფარგლებში, რაც შეესაბამება 2-დან 16-მდე წყლის მოლეკულის არსებობას ერთ [ch][dhp]-ს

იონურ წყვილზე [139]. მონაცემების დამუშავება ხორციელდებოდა სპეციალური კომპიუტერული ალგორითმის მეშვეობით, რომელიც წარმოადგენს ექსპერიმენტულად მიღებული მონაცემების მოდელირებას ელექტრონების ტრანსპორტის მარკუსის თეორიის თანახმად აგებულ თეორიული მრუდების საშუალებით (ანუ შესაბამისი მრუდების ზედდების მეთოდით), დეტალურად იხ. §2.4.

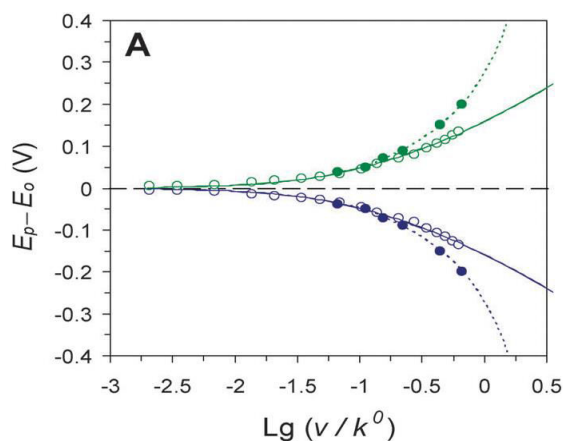
ჩვენი სამეცნიერო ჯგუფის წინმსწრებ სამუშაოში [137] დადგენილი იქნა, რომ იონური ლლობილების დანამატების გარეშე Au/SAM/Az სისტემაში ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტა და, საზოგადოდ, მექანიზმი არსებითად არის დამოკიდებული დონორსა და აქცეპტორს შორის მანძილზე, რომლის ვარირება შესაძლებელია სხვადასხვა სისქის SAM-ების გამოყენებით. მოკლე მანძილებზე ელექტრონის გადატანა ხორციელდება ადიაბატურ რეჟიმში, რომლის ფარგლებში სიჩქარის კონსტანტა არსებითად არის დამოკიდებული გარემოს (ამ შემთხვევაში ცილის გლობულის) რელაქსაციის დროზე სიჩქარის განტ. (1.11) ექსპონენტის წინა წევრის ხარჯზე [81-86]. ხოლო დიდ მანძილებზე ელექტრონის გადატანის პროცესი აღიწერება არაადიაბატური რეჟიმის ფარგლებში და სიჩქარის განტოლების (1.4) ექსპონენტის წინა წევრში შედის მხოლოდ ელექტრონული შეუღლების ენერგია [81-86]. ამ ორ რეჟიმებს შორის გადასვლის უბანი Au/SAM/Az სისტემისათვის შეესაბამება დაახლოებით 10-12 ანგსტრემის სისქის ალკანთიოლების ფირებს. აქედან გამომდინარე, თხელი ოთხი ნახშირბადის სისქის SAM-ების შემთხვევაში, რომლებიც გამოიყენება მოცემულ კვლევაში, ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონტროლი ხორციელდება გარემოს სიბლანტით, ანუ ცილის შინაგანი ძვრადობით. ამასთან ერთად ძალიან მაღალი კონცენტრაციის ბლანტი იორური სითხეების ნარევების გამოყენების გამო, რომლებიც ექსპერიმენტის ზოგ პირობებში უახლოვდებიან მინისებურ მდგომარეობას, მოსალოდნელი იყო მეტად საინტერესო ახალი ტიპის კინეტიკური გამოვლინებების აღმოჩენა.

ექსპერიმენტის სხვადასხვა პირობებში მიღებულ ციკლურ ვოლტამოგრამებზე ტემპერატურის, წნევისა და ციკლირების სიჩქარეების ფართო დიაპაზონში აღინიშნება მკვეთრად გამოხატული ფარადეის დენის შესაბამისი პიკები, რომლებიც პირველი შეხედვით არ განსხვავდება სტანდარტულ ბუფერულ ხსნარში მიღებული პიკებისაგან (სურ. 3.6). აღსანიშნავია, რომ სტანდარტულ ბუფერში ჩატარებულ ექსპერიმენტებთან შედარებით [137], ხსნარში [ch][dhp]-ის თანაობისას მეტად გაზრდილია Au/SAM/Az სისტემის მდგრადობა მაღალი ტემპერატურის, წნევისა და მრავალჯერადი ციკლირების მიმართ. [ch][dhp]-ის თანაობისას ექსტრემალური ტემპერატურისა და წნევის პირობებში ციკლირების შემდეგ ჩატარებული იყო საკონტროლო ციკლირება სტანდარტულ პირობებში (20°C და 0.1 MPa),

რომელიც მიუთითებს Au/SAM/Az სისტემის სტაბილობის შენარჩუნებაზე როგორც 80 °C-ზე, ასევე 150 MPa წნევის ქვეშ. ასეთი სურათი მოსალოდნელი იყო [ch][dhp]-ის მიერ აზურინის და სხვა ცილების სტაბილიზაციის დამადასტურებელი შრომების გათვალისწინებით [150-153].



**სურათი 3.6.** 1-პენტანთიოლების ( $n=4$ ) SAM-ზე იმობილიზებული აზურინის მიერ ელექტრონის გადატანის ტიპური ციკლური ვოლტამოგრაფია ხსნარში [ch][dhp]-ის 70% [ch][dhp] ბუფერული წყალხსნარების თანაობისას ( $pH\ 4.6$ ),  $T = 20\ ^\circ C$ ,  $P = 0.1\ MPa$ , პოტენციალის სკანირების სიჩქარე 10, 20, 40, 60 და 80  $V \cdot s^{-1}$  (პიკების ზრდის შესაბამისად).



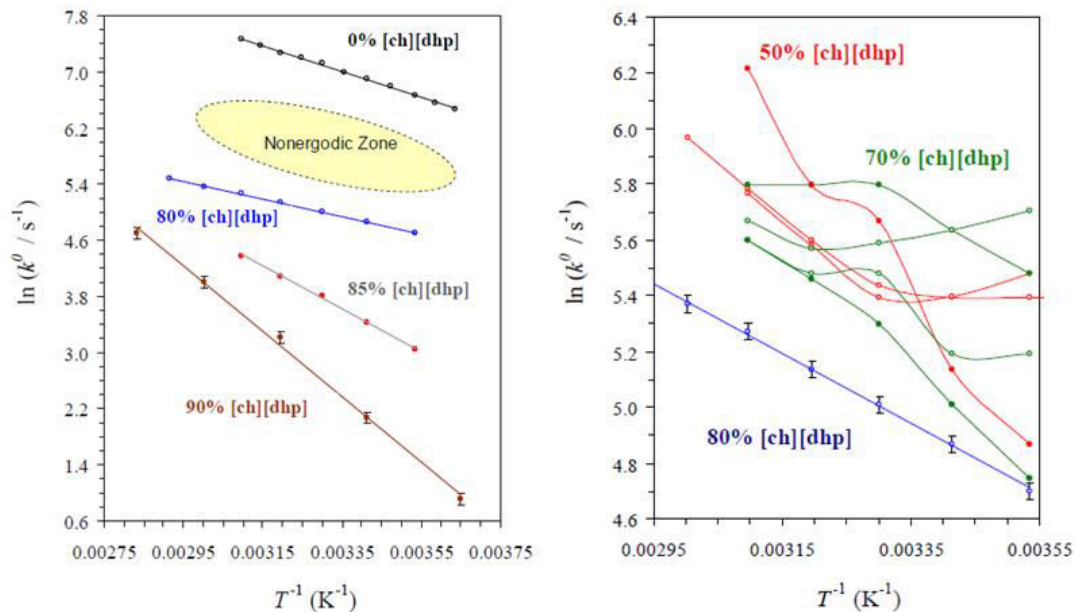
**სურათი 3.7.** პიკების მაქსიმუმების შესაბამისი პოტენციალების დამოკიდებულება სიჩქარის კონსტანტაზე (წერტილები) და მისი ფიტინგი მარკუსის თეორიულ მრუდეებზე. სრულყოფილი ფიტინგის მაგალითი (ღია სიმბოლოები): 85% [ch][dhp] ( $pH\ 4.6$ );  $T = 50\ ^\circ C$ ;  $P = 150\ MPa$  მინისებურ მდგომარეობაში გადასვლამდე.  $k^0 = 145\ s^{-1}$ ,  $\lambda = 0.3\ eV$ . არასრულყოფილი ფიტინგის მაგალითი (შევსებული სიმბოლოები): მინისებურ მდგომარეობაში გადასვლის შემდეგ.  $k^0 = 4.5\ s^{-1}$ ,  $\lambda = 0.3\ eV$  (0.1V-მდე გადაძაბვის ინტერვალში).

მაგრამ მიუხედავად Au/SAM/Az სისტემის მეტად გაზრდილი მდგრადობისა, გარკვეულ პირობებში ადგილი აქვს სიჩქარის კონსტანტის განსაკუთრებულ ქცევას. მაღალი წნევის, დაბალი ტემპერატურების და [ch][dhp]-ის გარკვეული კონცენტრაციების პირობებში ამ პიკებიდან მიღებული ექსპერიმენტული წერტილების ნაწილი არ ჯდება არც ერთ თეორიულ მრუდზე მათი ზედდების დროს (სურ. 3.7 შევსებული სიმბოლოები). ამასთან ერთად, იონური ლლობილების გარკვეული კონცენტრაციების თანაობისას დაბალი წნევის ან საკმაოდ მაღალი ტემპერატურის პირობებში სისტემა იქცევა ნორმალურად და ყველა ექსპერიმენტული წერტილი აღიწერება მარკუსის თეორიის ფარგლებში (სურ. 3.7 ღია სიმბოლოები).

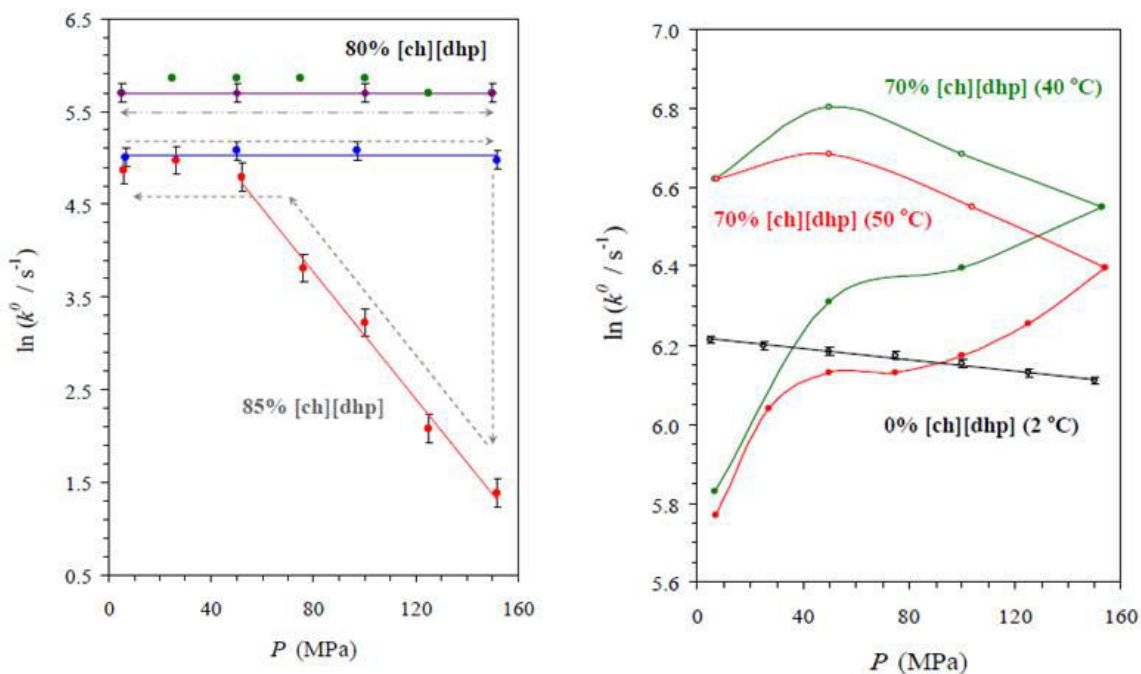
გარდა ამისა მაღალი ტემპერატურის და წნევის შემთხვევაში, იონური ლლობილის 50-70% ფარგლებში დარღვეულია როგორც კონსტანტის ტემპერატურაზე და წნევაზე დამოკიდებულება, ასევე მისი გამეორებადობა და შექცევადობა (სურ. 3.8 და 3.9). გარდა ამისა, ადგილი აქვს ჰისტერეზისის მოვლენას ტემპერატურის და წნევის ცვლილების მიმართ. მაგრამ, ამასთან ერთად, [ch][dhp]-ის გარკვეული კონცენტრაციის შემთხვევაში დაბალი წნევის ან/და საშუალო ტემპერატურის პირობებში (სურ. 3.7), Au/SAM/Az სისტემის მიერ ელექტრონის გადატანის პროცესი ისევ აღიწერება მარკუსის თეორიის ფარგლებში. ანუ, სიჩქარის კონსტანტის ტემპერატურაზე და წნევაზე დამოკიდებულება ბუფერში მიღებული ექსპერიმენტული შედეგების ანალოგიურია [137].

ასეთი შედეგები არ აღიწერება “კლასიკური“ (მაგალითად, მარკუსის) მოდელების ფარგლებში, მაგრამ შეიძლება აიხსნას მოქნილი მატერიის ფიზიკის (soft matter physics) თანამედროვე წარმოდგენებზე დაყრდნობით [210]. ამ ექსპერიმენტულ სერიებში ბლანტი, რიგ შემთხვევაში მინისებურ მდგომარეობაში მყოფი გამხსნელის გამო ადგილი აქვს სისტემის ერგოდიულობის დარღვევას. ანუ, ელექტრონის გადატანის მახასიათებელი დრო და გარემოს თავისუფლების ხარისხების მახასიათებელ დროთა სიმრავლე განიცდიან მრავალჯერადი თანხვედრისა და გამიჯვნის ხდომილებებს. ამათგან ზოგიერთ სიტუაციაში გარემოს რელაქსაციები შეიძლება „გაიყინოს“ ელექტრონის გადატანის პროცესის მიმართ. ეს ნიშნავს, რომ მათი წვლილი ელექტრონის გადატანის მახასიათებელ პარამეტრებში შესაძლოა თანდათან ან ნახტომისებურად გამოირიცხოს. ამ დროთა თანხვედრის შედარებით ვიწრო ინტერვალებში სისტემებისთვის დამახასიათებელია განსაკუთრებით არასტაბილური ქცევა, რაც გამოიხატება ჰისტერეზისის ეფექტში ტემპერატურასა და წნევის ცვლილების მიმართ და ზემოდ აღწერილ ექსპერიმენტული მონაცემების აცდენას თეორიული მრუდებიდან [166, 210, 211].





სურათი 3.8 Au/SAM/Az სისტემის მიერ ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტის ლოგარიტმის დამოკიდებულება ტემპერატურაზე [ch][dhp] 0, 80 და 90 წონითი % ბუფერულ წყალხსნარებში (pH4.6). (ა) წრფივი და (ბ) ანომალური დამოკიდებულება 50 და 70% [ch][dhp] ხსნარებში.



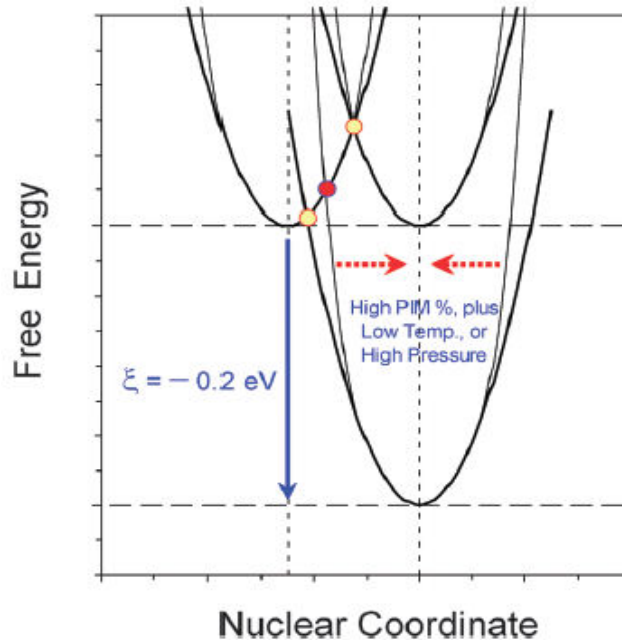
სურათი 3.9 Au/SAM/Az სისტემის მიერ ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტის წნევაზე დამოკიდებულება [ch][dhp] 80 და 85 წონითი % ბუფერულ წყალხსნარებში (pH 4.6) ანომალური დამოკიდებულება 50, 70 და 80% ხსნარებში, T=50 °C.

სისტემის ერგოდულობის დარღვევას, ერთი მხრივ, გამოწვეულია იმით, რომ ექსპერიმენტში გამოყენებული მოკლე SAM-ის შემთხვევაში ( $n=4$ ) ელექტრონის გადატანა ხორციელდება ადიაბატურ რეჟიმში და მისი სიჩქარე უშუალოდ არის დამოკიდებული გარემოს რელაქსაციის დროზე. ანუ, მრავალი წელი თავისუფლების ხარისხი ახდენს უშუალო გავლენას სიჩქარის კონსტანტაზე ექსპონენტის წინა წევრის ხარჯზე [164, 140]. გარდა ამისა ბლანტი მინისებური გამხსნელი ზრდის წელი თავისუფლების ხარისხებს წვლილს ჯამურ რეორგანიზაციის ენერჯიაში ლი. აღსანიშნავია, რომ წელი თავისუფლების ხარისხები შეიძლება ეკუთვნოდეს როგორც მეტალის იონის პირველ საკოორდინაციო სფეროს, ასევე ცილის გლობულას, თვითონ გამხსნელს ან SAM-ს [67, 140, 163] და იყოს კოოპერატიული, დისიპატიური და ნაწილობრივ მაინც არაჰარმონიული. სწრაფი თავისუფლების ხარისხები კი, პირიქით, დამოუკიდებელი და ჰარმონიულია [69, 86, 96, 210].

მეორე ტიპის ანომალია აისახება რიგ ექსპერიმენტულ პირობებში მარკუსის თეორიით განსაზღვრულ სიჩქარის კონსტანტის ტემპერატურასა და წნევაზე დამოკიდებულების დარღვევაში. მაგალითად, წნევის ვარირებისას 85% [ch][dhp]-ის შემცველი კომპოზიტიური სისტემა ( $T=50^{\circ}\text{C}$ ) განიცდის ნახტომისებურ გადასვლას (სურ. 3.7), რომელიც, სავარაუდოდ, დაკავშირებულია მინისებურ მდგომარეობაში გადასვლასთან. ხსნარში 90% [ch][dhp]-ის შემცველი ნიმუშის ტემპერატურის ვარირებისას კი ზემოდ ხსენებული შემთხვევისგან განსხვავებით გადასვლა ხდება თანდათან, მკვეთრი ცვლილებების გარეშე. ორივე შემთხვევაში გადასვლამდე მიღებული ექსპერიმენტული მონაცემები საკმაოდ კარგად ჯდება მარკუსის თეორიის თანახმად აგებულ ფიტინგის მრუდებზე და შეესაბამება რეორგანიზაციის მნიშვნელობას  $\lambda_0 = 0.3 \text{ eV}$ .

ამავე დროს, შედარებით უფრო ექსტრემალურ პირობებში ([ch][dhp]-ის ზემადალი კონცენტრაციები პლუს მაღალი წნევა ან დაბალი ტემპერატურა) თეორიულ მრუდებზე ჯდება მხოლოდ ექსპერიმენტული წერტილების მცირე ნაწილი, ხოლო მთელი რიგი დანარჩენი წერტილებისა არ ემთხვევა მარკუსის თეორიის მიხედვით აგებულ მრუდს (მარკუსის თეორია გულისხმობს ენერგეტიკული ზედაპირების პარაბოლურ ფორმას, ანუ მორეაგირე გარემოს პოლარიზაციის წრფივ “გამომახილს“). სავარაუდოდ, ამ ტიპის ანომალია აიხსნება იმით, რომ ზემოდ მოცემულ პირობებში მყოფი სისტემის თავისუფალი ენერჯია აღარ აღიწერება პარაბოლური ზედაპირით, ანუ ირღვევა გარემოს წრფივი პოლარიზაცია. თუმცა, როგორც ჩანს, მნიშვნელოვანი გადახრები ხდება ენერგეტიკული ზედაპირის ზედა ნაწილებში (პარაბოლურ თერმების “ფრთების“ უბნებში), ხოლო მათი მინიმუმების უბნები

პირველ მიახლოებაში ინარჩუნებენ პარაბოლურ ფორმას. დეფორმირებული ენერგეტიკული პროფილები სქემატურადაა მოცემული სურათზე 3.10.



*სურათი 3.10 Au/SAM/Az სისტემის მიერ ელექტრონის გადატანის პროცესის ენერგეტიკული პროფილის სქემატური შედარება მარკუსის თეორიულ (ჰარმონიულ) პოტენციალთან.*

ვინაიდან გარემოს წრფივი პოლარიზაცია არის ერთ-ერთი პოსტულატი, რომელიც დევს მარკუსის თეორიის საფუძველში [78-80], მისი დარღვევის შემთხვევაში მოსალოდნელია მსგავსი ანომალიების დამზერა. ელექტროდზე მოდებული პოტენციალის სკანირების დაბალი სიჩქარეების პირობებში სარეაქციო სისტემა იმყოფება თავისუფალი ენერჯის ზედაპირების მინიმუმებთან ახლოს, ხოლო პოტენციალის სკანირების სიჩქარის მატებასთან ერთად (პოტენციალის ე.წ. მაღალი გადაძაბვების პირობებში) სისტემა სულ უფრო შორდება თავისუფალი ენერჯის ზედაპირის მინიმუმის არეს, და გადის არაპარაბოლურ უბნებზე, რომლებიც, სავარაუდოდ, ბევრად უფრო ციცაბოა პარაბოლურ მრუდებთან შედარებით. ცხადია, რომ ანომალურ სერიებში გამოთვლილი სიჩქარის კონსტანტების და რეორგანიზაციის ენერჯიების მნიშვნელობები არის მხოლოდ ემპირიული და არა სიდიდეები “აბსოლუტური” სიდიდეები (ცხრ. 3.3). ვინაიდან ჯერჯერობით არ არსებობს სრულყოფილი თეორიული მოდელი, რომელიც რაოდენობრივად აღიწერს ელექტრონის გადატანის პროცესს ნებისმიერი ფორმის ენერგეტიკული ზედაპირების პირობებში, ჩვენ ვიყენებთ

მხოლოდ თვისობრივ, ან ნახევრად რაოდენობრივ წარმოდგენებს, მაგრამ ჩვენი შედეგები თანხვედრაშია ყველაზე თანამედროვე თეორიულ წარმოდგენებთან, რომლებსაც ანვითარებენ დ. მათიუშოვი და მისი თანაავტორები აშშ ქ. არიზონის უნივერსიტეტიდან [165, 211]. ახლო მომავალში შესაძლოა განხორციელდეს ჩვენი თანამშრომლობა ჩვენი ექსპერიმენტული მონაცემების ზუსტი რაოდენობრივი აღწერის თვალსაზრისით, აშშ-ში არსებული ზემდლავრი კომპიუტერული ტექნიკის გამოყენების გზით.

**ცხრილი 3.3.** Au/SAM/Az სისტემის მიერ ელექტრონის გადატანის პროცესის კინეტიკური და აქტივაციური პარამეტრები [ch][dhp]-ს სხვადასხვა კონცენტრაციების პირობებში და მის გარეშე (აცეტატის ბუფერი, pH4.6).

[ch][dhp] %, w/w	H <sub>2</sub> O / [ch][dhp]	k <sup>0</sup> , s <sup>-1</sup> *	λ <sub>0</sub> (λ <sub>eff</sub> ), eV	τ <sub>eff</sub> , s	ΔH <sub>a</sub> , kJ · mol <sup>-1</sup>	ΔV <sub>a</sub> , cm <sup>3</sup> · mol <sup>-1</sup>
0	-	1000±100	0.3±0.03	3.2 · 10 <sup>-5</sup>	15.4±2	+1.7±0.3
70	6.25±1.25	≈270	≈0.3	1.2 · 10 <sup>-4</sup>	-	-
80	3.70±0.70	110±20	0.3±0.03	3.0 · 10 <sup>-3</sup>	10.5±2	≈0
85	2.55±0.50	31±5	0.3±0.03	1.0 · 10 <sup>-3</sup>	25.4±3	≈0**
90	1.65±0.35	8±2	0.3±0.03	4.0 · 10 <sup>-3</sup>	40.2±5	-

\* - T = 20 °C, P = 0.1MPa

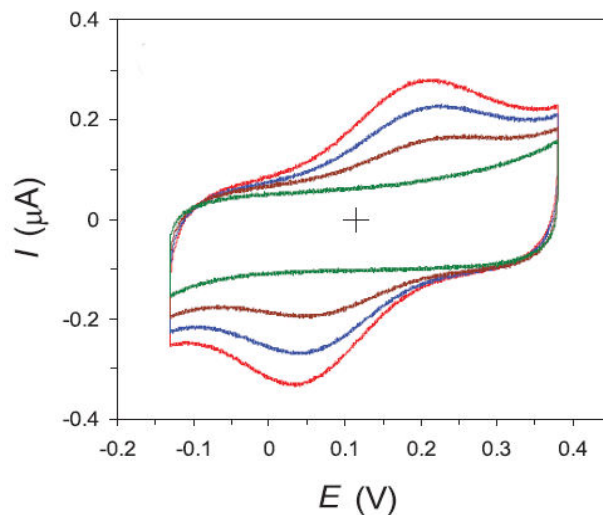
\*\* - (ანომალია 150 MPa)

### 3.3 L-ცისტეინით მოდიფიცირებული ელექტროდების გამოყენება სპილენძის იონების ( $\text{Cu}^{2+}$ ) იმობილიზაციისა და შესაბამისი მოდელური (ბიომიმეტიკური) ელექტრო-მიმოცვლის პროცესის შესწავლის მიზნით

ბიომოლეკულური პროცესების პრინციპული სირთულის გამო მათი ფიზიკური მექანიზმების ახსნა საკმაოდ რთულია და ხშირ შემთხვევაში მიზანშეწონილია გამარტივებული მოდელების შესწავლა. ცოცხალ უჯრედში ელექტრონის გადატანის პროცესის მექანიზმის შესასწავლად ექსპერიმენტში გამოიყენება როგორც ინტაქტური ცილები, ასევე უფრო მარტივი აგებულების ბიოქიმიური ნაერთები (ფრაგმენტები), რომლების შეიცავენ იგივე მეტალის იონს თუ აქტიურ ჯგუფს. გარდა ამისა, თანამედროვე შეხედულებებიდან გამომდინარე, ბიოლოგიურ პროცესებში ატომურ დონეზე მეტად მნიშვნელოვანი როლი ენიჭება სარეაქციო გარემოს თვისებებს. ცხადია, რომ რაც უფრო მარტივია მოდელური სისტემა ან ექსპერიმენტული გარემო, მით უფრო ნაკლებად ვრცელი, მაგრამ უფრო ზუსტი ინფორმაციის მოძიებაა შესაძლებელი. ფლექსიბილური აქტიური ცენტრის მქონე ელექტრონის გადამტანი ცილების მოდელირებისას დიდი მნიშვნელობა ენიჭება მეტალის იონის პირველ საკოორდინაციო სფეროს, რომლის მოდელირება შესაძლებელია გარემოს გარკვეული თვისებების შერჩევით (მაგალითად, გამხსნელის მაღალი სიბლანტე ან სათანადოდ შერჩეული რედოქს-აქტიური მეტალის იონის მაკოორდინირებელი SAM-ი).

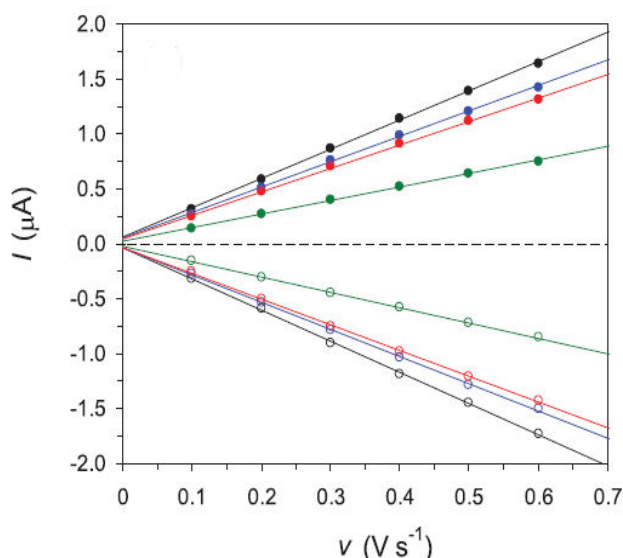
მოცემულ ნაწილში განხილული იქნება აზურინის ტიპის სპილენძის იონის შემცველ ცილებში ელექტრონის ტრანსპორტის (მიმოცვლის) მექანიზმების შესწავლის თვალსაზრისით ხელსაყრელი მოდელური სისტემის დეტალური კვლევის შედეგები. ეს ნანომასშტაბური კვაზი ორგანოზომილებიანი სისტემა წარმოადგენს უშუალოდ L-ცისტეინის თვითაწყობად ფირში (L-Cys SAM) ჩაჭერილ სპილენძის იონებს,  $\text{Cu}^{2+}$ . სწრაფი სკანირების ციკლური ვოლტამპერომეტრიის მეთოდის გამოყენებით შესწავლილი იყო ამ სისტემის მიერ ელექტრონის გადატანის კინეტიკური პარამეტრები და მათი დამოკიდებულება ტემპერატურასა და წნევაზე სხვადასხვა pH-ის პირობებში. სპილენძის იონების ჩაჭერა წინასწარ მომზადებულ SAM-ში ხდება სპონტანურად, დამატებითი მანიპულაციების გარეშე და საკმარისია სპილენძის ხსნარში არსებობა თუნდაც მინარევის სახით [212, 213], მაგრამ სიგნალის მიღება მოითხოვს საშუალოდ ერთ საათამდე დროს (იხ. ქვევით). სურ. 3.11-ზე ნაჩვენებია სიგნალის ინტენსივობის მატება 15 წუთიანი ინტერვალით, “გაჯერებული“

ინტენსივობის პიკის მიღებამდე, რაც ზოგადად დამახასიათებელია ზედაპირზე ადსორბირებული რედოქს ცენტრებისათვის [184,186]. ამ გარემოებების გამო ლიტერატურაში მოიძებნება რიგი სამუშაოები, რომლებშიც მიღებული ვოლტამპერომეტრული სიგნალი იყო მიჩნეული SAM-ზე ადსორბირებული სპილენძის იონების, კერძოდ კი  $\text{Cu}^{2+}/\text{Cu}^+$  იონური წყვილის მონაწილეობით მიმდინარე ელექტრონების მიმოცვლის ე.წ. ფარადეის დენის სიგნალად [214]. ვოლტამპერომეტრული სიგნალის წყაროს შესახებ აღნიშნული მოსაზრების დასადასტურებლად მოცემული სამუშაოს ფარგლებში ჩატარებული იყო დამატებითი ექსპერიმენტული სერია ზესუფთა,  $\text{Cu}^{2+}$  იონებისგან თავისუფალი რეაქტივების გამოყენებით, რომელშიც ფარადეის დენი არ დაფიქსირდა, რაც ადასრურებს, რომ დენის წყარო არის  $\text{Cu}^{2+}$  და არა L-ცისტეინი.

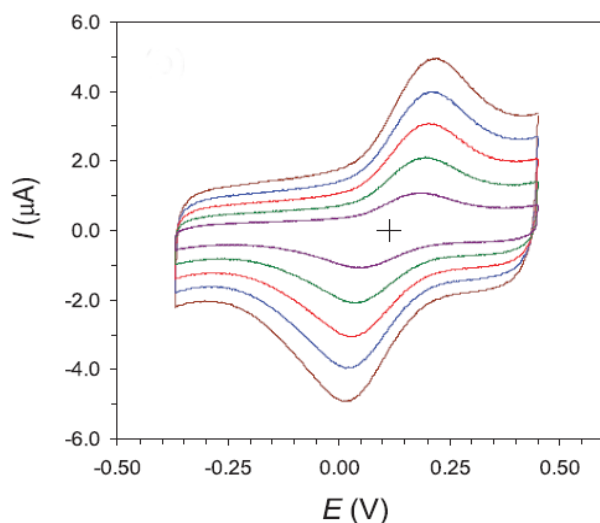


**სურათი 3.11.** სიგნალის ინტენსივობის მომატება დროში სკანირების დაწყებიდან 0, 15, 30 და 45 წუთის შემდეგ. სკანირების სიჩქარე  $0.1 \text{ V s}^{-1}$ ,  $0.1 \text{ M PBS}$ ,  $\text{pH } 6.4$ ,  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

L-ცისტეინის SAM-ებზე ადსორბირებული (ჩაჭერილი)  $\text{Cu}^{2+}$  იონების მიერ ერთ-საათიანი ციკლირების განმავლობაში მიღებული ელექტრონის მიმოცვლის მზარდი ინტენსივობის ვოლტამპერული მრუდები მოცემულია სურ. 3.12-ზე, ხოლო სურ. 3.13-ზე მოცემულია სიგნალის „გაჯერების“ შემდგომ გადაღებული პიკების დენის დამოკიდებულება სკანირების სიჩქარეზე სხვადასხვა pH-ის პირობებში. დამოკიდებულების ასეთი ტიპი კიდევ ერთხელ ადასტურებს, რომ სიგნალი მიიღება ელექტროდზე ადსორბირებული რედოქს-ცენტრებისაგან [184, 186].



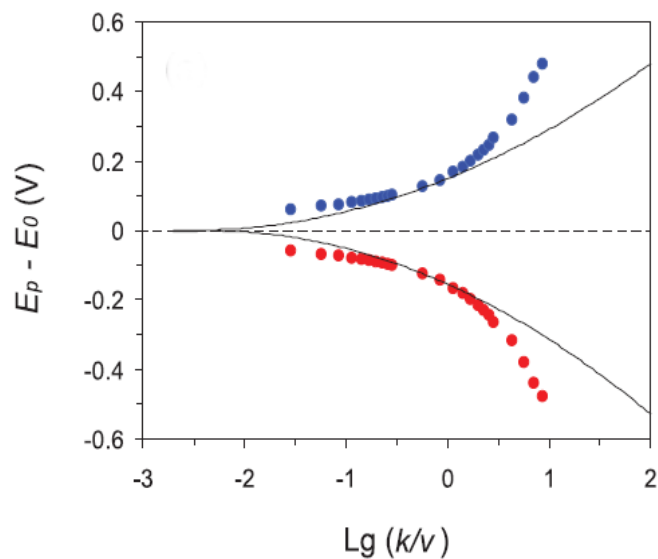
**სურათი 3.12** Au/Cys SAM/Cu სისტემის მიერ ელექტრონის მიმოცვლის შესაბამისი პიკის დენის დამოკიდებულება სკანირების სიჩქარეზე სხვადასხვა pH-ის პირობებში. 0.1 M PBS, pH 6.5, 6.9, 7.3 და 7.7, T = 20 °C.



**სურათი 3.13** Au/Cys SAM/Cu სისტემის მიერ ელექტრონის გადატანის პროცესის ტიპური ვოლტამოგრამა. სკანირების სიჩქარეები 0.1 – 1 V·s<sup>-1</sup> (0.1 M PBS, pH 5.7).

მიღებული ვოლტამპერული მრუდების (სურ. 3.13) პროგრამული დამუშავებით გამოთვლილი იყო ელექტრონის გადატანის სტანდარტული სიჩქარის კონსტანტის ეფექტური მნიშვნელობები გარემოს pH-ის სხვადასხვა მნიშვნელობების შემთხვევაში, ხოლო შემდგომ, ექსპერიმენტული მონაცემების თეორიულ მრუდებთან შედარების პროცედურის გამოყენებით, გამოთვლილი იყო გიბსის რეორგანიზაციის ენერჯის ეფექტური მნიშვნელობები (იხ. §2.2 და 3.2) [137-140]. მიუხედავად იმისა, რომ ვოლტამპერომეტრულ

მრუდებს არ ეტყობა არანაირი გადახრები (სურ. 3.13), პიკების გაგანიერების სიდიდეების მონაცემების შესაბამის თეორიულ მრუდებთან შედარების დროს ვერ ხერხდება მიღებული ექსპერიმენტული წერტილებთან დამთხვევა რომელიმე ერთი რეორგანიზაციის ენერჯის შესაბამის მრუდზე (სურ. 3.14). მსგავსი ქცევა მიუთითებს იმაზე, რომ შესწავლილი Au/Cys SAM/Cu<sup>2+</sup>, მსგავსად აზურინის შემცველი სისტემისა, ვერ აკმაყოფილებს მარკუსის თეორიის ძირითად დაშვებას (ენერგეტიკული თერმების პარაბოლური ფორმა), რომლებზე დაყრდნობით შედგენილია თეორიული მრუდები. პირველ რიგში, როგორც უკვე იყო ზევით განხილული, ამის მიზეზი შეიძლება იყოს გარემოს პოლარიზაციის არაწრფივი “გამოზახილი“, ანუ ელექტრონის გადატანის პროცესის ენერგეტიკული პროფილის ფორმის გადახრა პარაბოლურისაგან. მეორე მნიშვნელოვანი მომენტი მდგომარეობს იმაში, რომ ელექტრონის გადატანასთან შეუღლებული თავისუფლების ხარისხების ბუნება შესაძლოა არ იყოს ელასტიური (კვაზიელასტიური) და, რაც მთავარია, ეს თავისუფლების ხარისხები შეიძლება იყოს უფრო ნელი, ვიდრე შესასწავლი ელექტრონის გადატანის პროცესი.



**სურათი 3.14.** მიღებული მონაცემების შესაბამის თეორიულ მრუდებთან შედარების  $k = 3.5 \text{ s}^{-1}$ ,  $\lambda = 0.6 \text{ eV}$  სკანირების სიჩქარე  $0.1\text{--}60 \text{ V s}^{-1}$ ,  $0.1 \text{ M PBS}$ ,  $\text{pH } 5.7$ ,  $T = 20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

მიღებული ექსპერიმენტული წერტილები ფიტინგის თვალსაზრისით შეიძლება პირობითად დაიყოს სამ ნაწილად. ელექტროდული პოტენციალის დაბალი გადაძაბვის უბანში, სადაც თეორიის თანახმად ანოდურსა და კათოდურ პიკებს შორის მანძილი უნდა მისწრაფოს ნულისკენ, ადგილი აქვს საკმაოდ დიდ დაშორებას (სურ. 3.14). ეს დამახასიათებელია



ელექტროდის ზედაპირზე ადსორბირებული პატარა ზომის რედოქს-ცენტრებისთვის, ვინაიდან ელექტრონის მიმოცვლას მოყვება საპირისპირო მუხტის მიმოცვლა ჯამური ელექტრო-ნეიტრალობის შესანარჩუნებლად [184]. შუალედური უბნის წერტილები კარგად აღიწერება რომელიმე რეორგანიზაციის ენერჯის შესაბამისი თეორიული მრუდით და მხოლოდ ამ უბნის ფიტინგით არის შესაძლებელი ექსპერიმენტში ეფექტური სიჩქარის კონსტანტის და რეორგანიზაციის ენერჯის განსაზღვრა. მაღალი გადაძაბვის უბანში პიკებს შორის მანძილი იზრდება იმდენად სწრაფად, რომ შესაბამისი წერტილები არ ჯდება არც ერთ თეორიულ მრუდზე. ექსპერიმენტული წერტილების ასეთი განლაგება ხშირად მიიღება ე.წ. ომური ვარდნის დროს, რომლის გამორიცხვა და მონაცემების გადათვლა სირთულეს არ წარმოადგენს [140]. გარდა ამისა, მსგავსი სურათი ხშირად მიიღება ზედაპირზე ადსორბირებული ჟანგვა-აღდგენითი ცილების შესწავლის დროს და მთლიანად აიხსნება პარაბოლური ენერგეტიკური ზედაპირების დეფორმაციით მაღალი ენერჯების უბანში ნელი კონფორმაციული თავისუფლების ხარისხების წვლილის გაზრდის გამო [140].

განხილული Au/CysSAM/Cu სისტემის შემთხვევაში ელექტრონის გადატანა ხორციელდება ადიაბატურ რეჟიმში, ვინაიდან რედოქს-აქტიური სპილენძის იონი ჩაჭერილია L-ცისტეინის თხელ მონომრეზე, ანუ ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტა მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული გარემოს რეორგანიზაციის ენერჯიაზე წინა ექსპონენტური წევრის ხარჯზე. ფიტინგის პროცედურა, რომელიც კარგად მუშაობს წყალხსნარში მოთავსებულ მცირე ზომის არაორგანული ნაერთების შემთხვევაში, Au/CysSAM/Cu სისტემისათვის არ არის იდეალურად თავსებადი ვინაიდან ამ შემთხვევაში იზრდება ნელი არაჰარმონიული თავისუფლების ხარისხების წვლილი გარემოს მხრიდან [140, 85, 86]. პირველ რიგში, თვითონ მონომრე, რომელშიც ჩაჭერილია რედოქს-ცენტრი, არის მინის მაგვარი ბუნების მქონე გარემო და, ელექტრონის გადატანის მექანიზმის ადიაბატური ბუნების გათვალისწინებით, მისი ნელი რელაქსაციის უნარი აუცილებლად შეიტანს წვლილს ელექტრონის გადატანაში [139, 140]. გარდა ამისა, SAM-ის მოწესრიგებული სტრუქტურისა და დამუხტული ზედაპირის გამო მოსალოდნელია, რომ გამხსნელის გარკვეული ფენა განსხვავებით თავისუფალი ხსნარისაგან იყოს მეტად მოწესრიგებული წყალბადური ბმების გაძლიერების ხარჯზე [215-216].

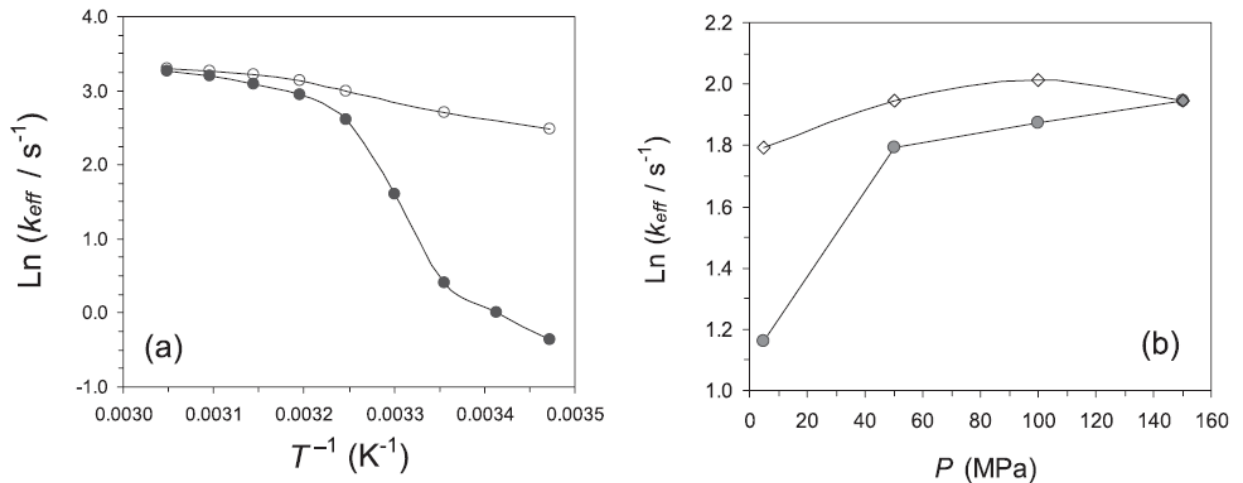
ყოველივე ამის გათვალისწინებით შეიძლება ითქვას, რომ წყალხსნართან შედარებით ნელი არაჰარმონიული თავისუფლების ხარისხების წვლილის გაზრდის გამო, შესწავლილ სისტემაში ადგილი აქვს ბიომოლეკულების შემთხვევასთან ანალოგიური თავისუფალი ენერჯის ზედაპირის ფორმის გადახრას პარაბოლურისაგან (სურ. 3.10). მისი ზუსტი რაოდენობრივი შეფასება სავსებით შესაძლებელია სხვა დამატებითი მეთოდების

გამოყენებით [217], მაგრამ ძალიან რთულია მხოლოდ ვოლტამპერომეტრული მეთოდის გამოყენებით, ვინაიდან არ არსებობს ჩამოყალიბებული თეორიული ბაზა, რომლის საფუძველზე შესაძლებელი იქნება ექსპერიმენტული მონაცემების დამუშავება არაწრფივი და არაერგოდული მოვლენების გათვალისწინებით [139, 165]. მაგრამ სურ. 3.14-ის მონაცემებიდან შესაძლებელია თვისობრივი შეფასების გაკეთება: სავარაუდოდ, მოცემულ შემთხვევაში თავისუფალი ენეგის ზედაპირი უნდა იყოს უფრო გაშლილი და განიერი მაღალი ენერგიების ნაწილში, თუმცა მინიმუმის მახლობლად საკმაოდ კლასიკურის მსგავსი.

ბოლო წლებში გამოქვეყნებულ მათემატიკის თეორიულ სამუშაოებში ნაჩვენებია, რომ გარემოს არაწრფივობა პრინციპულად უნდა იყოს დაკავშირებული სისტემის არაერგოდულ ქცევასთან, რაც განსაკუთრებით მკაფიოდ ვლინდება თუ საქმე გვაქვს ელექტრონის გადატანასთან მოკლე მანძილზე, ანუ ადიაბატურ რეჟიმთან [165, 217]. ნამდვილად, ადიაბატურ რეჟიმში ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტა მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული ნელ თავისუფლების ხარისხებზე, რადგან გარდა რელაქსაციის ენერჯისა  $\lambda$ , წინა ექსპონენტურ წევრში შედის გარემოს რელაქსაციის დროც  $\tau_{\text{eff}}$  [84, 140, 191, 194]. ხოლო არაწრფივი გარემო, რომელიც ხშირად გვხვდება ბლანტ იონურ სითხეებში, თხევად კრისტალებში ან მოქნილი მატერიის ფიზიკის სხვა ობიექტებში, ხასიათდება მრავალი ნელი თავისუფლების ხარისხით და გარკვეულ პირობებში ამას მოყვება სისტემის მინისებური ქცევა, ანუ თუ რიგ ექსპერიმენტულ პირობებში მოხდა სისტემის დამატებითი შეზღუდვა, ზოგიერთი ნელი თავისუფლების ხარისხი შეიძლება მოულოდნელად „გაიყინოს“ ან გააქტიურდეს [165, 217].

Au/Cys SAM/Cu სისტემის არაერგოდულობის შეფასებისათვის შესწავლილი იყო ელექტრონის გადატანის მახასიათებელი პარამეტრების დამოკიდებულება სხვადასხვა ტემპერატურასა და წნევაზე, რაც გვამძლევეს საშუალებას რომ უშუალოდ ვცვალოთ გარემოს მახასიათებელი სიხშირე  $\nu_{\text{eff}}$  და, შესაბამისად, რელაქსაციის დროც  $\tau_{\text{eff}}$ . თოთო ტიპური დამოკიდებულება მოცემულია სურათზე 3.15, სადაც სავსე სიმბოლოებით აღნიშნულია ტემპერატურის ან მაღალი წნევის თანმიმდევრული გაზრდის რეჟიმში მიღებული მონაცემები, ხოლო ღია სიმბოლოებით იგივე ინტერვალით უკან დაბრუნება. მიღებული მრუდები კლასიკურ შემთხვევისგან განსხვავებით არ არის არც წრფივი და არც გამეორებადი, გარდა ამისა, ადგილი აქვს ჰისტერეზისის მოვლენას, ანუ სისტემა ერთი ექსპერიმენტული პირობებიდან მეორეში გადაყვანის შემდეგ ვერ ასწრებს ახალი წონასწორობის დამყარებას. მსგავსი ქცევა ზოგადად დამახასიათებელია არაერგოდული სისტემებისათვის [139, 211, 217]. თეორიის თანახმად, ელექტრონის გადასვლის პროცესი არის არაერგოდული იმ

შემთხვევაში, თუ ელექტრონის გადატანის მახასიათებელი დრო და სისტემის წონასწორობის დამყარების დრო არის დაახლოებით ერთი რიგის [139, 165, 217]. ასეთ შემთხვევაში კი ირღვევა მარკუსის თეორიის ძირითადი მოთხოვნა [194], რაც ვლინდება ექსპერიმენტში მიღებულ არენიუსის დამოკიდებულების დარღვევაში კინეტიკური ჰისტერეზისის ეფექტის გამო [139]. მიუხედავად მარკუსის თეორიის დარღვევისა, მსგავსი ქცევა არ ეწინააღმდეგება მოქნილი მატერიის ფიზიკის კანონებს [41-47] და რაც უფრო მეტი წელი თავისუფლების ხარისხი გააჩნია სისტემას, მით უფრო ძლიერია ენერგეტიკული პროფილის პარაბოლურისაგან გადახრა და უფრო დიდია არაერგოდული ქცევის ალბათობა [139].



**სურათი 7.** Au/Cys/Cu სისტემის მიერ ელექტრონის გადატანის სიჩქარის კონსტანტის ტემპერატურასა და წნევაზე დამოკიდებულება. ღია სიმბოლოებით აღნიშნულია შესაბამისად ტემპერატურის და წნევის გაზრდა, შეფერილი სიმბოლოებით კი უკუსვლა.

#### თავი 4. პირითადი შედეგები

1. დინამიკური პოტენციომეტრიის მეთოდის გამოყენებით შესწავლილი იყო დუალისტური ზემოქმედების მქონე ორგანული ნაერთის, დიმეთილსულფოქსიდის (DMSO), დანამატების გავლენა  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის ფერმენტულ (ჰიდროლიზურ-კატალიზურ) აქტივობაზე; ხოლო დიფერენციული მასკანირებელი კალორიმეტრიის მეთოდის გამოყენებით შესწავლილი იყო იმავე სახის და რაოდენობის დანამატების გავლენა  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის თერმოდინამიკურ სტაბილობაზე, მოცემული ცილის თერმული დენატურაციის მიმართ. პირველად მოხდა დასახელებული ორი მეთოდის ერთობლივი გამოყენება ცილის სტაბილობასა და ფუნქციას შორის ურთიერთ კავშირის ახალი დეტალების გამოსავლენად.

2. დინამიკური პოტენციომეტრიის მეთოდით განხორციელებულმა ფერმენტული ჰიდროლიზის კინეტიკურმა კვლევებმა აჩვენა, რომ  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის ფუნქციური აქტივობა შენარჩუნებული იყო ხსნარებში DMSO-ს მოცულობითი კონცენტრაციის 0-დან 60%-მდე ვარირების პირობებში; ამასთან, კატალიზური კონსტანტის მვეთრი კლება შეინიშნება მხოლოდ 30%-იანი ხსნარის შემთხვევაში, 60%-მდე ფარგლებში, ხოლო 70% პირობებში აღარ დაიშინება. ამავე დროს,  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის მიკროკალორიმეტრულმა კვლევებმა აჩვენა, რომ იმავე კომპოზიტურ გარემოში, DMSO-ს მოცულობითი კონცენტრაციის 0-დან 60%-მდე ვარირების ფარგლებში,  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის თერმოსტაბილობა თავიდან თანაბრად იზრდება და მაქსიმუმს აღწევს 30%-ის პირობებში, შემდგომ თანაბრად მცირდება 60%-მდე ფარგლებში, ხოლო 70%-ის პირობებში აღარ დაიშინება.

3.  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის შემთხვევაში, ორი განსხვავებული, ურთიერთ-შემავსებელი მეთოდის გამოყენებით მიღებული შედეგებიდან გამონდინარეობს, რომ მიკროკალორიმეტრიის მეთოდი ახასიათებს ცილის გლობალურ კონფორმაციულ სტაბილობას, ხოლო კინეტიკური კვლევები ინფორმაციას იძლევიან ცილა-ფერმენტის აქტიური ცენტრის სტაბილობასა და ფლუქტუაციურ ლაბილობაზე. ამასთან,  $\alpha$ -ქიმოტრიპსინის გლობალურ სტაბილობაზე DMSO-ს დანამატების დუალისტური (საწინააღმდეგო მიმართულების) ეფექტი შეიძლება

ახსნას DMSO-ს კონცენტრაციების ორ სხვადასხვა დიაპაზონში (0-დან 30%-მდე და 30-დან 60%-მდე) ცილის ე.წ. „უპირატესი სოლვატაციის“ ორი ურთიერთსაწინააღმდეგო („შორს-მოქმედი“ და „ახლო-მოქმედი“) მექანიზმით. ამას გარდა, უნდა ვიგულისხმოთ, რომ დასახელებული ორი დიაპაზონიდან პირველში საქმე გვაქვს ცილის ნატივურ ან ნატივურის მსგავს კონფორმაციასთან, ხოლო მეორე დიაპაზონში - ე.წ. „გალმღვალი გლობულის“ (“molten globule”) მდგომარეობასთან.

4. ციკლური ვოლტამპერომეტრიის მეთოდის გამოყენებით შესწავლილი იყო ალკანთიოლების ფირებით დაფარულ ოქროს ელექტროდებზე იმობილიზებული აზურინის მონაწილეობით ელექტრონების გადასვლების (მიმოცვლის) პროცესების მექანიზმები, ამჯერად ზებლანტ კომპოზიტურ გარემოში, პროტონული იონური ლლობილის, ქოლინ დიჰიდროგენფოსფატის, ([ch][dhp]), უკიდურესად მაღალი კონცენტრაციის დანამატებთან ურთიერთქმედების პირობებში. დამატებით ვახდენდით საცდელი ნიმუშების ტემპერატურის (273–353 K) და წნევის (0.1–150 MPa) საკმაოდ ფართო ფარგლებში ვარირებას (ცდები ტარდებოდა ქ. ერლანგენის უნივერსიტეტის ექსპერიმენტული ბაზის გამოყენებით). იონური დანამატის მაქსიმალური (90 წონითი %) კონცენტრაციის პირობებში უკვე მიიღწეოდა ვიზუალურად დაკვირვებადი მინისებური მდგომარეობა, რომელშიც აზურინი ხასიათდებოდა საკმაოდ მაღალი სტაბილობით და რედოქს აქტივობით.

5. აზურინის რედოქს აქტივობის კინეტიკური კვლევების შედეგად გამოვლენილი იქნა რიგი ახალი კანონზომიერებებისა. კერძოდ, ელექტრონის მიმოცვლის პროცესზე მინის წარმომქმნელი ზებლანტი გარემოს ზემოქმედების დამახასიათებელი ნიშნები: პროცესის სიჩქარის მუდმივას ტემპერატურაზე და წნევაზე დამოკიდებულებების კარგად გამოხატული გამრუდებული და ჰისტერეზისული ხასიათი, ხოლო თანამედროვე თეორიული წარმოდგენების ბაზაზე ჩატარებულმა ჩადრმავებულმა ანალიზმა აჩვენა, რომ ელექტრონების მიმოცვლის ფიზიკურ მექანიზმს განაპირობებს ისეთი ფაქტორები, როგორებიცაა გარემოს არსებითად არაწრფივი და არაერგოდიული შინაგანი ბუნება.

6. ასევე ციკლური ვოლტამპერომეტრიის მეთოდით შევისწავლეთ მოდელური, კომპოზიტური კვაზი ორგანოზომილებიანი ნანო-სისტემის, კერძოდ, ოქროს ელექტროდზე

დაფენილი ცილური წარმოშობის ამინომჟავური ფრაგმენტებისგან (L-ცისტეინისგან) შედგენილი თვითაწყობილი ფირის და მასში „ჩაჭერილი“ სპილენძის იონის, როგორც სპილენძის შემცველი ცილის ბიომიმეტიკური მოდელის მონაწილეობით ელექტრონის გადასვლების ფიზიკური მექანიზმები. კვლევებმა გვაჩვენა რომ, რეალურად, მოცემული სისტემა, კერძოდ კი მისი მზიდი ნაწილი, ცისტეინის ფირი, როგორც რეაქციის გარემო, კინეტიკური გამოვლინებების თვალსაზრისით იქცევა მინის წარმომქმნელ ზებლანტ გარემოში მოთავსებული რედოქს-აქტიური ცილის, აზურინას მსგავსად, და ამდენად, წარმოადგენს მის სრულფასოვან ბიომიმეტიკურ მოდელს.

## ციტირებული ლიტერატურა

1. Klinman JP, Kohen A, Evolutionary aspects of enzyme dynamics, *J Biol Chem.* 2014, v. 289(44), p. 30205-12.
2. Williams R.J.P., The conformational properties of proteins in solution, *Biol. Rev.*, 1979, v.54, p. 389-437.
3. Fuglebakk E, Tiwari SP, Reuter N, Comparing the intrinsic dynamics of multiple protein structures using elastic network models, *Biochim Biophys Acta.* 2015, 1850(5), p.911-22.
4. Richardson J.S., The Anatomy and Taxonomy of Protein Structure, *Adv. Protein Chem.*, 1981, v.34 p.167-339.
5. Anfinsen C.B., Principles that govern the folding of protein chains, *Science*, 1973, v.181, p.223-230.
6. Orengo C.A., Flores T.P., Taylor W.R., Identification and classification of protein fold families, *Protein Eng.* 1993, v.6, p. 485-500.
7. Fasman G.D. (Ed), Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Plenum Press, New York, 1989.
8. Рубин А.Б., Биофизика, т.1. Москва, Высшая школа, 1987, с.149.
9. K.Morikawa, M.Ariyoshi, D.G.Vassylyev, O.Matsumoto, K.Katayanagi, E.Ohtsuka, Crystal structure of a pyrimidine dimer-specific excision repair enzyme from bacteriophage T4: refinement at 1.45 Å and X-ray analysis of the three active site mutants, *J Mol Biol* (1995), 249, p. 360-375.
10. Liang Tong, Viral Proteases, *Chemical Reviews*, 2002, Vol. 102 (12), p. 4609-26.
11. Кантор Ч., Шиммель П., Биофизическая химия, т.1 Москва, "Мир", 1985, с.54.
12. Александров В.Я., Реактивность клеток и белки, Ленинград, "Наука", 1985.
13. Волькенштейн М.В., Биофизика. Москва, "Наука", 1981.
14. Kannan K.K. et al., Crystal structure of human erythrocyte carbonic anhydrase C. VI. The three-dimensional structure at high resolution in relation to other mammalian carbonic anhydrases, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1971, v.36, p.221.
15. Бреслер С.Е., Молекулярная Биология, Ленинград, "Наука", 1973.
16. Финкельштейн А. В., Введение в физику белка, курс лекций, 1999-2000.
17. Ben-Naim A., Hydrophobic hydrophilic phenomena in biochemical processes, *Biophys Chem* 2002 v. 105, 2-3, pp183-193.
18. T. Nakashima, M. Kabata and T. Kikuchi, Properties of Amino Acid Sequences of Lysozyme-Like Superfamily Proteins Relating to Their Folding Mechanisms, 2017, *J Proteomics Bioinform* 10:94-107.
19. Брандтс Д., Структура и стабильность биологических макромолекул, 1973, Москва, "Мир" с. 174-254.
20. Лим В., Биофизика, 1974, т. 19.
21. Птицын О.Б., ДАН СССР, 1973, т.210, с.1213.

22. Matthews B.W., Structural and Genetic Analysis of Protein Stability, *Annu. Rev. Biochem.*, 1993, v.62, p.139-160.
23. Dill K.A., Dominant forces in protein folding, *Biochemistry*, 1990, v.29 (31), p.7133-7155.
24. Волькенштейн М.В., Молекулярная биофизика, Москва, "Наука", 1975.
25. Zhi-Ping Liu., Rizo J., Gierasch L.M., Protein Folding, *Bioorganic Chemistry*, (Hecht S.M., Ed.) Oxford Press, 1998. p.224-257.
26. Richards F.M., Areas, Volumes, Packing, and Protein Structure, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 1977, v.6, p.151-176.
27. Pauling L., Corey R.B., The Pleated Sheet, A New Layer Configuration of Polypeptide Chains, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 1951, v.37, p.252-256.
28. Privalov P.L. Gill S.J., Stability of protein structure and hydrophobic interaction, *Adv. Protein. Chem.*, 1988, v.39, p.191-234.
29. Shirley B.A., Stanssens P., Hahn U., Pace C.N., Contribution of hydrogen bonding to the conformational stability of ribonuclease T1, *Biochemistry*, 1992, v.31 (3), p.725-732.
30. Jeffrey D. G., Saenger W., *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Springer, New York, 1991.
31. Stahl N., Jencks W. P., Hydrogen bonding between solutes in aqueous solution , *J. Am. Chem. Soc.*, 1986, v.108 (14), p.4196-4205.
32. Rose G.D., Wolfenden R., Hydrogen bonding, hydrophobicity, packing, and protein folding, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 1993, v.22, p.381-415.
33. Stickle D.F., Presta L.G., Dill K.A., Rose G.D., Hydrogen bonding in globular proteins, *J. Mol. Biol.*, 1992, v.226, p.1143-1159.
34. Khoshtariya D.E., E. Hansen, R. Leecharoen & G.C. Walker, Probing protein hydration by the difference HO-H (HO-D) vibrational spectroscopy: Interfacial percolation network involving highly polarizable water-water hydrogen bonds, *J. Mol. Liquids*, 2003, v.105, p.13-36.
35. 1. J.N. Onuchic, H. Nymeyer, A.E. Garcia, J. Chahine, N.D. Socci, The energy landscape theory of protein folding: insights into folding mechanisms and scenarios, *Adv. Protein Chem.* (2000) v.53 p. 87-152.
36. Gibson K., Sheraga H., *Physiol. Chem. Phys.*, Minimization of polypeptide energy. V. Theoretical aspects, 1969, v.1, p.109-126.
37. Zhi-Ping Liu., Rizo J., Gierasch L.M., Protein Folding, *Bioorganic Chemistry*, 1998, p. 224-257.
38. Yang J., The Viscosity Of Macromolecules In Relation To Molecular Conformation, *Adv. Protein Chem*, 1961, v. 16, p. 323-400.
39. Tanford C., Protein denaturation. C. Theoretical models for the mechanism of denaturation, *Adv. Protein Chem.*, 1970, v.24, p.1-95.
40. Alonso D.O., Dill K.A., Stigter D., The three states of globular proteins: Acid denaturation, *Biopolymers*, 1991, v. 31, p.1631-1649.
41. Robertson A.D., Baldwin R.L. Hydrogen exchange in thermally denatured ribonuclease A, *Biochemistry*, 1991, v.30 (41), p. 9907-9914.
42. Labhardt A.M., *J. Mol. Biol.*, Secondary structure in ribonuclease. I. Equilibrium folding transitions seen by amide circular dichroism, 1982, v. 157, p.331-355.



43. Liu Z.P., Rizo S., Gierasch L.M., Equilibrium folding studies of cellular retinoic acid binding protein, a predominantly beta-sheet protein, *Biochemistry*, 1994, v. 33 (1), pp134-142.
44. Ohgushi M., Wada A., *FEBS Lett.*, 'Molten-globule state': a compact form of globular proteins with mobile side-chains, 1983, v. 164 (1), p. 21-24.
45. Kuwajima K., Nitta K., Yoneyama M., Sugai S., Three-state denaturation of alpha-lactalbumin by guanidine hydrochloride, *J. Mol. Biol.*, 1976, v.106 (2), p.359-373.
46. Ptitsyn O.B., Uversky V.N. The molten globule is a third thermodynamical state of protein molecules, *FEBS Letters*, 1994, v. 341 (1), p. 15-18.
47. Ptitsyn O.B., Protein folding: Hypotheses and experiments, *J. Protein. Chem.*, 1987, v.6 (4), p.273-293.
48. Haynie D.T., Freire E. Structural energetics of the molten globule state, *Proteins*, 1993, v. 16 (2), p. 115-140.
49. Griko Y.V., Energetic basis of structural stability in the molten globule state: alpha-lactalbumin, *J. Mol. Biol.*, 2000, v.297, p.1259-1268.
50. Goto Y., Calciano L.J., Fink A.L., Acid-induced folding of proteins, *PNAS*, 1990, v.87 (2), p.573-577.
51. Goto Y., Aimoto S., Anion and pH-dependent conformational transition of an amphiphilic polypeptide, *J. Mol. Biol.*, 1991, v.218, p.387-396.
52. Goto. Y., Nishikiori, S. Role of electrostatic repulsion in the acidic molten globule of cytochrome c., *J Mol Biol.*, 1991, v. 222(3), p. 679-86.
53. Mottonen J., Strand A., Symersky J., Sweet R. M., Danley D. E., Geoghegan K. F., Gerard R. D., Goldsmith E. J., Structural basis of latency in plasminogen activator inhibitor-1, *Nature*, 1992, v.355, p.270-273.
54. Baker D., Agard D.A., Kinetics versus thermodynamics in protein folding, *Biochemistry*, 1994, v.33 (24), p. 7505-7509.
55. Baker D., Sohl J.L., Agard D.A., A protein-folding reaction under kinetic control, *Nature*, 1992, v.356, p.263-265.
56. Teilum K., Olsen J. G., Kragelund B. B. Protein stability, flexibility and function, *Biochim Biophys Acta*. 2011, v. 1814(8), p. 969-76.
57. Brooks C. L. 3rd, Gruebele M., Onuchic J. N., Wolynes P. G., Chemical physics of protein folding, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p.. 11037-11038.
58. J.N. Onuchic, H. Nymeyer, A.E. Garcia, J. Chahine, N.D. Socci, The energy landscape theory of protein folding: insights into folding mechanisms and scenarios, *Adv. Protein Chem.* 53 (2000) 87-152.
59. Kenoth R., Kamlekar R. K., Simanshu D. K., Gao Y., Malinina L., Prendergast F. G., Molotkovsky J. G., Patel D. J., Venyaminov S. Y, Brown R. E. Conformational folding and stability of HET-C2 glycolipid transfer protein (GLTP)-fold: Does a molten globule-like state regulate activity?, *Biochemistry*, 2011, v. 50(23), p. 5163-5171.
60. Zwanzig R., Szabo A., Bagchi B., Levinthal's paradox, *Proc. Nail. Acad. Sci. USA*, 1992, v. 89, p.. 20-22.

61. Calderone, R. Berni, G. Zanotti, High-resolution Structures of Retinol-binding Protein in Complex with Retinol: pH-induced Protein Structural Changes in the Crystal State, *J Mol Biol*, 2003, v. 329 (4), p. 841-850.
62. Polverino de Laureto, P., Frare, E., Gottardo, R. and Fontana, A., Molten globule of bovine  $\alpha$ -lactalbumin at neutral pH induced by heat, trifluoroethanol, and oleic acid: A comparative analysis by circular dichroism spectroscopy and limited proteolysis. *Proteins*, 2002, v. 49, p. 385–397.
63. Kumar R., Kukreja R. V., Cai S., Singh B. R., Differential role of molten globule and protein folding in distinguishing unique features of botulinum neurotoxin, *Biochim Biophys Acta*, 2014, v. 1844 (6), p. 1145-52.
65. Fusco G., Lewitzky M., Simister P. C., Marchant J., Camilloni C., Feller S. M., De Simon A., Conformational Recognition of an Intrinsically Disordered Protein, *Biophys J*, 2014, v. 106 (8), p. 1771 – 1779.
66. Oldfield C. J., Dunker A. K., Intrinsically Disordered Proteins and Intrinsically Disordered Protein Regions, *Annual Review of Biochemistry*, 2014 , v. 83 (1), p. 553-584.
67. Gray, H.B. and Winkler, JR. (1996) Electron Transfer in Proteins, *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 537–561.
68. Marcus, R.A. (1999) Electron transfer past and future, in *Advances in Chemical Physics*, vol. 107, Part 1 (eds. J. Jortner and M. Bixon), John Wiley & Sons, Inc., NY, p. 1–6.
69. Marcus, R.A. and Sutin, N. (1985) Electron transfers in chemistry and biology, *Biochim. Biophys. Acta*, 811 (2), 265–322.
70. Jortner, J. and Bixon, M. (eds.) (1999) Electron transfer: from isolated molecules to biomolecules, in *Advances in Chemical Physics*, vol. 106, 107, John Wiley & Sons, Inc., NY.
71. Gust, D., Moore, T.A., and Moore, A.L. (2009) Solar Fuels via Artificial Photosynthesis, *Acc. Chem. Res.*, 42 (12), 1890–1898.
72. Magnuson A., Anderlund M., Johansson O., Lindblad P., Lomoth R., Polivka T., Ott S., Stensjö K., Styring S., Sundström V., Hammarström L., Biomimetic and Microbial Approaches to Solar Fuel Generation, *Accounts of Chemical Research* 2009, v. 42 (12), p. 1899-1909.
73. Beratan, D. N., Liu, C., Migliore, A., Polizzi, N. F., Skourtis, S. S., Zhang, P., & Zhang, Y., Charge Transfer in Dynamical Biosystems, or The Treachery of (Static) Images. *Accounts of Chemical Research*, 2015, 48(2), 474–481.
74. Hosseinzadeh P., Lu Y., Design and fine-tuning redox potentials of metalloproteins involved in electron transfer in bioenergetics, *Biochim Biophys Acta*, v. 1857 (5), 2016, pp.557-581.
75. Marcus, R.A. Tutorial on Rate Constants and Reorganization Energies, *J. Electroanal. Chem.*, 2000, 483 (1), p.2–6.
77. W. F. Libby Theory of Electron Exchange Reactions in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem.*, 1952, 56, 893-868.
78. R. A. Marcus On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. I., *J. Chem. Phys.* 24, 966 (1956).
79. R. A. Marcus On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. II. Applications to Data on the Rates of Isotopic Exchange Reactions, *J. Chem. Phys.* 26, 867 (1957).

80. R. A. Marcus On the Theory of Oxidation-Reduction Reactions Involving Electron Transfer. III. Applications to Data on the Rates of Organic Redox Reactions, *J. Chem. Phys.* 26, 872 (1957).
81. Zusman L. D., Dynamical solvent effects in electron transfer reactions, *Z. Phys. Chem.*, 1994, v.186, p.1-29.
82. Beratan D. N., Onuchic J. N., Adiabaticity and Nonadiabaticity in Bimolecular Outer-Sphere Charge Transfer Reactions, *J. Chem. Phys.*, 1988, v.89, p.6195-6203.
83. Onuchic J. N., Beratan D. N., Hopfield J.J., Some Aspects of Electron Transfer Reaction Dynamics, *J. Phys. Chem.*, 1986, v.90, p.3707-3721.
84. Zusman L. D., Outer-sphere electron transfer reactions at an electrode, *Chem. Phys.*, 1987, v.112, p.53-59.
85. Dogonadze R. R., Kuznetsov A. M., and Vorotyntsev M. A., On the theory of nonradiative transitions in polar media II. Processes with 'mixing' of quantum and classical degrees of freedom, *Phys. Status Solidi B*, 1972, v.54, p. 425-433.
86. Dogonadze R. R., Kuznetsov A. M., Theory of charge transfer kinetics at solid-polar liquid interfaces, *Progr. Surf. Sci.*, 1975, v.6, p.1-5.
87. Kestner, N.R., Logan, J., Jortner, J., Thermal electron transfer reactions in polar solvents, *J. Phys. Chem.*, 1974, v.78, p. 2148-2166.
88. Ulstrup, J., Jortner, J., The effect of intramolecular quantum modes on free energy relationships for electron transfer reactions, *J. Chem. Phys.*, 1975, v.63, p.4358-4368.
89. Ulstrup, J., *Charge Transfer Processes in Condensed Media*, Springer: Berlin, 1979.
90. Hopfield J. J., Electron Transfer between Biological Molecules by Thermally Activated Tunneling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974, v.71, p.3640-3644.
91. Beratan D. N., Onuchic J. N. and Hopfield J. J., Electron tunneling through covalent and noncovalent pathways in proteins, *J. Chem. Phys.*, 1987, v.86, p.4488-4498.
92. Beratan D. N., Onuchic J. N., Winkler J.R and Gray H., Electron-tunneling pathways in proteins, *Science* 1992, v.258, p.1740-1744.
93. Dogonadze R.R., Kuznetsov A.M., Marsagishvili T.A., The present state of the theory of charge transfer processes in condensed phase, *Electrochim. Acta*, 1980, v.25, p.1-28.
94. Newton M. D., and Sutin N., Electron Transfer Reactions in Condensed Phases, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 1984, v.35, p.437-439.
95. Newton M. D., Quantum chemical probes of electron-transfer kinetics: the nature of donor-acceptor interactions, *Chem. Rev.*, 1991, v.91, p.767-792.
96. Marcus R. A., On the theory of electron-transfer reactions. VI unified treatment for homogeneous and electrode reactions, *J. Chem. Phys.*, 1965, v.43, p.679-701.
97. Marcus R. A, Chemical and Electrochemical Electron-Transfer Theory, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 1964, v.15, p. 155-196.
98. Marcus R. A., Reorganization free energy for electron transfers at liquid-liquid and dielectric semiconductor-liquid interfaces, *J. Phys. Chem.* 1990, v. 94, p. 1050- 1055.
99. Heitele H., Dynamic solvent effects on electron-transfer reactions, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1993, v.32, p.359-377.

100. Hynes J. T., Outer-sphere electron-transfer reactions and frequency-dependent friction, *J. Phys. Chem.*, 1986, v.90, p.3701-3706.
101. Horton H.R., Moran L.A., Ochs R.S., Rawn J.D., Scrimgeour K.G., *Principles of Biochemistry*, Prentice Hall, 1996.
102. Hess, G. P., *The Enzymes*, 3rd ed., vol. 3, Boyer, P. D., ed., Academic Press (New York, NY: 1971), pp. 213-248.
103. Hartly B. S., Amino-acid sequence of bovine Chymotrypsinogen-A, *Nature*, 1964, v.201, p.1284.
104. Д.Э. Хоштария. Исследование элементарного процесса переноса протона при ферментативном гидролизе методом температурной зависимости кинетического изотопного эффекта. Диссерт. канд. хим. наук (1980).
105. A.R. Fersht, *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein*
106. Hedstrom L., Serine Protease Mechanism and Specificity, *Chem. Rev.* 2002, 102, 4501-4523.
- Folding, 2nd ed. Freeman, New York, 1998.
107. L.M. Simon , K. Laszlo, A. Vertesi, K. Bagi, B. Szajani, Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 4 (1998) 41-45.
108. L. Olofsson, P. Soderberg, I. A. Nicholls, Influence of water miscible organic solvents on  $\alpha$ -chymotrypsin in solution and immobilized on Eupergit CM, *Biotechnol Lett* (2006) 28:929-935.
109. Deschrevel B, Vincent JC, Thellier M., Kinetic study of the  $\alpha$ -chymotrypsin-catalyzed hydrolysis and synthesis of a peptide bond in a monophasic aqueous/organic reaction medium, *Arch Biochem Biophys.* 1993, v. 304(1):45-52.
110. E. A. Belyaeva, D. V. Gra, and N. L. Eremeev, On the Mechanism of Interaction of Organic Solvents with the Active Site of  $\alpha$ -Chymotrypsin, *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 67, No. 9, 2002, pp. 1032-1036.
111. N. L. Eremeev, Interaction of  $\alpha$ -Chymotrypsin with Dimethyl Sulfoxide: A Change of Substrate Could "Change" the Interaction Mechanism, *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, Vol. 29, No. 5, 2003, pp. 434-440.
112. Vinogradov AA, Kudryashova EV, Grinberg VY, Grinberg NV, Burova TV, Levashov AV., The chemical modification of  $\alpha$ -chymotrypsin with both hydrophobic and hydrophilic compounds stabilizes the enzyme against denaturation in water-organic media, *Protein Eng.* 2001, v. 14, p.683-9.
113. A. C. Hengge and R. L. Stein, Role of Protein Conformational Mobility in Enzyme Catalysis: Acylation of  $\alpha$ -Chymotrypsin by Specific Peptide Substrates, *Biochemistry* 2004, 43, 742-747.
114. C. Malardier-Jugroot, D. T. Bowron, A. K. Soper, M. E. Johnson and T. Head-Gordon, Structure and water dynamics of aqueous peptide solutions in the presence of co-solvents, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12, 382-392.
115. Russo D., The impact of kosmotropes and chaotropes on bulk and hydration shell water dynamics in a model peptide solution, *Chem Phys* 345 (2008) 200-211.
116. Spreti N., Di Profio P., Marte L., Bufali S., Brinchi L., Savelli G., Activation and stabilization of  $\alpha$ -chymotrypsin by cationic additives, *Eur J Biochem.* 2001, v. 268(24), p.6491-7.
117. P. Attri, P. Venkatesu, and M.-J. Lee, Influence of Osmolytes and Denaturants on the Structure

and Enzyme Activity of  $\alpha$ -Chymotrypsin, *J. Phys. Chem. B* 2010, 114, 1471–1478.

118. Khoshtariya D. E., Shushanian M., Sujashvili R., Makharadze M., Tabuashvili E. and Getashvili G., Enzymatic activity of  $\alpha$ -chymotrypsin in the urea-induced molten-globule-like state: a combined kinetic/thermodynamic study, *J Biol Phys Chem* (2003), v. 3, p.2-10.
119. Shushanyan M., Sujashvili R., Tabuashvili E., Makharadze M., Getashvili G. and Khoshtariya D. E., Kinetic and thermodynamic manifestations of the thermally-induced molten globule-like state of  $\alpha$ -chymotrypsin, *J Biol Phys Chem*, 2006, v.6 pp. 51–55.
120. E. Vijgenboom, J. E. Busch and G. W. Canters, In vivo studies disprove an obligatory role of azurin in denitrification in *Pseudomonas aeruginosa* and show that azu expression is under control of rpoS and ANR, *Microbiology* (1997) 143 ( Pt 9):2853-63.
121. Ronnberg M, Araiso T, Ellfolk N, Dunford H B, The reaction between reduced azurin and oxidized cytochrome c peroxidase from *Pseudomonas aeruginosa*, *J Biol Chem*, 1981 10; 256(5):2471-4.
122. E.T. Adman, Copper protein structures, *Adv. Protein Chem.* 42 (1991) 145–197.
123. M. E. Palm-Espling, M. S. Niemiec, P. Wittung-Stafshede, Role of metal in folding and stability of copper proteins in vitro, *BBA* 1823 (2012) 1594–1603.
124. Arvidsson, R.H., Nordling M, Lundberg L.G.The azurin gene from *Pseudomonas aeruginosa*. Cloning and characterization, *Eur. J. Biochem.*, 1989, v.179, 195-200.
125. Van de Kamp, M., Canters G. W., Wijmenga S. S, Lommen A., Hilbers C. W., Nar H., Messerschmidt A., and Huber R., Complete sequential proton and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance assignments and solution secondary structure of the blue copper protein azurin from *Pseudomonas aeruginosa*, *Biochemistry*, 1992, v. 31, p. 10194-10207.
126. Malmstrom, B.G., Rack-induced bonding in blue-copper proteins, *Eur. J. Biochem.*, 1994, 223, 711-718.
127. Williams, R.J.P., Energised (entatic) States of Groups and of Secondary Structures in Proteins and Metalloproteins, *Eur. J. Biochem.*, 1995, v.234, 363-38.
128. Pozdnyakova I, Guidry J, Wittung-Stafshede P., Copper stabilizes azurin by decreasing the unfolding rate. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2001; 390 146–148.
129. H. Nar, A. Messerschmidt, R. Huber, M. van de Kamp, G.W. Canters, Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* apo-azurin at 1.85 Å resolution, *FEBS Lett.* 306 (1992) 119–124.
130. H. Nar, A. Messerschmidt, R. Huber, M. van de Kamp, G.W. Canters, Crystal structure analysis of oxidized *Pseudomonas aeruginosa* azurin at pH 5.5 and pH 9.0. A pH-induced conformational transition involves a peptide bond flip, *J. Mol. Biol.* 221 (1991) 765–772.
131. J. Leckner, P. Wittung, N. Bonander, G. Karlsson, B. Malmstrom, The effect of redox state on the folding free energy of azurin, *J. Biol. Inorg. Chem.* 2 (1997) 368–371.
132. I. Pozdnyakova, J. Guidry, P. Wittung-Stafshede, Studies of *Pseudomonas aeruginosa* azurin mutants: cavities in beta-barrel do not affect refolding speed, *Biophys. J.* 82 (2002) 2645–2651.
133. I. Pozdnyakova, P. Wittung-Stafshede, Approaching the speed limit for Greek Key beta-barrel formation: transition-state movement tunes folding rate of zinc-substituted azurin, *Biochim. Biophys. Acta* 1651 (2003) 1–4.
134. Marks J, Pozdnyakova I, Guidry J, Wittung-Stafshede P., Methionine-121 coordination

- determines metal specificity in unfolded *Pseudomonas aeruginosa* azurin., *J Biol Inorg Chem.* 2004, Volume 9 (3), p.281-288.
135. I. Pozdnyakova, P. Wittung-Stafshede, Biological relevance of metal binding before protein folding, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 10135–10136.
136. L. Li, S. Chen, and S. Jiang, Protein Adsorption on Alkanethiolate Self-Assembled Monolayers: Nanoscale Surface Structural and Chemical Effects, *Langmuir*, 2003, 19 (7), p.2974–2982.
137. D. E. Khoshtariya, T. D. Dolidze, M. Shushanyan, K. L. Davis, D. H. Waldeck, and R. van Eldik, Fundamental signatures of short- and long-range electron transfer for the blue copper protein azurin at Au/SAM junctions, *PNAS*, vol. 107, #7, (2010), 2757–2762.
138. D.E. Khoshtariya, T.D. Dolidze, S. Seyfert, D. Sarauli, G. Lee, R. van Eldik, Kinetic, thermodynamic and mechanistic patterns for free (unbound) cytochrome C at Au/SAM junctions. Impact of electronic coupling, hydrostatic pressure, and stabilizing/denaturing additives. *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 7041-7056.
139. D. E. Khoshtariya, T. D. Dolidze, T. Tretyakova, D. H. Waldeck, and R. van Eldik, Electron transfer with azurin at Au–SAM junctions in contact with a protic ionic melt: impact of glassy dynamics, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, v. 15, 16515-16526.
140. D. H. Waldeck and D. E. Khoshtariya, in *Modern aspects of Electrochemistry. Applications of Electrochemistry and Nanotechnology in Biology and Medicine*, No. 52, ed. N. Elias, Springer, New York, 2011, pp. 105–241.
141. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, Whitesides GM, Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology, *Chem Rev.* 2005; 105(4):1103-69.
142. S.M.Barlow, R.Raval, Complex organic molecules at metal surfaces: bonding, organisation and chirality, *Surface Science Reports*, v. 50 (6–8), 2003, p.201-341.
143. Finklea H.O., *Electrochemistry of Organized Monolayers of Thiols and Related Molecules on Electrodes*, *Electroanalytical Chemistry*, 1996 (A.J. Bard and I. Rubinstein, eds.); Marcel Dekker: New York, v.19, p.109 -335.
144. Finklea H.O., *Self-assembled monolayers on electrodes.*, *Encyclopedia of analytical chemistry*, ed by R.A. Meyers, J.Wiley and sons Ltd, Chichester p.1-29.
145. Liu Y.-P., Newton M. D., Reorganization energy for electron-transfer at film-modified electrode surfaces – a dielectric continuum mode, *J. Phys. Chem.*, 1994, v.98, p.7162-7170.
146. Diao P., Jiang D., Cui X, Gu D., Tong R. and Zhong B., Studies of structural disorder of self-assembled thiol monolayers on gold by cyclic voltammetry and ac impedance, *J. Electroanal. Chem.*, 1999, v.464, p.61-67.
147. Fawcett W.R., The role of the metal and the solvent in simple heterogeneous electron transfer reactions, *Electrochem acta*, 1997, v.42, n.5 p.833-839.
148. Finklea H. O., Snider D. A., Fedyk J., Sabatani E., Gafni Y., Rubinstein I., Characterization of octadecanethiol coated gold electrodes as microarray electrodes by cyclic voltammetry and ac-impedance spectroscopy, *Langmuir*, 1993, v.9, p.3660-3667.
149. J.-P. Belieres and C. A. Angell, Protic Ionic Liquids: Preparation, Characterization, and Proton Free Energy Level Representation, *J. Phys. Chem. B*, 2007, 111, 4926–4937.
150. H. Weingärtner, C. Cabrele, C. Herrmann, How ionic liquids can help to stabilize native

- proteins, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2012, v. 14, p.415-426.
151. K. Fujita, R. D. MacFarlane and M. Forsyth, Protein solubilising and stabilising ionic liquids, *Chem. Commun.*, 2005, 4804–4806.
152. K. Fujita and H. Ohno, Enzymatic activity and thermal stability of metallo proteins in hydrated ionic liquids, *Biopolymers*, 2010, 93, 1093–1099.
153. M. Naushad, Z.A. Allothman, A.B. Khan, M. Ali, Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review, In *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, v. 51(4), p.555-560.
154. Osada I, de Vries H, Scrosati B, Passerini S. Ionic-Liquid-Based Polymer Electrolytes for Battery Applications, *Angew Chem Int Ed Engl.* 2016;55(2):500-13.
155. Marrucho IM, Branco LC, Rebelo LP. Ionic liquids in pharmaceutical applications, *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2014, v.5, p. 527-46.
156. Fujita K, Macfarlane DR, Noguchi K, Ohno H., Choline dihydrogen phosphate, *Acta Crystallogr Sect E Struct Rep Online.* 2009 Mar 6;65(Pt 4) p. o709.
157. U. A. Rana, P. M. Beyley, R. Vijayaraghavan, P. Howlett, D. R. MacFarlane and M. Forsyth, Proton transport in choline dihydrogen phosphate/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> mixtures, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2010, 12, 11291–11298.
158. Chow, E. and Gooding, J. Justin. (2006), Peptide Modified Electrodes as Electrochemical Metal Ion Sensors. *Electroanalysis*, 18: 1437–1448.
159. Nitzan A and Ratner M A, Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology, *Chem. Rev.*, 2005, 105 (4), p.1103–1170.
160. R. R. Nazmutdinov, I. R. Manyurov, T. T. Zinkicheva,, J. Jang, and J. Ulstrup, Cysteine Adsorption on the Au(111) Surface and the Electron Transfer in Configuration of a Scanning Tunneling Microscope: A Quantum-Chemical Approach, *Russian Journal of Electrochemistry*, Vol. 38, No. 1, 2002, pp. 68–76.
161. J. Zhang, Q. Chi, R. R. Nazmutdinov, T. T. Zinkicheva, M. D. Bronshtein Submolecular Electronic Mapping of Single Cysteine Molecules by in Situ Scanning Tunneling Imaging, *Langmuir* 2009, 25, 2232-2240.
162. Zaballa M-E, Abriata L A, Donaire A and Vila A J, Flexibility of the metal-binding region in apo-cupredoxins, *PNAS* 2012 109 (24) 9254-9259.
163. Cascella M, Magistrato A, Tavernelli I, Carloni P and Rothlisberger U, Role of protein frame and solvent for the redox properties of azurin from *Pseudomonas aeruginosa*, *PNAS* 2006 103 (52) 19641-19646.
164. B. M. Hoffman and M. A. Ratner, Reorganization energies and rate constants for electron reactions in glass-forming media and proteins, *Inorg. Chim. Acta*, 1996, 243, 233–238.
165. Matyushov D V, Energetics of Electron-Transfer Reactions in Soft Condensed Media, *Acc. Chem. Res.*, 2007, 40 (4), p.294–301.
166. D. L. Stein and C. M. Newman, Broken ergodicity and the geometry of rugged landscapes, *Phys. Rev. E* 51, 5228-38.
167. D. E. Khoshtariya, D Dolidze, T. Tretyakova and R van Eldik, Electron transfer with self-assembled copper ions at Au-deposited biomimetic films: mechanistic ‘anomalies’ disclosed by

- temperature- and pressure-assisted fast-scan voltammetry, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 48 (2015) 255402.
168. N.Linnet, *pH Measurements in Theory and Practice*, Copenhagen (1970).
169. T. Tretyakova, M. Shushanyan, T. Partskhaladze, M. Makharadze, R. van Eldik and D. E. Khoshtariya, Simplicity within the complexity: Bilateral impact of DMSO on the functional and unfolding patterns of  $\alpha$ -chymotrypsin, *Biophysical Chemistry* 175–176 (2013) 17–27.
170. D.E. Khoshtariya, N.G. Gogvadze, Conformationally-adiabatic process of deacylation of N-acetyl-L-tyrosine- $\alpha$ -chymotrypsin, *Bioorganicheskaia Khimiia* 11 (1985) 1621–1626.
171. D.E. Khoshtariya, N.G. Gogvadze, J. Ulstrup, Kinetic manifestation of conformational dynamics accompanying enzymatic hydrolysis of benzoyl-glycyl-phenyllactate by carboxypeptidase A, *Bioorganicheskaia Khimiia* 17 (1991) 618–625.
172. Мдзинარაშვილი Т.Дж., Определение термодинамических и кинетических параметров конформационных переходов биополимеров (глобулярных и фибриллярных белков, ДНК) и их естественных комплексов (бактериофагов) с помощью сканирующей микрокалориметрии. Диссертация на соиск. научной степени доктора физ.-мат. наук. 1999, с.10-32.
173. Privalov P.L., Dragan A.I., Microcalorimetry of biological macromolecules, *Biophys. Chem.* 2007, v. 126, p. 16–24.
174. Privalov G., Kavina V., Freire E. and Privalov P.L., Precise Scanning Calorimeter for Studying Thermal Properties of Biological Macromolecules in Dilute Solution, *Analytical Biochemistry*, 1995, v. 232, 79–85.
175. Privalov PL, Scanning microcalorimeters for studying macromolecules, *Pure & Appl. Chem.*, 1980, v.52, p. 479–497.
176. J. E. Ladbury, M. L. Doyle *Biocalorimetry 2: Applications of Calorimetry in the Biological Sciences*, J. Wiley, 2004, part 3.
177. Privalov P.L., Medved L.V., Domains in the fibrinogen molecule, *J. Mol. Biol.*, 1982, v.159, p.665–683.
178. Privalov P.L., Potekchin S. Scanning microcalorimetry in studying temperature-induced changes in proteins, *Methods in enzymology*, 1986, v.131, p.4–51.
179. Пфайль В., Привалов П.Л., сб. Биохимическая Термодинамика, "Мир", 1982, с.95–139.
180. Jackson W.M., Brandts J.F., *Biochemistry*, 1970, v.9, p.2294–2301.
181. Кантор. Ч., Шиммель П., *Биофизическая химия*, М, "Мир" т.3, 1985, с.219.
182. Какабадзе Г. Р., Денатурационный инкремент теплоемкости водных растворах ДНК, Дис. на соиск. ученой степени физ.-мат. наук, 1993.
183. Plotnikov VV, Brandts JM, Lin LN, Brandts JF., A new ultrasensitive scanning calorimeter. *Anal Biochem*, 1997, v. 250, p. 237–244.
184. A. J. Bard, L.R. Faulkner, *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, 2nd ed., 2001.
185. P. F. Barbara, T. J. Meyer and M. A. Ratner, *Contemporary Issues in Electron Transfer Research*, *J. Phys. Chem.*, 1996, v. 100, p. 13148–68.
186. E. Laviron, General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems, *J. Electroanal. Chem.* 101(1979) 19–28.



187. E. Khoshtariya, J. Wei, H. Liu, H. Yue and D. H. Waldeck, Charge-transfer mechanism for cytochrome c adsorbed on nanometer thick films. Distinguishing frictional control from conformational gating, *J. Am. Chem. Soc.* 125 (2003) 7704-7714.
188. E. Khoshtariya, T. D. Dolidze, D. Sarauli and R. van Eldik, High-Pressure Probing of a Changeover in the Charge-Transfer Mechanism for Intact Cytochrome c at Gold/Self-Assembled Monolayer Junctions, *Angew. Chem. Int. Ed.* 45 (2005) 277-281.
189. D. E. Khoshtariya, T. D. Dolidze, S. Seyfert, D. Sarauli, G. Lee and R. van Eldik, Kinetic, thermodynamic, and mechanistic patterns for free (unbound) cytochrome c at Au/SAM junctions: impact of electronic coupling, hydrostatic pressure, and stabilizing/denaturing additives, *Chem. Eur. J.* 12 (2006) 7041-7056.
190. Dolidze T.D, Rondinini S, Vertova A, Waldeck D.H, Khoshtariya D.E Impact of self-assembly composition on the alternate interfacial electron transfer for electrostatically immobilized cytochrome c, *Biopolymers* (2007) 87 p. 68-189.
191. I. Rips and J. Jortner, Dynamic solvent effects on outer-sphere electron transfer, *J. Chem. Phys.* 87 (1987) 2090-2104.
192. D.H. Murgida, P. Hildebrandt, Proton-Coupled Electron Transfer of Cytochrome c, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123 (17), 4062-4068.
193. T. D. Dolidze, D. E. Khoshtariya, D. H. Waldeck, J. Macyk and R. van Eldik, *J. Phys. Chem. B* 107 (2003) 7172-7179.
194. H. Sumi and R. A. Marcus, Dynamical Effects in Electron Transfer Reactions, *J. Chem. Phys.* 1986, v.84, p. 4894.
195. B. Zerner, M.L. Bender, The kinetic consequences of the acyl-enzyme mechanism for the reactions of specific substrates with chymotrypsin, *J. Am. Chem. Soc.* (1964), 86, p. 3669-3674.
196. D.E. Khoshtariya, V.V. Topolev, L.I. Krishtalik, Study of proton transfer in enzymatic hydrolysis by the method of temperature dependence of kinetic isotope effect. I.  $\alpha$ -chymotrypsin catalyzed hydrolysis of N-acetyl- and N-benzyl-L-tyrosine ethyl esters, *Bioorganicheskaiia Khimiiia* 4 (1978) 1341-1351.
197. D.M. Segal, J.C. Powers, G.H. Cohen, D.R. Davies, P.E. Wilcox, Substrate binding site in bovine chymotrypsin A $\alpha$ . Crystallographic study using peptide chloromethyl ketones as site-specific inhibitors, *Biochemistry* 10 (1971) 3728-3739.
198. J.C. Powers, B.L. Baker, J. Browb, B.K. Chelm, Inhibition of chymotrypsin A-alpha with N-acyl- and N-peptidyl-2-phenylethylamines. Subsite binding free energies, *J. Am. Chem. Soc.* (1974), v. 96, p. 238-243.
199. S.N. Timasheff, G. Xie, Preferential interactions of urea with lysozyme and their linkage to protein denaturation, *Biophys. Chem.* (2003), 105, p. 421-448.
200. A. Kumar, P. Venkatesu, Overview of the stability of  $\alpha$ -chymotrypsin in different solvent media, *Chem. Rev.*, 2012, v. 112, p. 4283-4307.
201. A. Torreggiani, M.D. Foggia, L. Manco, A. DeMaio, S.A. Markarian, S. Bonora, Effect of sulfoxides on the thermal denaturation of hen lysozyme: a calorimetric and Raman study, *J Mol Str* (2008), 891, p. 115-122.
202. T. Arakawa, Y. Kita, S.N. Timasheff, Protein precipitation and denaturation by dimethyl sulfoxide, *Biophys. Chem.* (2007), 131, p. 62-70.

203. Y. Fujita, A. Miyanaga, Y. Noda, Effect of alcohols on the thermal denaturation of lysozyme as measured by differential scanning calorimetry, *Bul Chem Soc Jpn* (1979), 52 , p.3659–3662.
204. A. Giugliarelli, M. Paolantoni, A. Morresi, P. Sassi, Denaturation and preservation of globular proteins: the role of DMSO, *J Phys Chem. B* (2012), 116, p.13361–13367.
205. I.K. Voets, W.A. Cruz, C. Moitzi, P. Lindner, E.P.G. Areas, P. Schurtenberger, DMSO induced denaturation of hen egg white lysozyme, , *J Phys Chem. B* (2010), 114, p.11875–11883.
206. S. Roy, B. Jana, B. Bagchi, Dimethyl sulfoxide induced structural transformations and non-monotonic concentration dependence of conformational fluctuation around active site of lysozyme, , *J Chem Phys* (2012), 136 (115103) 1–10.
207. H. Frauenfelder, G.A. Petsko, D. Tsernoglou, Temperature-dependent X-ray diffraction as a probe of protein structural dynamics, *Nature* (1979), 280, p.558–563.
208. C.L. Tsou, Active site flexibility in enzyme catalysis, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (1998), 864, p.1–8.
209. K. Teilum, J.G. Olsen, B.B. Kragelund, Protein stability, flexibility and function, *Biochim Biophys Acta* 2011, 1814 p.969–976.
210. J.C. Mauro, P.K. Gupta, R.J. Loucks, Continuously broken ergodicity. *J Chem Phys* (2007), 126, p.184511(11).
211. D. V. Matyushov, Non-Ergodic Electron Transfer in Mixed-Valence Charge-Transfer Complexes, *J. Phys. Chem. Lett.*, 2012, 3, 1644–1648.
212. 51. Chow E and Gooding J J Peptide Modified Electrodes as Electrochemical Metal Ion Sensors, *Electroanalysis*, 2006, 18 1437–48.
213. [53] Qu, X., Bond, A. M., & Martin, L. L. (2009). Interference from trace copper in electrochemical investigations employing carboxylic acid terminated thiol modified gold electrodes. *Electroanalysis*, 21(6), 681-688.
214. T. de F. Paulo, I. C. N. Diógenes, and H. D. Abruña, Direct Electrochemistry and Electrocatalysis of Myoglobin Immobilized on l-Cysteine Self-Assembled Gold Electrode, *Langmuir* 2011 27 (5), 2052-2057.
215. Badia A, Cuccia L, Demers L, Morin F and Lennox R B, Structure and Dynamics in Alkanethiolate Monolayers Self-Assembled on Gold Nanoparticles: A DSC, FT-IR, and Deuterium NMR Study, 1997, *J. Am. Chem. Soc.* 119 2682–92.
216. Pawsey S, Yach K, Halla J and Reven L Self-Assembled Monolayers of Alkanoic Acids: A Solid-State NMR Study, *Langmuir* 2000, 16 3294–303.
217. D. N. LeBard and D. V. Matyushov, Glassy protein dynamics and gigantic reorganization energy of plastocyanin, *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112, 5218–5227.

## მადლობა

ჩემს ხელმძღვანელს, ფიზ.-ქიმ. მეცნ. დოქტორს, დიმიტრი ხოშტარიას მხარდაჭერისათვის და გაწეული დახმარებისთვის. ასევე პროფესორ თამაზ მძინარაშვილს - სასარგებლო რჩევებისა და კრიტიკული შენიშვნებისთვის, დოქტორებს, თინა დოლიძეს, მიხეილ შუმანიანს, ნინო შენგელიას და თამარ ფარცხალაძეს ექსპერიმენტების ჩატარებისას გაწეული დახმარებისთვის.

აგრეთვე გერმანულ "ფოლკსვაგენის" ფონდს (Volkswagen Stiftung) საქართველო-გერმანიის პარტნიორული თანამშრომლობის საგრანტო პროექტების დაფინანსებისთვის (2008-2013) და საქართველოს ეროვნულ სამეცნიერო ფონდს 2009-2011 და 2012-2015 წლების საგრანტო პროექტების დაფინანსებისათვის.