

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი  
ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

## თამარ სიგუა

გენომური პარამეტრების შესწავლა ძუძუს კიბოს დროს

სადოქტორო პროგრამა „ბიოლოგია“

## დისერტაცია

ბიოლოგიის დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

სამეცნიერო ხელმძღვანელები:

თეიმურაზ ლეჟავა, პროფესორი,  
ბიოლოგიისმეცნიერებათა დოქტორი

თინათინ ჯოხაძე, ასოცირებული პროფესორი,  
ბიოლოგიის მეცნიერებათადოქტორი

თბილისი 2023

Ivane Javakhishvili Tbilisi State University  
Faculty of Exact and Natural Sciences

**Tamar Sigua**

**Study of Genomic Parameters in the case of Ductal Breast  
Cancer**

PhD Programm „Biology“

**PhD thesis**

To obtain the academic degree of PhD in Biology

Scientific supervisors:

**Teimuraz Lezhava**, Professor,  
Doctor of Biological Sciences

**Tinati Jokhadze**, Associated Professor,  
Doctor of Biological Sciences.

Tbilisi 2023

## ანოტაცია

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა გენომის ფუნქციური პარამეტრების სპეციფიკური ცვალებადობის გამოვლენა ძუძუს კიბოს სადინროვანი ფორმით დაავადებულ ინდივიდებში, და მისი ნორმალიზაციის შესაძლებლობების დასახვა.

წარმოდგენილი კვლევის აქტუალობა განპირობებულია, ერთი მხრივ, საკუთრივ ძუძუს კიბოს ეპიდემიოლოგიით (მისი სიხშირის ზრდის პროგრესული ხასიათით), მეორე მხრივ, ეპიგენეტიკური რეგულაციის ამსახველი გენომური პარამეტრების ცვალებადობის შესწავლის მნიშვნელობით, რაც ამ დაავადებისათვის სპეციფიკური დამატებითი ეპიგენეზური ფაქტორების გამოვლენისა და მათი კორექციის შესაძლებლობას იძლევა.

აღსანიშნავია ისიც, რომ ძუძუს კიბოს კვლევები ამ მიმართულებით საქართველოში არ ჩატარებულა, და, შესაბამისად, მიღებული შედეგები ორიგინალურია.

კვლევის მიზნის შესაბამისად დასახული იყო შემდეგი ამოცანები:

1. ქრომატინის ზოგადი მდგომარეობის შეფასება, ქრომატინის ლლობის პარამეტრების ცვალებადობის დადგენის გზით, დიფერენცირებული სკანირების მიკროკალორიმეტრიული მეთოდის გამოყენებით. 2. აკროცენტრულ ქრომოსომათა ასოციაციების სიხშირის დადგენა და გარკვეულ ქრომოსომებში ბირთვაკმაროგანიზებელი უბნების აქტივობის შეფასება ძუძუს კიბოს სადინროვანი ფორმით დაავადებულებში, როგორც სინთეზური პროცესების ინტენსივობის განსაზღვრის, ისე ამ დაავადებისათვის სპეციფიკური მარკერის გამოსავლენად. 3. ქრომოსომათა მუტაციების (აბერაციები, ანეუპლოიდია, პოლიპლოიდია, ფრაგილური საიტები, ერთძაფიანი წყვეტები, ქრომატიდთაშორისი გაცვლების დონის განსაზღვრა, 4. ძუძუს კიბოთი დაავადებული ინდივიდების გენომზე ლივაგენისა და კობალტის განმხოლოებული და ერთობლივი მოქმედების მაკორეგირებელი ეფექტის შესწავლა.

კვლევის ფარგლებში მიღებული შედეგებით დადგინდა, რომ ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულთ ინდივიდთა ლიმფოციტური კულტურების უჯრედებში უჯრედებში ადგილი აქვს ქრომატინის მოდიფიკაციურ ცვალებადობას (ჰეტეროქრომატინიზაციის მატებას); ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტურ კულტურებში გაზრდილია ჰომოლოგიურ ქრომოსომათა 15:15 ტიპის ქრომატიდული ასოციაციების სიხშირე, გამოხატული რიბოსომული ცისტრონების გაზრდილი ექსპრესიით, რომელიც წარმოადგენს აღნიშნული ავთვისებიანი სიმსივნისათვის სადიაგნოსტო მარკერს; დაავადებულთა ლიმფოციტური კულტურების უჯრედებში გაზრდილია ქრომოსომული არასტაბილურობის დონე (აბერაციები, ანეუპლოიდია, პოლიპლოიდია, ერთძაფიანი წყვეტები, ფრაგილური საიტები); პეპტიდურ ბიორეგულატორი ლივაგენი (Lys-Glu-Asp-Ala) ხასიათდება ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა შეცვლილი გენომის მაკორეგირებელი უნარით; მიღებულ

შედეგებს მნიშვნელობა აქვს დიაგნოსტიკისა და მკურნალობის ახალი სტრატეგიის განსაზღვრისათვის.

### **Annotation**

The work aimed to reveal the specific variation of the functional parameters of the genome in individuals suffering the ductal form of breast cancer and to determine the possibilities of its normalization.

The relevance of the presented research is due, on the one hand, to the epidemiology of breast cancer itself (the progressive nature of its frequency increase), on the other hand, to the importance of studying the variability of genomic parameters reflecting epigenetic regulation, which provides the opportunity to identify additional epigenetic factors specific to this disease and to correct them.

It should also be noted that breast cancer studies in this direction have not been conducted in Georgia, and therefore, the obtained results are original.

In accordance with the purpose of the research, the following tasks were set:

1. Evaluation of the general state of chromatin by determining the variation of chromatin loosening parameters using the differential scanning microcalorimetric method;
2. Determining the frequency of acrocentric chromosome associations and evaluating the activity of nucleolar organizing regions in certain chromosomes in patients with a ductal form of breast cancer, both to determine the intensity of synthetic processes and to identify a specific marker for this disease.
3. Determination of chromosome mutations (aberrations, aneuploidy, polyploidy, fragile sites, single strand breaks, level of sister chromatid exchanges;
4. Study of the corrective effect of Livagen and cobalt ions on the genome of individuals suffering from breast cancer.

The results obtained within the framework of the study determined that, in the lymphocyte cells of patients with ductal breast cancer, there is a modification of chromatin (increased heterochromatinization); In lymphocyte cultures of breast cancer patients is increased frequency of 15:15 type chromatid associations of homologous chromosomes, revealed by increased expression of ribosomal cistrons, is a diagnostic marker for this malignant tumor type. The level of chromosomal instability (aberrations, aneuploidy, polyploidy, single-strand breaks, fragile sites) is increased in the cells of lymphocyte cultures of ductal breast cancer patients; Peptide bioregulator Livagen (Lys-Glu-Asp-Ala) is characterized by its ability to regulate the altered genome of individuals suffering from ductal breast cancer. The obtained results are important for determining a new strategy for diagnosis and treatment.

## სარჩევი

1. შესავალი -----	5
2. ლიტერატურის მიმოხილვა -----	9
2.1. ძუძუს კიბოს განვითარების რისკ-ფაქტორები-----	9
2.2. ძუძუს კიბოს ფორმები და მასთან დაკავშირებული გენები-----	9
2.3. ქრომოსომათა სტრუქტურული ცვლილებები-----	12
2.4. გენომის ფრაგილური საიტები-----	13
2.5. შვილეულ ქრომატიდთაშორისი გაცვლები-----	18
2.6 Ag - დადებითი ბირთვაკმაორგანიზებელი უბნების გამოვლენის სიხშირე და განაწილების თავისებურება აკროცენტრულ ქრომოსომებზე . ბირთვაკმაორგანიზებელი უბნები. მათი როლი რიბოსომების ფორმირებაში -----	20
2.7. მეტალთა იონების ბიოლოგიური აქტივობა-----	23
2.8. პეპტიდური ბიორეგულატორები -----	26
3. კვლევის მასალა და მეთოდика-----	29
3.1. კვლევის მასალა-----	29
3.2. კვლევის მეთოდები-----	29
3.2.1 . დიფერენციული სკანირების მიკროკალორიმეტრული მეთოდი-----	29
3.2.2. ადამიანის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტების კულტივირება-----	30
3.2.3. ქრომოსომული მუტაციების აღრიცხვის მეთოდი-----	31
3.2.4. ფრაგილური საიტების გამოვლენისა და აღრიცხვის მეთოდი-----	31
3.2.5. ქრომატინის ერთძაფიანი წყვეტების გამოვლენის მეთოდი - Comet assay-----	32
3.2.6. შვილეულ ქრომატიდთაშორისი გაცვლების (შქგ) გამოვლენის მეთოდი-----	33
3.2.7. აკროცენტრულ ქრომოსომათა ასოციაციათა აღრიცხვის მეთოდი-----	34
3.2.8. ბირთვაკმაორგანიზებელი უბნების გამოვლენის მეთოდი-----	35
3.2.9. G-ბენდირების მეთოდი-----	35
4. მიღებული შედეგები და განსჯა-----	37
4.1. ჰეტეროქრომატინიზაციის დონის განსაზღვრა ძუძუს კიბოთი დაავადებულეებში დიფერენციული სკანირების მიკროკალორიმეტრული მეთოდის გამოყენებით -----	37
4.2. გენომის სტაბილურობის დონის ცვალებადობის შეფასება ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტებზე ბიორეგულატორისა და მეტალის განმხილვით და ერთობლივი მოქმედების დროს-----	39

4.2.1. ფრაგილური საიტების სიხშირისა და განაწილების შესწავლა ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტებზე ბიორეგულატორისა და მეტალის განმხოლოებული და ერთობლივი მოქმედების დროს-----	46
4.2.2. დნმ-ს ერთძაფიანი წყვეტების შემცველ უჯრედთა სიხშირის განსაზღვრა ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულ ინდივიდებში-----	52
4.3. შვილეულ ქრომატიდთაშორისი გაცვლების სიხშირისა და განაწილების შესწავლა ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტებზე ბიორეგულატორისა და მეტალის განმხოლოებული და ერთობლივი მოქმედებისას -----	53
4.4. Ag - დადებითი ბირთვაკმაორგანიზებული უბნების გამოვლენის სიხშირე და განაწილების თავისებურება აკროცენტრულ ქრომოსომებზე ბიორეგულატორისა და მეტალის ერთობლივი და განმხოლოებული ზემოქმედებისას ძუძუს სადინროვანი დაავადებულებში -----	58
4.5. ქრომატიდული ასოციაციების ტიპები და რიბოსომული ცისტრონების აქტივობის შეფასება ბიორეგულატორისა და მეტალის იონების განმხოლოებული და ერთობლივი მოქმედებისას ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულებში -----	66
4.5.1. ბიორეგულატორისა და მეტალის იონების კომბინირებული მოქმედება ქრომატიდული ასოციაციების ტიპების ინტენსივობაზე ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტური კულტურების უჯრედებში-----	68
5. დასკვნა-----	71
6. გამოყენებული ლიტერატურა-----	73
7. განმარტებები-----	84

## 1. შესავალი

### თემის აქტუალობა

ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაციის მონაცემებით მსოფლიოში დარეგისტრირებულია 18,1 მილიონი ადამიანი კიბოს პირველადად გამოვლენილი დიაგნოზით და კიბოთი სიკვდილის 9,6 მილიონი შემთხვევა. კიბოს სხვადასხვა ფორმით ავადობისას პირველ ადგილზე (ორივე სქესისათვის) ფილტვის კიბოა (11,6%), მეორეზე - ძუძუს კიბო (11,5%). 2020 წლის მონაცემებით ქალებში კიბოთი ავადობის სიხშირისა და ონკოლოგიური დაავადებებით გამოწვეული სიკვდილიანობის მიხედვით ძუძუს კიბო პირველ ადგილზეა (WHO.int./news-room 2023). მიღებულია, რომ კიბო ზოგადად ალბელ კონკრეტულ პათოლოგიას კი არ წარმოადგენს, არამედ დაავადებათა ჯგუფს, რომელიც 100-ზე მეტი ცალკეული ერთეულისაგან შედგება, და ამასთან, მათი განვითარების მექანიზმები განსხვავებულია. ნებისმიერ შემთხვევაში კიბოს განვითარებაში გენოტიპის როლი ძალიან მაღალია ავთვისებიანი ტრანსფორმაცია რთული, მრავალეტაპიანო პროცესია, რომელიც მოიცავს ონკოგენთა შემთხვევით აქტივაციას, სიმსივნის სუპრესორი გენების საილესინგს და ხორციელდება გენეტიკური და/ან ეპიგენეტიკური მოვლენების მეშვეობით. გასული საუკუნის 70-იან წლებში ა.კნუდსენის მიერ კიბოსთან დაკავშირებით გამოითქვა მოსაზრება, რომლის თანახმადაც ერთი სომატური მუტაცია უჯრედში მხოლოდ ზრდის რისკს უჯრედის ავთვისებიანი ტრანსფორმაციისა, იგივე გენის მეორე ალელის მუტაციური დაზიანება კი იწვევს უჯრედის უკონტროლო ზრდასა და სიმსივნის ფორმირებას (knudson's two-hit hypothesis for tumorigenesis involving a tumour suppressor genes). ეს თეორია ონკოლოგიაში ცნობილია კნუდსონის ორდარტყმიანი მოდელის სახელწოდებით.

თუ ადრეულ შრომებში კანცეროგენეზად მოიაზრებოდა მუტაციების დაგროვების ხანგრძლივი პათოფიზიოლოგიური პროცესი, რომელიც საბოლოოდ იწვევს სიმსივნის ფორმირებას, ბოლო წლების შრომებში პარალელურად სულ უფრო დიდი ყურადღება ეთმობა ეპიგენეზური სურათის ცვალებადობას. ეს გასაგებიცაა, რადგან ხშირ შემთხვევაში ადგილი აქვს მუტანტური გენების ჰეტეროზიგოტულ მატარებლობას, და

ხშირად, ავთვისებიანად ტრანსფორმაციის მიზეზს მუტანტური ალელის ჰომოზიგოტურ მდგომარეობაში გადასვლა ანუ ახალი მუტაციის ფორმირება კი არ იწვევს, არამედ ნორმალური ალელის ეპიგენეზური გამორთვა.

მიღებულია, რომ კანცეროგენეზში ჩართული გენებია: ონკოგენები (პროტოონკოგენების მუტანტური ვარიანტები), სიმსივნის სუპრესორი გენები და რეპარაციის მარეგულირებელი გენები. ნაჩვენებია, რომ ეპიგენეზურ მექანიზმებს შორის, რომლებიც ჩართულნი არიან ეპიგენეზურ რეგულაციაში (გენების აქტივაცია-დეაქტივაციაში), გადამწყვეტ როლს ასრულებს ქრომატინის მოდიფიკაციური ცვალებადობა (ჰეტერო- და დეჰეტეროქრომატინიზაცია), რომელიც პირველადია როგორც მუტაგენეზთან, ისე რეპარაციულ პროცესებთან მიმართებაში (Lezhava et al., 2008).

რაც შეეხება ძუძუს კიბოს, მისი გაჩენის სიხშირეს ზრდის, პირველ რიგში, BRCA1 და BRCA2 გენების მუტაციები. ამ გენების მუტაციებით არის განპირობებული ძუძუს კიბოთი ავადობის 87%. ძუძუს კიბო მემკვიდრულ წინასწარგანწყობის დაავადებას წარმოადგენს, რაც დასტურდება BRCA1 და BRCA2 გენების მუტანტური ალელების მაღალი ჰეტეროზიგოტული მატარებლობით და ანამნეზში ოჯახური შემთხვევების არსებობით. სავარაუდოა, რომ მუტანტური ალელების ჰომოზიგოტიზაციის გარდა, (რაც რეპარაციის დარღვევასა და ახალი მუტაციების წარმოქმნასთან არის დაკავშირებული), გარკვეულ როლს ძუძუს კიბოს წარმოქმნაში ქრომატინის მოდიფიკაციური (ეპიგენეზური) ცვალებადობა უნდა ასრულებდეს. ამის დადასტურება შესაძლებელია ეპიგენეზური რეგულაციის ამსახველი გენომის ფუნქციური პარამეტრების ცვალებადობის შესწავლით. ასეთ გენომურ პარამეტრებს წარმოადგენს: ქრომოსომათა სტრუქტურულ-რაოდენობრივი ცვლილებების მაჩვენებელი, ქრომატინის ზოგადი კონდენსაციის ცვალებადობის მაჩვენებელი, აკროცენტრულ ქრომოსომათა ასოციაციური აქტივობის მაჩვენებელი. ყველა ეს გენომური პარამეტრი მჭიდროდ არის დაკავშირებული გენომის ფუნქციონირებასთან და იძლევა როგორც ქრომატინის ზოგადი მდგომარეობის შეფასების, ასევე ძუძუს კიბოსათვის დამატებითი სპეციფიკური მარკერების გამოვლენის შესაძლებლობას.



გამომდინარე იქიდან, რომ ეპიგენეზური ცვალებადობა შექცევად ხასიათს ატარებს, დგება, აგრეთვე, ამ ცვალებადობის ნორმალიზაციის საკითხი, ანუ ისეთი საშუალებების მოძიება, რომელთაც ძუძუს კიბოს შემთხვევაში შეცვლილი გენომური პარამეტრების კორექციის უნარი აქვთ. ამ კუთხით, პირველ რიგში, ყურადღებას იპყრობს გერიატრიულ პრაქტიკაში გამოყენებული ახალი თაობის სინთეზური რეგულატორული ოლიგონუკლეოტიდები. ზოგიერთი მათგანისათვის ნაჩვენებია პათოლოგიის ზეგავლენით მოდიფიცირებული - ჰეტეროქრომატინიზირებული ქრომატინის ნორმალიზაციის უნარი (Lezhava et al., 2008).

აღნიშნულიდან გამომდინარე, წარმოდგენილი კვლევის აქტუალობა განპირობებულია, ერთი მხრივ, საკუთრივ ძუძუს კიბოს ეპიდემიოლოგიით (მისი სიხშირის ზრდის პროგრესული ხასიათით), მეორე მხრივ, ეპიგენეტიკური რეგულაციის ამსახველი გენომური პარამეტრების ცვალებადობის შესწავლის მნიშვნელობით, რაც ამ დაავადებისათვის სპეციფიკური დამატებითი ეპიგენეზური ფაქტორების გამოვლენისა და მათი კორექციის შესაძლებლობას იძლევა.

აღსანიშნავია ისიც, რომ ძუძუს კიბოს კვლევები ამ მიმართულებით საქართველოში (ქართულ პოპულაციაში), არ ჩატარებულა, და, შესაბამისად, მიღებული შედეგები ორიგინალურია.

**სამუშოს მიზანს** წარმოადგენდა გენომის ფუნქციური პარამეტრების სპეციფიკური ცვალებადობის გამოვლენა ძუძუს კიბოს სადინროვანი ფორმით დაავადებულ ქართული პოპულაციის ინდივიდებში, და მისი ნორმალიზაციის შესაძლებლობების დასახვა.

კვლევის მიზნის შესაბამისად დასახული იყო შემდეგი **ამოცანები**:

- ქრომოსომათა მუტაციების (აბერაციები, ანეუპლოიდია, პოლიპლოიდია, ფრაგილური საიტები, ერთმაფიანი წყვეტები, ქრომატიდთაშორისი გაცვლების დონის განსაზღვრა,
- ქრომატინის ზოგადი მდგომარეობის შეფასება, ქრომატინის ლლობის პარამეტრების ცვალებადობის დადგენის გზით, დიფერენცირებული სკანირების მიკროკალორიმეტრიული მეთოდის გამოყენებით.

- აკროცენტრულ ქრომოსომათა ასოციაციების სიხშირის დადგენა და გარკვეულ ქრომოსომებში ბირთვაკმაორგანიზებული უბნების აქტივობის შეფასება ძუძუს კიბოს სადინროვანი ფორმით დაავადებულებში, როგორც სინთეზური პროცესების ინტენსივობის განსაზღვრის, ისე ამ დაავადებისათვის სპეციფიკური მარკერის გამოსავლენად.
- ძუძუს კიბოთი დაავადებული ინდივიდების გენომზე ლივაგენისა და კობალტის განმხილოებული და ერთობლივი მოქმედების მაკორეგირებელი ეფექტის შესწავლა.

## 2.ლიტერატურის მიმოხილვა

### 2.1. ძუძუს კიბოს განვითარების რისკ-ფაქტორები

ძუძუს კიბო არის კომპლექსური დაავადება, რომელიც განპირობებულია გენეტიკური და გარემო ფაქტორების ზემოქმედებით (Martin, Weber 2000). სარძევე ჯირკვლის კიბოსთან მიმართებაში არ არის გამოვლენილი ერთი რომელიმე სპეციფიკური ფაქტორი, თუმცა ცნობილია რისკ-ფაქტორების ჯგუფი, რომლებიც მნიშვნელოვნად ზრდიან აღნიშნული დაავადების განვითარების ალბათობას. პირველ ხარისხოვან რისკ-ფაქტორებს წარმოადგენს გენეტიკური და ჰორმონალური ფაქტორები. ძუძუს კიბოს განვითარება ძირითადად დაკავშირებულია ორ დომინანტურ გენში BRCA1 და BRCA2-ში მუტაციების წარმოქმნასა და არასრულფასოვან ფუნქციონირებასთან. აღსანიშნავია, რომ ასაკის ზრდასთან ერთად, ძუძუს კიბოს განვითარების რისკიც იმატებს და მისი სიხშირე 40-50 წლის ასაკისათვის პიკს აღწევს. დაახლოებით ორჯერ იმატებს ძუძუს კიბოს რისკი ქალებში, რომელთაც აქვთ ადრეული მენარქე - 12 წლამდე და გვიანი მენოპაუზა - 55 წლის ზევით. ასევე ორჯერ მეტია იმ ქალთა ძუძუს კიბოთი დაავადების სიხშირე, ვისაც პირველი მშობიარობა 30 წლის ასაკის ზევით ჰქონდათ. რისკი მკვეთრად მატულობს ხშირი აბორტებისას და მშობიარობის არარსებობის შემთხვევაში. მნიშვნელოვანია ლაქტაციის პერიოდი მინიმუმ 6 თვემდე, ამ დროს რისკი 20%-ით მცირდება. ფონური დაავადებები, სასქესო ორგანოების ანთებები, ფარისებრი ჯირკვლის დაავადებები, სარძევე ჯირკვლის ტრავმები, ჰორმონალური პრეპარატები, ფსიქიური სტრესი, ეკოლოგია, ცხოვრების წირი, ეს ყველაფერი ძუძუს კიბოს განვითარების რისკ-ფაქტორებს მიეკუთვნება (Martin, Weber 2000).

### 2.2. ძუძუს კიბოს ფორმები და მასთან დაკავშირებული გენები

ძუძუს კიბოს მემკვიდრული ფორმის განვითარება ძირითადად დაკავშირებულია ორ დომინანტურ გენში BRCA1 და BRCA2-ში (სურ.2.2.1.) მუტაციების გაჩენასა და ამ გენების არასრულფასოვან ფუნქციონირებასთან (Shiovitz, Korde, 2015). BRCA1 და BRCA2 გენების საფუძველზე კოდირებული ცილების ძირითად ფუნქციას წარმოადგენს უჯრედული გენომის სტაბილურობის შენარჩუნება. ეს ცილები პასუხისმგებელი არიან დნმ-ის

რეპარაციაზე. თუ რომელიმე უჯრედში არ ხდება დნმ-ის სტრუქტურის ზუსტი აღდგენა, აღნიშნული გენები რთავენ აპოპტოზის მექანიზმს და უჯრედი იღუპება.

BRCA1 გენის დეფექტი ავთვისებიან სიმსივნის გაჩენას იწვევს შემთხვევათა 85%-ში. BRCA1 გენი ლოკალიზებულია მე-17 ქრომოსომის გრძელი მხრის მედიალურ უბანში (17q21) და შეიცავს 38,449,839-დან 38,530,993 გენს. BRCA1 გენი აკოდირებს ბირთვულ ფოსფოპროტეინს, რომელიც მონაწილეობს გენომის სტაბილიზაციის შენარჩუნებაში და მოქმედებს, როგორც სიმსივნის სუპრესორი. დნმ-ის დაზიანების სენსორებთან და სიგნალ-ტრანსდუქციულ ცილებთან ერთად იგი აყალიბებს მულტიპროტეინულ კომპლექსს, რომელიც ცნობილია BASC-ს სახელწოდებით. ეს პროტეინი მონაწილეობს ტრანსკრიპციაში, დნმ-ის რეპარაციაში და რეკომბინაციაში. მუტაციები ამ გენში შემთხვევათა 40%-ში იწვევს ძუძუს ავთვისებიან სიმსივნეს. გენის სტრუქტურულ და ფუნქციურ ცვლილებებში მთავარ როლს ალტერნატიული სპლაისინგი თამაშობს. დადგენილია, რომ BRCA დომენში BRCA1-ის ნუკლეოტიდური ცვლილება აზიანებს ამ პროტეინის კავშირს p-53-თან. BRCA1 გენტან დაკავშირებულია 600-მდე მუტაცია, რომლებიც ასოცირებულია სიმსივნის განვითარების მაღალ რისკთან. მრავალი მათგანი იწვევს ამინომჟავის შეცვლას BRCA1 პროტეინში. ამის გამო პროტეინი ვეღარ მონაწილეობს დნმ-ის რეპარაციაში.

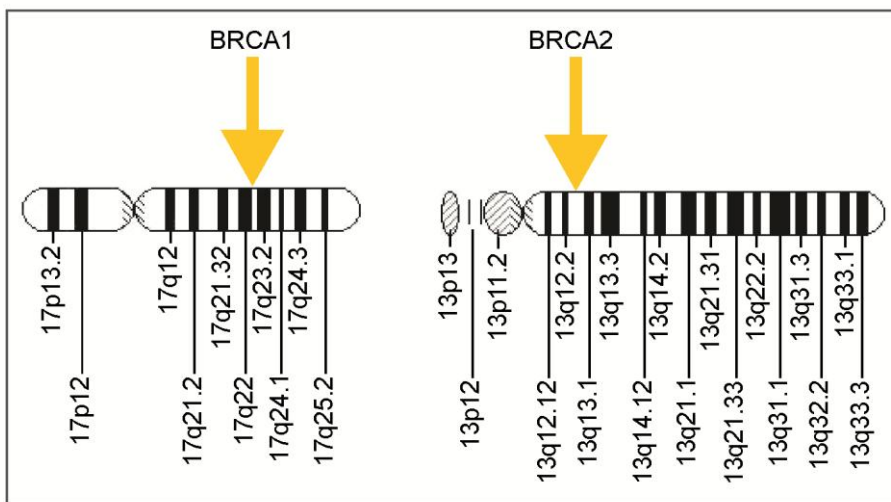
BRCA2 გენი მიეკუთვნება სიმსივნის სუპრესორ გენებს. მსგავსად სხვა სიმსივნის სუპრესორი გენებისა, BRCA2 გენი ხელს უშლის უჯრედების სწრაფ ზრდასა და დაყოფას არაკონტროლირებადი გზით. BRCA2 გენი ლოკალიზებულია მე-13 ქრომოსომაში, კერძოდ 13q12 მდგომარეობაში. მოლეკულური ლოკალიზაცია 31787616-დან 31871804 ნუკლეოტიდურ წყვილამდე. BRCA2 გენი აკოდირებს ცილას, რომელიც ჩართულია დაზიანებული დნმ-ის აღდგენაში. დაზიანებები შეიძლება გამოწვეულ იქნას ბუნებრივი, რადიაციული ან სხვა გარემო ფაქტორებით. დნმ-ის რეპარაციის გზით ეს პროტეინი ხელს უწყობს უჯრედის გენეტიკური ინფორმაციის სტაბილიზაციას. BRCA2 გენში აღმოჩენილია 450-ზე მეტი მუტაცია. მათი უმეტესობა იწვევს ძუძუს კიბოს. მუტაციები ძირითადად გამოწვეულია ნუკლეოტიდური წყვილების ამოვარდნით ან ჩართვით BRCA2 გენში. უმეტესობა ამ მუტაციებისა არღვევს ნორმალური პროტეინის

პროდუქციას, რაც გამოიხატება ანომალურად პატარა, არაფუნქციური BRCA2 პროტეინის სინთეზში. ამგვარი დეფექტური პროტეინი ვერ ახორციელებს დაზიანებული დნმ-ის აღდგენას, ხდება მუტაციების დაგროვება, რაც განაპირობებს უჯრედების არაკონტროლირებულ დაყოფასა და სიმსივნის განვითარებას.

სიმსივნის სუპრესორი გენების მუტაციებით ინდუცირებული ავთვისებიანი სიმსივნეების დროს ძირითად როლს ასრულებს ამ მუტაციათა ჰომოზიგოტიზაცია, ანუ კონსტიტუციური ჰეტეროზიგოტურობის დაკარგვა. სიმსივნის სუპრესორი გენებისათვის დამახასიათებელია დამემკვიდრების აუტოსომურ-რეცესიული ტიპი, რის გამოც ალელის ჰეტეროზიგოტური მდგომარეობისას სიმსივნის განვითარება არ ხდება. კანცეროგენეზის მექანიზმების რეალიზაციას ადგილი აქვს მხოლოდ მუტანტური ალელის ჰომო- ან ჰემიზიგოტური მდგომარეობის დროს. სომატურ უჯრედებში, მათი ცხოველმყოფელობის პროცესში მიმდინარეობს მუტაციური პროცესი, რის გამოც უჯრედმა შეიძლება დაკარგოს მოცემული ალელის მიმართ ჰეტეროზიგოტურობა. მუტაციების მიზეზები შეიძლება განსხვავებული იყოს. ხშირად ასეთი მიზეზი რადიაციაა. დადგენილია, რომ მე-17 და მე-13 ქრომოსომებში ლოკალიზებული BRCA1 და BRCA2 მუტანტური გენების თითო ალელის მქონე ჰეტეროზიგოტი ინდივიდები მაღალ მგრძობელობას იჩენენ რადიაციული გამოსხივების მიმართ. გამოსხივების დროს შესაძლებელია მოხდეს აღნიშნული გენების შესაბამის ნორმალურ ალელში დნმ-ს მოლეკულის მუტაცია.

გარდა BRCA გენებისა, მკერდის ავთვისებიანი მემკვიდრული სიმსივნის განვითარება დაკავშირებულია სხვა გენებთანაც: FHIT, RBSA 1, RBSA 2, APC, MCC, HPMS 1. მემკვიდრეობითი შემთხვევების 25%-მდე განპირობებულია ამათაგან ერთ-ერთი იშვიათი, მაგრამ მაღალი პენეტრანტობის მქონე გენის მუტაციით (BRCA1, BRCA2, PTEN, TP53, CDH1 და STK11), რაც იწვევს სიცოცხლის განმავლობაში ძუძუს კიბოს განვითარების რისკის 80%-მდე გაზრდას. შემთხვევების დამატებით 2%-3% განპირობებულია იშვიათი, ზომიერი პენეტრანტობის გენის მუტაციით (მაგ. CHEK2, BRIP1, ATM და PALB2), რომელთაგან თითოეული დაკავშირებულია რისკის ორმაგ ზრდასთან (Shiovitz, Korde, 2015). ყველა სახის ავთვისებიანი გადაგვარების 50%

დაკავშირებულია სიმსივნის სუპრესორ p53 გენტან. დნმ-ს დაზიანების დროს, დარღვევების გამოსასწორებლად მოქმედებს რეპარაციული ფერმენტული სისტემა. თუ დაზიანებული უბნების რეპარაცია არ ხორციელდება, მაშინ უჯრედი ექვემდებარება აპოპტოზს. სხვა შემთხვევაში დაზიანებულ დნმ-ს უერთდება p53 გენის პროდუქტი - ცილა p53, რომელიც მოქმედებს, როგორც ტრანსკრიფციის ფაქტორი. ერთ-ერთი გენი, რომელიც იღებს p53-დან სიგნალს არის გენი WAF1. ამის შემდგომ სინთეზირდება WAF1 გენის პროდუქტი - ცილა p21, რომელიც უკავშირდება Cyc/CDK და აჩერებს კინაზურ აქტივობას, რომელიც აუცილებელია, რომ უჯრედი გადავიდეს G1 ფაზიდან S ფაზაში. G1 ფაზის შეჩერება უჯრედს აძლევს დროს რათა განახორციელოს რეპარაციული სისტემის ინდუცირება და დასხივებით გამოწვეული დაზიანებული დნმ-ს მოლეკულის აღდგენა (Georgiev, 2000).



**სურ.2.2.1.** ნაჩვენებია BRCA1 და BRCA2 გენების ქრომოსომული მდებარეობის სქემა (Mohammed A. 2014. Genetic Cancer Ovary)

### 2.3. ქრომოსომათა სტრუქტურული ცვლილებები

ქრომოსომა ბირთვის მუდმივი კომპონენტია, მისთვის დამახასიათებელია განსაკუთრებული ორგანიზაცია, ინდივიდუალობა, ფუნქცია და რეპლიკაცია, უჯრედთა გამრავლების ციკლში მას აქვს სპირალიზაციისა და დესპირალიზაციის უნარი და უჯრედთა თაობებში ინარჩუნებს ავტონომიურ თვისებებს (Lezhava, 1999). ადამიანის სომატურ უჯრედებში ქრომოსომული აბერაციების ფორმირების კანონზომიერი

პროცესის შესწავლა დიდ ყურადღებას იპყრობს იმ ფაქტორებთან კავშირში, რომლებიც გავლენას ახდენენ ინდუცირებული მუტაგენეზის ინტენსივობაზე. სპონტანური ქრომოსომული აბერაციები ფორმირდება სხვა და სხვა აგენტების გავლენით, რომელთა ზემოქმედებაც იწვევს ქრომოსომათა ინდუცირებულ მუტაციებს. მათ შორისაა ქიმიური, რადიაციული, ვირუსული აგენტები, რომლებიც ჩვეულებრივ არსებობს გარემოში ან წარმოიქმნება მეტაბოლიზმის პროცესში. ლიტერატურული მონაცემებით ნაჩვენებია, რომ აბერანტული ქრომოსომების მქონე უჯრედების სიხშირე საშუალო ასაკის ინდივიდთა უჯრედულ კულტურებში ძირითადად ვარიებს 0,03% – 2,5% –მდე (Lezhava, 2006). ქრომოსომათა სტრუქტურული მუტაციები შესაძლოა იყოს ერთი ან რამდენიმე გაწყვეტისა და შეერთების შედეგი, ბალანსირებულ მდგომარეობაში გადაეცემა (ან არ გადაეცემა) მემკვიდრეობით. ჩატარებული კვლევების (Lezhava, 1999, 2006) შედეგებმა 20–დან 48 წლამდე ასაკის ინდივიდებში (23 ქალი და 25 კაცი) აჩვენა, რომ აბერანტული ქრომოსომების შემცველი უჯრედების რაოდენობა ორივე სქესის ინდივიდებში საშუალოდ შეადგენდა 1,26+0,47 %-ს ქალებში და 1,57+0,51%-ს მამაკაცებში. ქრომოსომული აბერაციების ტიპების ანალიზმა აჩვენა, რომ საშუალო ასაკის ინდივიდთა უჯრედებში წარმოიქმნება როგორც ქრომოსომული, ასევე ქრომატინული ტიპის აბერაციები. ქრომოსომული დარღვევების ძირითად ფორმას წარმოადგენს ერთეული და წყვილი ფრაგმენტები. გაცილებით იშვიათად ვლინდება დიცენტრული ქრომოსომები, ქრომოსომული და ქრომატიდული ტრანსლოკაციები და ატიპიური ქრომოსომები (Lezhava, 1999).

#### **2.4. გენომის ფრაგილური საიტები**

ადამიანის გენომისთვის დამახასიათებელია ნუკლეოტიდთა გარკვეული თანამიმდევრობის რამდენიმე ასლის სახით არსებობა. განასხვავებენ ტანდემურ (ერთმანეთის მიყოლებით განლაგებულ) და მთელ გენომში დისპერგირებულ განმეორებადობებს. ტანდემურად გამეორებად თანამიმდევრობებში ზომების მიხედვით გამოყოფენ მინი - (10-20-მდე ნუკლეოტიდური წყვილი) და მიკროსატელიტურ (2-5 ნ.წ.) განმეორებადობებს. მინისატელიტები ძირითადად ტელომერების მახლობლად არის

კლასტერიზებული, მიკროსატელიტები კი მთელს გენომშია გაფანტული (Mirceta et al., 2022). ეს უკანასკნელი გამოყენებას პოვნებს სამედიცინო გენეტიკაში სხვადასხვა დაავადებათა კარტირებისათვის.

ტრინუკლეოტიდური გამეორადობები მიკროსატელიტების ერთ-ერთ კლასს წარმოადგენს. ტანდემური ტრინუკლეოტიდური გამეორადობების საფუძველზე ხდება ე.წ. „დინამიური მუტაციების“, წარმოქმნა, რომლებისთვისაც ნიშანდობლივია ამ განმეორებადობათა ასლების რაოდენობის ზრდა როგორც გენის რეგულატორულ, ისე ტრანსლირებად ნაწილებში (Richards and Sutherland, 1992; Weber and Wong, 1993). ნორმაში ზოგიერთი გენისათვის დამახასიათებელია ტრინუკლეოტიდურ განმეორებათა გარკვეული რიცხვი. ნორმალურ ალელებში განმეორებათა რიცხვი შეიძლება ვარიირებდეს რამდენიმე ათეულიდან რამდენიმე ასეულამდე. რიგ შემთხვევაში ადგილი აქვს ტრინუკლეოტიდური განმეორებადობების ექსპანსიას – ასლების რაოდენობის ზრდას სპეციფიკური კრიტიკული ზღვრის ზევით. ქრომოსომებზე ასეთი ექსპანსირებული ტრინუკლეოტიდური განმეორებადობების ლოკალიზაციის უბნები უფრო მგრძნობიარეა გენეტიკური სტრუქტურის ცვლილების თვალსაზრისით, ხასიათდება მაღალი მიდრეკილებით გაწყვეტებისადმი, გვიან რეპლიცირებს (Wang et al., 1999) და ეწოდება ფრაგილური (მსხვრევადი) საიტები (Hecht, 1969).

ფრაგილური საიტები ქრომოსომებზე ვლინდება: ცვალებადი სიგრძის მქონე შეუღებავი უბნის - გეპის სახით, რომელიც ჩვეულებრივ, ორივე ქრომატიდას მოიცავს; მეორადი ჭიმის სახით; დაუსრულებელი ქრომატიდული ან იზოქრომატიდული წყვეტების სახით. ფრაგილური საიტების საფუძველზე შემდგომში ხდება ქრომოსომული მუტაციების ფორმირება. რიგი ფრაგილური საიტებისათვის დადგენილია მემკვიდრეობით გადაცემის უნარი და დამემკვიდრების დომინანტური ხასიათი. ცალკეულ ინდივიდთა და მათი სისხლით ნათესავების უჯრედების ქრომოსომებზე ფრაგილურ საიტებს ერთი და იგივე ლოკალიზაცია აქვთ (M.Mirceta, 2022).

ფრაგილური საიტები კლასიფიცირდება ორი მიმართულებით: 1. პოპულაციაში გავრცელების სიხშირის მიხედვით, სადაც გამოიყოფა 2 შტო: 1) იშვიათი (rare ~2%) ფრაგილური საიტები, რომლებიც ძირითადად ვლინდება ფოლატითა და



თიმიდილატიტ დამუშავების შედეგად. ფოლატ-მგრძნობიარე მუტაციებს ადგილი აქვს CCG განმეორებებით მდიდარ უბნებში. ყველაზე კარგად შესწავლილი “იშვიათი” ფრაგილური საიტია FRAX, რომელიც გვხვდება ფრაგილურ X სინდრომიან ინდივიდებში (Coffee et al., 2002). იშვიათი ფრაგილური საიტები აღინიშნება მხოლოდ გარკვეულ ინდივიდებსა და მათ ნათესავებში. 2) ზოგადი (common ~50%) ფრაგილური საიტები. მათი ექსპრესია იზრდება დნმ-პოლიმერაზას ინჰიბიტორით უჯრედების დამუშავების შედეგად (Arlt et al., 2003; Sutherland, 2003). ფრაგილური საიტები აღმოჩენილია ადამიანში, პრიმატებში, თაგვებში და შესაძლოა იყოს საფუარშიც კი. იმისათვის, რომ ზოგადი ფრაგილური საიტების ქრომოსომებში მდებარეობა, ისევე როგორც გეპების, გახდეს ხილული, უჯრედმა უნდა გაიაროს რეპლიკაციური სტრესი (Helmrich et al., 2006). ფრაგილური საიტები წარმოადგენენ რიგ პათოლოგიათა ფორმირების მოლეკულურ საფუძველს, რომლებსაც ტრინუკლეოტიდურ გამეორებადობათა ექსპანსიის დაავადებებს უწოდებენ. ფრაგილური საიტების ექსპანსიით არის განპირობებული მთელი რიგი ნეიროდეგენერაციული და ნეიროკუნთოვანი მემკვიდრული დაავადებები.

არსებობს ფრაგილური საიტების ექსპრესიის მექანიზმების რამდენიმე სავარაუდო ახსნა. მიიჩნევენ, რომ ფრაგილური საიტების ერთ-ერთი ფორმის გეპების გამოვლენა განპირობებულია დნმ-ის დესპირალიზაციით. პროცესში ჩართულია თავად დნმ, ჰისტონები, არაჰისტონური ცილები და ორვალენტანი იონები. აღინიშნება აგრეთვე, რომ გეპები დასაშვებია მოიცავდეს დნმ-ში კოდირებულ ინფორმაციას. შემთხვევითი (სპორადული) ქრომატიდული გეპები შესაძლოა გამოიწვიოს G1 G2 ფაზაში მიმდინარე პროცესებმა.

აგრეთვე აღსანიშნავია მეთილირების და აცეტილირების როლი გენის ტრანსკრიპციის პროცესში, რომელიც თავის მხრივ ჩართულია ფრაგილური საიტების ექსპრესიაში. H3 ჰისტონის მე-4 და მე-9 ლიზინის მეთილირება განაპირობებს ტრანსკრიპციის რეპრესიას და ჰეტეროქრომატინის წარმოქმნას, რაც FMR1 გენში იწვევს მუტაციას რომელიც საფუძველი ხდება ფრაგილური X სინდრომისა. H3 ჰისტონის მე-9 ლიზინის

მეთილირების შემცირება შესაძლებელია თუ FRAX-იან უჯრედზე ვიმოქმედებთ ჰისტონის დეაცეტილირების ინჰიბიტორით ანუ აცეტილტრანსფერაზებით, რომელიც აღადგენს H4 ჰისტონის აქტივაციას, ეს კი თავის მხრივ იწვევს ტრანსკრიფციის გააქტივებას.

დნმ-ის ინჰიბიტორის დეოქსიცითიდინის მოქმედების შედეგად FMR1 გენში დნმ-ის მეთილირება აღარ ხდება და აქტივირდება გენის ტრანსკრიპცია. დნმ-ის მეთილირება უკვე დიდხანია ასოცირდება გენის ტრანსკრიპციის რეპრესიასთან. დნმ-ის მეთილირება შეიძლება პირდაპირ იყოს დაკავშირებული გენის გაჩუმებასთან, რომელშიც მონაწილეობენ ტრანსკრიპციის ინჰიბიტორები (Coffee et al., 2002).

ფრაგილური საიტების (როგორცაა პრაქტიკულად ყველა იზოქრომატიდული გეპები) ექსპრესიის სიხშირე შესაძლოა შეიცვალოს საკულტივაციო არის შემადგენლობის ცვლილებით, მაშინაც კი თუ დამატებული აქვს კოლხიციანი. ამ საიტების ექსპრესიაზე შეიძლება პირდაპირ გავლენას ახდენდეს გვიანდელ G1, G2 ან ადრეულ პროფაზაში ქრომატიდების სპირალიზაცია.

ფრაგილური საიტების ექსპრესია შესაძლოა გამოიწვიოს ვირუსული დნმ-ის ურთიერთქმედებამ, მაგრამ ვირუსს შეუძლია მხოლოდ დნმ-ის სპეციფიურ თანმიმდევრობას შეუცვალოს სახე. მაგ. ადენოვირუსი-პირველ და მე-17 ქრომოსომაზე იწვევს ფრაგილური საიტების მსგავს სპეციფიკურ ზედაპირულ დაზიანებას.

ფრაგილური საიტების ექსპრესიის მომატება ინდუცირდება მეტატრექსატით. იგი აფერხებს DHF DHFA-ს გარდაქმნას THFA-დ, რაც მიიღწევა დიჰიდროფოლატ-რედუქტაზას მეშვეობით. ეს კი არის dTMP-ს წარმოქმნის მექანიზმი. ტრიმეთოპრიმი იწვევს fra(X) ექსპრესიის მატებას იგივე გზით, როგორც მეტატრექსატი. ვარაუდობენ, რომ ფრაგილური საიტების ექსპრესია არის არა დნმ-ის სინთეზის ინჰიბირების შედეგი, არამედ გამოწვეულია dTMP-ს წარმოქმნის სპეციფიური ინჰიბირებით.

ზოგადი ფრაგილური საიტების მდებარეობის გამომჟღავნება, როგორც საიტ-სპეციფიკური გეპების და ქრომატიდული წყვეტების სახით, მაშინ როცა უჯრედი დამუშავებულია დნმ-ის სინთეზის ინჰიბიტორით ან აფედიქოლინით. ფრაგილურ საიტებს ემახიან აგრეთვე ცხელ ადგილებს (hot spots), შვილეულ ქრომატიდში

ცვლილებების, ტრანსლოკაციების და დელეციების გამო, აგრეთვე უჯრედულ კულტურაში პლაზმიდის ინტეგრაციისას მიმდინარე რეპლიკაციური სტრესის გამო.

ზოგადი ფრაგილური საიტების რეპლიკაციის შესწავლით აღმოჩნდა რომ მათი რეპლიკაცია ხდება გვიან. აფედიქოლინის და დნმ პოლიმერაზა A-ს ინჰიბიტორის დამატებით, რეგიონები რეპლიცირდება ერთნაირად გვიან. გვიანი ან შენელებული რეპლიკაცია ხელს უწყობს ფრაგილური საიტების არასტაბილურობას და არარეპლიცირებული დნმ-ის ჩართვას G2 ფაზაში.

რეპლიკაციის მაკონტროლებელი წერტილი და ცილა ATR (რეპარაციაზე პასუხისმგებელი ცილა) არის მნიშვნელოვანი ფრაგილური საიტების სტაბილურობაში. რომლებიც წარმოადგენენ დნმ-ის დამცველებს ფრაგილური საიტების გაწყვეტებისაგან რეპლიკაციის განმავლობაში. ვინაიდან ფრაგილური საიტები განლაგებულია სიმსივნესთან ასოცირებულ გენებთან ახლოს, შესაძლოა ATR ცილების დეფექტი მონაწილეობდეს სიმსივნის პროგრესირებაში.

კასპერმა აღმოაჩინა (Dennis L Kasper,2018), რომ ფრაგილურ საიტებში გაწყვეტები A ATR ცილების არ არსებობისას კონტროლთან შედარებით მომატებული იყო 8-10-ჯერ. აგრეთვე აფედიქოლინის მოქმედებისას თუ უჯრედში არ არსებობს ATR ცილები, წარმოიქმნება გაცილებით მეტი წყვეტები. უჯრედის რეპლიკაციის მაკონტროლებელ ჯაჭვში A ATR ცილები არეგულირებენ რამდენიმე მნიშვნელოვანი ცილის აქტიურობას, მაგ. B BRCA ცილა. ATR ცენტრალურ როლს თამაშობს რეპლიკაციურ ჩანგლის სტაბილიზაციაში, S და G2/M უჯრედული ციკლის მაკონტროლებელ წერტილის ინდუქციაში რეპლიკაციის ინჰიბირების შემდეგ .

არის მოსაზრება , რომ ფრაგილური საიტები შეიძლება იყოს ცალ ძაფიანი, რომლის მიზეზია მეტაფაზური ქრომოსომების არარეპლიცირებული რეგიონების არსებობა და რეპლიკაციური ჩანგლის შესუსტება, მათ შესაძლოა საწყისი მისცენ წყვილ ძაფიან წყვეტებს( DSBs ) ზოგიერთ ქრომოსომაში (Shibo Li,2020).

როგორც ვხედავთ ATR და BRCA1 როლი უჯრედში მნიშვნელოვანია. BRCA 1 იღებს მონაწილეობას ზოგად ფრაგილური საიტების სტაბილურობაში, მისი ნაკლებობისას იზრდება გეპების და ფრაგილური საიტების რიცხვი. BRCA 1 გენის მუტაციისას, HCC1937

სარმევე ჯირკვლის უჯრედებში მომატებულია ფრაგილური საიტების ექსპრესია. თავის ემბრიონულ ფიბრობლასტის უჯრედებში ფრაგილური საიტების ექსპრესია მიგვითითებს BRCA1 გენის ფუნქციის დაქვეითებაზე (Martin et al., 2004).

ATR ცილების შესწავლის დროს კასპერი (Dennis L Kasper, 2018) დაინტერესდა “მონათესავე” ცილებით, რომლებიც აღმოაჩინეს რეპლიცირებული დნმ-ის სპეციფიური დაზიანების დროს. ATR პასუხისმგებელია რეპლიკაციის შეჩერებაზე დნმ-ის ორმაგი ძაფის გაწყვეტის დროს, დაზიანების აღდგენამდე. ATR-ის გარეშე უჯრედების შესწავლისას განსხვავება ფრაგილური საიტების არასტაბილურობაში, ნორმალურ უჯრედებთან შედარებით არ იქნა ნანახი.

## 2.5. შვილეულ ქრომატიდაშორისი გაცვლები

შვილეულ ქრომატიდაშორისი გაცვლების (შქგ) ფენომენი მდგომარეობს შვილეულ ქრომატიდებს შორის იზოლოკუსურ გაცვლებში, დუპლექსების აუცილებელი გაერთიანებით. შქგ-ს რაოდენობის განაწილება ქრომოსომებზე სრულიად პროპორციულია მათ შედარებით სიგრძისა და მათი შემადგენელი დნმ-ის რაოდენობისა. შქგ-ს სიხშირე მცირდება სტრუქტურული ჰეტეროქრომატინის განლაგების ადგილებში და ქრომოსომის ჰეტეროქრომატინიზებულ ნაწილებში (Lezhava, 1999, 2001). დადგენილია (Hoo, Perslow, 1979), რომ შქგ ძირითადად ხდება ევქრომატინულ რაიონებში.

დადგენილია, რომ შვილეულ ქრომატიდა შორის გაცვლები უჯრედებში მიმდინარე სომატური რეკომბინაციის გამოვლენაა. შქგ-ს წარმოქმნა, უცილობლად არის დაკავშირებული ისეთ ფუნდამენტურ გენეტიკურ პროცესებთან, როგორცაა რეპლიკაცია, რეპარაცია. ამ კავშირების გამოვლენა მნიშვნელოვანია არა მარტო შქგ-ს წარმოქმნის მექანიზმებში გარკვევისათვის, არამედ ეუკარიოტებში გენეტიკური მასალის ფუნქციონირების უფრო სრული გაგებისათვისაც.

შქგ-ს მოლეკულური მექანიზმებთან დაკავშირებული ჰიპოთეზები ძირითადად ორ ჯგუფად ერთიანდება: “რეპარაციული” ჰიპოთეზის თანახმად, შქგ არის პოსტრეპლიკაციური რეპარაციის მაჩვენებელი და “რეპლიკაციური”, რომლის

თანახმადაც, რეკომბინაციის განსახორციელებლად აუცილებელი გაწყვეტები დნმ-ში ხდება რეპლიცირებული რეპლიკონების კლასტერების საზღვარზე (Painter, 1980).

მრავალი მუტაგენი იწვევს შქგს წარმოქმნას, თუმცა განსხვავებული მუტაგენები ინდუცირებენ მათ განსხვავებული ეფექტურობით. ისეთი ძლიერი მუტაგენი, როგორც მაიონიზებული გამოსხივებაა, გაცვლების სუსტ ინდუქტორს წარმოადგენს, თუმცა ცნობილია, რომ რადიაციის მოქმედებისას ადგილი აქვს დნმ-ს წყვეტებს, რის შედეგადაც ხდება ქრომოსომული აბერაციების ფორმირება. ამდენად, გაუგებარია რადიაციის სუსტი ეფექტურობა შქგ-ს ინდუქციის თვალსაზრისით. მაიონიზებული გამოსხივებისაგან განსხვავებით, ულტრაიისფერი სხივები შქგ-ს ძალზე ეფექტურ ინდუქტორებს წარმოადგენენ (Лазутка, 1990).

არსებობს ისეთ აგენტთა მნიშვნელოვანი ჯგუფი, რომლებიც ზრდიან შქგ-ს სიხშირეს უჯრედის მეტაბოლიზმზე ზემოქმედების გზით, ისე, რომ უშუალოდ არ აზიანებენ გენეტიკურ აპარატს. ამ ჯგუფს მიეკუთვნება ნივთიერებები, რომლებიც აფერხებენ დნმ-ს ძაფის ელონგაციას – შარდოვანა, აფიდიკოლინი და სხვ. დნმ-ს რეპლიკაციის ინჰიბირებას ახდენენ ცილის სინთეზის ინჰიბიტორებიც (მაგ., ციკლოჰექსამიდი). შესაბამისად, ჰისტონების დეფიციტის გამო ფერხდება არა მხოლოდ ელონგაცია, არამედ რეპლიკაციის სხვა მექანიზმებიც.

როგორც ლიტერატურაში მიუთითებენ, შქგ-ს მოლეკულური მექანიზმების კვლევისათვის აუცილებელია მათი შესწავლა ინდუქტორებით და მოდიფიკატორებით ზემოქმედების პირობებში. აღინიშნება, რომ გაცვლების პროცესის მოდიფიკატორების ზემოქმედება შემდგომ შესწავლას მოითხოვს, თუმცა დაბეჯითებით შეიძლება ითქვას, რომ ყველა ნივთიერება, რომელიც გავლენას ახდენს რეპლიკაციაზე, გავლენას ახდენს, აგრეთვე, შქგ-ს ფორმირების პროცესზეც. უჯრედული ციკლის S-ფაზა კრიტიკულ წერტილს წარმოადგენს გაცვლების ფორმირებისათვის. უჯრედების დამუშავება გაცვლების ინდუქტორით შეიძლება მოხდეს უჯრედული ციკლის ნებისმიერ ფაზაში, მაგრამ შქგ-ს ფორმირებისათვის ქრომოსომამ აუცილებლად უნდა გაიაროს S-ფაზა. ნაჩვენებია, რომ გაცვლების საიტების ლოკალიზაცია ქრომოსომის გასწვრივ მჭიდროდ არის დაკავშირებული რეპლიკაციის უბნებთან (რეპლიკონებთან) (Painter, 1980)

2.6. Ag - დადებითი ბირთვაკმაორგანიზებელი უბნების გამოვლენის სიხშირე და განაწილების თავისებურება აკროცენტრულ ქრომოსომებზე. ბირთვაკმაორგანიზებელი უბნები. მათი როლი რიბოსომების ფორმირებაში.

ადამიანის ათივე აკროცენტრული ქრომოსომის მოკლე მხარი, კლასიკურ შემთხვევაში, შედგება სამი ნაწილისაგან: მოკლე სეგმენტისაგან – რომელიც განლაგებულია ცენტრომეროს რაიონთან, ძაფისაგან („Stalk“) – რომელიც წარმოადგენს მოკლე მხრის მეორად ჭიმს (ბირთვაკის ორგანიზატორი) და პატარა, კომპაქტური სხეულაკის – თანამგზავრისაგან (სურ.2.6.1.)

დადგენილია, რომ ადამიანის აკროცენტრულ ქრომოსომათა თანამგზავრის ძაფს და თანამგზავრს ახასიათებს ძალზედ ფართო სპექტრი ფენოტიპური ცვალებადობის გამოვლენისა, რაც დაკავშირებულია იმ ქრომოსომების კონდენსაციის ლაბილობასთან, რომლის შემადგენლობაშიც შედიან. როგორც ჩანს, თანამგზავრის ძაფის სიგრძის ვარიაციები და ამ უკანასკნელის ზომები დაკავშირებულია კონდენსაციის ცვლილებასთან და თანმიმდევრულად, ქრომოსომების ფუნქციონირებასთან (Прокофьева-Бельговская, 1986).

დადგენილია, რომ ადამიანის ათივე აკროცენტრული ქრომოსომის მოკლე მხარი შეიცავს გენებს, რომლებიც აკოდირებენ 18s და 28s რიბოსომული რნმ-ების სინთეზს (Evans et al., 1974; de Silva et al., 2000). თანამგზავრის ძაფები, ბირთვაკმაორგანიზებელი უბნები (NOR), რომლებიც მონაწილეობენ ბირთვაკის შექმნაში, უმეტესწილად წარმოადგენილი არიან ჰეტეროქრომატინული რაიონებით. ბირთვაკთან დაკავშირებული ჰეტეროქრომატინი შეიცავს რიბოსომულ გენებს, რომლებიც მონაწილეობენ ერთ-ერთ ძირითად უჯრედულ პროცესში – ცილების სინთეზში. ეს ცილები განსაზღვრავენ უჯრედის ზრდას, მის ქიმიურ და სტრუქტურულ განახლებას (Olson et al., 2000).

რიბოსომული ცისტრონების ტრანსკრიპცია ხორციელდება ენდოგენური დნმ-დამოკიდებული რნმ-პოლიმერაზა I-ით (Matsui, Sandberg, 1985). წარმოიქმნება რნმ-პოლიმერაზა-I-ის კომპლექსები რიბოსომულ გენებთან. იმუნოფლორესცენციის

მეთოდის გამოყენებით ნანახია, რომ ტრანსკრიბირებადი რიბოსომული დნმ საიტები ლოკალიზებულია ბირთვაკის ფიბრილარულ ცენტრებში, ხოლო რნმ-პოლიმერაზა- I-ის მოლეკულები NOR-შია მოთავსებული. ამ მოლეკულების დიდი ნაწილი მთელი უჯრედული ციკლის განმავლობაში რჩება დაკავშირებული რ-რნმ-ის გენებთან.

დადგენილია, რომ NOR შერჩევითად იღებება აზოტმჟავა ვერცხლით (Bloom and Goodpasture, 1976). ქრომოსომები კარგავენ შეღებვის უნარს მათი პროტეოლიტური ან ჟანგვითი დამუშავებისას, რაც იძლევა საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ Ag-შეღებვისას იღებებიან აკროცენტრული ქრომოსომების არაჰისტონური ცილები, რომლებიც აღადგენენ ვერცხლის იონებს (Matsui et al., 1986). არგენტოფილური ცილები ვლინდება აქტიურად ტრანსკრიბირებად ერთეულებში, მაგრამ არა სპეისერებში (Verma and Rodrigues, 1985).

კვლევებით დადგენილია, რომ მეტაფაზური ქრომოსომების ვერცხლით შეღებვა (Ag-ბენდირება) დამახასიათებელია მხოლოდ იმ ბირთვაკის ორგანიზატორთათვის, რომლებიც ინტენსიურად ფუნქციონირებდნენ წინამდებარე ინტერფაზასა და პროფაზაში და მათი შეღებვის ინტენსივობა დამოკიდებულია მათი ფუნქციური აქტივობის ხარისხზე (Lezhava et al., 1972; Lezhava, 1999; Heliot et al., 2000; Stitou et al., 2000). ეს დაკვირვებები საშუალებას იძლევა შევიმუშავოთ საფუძვლიანი ჰიპოთეზა, რომ ჰეტეროქრომატინიზაცია – თანამგზავრული ძაფების კონდენსაციის დონე, არის მიზეზი, რომელიც დაკავშირებულია ბირთვაკის ორგანიზატორთა აქტივობასთან, მასზე ლოკალიზებული აქტიური რიბოსომული გენების რაოდენობასთან.

ადამიანში აკროცენტრული ქრომოსომებიდან ასოციაციების ფორმირებაში მონაწილეობას დებულობენ როგორც ჰომოლოგიური, ასევე არაჰომოლოგიური ქრომოსომები. ქრომოსომების უნარი, შეერთდნენ და წარმოქმნან ასოციაციები, განისაზღვრება ორი ქრომატიდული თანამგზავრული ძაფის არსებობით. ე.ი. ქრომოსომები ითვლებიან ასოცირებულად, როდესაც შეერთებულია მათი თანამგზავრული ძაფების რომელიმე წყვილი. ასოციაციებში შედიან მხოლოდ ის ქრომოსომები, რომელთაც გააჩნიათ წინამორბედ ინტერფაზაში აქტიურად ფუნქციონირებადი NOR-ები (Verma et al., 1983).

ნაჩვენებია NOR-ის ტრანსკრიპციული აქტივობის დამოკიდებულება სქესზე, ასაკზე, ეთნიკურ ჯგუფზე, ასევე უჯრედების ტიპზე, მიტოზური დაყოფების რიცხვზე კულტურაში, უჯრედების მალიგნიზაციაზე (Грабовская и др., 1986) და სხვ.

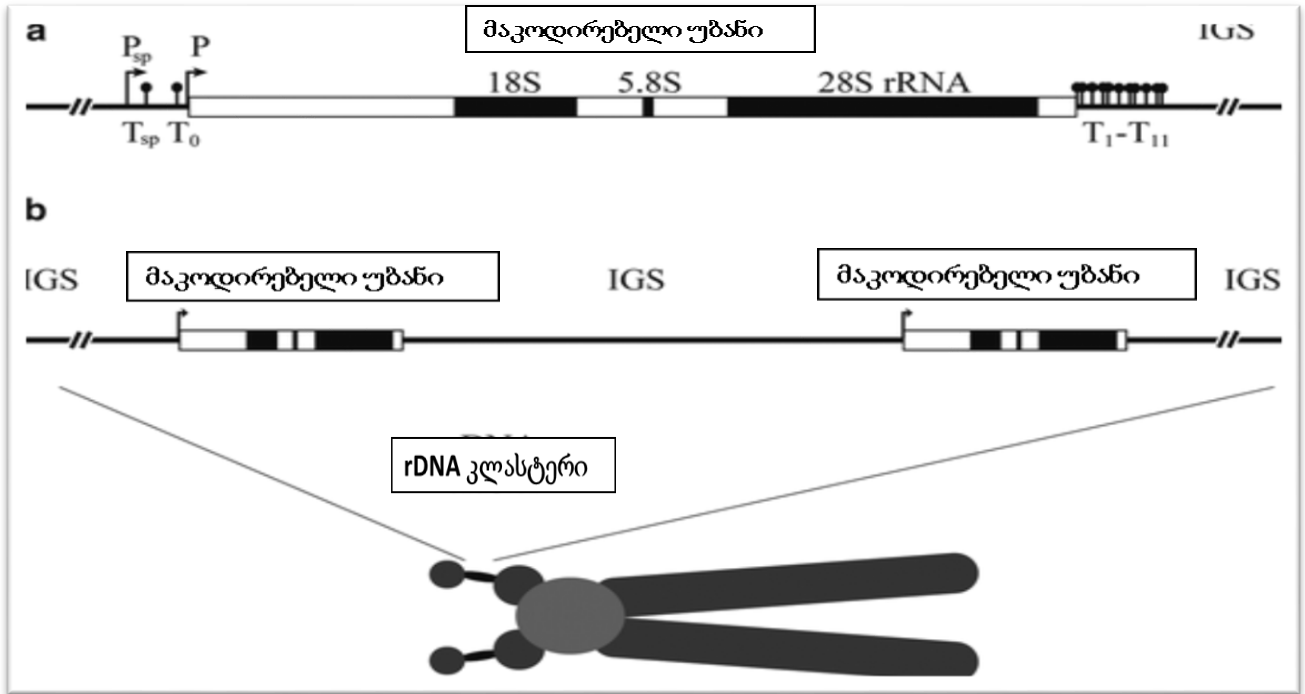
ზოგიერთი ავტორის აზრით, აკროცენტრულ ქრომოსომათა ასოციაციები ხელს უწყობენ მეიოზში ამ ქრომოსომათა განურიდებლობას და აღნიშნავენ, რომ რეციპროკული ტრანსლოკაციები უპირატესად გვხვდება თანამგზავრების მქონე ქრომოსომებში (Joens et al., 1988).

ასოციაციებში ჩართვის მომატებული ტენდენცია 21-ე ქრომოსომისთვის აღმოჩენილია დაუნის სინდრომით დაავადებულებსა და მათ მშობლებში. აკვირდებოდნენ მარკერულ 21-ე ქრომოსომას გაორმაგებული Ag-პოზიტიური უბნით, შენიშნეს, რომ ეს ქრომოსომა ხასიათდებოდა ასოციაციებში შესვლის მაღალი უნარით (Yasseen and Musavi, 2001).

ამრიგად, კავშირი Ag-შეღებულ მეტაფაზური ქრომოსომების თანამგზავრულ ძაფებსა და Ag-შეღებვის ინტენსივობას შორის, უმთავრესად განპირობებულია მათი ბირთვაკის მორგანიზებული ფუნქციით (Hens et al., 1980; Trere, 2000).

ბირთვაკისა და ბირთვაკის მორგანიზებული უბნების ფუნქციონირება, რომლებიც უჯრედის უმნიშვნელოვანეს მოლეკულურ-გენეტიკურ პროცესებში მონაწილეობენ, უჯრედის ერთ-ერთ ძირითად მახასიათებელს წარმოადგენს. აქედან გამომდინარე, ბირთვაკის ორგანიზატორების მუშაობის კანონზომიერებათა შესწავლა სხვადასხვა ხასიათის ფუნქციონალური ცვლილებების პირობებში, განსაკუთრებულ მნიშვნელობას იძენს.





სურ.2.6.1. წარმოდგენილია აკროცენტრული ქრომოსომის სტრუქტურა სქემატურად

## 2.7. მეტალთა იონების ბიოლოგიური აქტივობა

ინტერესი სხვადასხვა ბიოლოგიურ პროცესზე მეტალთა იონების ზემოქმედებისადმი უკანასკნელ წლებში მნიშვნელოვნად გაიზარდა. ეს განპირობებულია როგორც მეტალებით გარემოს დაბინძურების დონის ზრდით, ისე იმ როლით, რომელსაც ისინი ასრულებენ უჯრედთა ცხოველქმედების ყველა ეტაპზე. მეტალთა იონებით რეგულირებადი პროცესებისათვის დამახასიათებელია განსაკუთრებული სირთულე. მაგალითად, კალიუმის, მაგნიუმის, რკინის, კობალტის, მოლიბდენის, სპილენძის, და თუთიის იონები შედიან იმ ფერმენტთა შემადგენლობაში, რომლებიც აკატალიზებენ ისეთ რეაქციებს, როგორცაა ჯგუფების გადატანა, ჟანგვა-აღდგენითი და ჰიდროლიზური პროცესები. უნდა აღინიშნოს, რომ ამ პროცესებში მონაწილეობენ არა მარტო მეტალშემცველი ფერმენტები, არამედ რიგ შემთხვევებში სხვა ცილოვანი სისტემებიც, რომლებიც ახორციელებენ როგორც მეტალთა იონების დაგროვებას და კონტროლს მათ კონცენტრაციაზე, ისე უზრუნველყოფენ მათ ტრანსპორტირებას შესაბამის ადგილებში და საჭირო ფერმენტულ სისტემებში ჩართვას. კალიუმის,

კალციუმის და მაგნიუმის იონები ძალიან მნიშვნელოვანია აგრეთვე უჯრედის კედლის სტრუქტურის შენარჩუნებაში და აკონტროლებენ მათ ფუნქციონირებას. ლიტერატურაში განსაკუთრებულად განიხილება მეტალთა იონების კავშირი ქრომატინთან და ნუკლეინის მჟავებთან (Mello et al., 1995; Nowosielska and Pawlas, 2015). მეტალთა იონების ურთიერთქმედება ნუკლეინის მჟავებთან და ქრომატინთან ვრცლად არის გაშუქებული ლიტერატურაში. მთელ რიგ შრომებში მოყვანილია მონაცემები ნუკლეინის მჟავებთან მეტალთა იონების კომპლექსების ბიოლოგიური მნიშვნელობის შესახებ, უჯრედულ სისტემებში მეტალთა იონების არსებობის შესახებ, მათი გავლენის შესახებ რნმ-ს აქტივობაზე და ნუკლეინის მჟავების მონაწილეობით მიმდინარე ფერმენტული რეაქციების სპეციფიურობაზე (Девидзе 1983; Львова и др., 1990; Abshire et al., 1996; Nowosielska and Pawlas, 2015). მძიმე მეტალთა გენეტიკური მოქმედების ეფექტი მნიშვნელოვნად არის დამოკიდებული გამოყენებულ ტესტ-სისტემაზე. ასეთ ტესტ-სისტემებს მიეკუთვნება ბაქტერიული სისტემა, უმაღლეს მცენარეთა უჯრედები, დროზოფილა, ძუძუმწოვართა ძვლის ტვინის უჯრედები, ძუძუმწოვართა და ადამიანის უჯრედული კულტურები. მძიმე ლითონთა ციტოგენეტიკური ეფექტი დაფიქსირებულია ძუძუმწოვართა უჯრედებზე მათი ზემოქმედებისას როგორც *in vitro* ისე *in vivo* სისტემებში (Davidson et al., 2011; Arita et al., 2012). მოლიბდენის მარილების გენეტიკური ექტივობის შესწავლისას ნაჩვენებია, რომ მოლიბდენის საამქროს მუშებში, რომელთაც ხანგძლივი კონტაქტი ჰქონდა მოლიბდენის ნაერთებთან, ადგილი აქვს ქრომოსომათა აბერაციებისა და შქგ-ს სიხშირის მატებას. იგივე შედეგი მიიღეს *in vitro* სისტემაშიც – საკონტროლო პირების ლიმფოციტურ კულტურათა უჯრედებში მოლიბდენის მარილების შეყვანისას (Costa 1999). პოზიტიური ეფექტი ქრომოსომათა დარღვევების ინდუქციის ტესტის მიხედვით დადასტურებულია თუთიის იონებისათვის, მათი ზემოქმედებისას ადამიანის ლიმფოციტურ კულტურებზე. კადმიუმის ქლორიდის დაბალი კონცენტრაციებით 34 ზემოქმედებისას მიუთითებდნენ დიცენტრული ქრომოსომების არსებობაზე უჯრედულ კულტურებში (Abshire et al., 1996).

ქრომოსომათა აბერაციების სიხშირის ზრდის უნარი გამოვლენილია კობალტის ქლორიდისათვის. კობალტი ქრომოსომათა აბერაციების ინდუქციას იწვევდა როგორც იმ

პირთა ლიმფოციტებში, რომლებიც კობალტის ქლორიდთან 10 წელზე მეტი ხნის განმავლობაში კონტაქტობდნენ, ასევე in vitro პირობებშიც, ლიმფოციტურ კულტურებზე ზემოქმედებისას. ორივე შემთხვევაში მოცემული შრომის ავტორებმა მოახდინეს კობალტის დამაზიანებელი მოქმედების მოდიფიცირება ასკორბინის მჟავით, რომელიც საგრძნობლად აქვეითებდა აღნიშნული ნაერთის მუტაგენურ ეფექტს. ავტორები ამას ხსნიან ასკორბინის მჟავას უნართ გაყოფილ დნმ-ს რეპარაციის ოპტიმიზაცია (Bellicci-Ferrari et al., 2005). მძიმე ლითონების ზემოქმედებით განპირობებული დნმ-ს დაზიანებები ძირითადად წარმოდგენილია დნმ-ს ერთძაფიანი გაწყვეტებით და ალკირებადი ბმული საიტების – დნმ-დნმ და დნმ- ცილა ჯვარედინი კავშირების სახით. ნაჩვენებია აგრეთვე, რომ კობალტის ზოგიერთი ნაერთი ინდუცირებს ქრომოსომათა აბერაციებს მცენარეთა უჯრედებში. ამასთანავე, ავტორები უარყოფენ კობალტისა და მისი ნაერთების მუტაგენურ აქტივობას ძუძუმწოვართა უჯრედებისთვის (Leonard and Lauverys, 1990), თუმცა ნაჩვენებია ვირთაგვებზე კობალტის აცეტატის ზემოქმედებით განპირობებული დნმ-ის ოქსიდაცია ფილტვის, ღვიძლის, თირკმლის ქრომატინში. უფრო მეტიც, დნმ-ის ფუძეებიდან ზოგიერთი, მაგ.: 5-ჰიდროქსიციტოზინი მიჩნეულია პრომუტაგენად, რომელიც სავარაუდოდ ჩართულია კობალტ (II) –ით ინდუცირებულ მუტაგენებში (Li et al., 2009).

მძიმე მეტალები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ უჯრედში მიმდინარე პროცესებში. მათი მოქმედება ყოველთვის უნდა გაანალიზდეს კომპლექსური მიდგომით. მათი შესაძლო ეფექტები ცალსახად არის დამოკიდებული მათ კონცენტრაციაზე. მძიმე მეტალები, გარკვეულ კონცენტრაციით, აღწევენ უჯრედში და მონაწილეობენ ნორმალურ ფიზიოლოგიურ პროცესებში. ამასთან, ავლენენ თავის ტოქსიკურობას ნუკლეინის მჟავებთან და ცილებთან ქიმიური ურთიერთქმედების გზით, ცვლიან ბირთვში შემავალი მაკრომოლეკულების კონფორმაციას. ეს ყველაფერი იწვევს სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვანი ბირთვული პროცესების რეგულაციის დარღვევას, როგორცაა ტრანსკრიფცია, დნმ-ს რეპლიკაცია, რეპარაცია, რითაც ხშირად მიყავთ უჯრედი მოულოდნელ და შეუქცევად ცვლილებებამდე - კარცინოგენუზამდე (Nowosielska and Pawlas, 2015).

## 2.8. პეპტიდური ბიორეგულატორები

პეპტიდურ ბიორეგულატორებს აქვთ უნარი აღადგინონ ფუნქციური დარღვევები, შეანელონ პათოლოგიური პროცესების განვითარება, უჯრედული პოპულაციების ნორმალური სტრუქტურული და ფუნქციური ჰომეოსტაზის შენარჩუნებითა და იმუნური სისტემის ჰომეოსტაზის მოლეკულური მექანიზმების რეგულაციის გზით (Хавинсон, Морозов, 2001; Kuznik et al., 2013). ამასთანავე, აქვთ მაღალი სამკურნალო პოტენციალი მათი ბიოლოგიური აქტივობის გამო და ქსოვილსპეციფიური მოქმედება (Khavinson et al., 2014).

პეპტიდთა კომპლექსები (რეგულატორული პეპტიდები) გამოყოფილია პრაქტიკულად ყველა ქსოვილიდან. ისინი ახალი თაობის მაღალთერაპიული აქტივობის მქონე სამკურნალო პრეპარატებია, რომელთა მასა არ აღემატება 10 კდ-ს. პეპტიდური ბიორეგულატორები მონაწილეობენ უჯრედული პოპულაციების სტრუქტურული და ფუნქციური ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაში (Khavinson et al., 2013).

ბიორეგულატორული პეპტიდები განაპირობებენ ორგანიზმის ძირითადი ფუნქციების ნორმალიზებას, ჰომეოსტაზის და მეტაბოლიზმის გაუმჯობესებას, რაც დადებითად აისახება ორგანიზმის ჯანმრთელობაზე (Kuznik et al., 2013; Khavinson et al., 2014).

მრავალიერარქიული პრინციპის მიუხედავად, ჰომეოსტაზის რეგულაციის ყველა მექანიზმი პრინციპულად ერთიდაიგივე მიზანს ემსახურება – კოორდინირებას უწყვეს უჯრედში ცილის ბიოსინთეზს გენთა ექსპრესიაზე ზემოქმედების გზით.

ბიორეგულატორული პეპტიდების მოქმედების შესწავლამ დაადგინა, რომ ისინი ჰომეოსტაზის დარღვევის შემთხვევაში ააქტიურებენ უჯრედის ანტიოქსიდანტურ სისტემებს და მაკრომოლეკულების რეპარაციას (Хавинсон и Морозов, 2001).

ნაჩვენებია პეპტიდური რეგულატორების ანტისიმსივნური აქტივობა ნეიროენდოკრინული და იმუნური სისტემების მოდულირების გზით (Anisimov, 2002; 2004; 2010). ზოგიერთი ბიორეგულატორული პეპტიდი (ეპიტალამინი, ეპიტალონი) ხასიათდება გამოხატული ანტიოქსიდანტური აქტივობით (Anisimov et al., 2001; Khavinson et al., 2013).

პეპტიდური ბიორეგულატორებს აქვთ უნარი შეცვალონ გენომის ფუნქციონალური აქტივობა უჯრედული ციკლის სხვადასხვა სტადიაზე და გავლენა იქონიონ გენტა ექსპრესიაზე, ი-რნმ-ის ტრანსკრიფციულ პროცესზე და ამდენად ცილების ბიოსინთეზზე, უჯრედთა პროლიფერაციისა და დიფერენციაციის პროცესებზე (Mopozov , 2000; Lezhava et al., 2004).

ბიომარეგულირებელი თერაპია, რომლის საფუძველს წარმოადგენს პეპტიდური ბიორეგულატორების კომპლექსური გამოყენება, თანამედროვე მედიცინის ინტენსიურად განვითარებადი ახალი მიმართულებაა. პეპტიდური ბიორეგულატორული თერაპია შეიძლება განვიხილოთ, როგორც ჰომეოსტატიური მიმართულება მედიცინაში. დღითიდღე იმატეს იმ ადამიანების რიცხვი, რომლებიც ორგანიზმის დარღვეული ფუნქციების აღსადგენად ასეთ თერაპიას მიმართავენ.

სინთეზირებულია მოკლე პეპტიდები: ლივაგენი (Lys-Glu-Asp-Ala), ვილონი (Lys-Glu), თიმოგენი ( $\alpha$ -Glu-Trp), კორტაგენი (Ala-Glu-Asp-Pro), ეპიტალონი (Ala-Glu-Asp-Gly), პროსტამაქსი (Lys-Glu-Asp-Pro) და სხვა. მათი გამოყენება დაიწყო მედიცინის პრაქტიკულად ყველა სფეროში. სამედიცინო პრაქტიკაში წარმატებით გამოიყენება როგორც სხვადასხვა ორგანოდან გამოყოფილი, ისე სინთეზურად მიღებული პეპტიდური ბიორეგულატორები. ცნობილია, რომ ისინი ანელებენ ორგანიზმის ბიოლოგიური საათის სვლას. მათი მოქმედება მიმართულია სიმსივნეების და ასაკთან დაკავშირებული პათოლოგიების პროფილაქტიკისაკენ (Lezhava, 2006; Khavinson et al., 2013, 2022). მაგალითად, პეპტიდები Lys-Glu და Ala-Glu-Asp-Gly ამცირებენ სიმსივნის განვითარების რისკს ცხოველებში და ზრდიან მათისიცოცხლის საშუალო ხანგრძლივობას (Khavinson et al., 2000; Anisimov et al., 2002; Anisimov et al., 2003; Виноградова и др., 2008), პეპტიდი Ala-Glu-Asp-Pro ასტიმულირებს ნერვული უჯრედების რეგენერაციას (Khavinson et al., 2003, 2005, 2007), Lys-Glu-Asp-Trp ამცირებს გლუკოზის დონეს შაქრიანი დიაბეტის მქონე ექსპერიმენტულ ცხოველებში (Khavinson et al., 2005; 2010), Ala-Glu-Asp-Leu აღადგენს ბრონხული ეპითელიუმის უჯრედების ფუნქციას, Ala-Glu-Asp-Arg პეპტიდი აღადგენს მიუკარდიუმის უჯრედების ფუნქციონალურ აქტივობას (Khavinson et al., 2022).

პეპტიდური ბიორეგულატორი ლივაგენი ტეტრაპეპტიდია (Lys-Glu-Asp-Ala) - ღვიძლის კომპლექსური პრეპარატის ამინომჟავური ანალიზის საფუძველზე ქიმიური სინთეზის გზით არის შექმნილი სანქტ-პეტერბურგის ბიორეგულაციისა და გერონტოლოგიის ინსტიტუტში. პრეპარატი ასტიმულირებს ქსოვილთა რეგენერაციის პროცესებს, ქსოვილსპეციფიკური ცილების სინთეზს, უჯრედების პროლიფერაციულ და მეტაბოლიტურ აქტივობას, აჩქარებს ჭრილობების შეხორცებას, ააქტიურებს შემაერთებელი ქსოვილის უჯრედების, მაკროფაგებისა და ლეიკოციტების ფუნქციას დაზიანების კერაში. გააჩნიათ ანტიოქსიდანტური, იმუნომასტიმულირებელი და ანტიისტრესული მოქმედება (Khavinson, 2009).

### 3. კვლევის მასალა და მეთოდика

#### 3.1. კვლევის მასალა

გამოყენებული იყო 25–50 წლის კლინიკურად ჯანმრთელი 100 ინდივიდისა და ამავე ასაკობრივი ჯგუფის ძუძუს კიბოთი დაავადებული 50 პაციენტების ლიმფოციტარულ კულტურათა უჯრედები. ანალიზდებოდა როგორც ინტაქტური, ასევე მეტალის იონისა და ბიორეგულატორის განმხოლოებული და კომბინირებული მოქმედებისას მიღებული ლიმფოციტური კულტურების მეტაფაზები.

მასალის აღება ხდებოდა პაციენტთა ჯანმრთელობის დაცვის სამინისტროს ეთიკური კომისიის მოთხოვნის შესაბამისად პაციენტთა დადასტურებული თანხმობით.

#### 3.2 კვლევის მეთოდები

##### 3.2.1 დიფერენციული სკანირების მიკროკალორიმეტრული მეთოდი

ქრომატინის კონდენსაციის, ჰეტეროქრომატინიზაციის დონეს ვიკვლევდით დიფერენციული სკანირების კალორიმეტრის გამოყენებით (Monaselidze et al., 1978). აღნიშნული დანადგარი საშუალებას გვაძლევს შევისწავლოთ როგორც ცილებისა და ნუკლეინის მჟავების განზავებული ხსნარების, ასევე უჯრედებისა და ქსოვილების სითბური თვისებები.

დიფერენციული სკანირების კალორიმეტრის მგრძობელობა შეადგენს  $10^{-7}$  კალ/წთ, ტემპერატურული ინტერვალი – 20–150°C. გათბობის სიჩქარე ვარიირებს 1-დან 0.05 კ/სთ, გასაზომი უჯრედების რაოდენობა – 0,3 მლ. რნპ-კომპლექსისა და ქრომატინის განსაზღვრის სიზუსტის ცდომილება არ აღემატება  $\pm 1^{\circ}$ .

ქრომატინის კონდენსაციის გრაფიკულ გამოსახვას ვახდენდით სითბოს შთანთქმის მრუდებით. დიფერენციული სკანირების მიკროკალორიმეტრულ მეთოდს საფუძვლად უდევს ის ფაქტი, რომ ქრომატინის განსხვავებული ფრაქციები ხასიათდებიან განსხვავებული თერმოსტაბილობით.

### 3.2.2 ადამიანის პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტების კულტივირება

ცნობილია, რომ პერიფერიული სისხლის ლიმფოციტები ჩვეულებრივ პირობებში, დაუყოფადი უჯრედებია, რომლებიც იმყოფებიან  $G_0$  ფაზაში. *in vitro* უჯრედულ კულტურაში ფიტოჰემაგლუტინინის (ფჰა) დამატების შემდეგ ისინი იწყებენ ციკლში შესვლას, რასაც თან სდევს ცილებისა და დნმ-ს სინთეზი და უჯრედების დაყოფა.

ამ სისტემის უმნიშვნელოვანესი დამსახურება არის მოკლევადიანი კულტურების მისაღებად დიდი რაოდენობით უჯრედების ხელმისაწვდომობა; ინტერფაზის  $G_0$  და  $G_1$  ფაზაში მყოფი უჯრედული პოპულაციების სინქრონულობა და მიტოგენით მათი სტიმულირების შესაძლებლობა; სპონტანური ქრომოსომული აბერაციების დაბალი სიხშირე; ქრომოსომათა გადანაცვლებების (ტრანსლოკაციების) ტიპების შესწავლის შესაძლებლობა ნამდვილი მუტაციური პროცესის დროს და მათი ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორებით ინდუცირებისას. ამასთანავე, ლიმფოციტები არიან იმუნოკომპეტენტური უჯრედები და ავლენენ მაღალ მგრძობელობას ენდოგენური და ეგზოგენური ფაქტორების ზემოქმედებაზე.

ლიმფოციტების კულტივირება ხდებოდა მოდიფიცირებული მეთოდით (Lezhava, 2006). ხდებოდა ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებული 25-50 წლის ასაკის და ასევე კლინიკურად ჯანმრთელი 25-50 წლის ინდივიდების 5 მლ ვენური სისხლის აღება და სტერილურ სინჯარებში გადატანა, სადაც სისხლის შედედების თავიდან აცილების მიზნით ჩასხმული იყო 0,5 მლ ჰეპარინის სამუშაო ხსნარი. ერითროციტების დალექვის მიზნით სისხლი 2 საათით თავსდებოდა ოთახის ტემპერატურაზე და ლიმფოციტების შემცველი პლაზმა ინკუბაციისათვის გადაიტანებოდა სტანდარტულ სინჯარებში. ემატებოდა 3 მლ საკვები არე RPMI 1640 და ფიტოჰემაგლუტინინი (ფჰა) (Sigma). სინჯარები თავსდებოდა თერმოსტატში  $37^{\circ}\text{C}$  -ზე. ფიქსაცია ხდებოდა ინკუბაციის 72-ე საათზე. ფიქსაციამდე 3 სთ-ით ადრე კულტურებს ემატებოდა კოლხიცინი საბოლოო კონცენტრაციით – 0,5 მკგ/მლ. ფიქსაცია მიმდინარეობდა სამჩანაცვლებული ნატრიუმის ციტრატის ჰიპოტონური ხსნარით და მეთანოლისა და ყინულოვანი ძმარმჟავის ნარევით (3:1), ფიქსატორის ორჯერადი შეცვლით 30 წთ-ის განმავლობაში. ამის შემდეგ ხდებოდა უჯრედების მცირე რაოდენობის ფიქსატორში (0,2-0,3 მლ) კარგად რესუსპენზირება და



პასტერის პიპეტის მეშვეობით ცივ სასაგნე მინებზე გადატანა. პრეპარატები შრებოდა ჰაერზე.

### 3.2.3 ქრომოსომული მუტაციების აღრიცხვის მეთოდი

ქრომოსომების რაოდენობრივ-სტრუქტურული დარღვევების შეფასება ხდებოდა ციტოგენეტიკური ნომენკლატურის საერთაშორისო სისტემის (ISCN,2003) მიხედვით. ვანალიზებდით კარგი განზნევის მქონე 46-47 ქრომოსომის შემცველ მეტაფაზებს. აღვრიცხავდით ერთეულ და წყვილ ფრაგმენტებს, ტრანსლოკაციებს, გეპებს.

აბერაციების შემცველ უჯრედთა პროცენტისათვის სტანდარტული შეცდომის გამოთვლა ხდებოდა ფორმულით:

$$m = \pm \frac{\sqrt{n(100-n)}}{N}$$

სადაც: n აბერანტულ უჯრედთა პროცენტული მაჩვენებელია,

N-განალიზებულ უჯრედთა რაოდენობა.

ორ სიმრავლეს ვადარებდით სტიუდენტის (t) კრიტერიუმით:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

### 3.2.4 ფრაგილური საიტების გამოვლენისა და აღრიცხვის მეთოდი

დღეისათვის ფრაგილური საიტების გამოსავლენად გამოიყენება მრავალი ნაერთი: თიმიდინი, მეტათრექსატი, ბრომდეზოქსიურიდინი, მეთიონინი, ტრიმეთოპრიმი, დისტამიცინი და სხვ. ჩვენს მიერ ფრაგილური საიტების ინდუქციისათვის გამოყენებული იყო 5-ბრომდეზოქსიურიდინი. კულტივირება მიმდინარეობდა სტანდარტული მეთოდით. 5-ბრომდეზოქსიურიდინის შესაბამისი კონცენტრაციის ხსნარი (2000 მკგ/მლ) კულტურებს ემატება 24 საათით, ქრომოსომული პრეპარატები იღებებოდა 5%-იანი აზურ-ეოზინით. აღვრიცხებოდა ფრაგილური საიტების შემცველ უჯრედთა სიხშირე, ფრაგილური საიტების რაოდენობა ერთ უჯრედზე და მათი განაწილება ქრომოსომულ ჯგუფებში და ქრომოსომის სიგრძის გასწვრივ.

### 3.2.5 ქრომატინის ერთმაფიანი წყვეტების გამოვლენის მეთოდი - Comet Assay

კომეტ-ესეი (Comet Assay), რომელსაც ასევე უწოდებენ ერთუჯრედოვან გელ-ელექტროფორეზს (SCGE), არის მგრძნობიარე და სწრაფი ტექნიკა ცალკეულ უჯრედებში დნმ-ის დაზიანების რაოდენობრივი განსაზღვრისა და ანალიზისთვის. როგორც ასეთი, ეს არის ერთ-ერთი ტექნიკა, რომელიც გამოიყენება კიბოს კვლევის სფეროში გენოტოქსიურობისა და ქიმიოპრევენციის ეფექტურობის შესაფასებლად. ეს ტექნიკა შვედმა მკვლევარებმა ოსტლინგმა და იოჰანსონმა (Östling & Johansson, 1984) შეიმუშავეს 1984 წელს, რომელიც მოგვიანებით შეცვალა სინგმა (Singh, 1988), 1988 წელს, როგორც Alkaline Comet Assay. ამ მეთოდის შედეგად მიღებული სურათი წააგავს "კომეტას" განსხვავებული თავით და კუდით. თავი შედგება დაუზიანებელი დნმ-ისგან, ხოლო კუდი შედგება დაზიანებული (ერთჯაჭვიანი ან ორჯაჭვიანი რღვევები) ან გაწყვეტილი დნმ-ისგან.

ცალკეული უჯრედები ჩასმულია თხელ აგაროზის გელში მიკროსკოპის სლაიდზე. ყველა ცილა მოცილებულია უჯრედებიდან ლიზისით. დნმ-ს სპირალის გახსნა ხდება ტუტე/ნეიტრალურ პირობებში. გახსნის შემდეგ, დნმ გადის ელექტროფორეზს, რაც საშუალებას აძლევს გაწყვეტილ დნმ-ის ფრაგმენტებს ან დაზიანებულ დნმ-ს, მიგრირდეს ბირთვიდან. დნმ-სპეციფიკური ფლუორესცენტური საღებავით შეღებვის შემდეგ, როგორც არის ეთიდიუმის ბრომიდი ან პროპიდიუმის იოდიდი, გელზე იკითხება ფლუორესცენტის ოდენობა თავში და კუდში და კუდის სიგრძეზე. კომეტის თავიდან გამოთავისუფლებული დნმ-ის მოცულობა პირდაპირპროპორციულია დნმ-ის დაზიანების ოდენობისა (Olive and Banath, 2006).

Comet Assay შეიძლება გამოყენებულ იქნას დნმ-ის დაზიანების აღმოსაჩენად, რომელიც გამოწვეულია ორმაფიანი წყვეტით, ერთმაფიანი რღვევით, ტუტე-ლაბილური ადგილების არსებობით, ჟანგვითი ბაზის დაზიანებისა და დნმ-ის ჯვარედინი კავშირით დნმ-თან ან ცილასთან. Comet Assay ასევე გამოიყენება ცოცხალი უჯრედების მიერ დნმ-ის რეპარაციის მონიტორინგისთვის (Collins, 2004).

### 3.2.6 შვილეულ ქრომატიდთაშორისი გაცვლების (შქგ) გამოვლენის მეთოდი

შვილეულ ქრომატიდთა დიფერენციული შეღებვის საფუძველი შქგ-ს გამოსავლენად მდგომარეობს იმაში, რომ რეპლიკაციის ორი ციკლის განმავლობაში ხდება უჯრედების ინკუბაცია 5-ბრომდეზოქსიურიდინის თანაობისას (5-ბდუ), რომელიც დნმ-ს სინთეზის პროცესში ერთვება თიმინის ადგილას. რეპლიკაციის ორი ციკლის შემდეგ ერთ-ერთი ქრომატიდის დნმ-ს მოლეკულის ორივე ჯაჭვი შეიცავს ანალოგს და სპეციალური დამუშავების შემდეგ იღებება ნაკლებად ინტენსიურად, ვიდრე მეორე შვილეული ქრომატიდა, რომელიც შეიცავს მხოლოდ ერთ ბდუ-ჩანაცვლებულ ჯაჭვს, რაც იძლევა მათ შორის გაცვლების აღმოჩენის შესაძლებლობას.

ლიმფოციტურ კულტურაში შვილეულ ქრომატიდთა მონიშვნისათვის, ფჰა-ის შეყვანისთანავე ემატებოდა 5-ბდუ კონცენტრაციით 7,7მკგ/მლ, რომელიც რჩებოდა კულტურაში ფიქსაციამდე. უჯრედების ინკუბაცია მიმდინარეობდა 72 სთ-ის განმავლობაში 37 °C-ზე. ტესტირებული ბიორეგულატორები კულტურებს ემატებოდა დადგმიდან 24-ე საათზე, კონცენტრაციით – 0,01 მკგ 1 მლ კულტურაზე. კოლხიციინიზაცია, ჰიპოტონიზაცია და კულტურების ფიქსაცია ტარდებოდა ისევე, როგორც ლიმფოციტების კულტივირების შემთხვევაში.

რამდენიმე (5-6) დღის განმავლობაში პრეპარატები ინახებოდა სიბნელეში და ამის შემდეგ იღებებოდა ფლუოროქრომების გამოყენების გარეშე, ანტომჰინასა და პარიადკოვას მეთოდის მიხედვით (1978). ქრომოსომული სლაიდები თავსდებოდა 2xSSC ხსნარში და სხივდებოდა DPT-375 ნათურით. დასხივების დასრულების შემდეგ, პრეპარატები ირეცხებოდა წყლით და შრებოდა. შეღებვა ხდებოდა აზურ-ეოზინის ახლად დამზადებული საღებავით.

აღწერილი პროცედურების შედეგად მეორე მიტოზის მეტაფაზურ ქრომოსომებში ვლინდება მკვეთრი დიფერენცირება შვილეულ ქრომატიდთა შორის, კარგად გარჩევადი შქგ-თი.

შქგ-ს სიხშირის შესაფასებლად ცალკეულ ქრომოსომულ ჯგუფებში აღირიცხებოდა ტერმინალური და ინტერკალარული გაცვლები. ეს უკანასკნელი აღირიცხებოდა როგორც ორი გაცვლა.

ციტოგენეტიკური ეფექტის მაჩვენებელს წარმოადგენდა შქგ-ს დონე მეტაფაზაზე (M), რომელიც გამოითვლებოდა ფორმულით:

$$M = \frac{n}{N},$$

სადაც: n არის შესწავლილი შქგ-ების სრული რაოდენობა,

N - შესწავლილი მეტაფაზების სრული რიცხვი.

სტანდარტული შეცდომა გამოითვლებოდა ფორმულით:

$$m = \frac{\sqrt{n}}{N}.$$

ორი სიდიდის შესადარებლად გამოიყენებოდა სტიუდენტის (t) კრიტერიუმი:

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}.$$

### 3.2.7 აკროცენტრულ ქრომოსომათა ასოციაციათა აღრიცხვის მეთოდი

ასოციაციათა სიხშირე ფასდებოდა შემდეგი კრიტერიუმით: აცოციაციების შემცველი უჯრედების რაოდენობა, უჯრედზე ასოციაციათა საშუალო რიცხვი, ასოციაციაში მონაწილე ქრომოსომების რიცხვი (Lezhava, 1999).

ტრანსკრიფციულად აქტიურ უბნებში ხდება იონების აღდგენა, რაც პრეპარატის მოყვითალო-ყავისფერ ფონზე მუქი ლაქების სახით ჩანს. იღებება აკროცენტრული ქრომოსომების მხოლოდ ის უბნები, რომლებიც წინამორბედ ინტერფაზაში იყვნენ აქტიურნი. რამდენიმე კრიტერიუმით ვაფასებდით ბირთვაკმორგანიზებელ უბნებში ლოკალიზებული რიბოსომული ცისტრონების აქტივობას: ვერცხლით ღებვადი უბნების სიხშირის აღრიცხვით (D და G ჯგუფის ქრომოსომებისათვის ცალ-ცალკე და ერთდროულად) მოვერცხლილი სეგმენტების ზომით.

გამოითვლებოდა D და G აკროცენტრული ქრომოსომების Ag- პოზიტიურობა. მათი ნორმალური რიცხოვნების სხვაობის გათვალისწინებით გამოიყენებოდა ფორმულა:

$$\frac{P_D - P_G}{\sqrt{\frac{P_D(1-P_D)}{6n} + \frac{P_G(1-P_G)}{4n}}}$$

სადაც,  $P_D$  და  $P_G$   $Ag^+$  - პოზიტიური აკროცენტრული ქრომოსომების შეხვედრის ალბათობის მაჩვენებელია. მათი გამოთვლა ხდებოდა ფორმულით:

$$P_D = \frac{m_D}{6n}, \quad P_G = \frac{m_G}{4n}$$

სადაც,  $m$  -  $Ag^+$  - პოზიტიური ქრომოსომებია შესაბამის ჯგუფში.

$n$  - გაანალიზებული უჯრედების რაოდენობა.

სარწმუნოება საკვლევ და საკონტროლო მნიშვნელობებს შორის ფასდებოდა სტიუდენტის ( $t$ ) კრიტერიუმით.

### 3.2.8 ბირთვაკმაორგანიზებული უბნების გამოვლენის მეთოდი

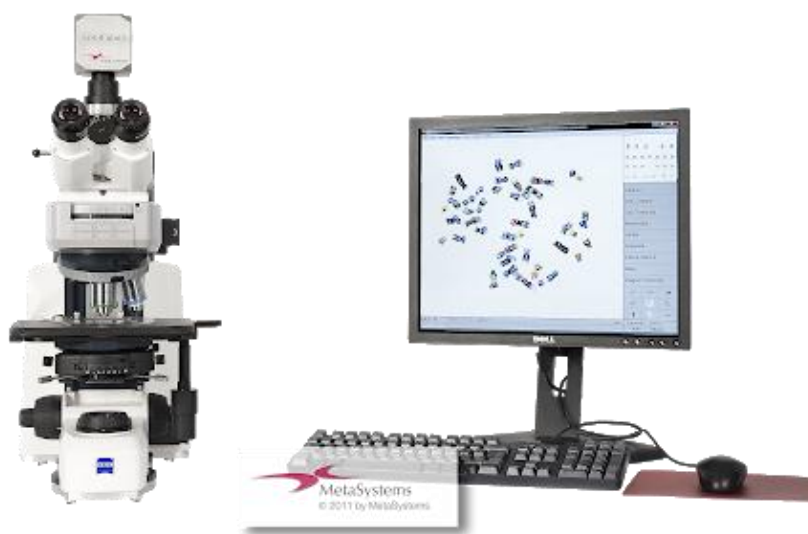
ინტერფაზულ უჯრედებში ქრომოსომების აქტიური ბირთვაკმაორგანიზებული უბნების გამოვლენა და აქტივობის შეფასება შესაძლებელია დავერცხლის მეთოდის საშუალებით, არგენტოფილური სეგმენტების რაოდენობისა და ზომების მიხედვით. უჯრედის ეს მატად ზუსტი და მგრძობიარე რაოდენობრივი მახასიათებლები უმაღლეს რეაგირებენ უჯრედის ფიზიოლოგიური მდგომარეობის შეცვლაზე, აგრეთვე ამა თუ იმ აგენტის მოქმედებაზე.  $Ag^+$  - შეღებვა ხდებოდა Bloom-ისა და Goodpasture-ს (1976) მცირედ მოდიფიცირებული მეთოდით. ოთახის ტემპერატურაზე პრეპარატებს ემატებოდა ვერცხლის ნიტრატის 50%-იანი ხსნარის 3 წვეთი, ეფარებოდა საფარი მინა, თავსდებოდა ტენიან კამერაში და ინახებოდა 48 საათის განმავლობაში თერმოსტატში,  $37^{\circ}C$ -ზე. ამის შემდეგ პრეპარატები ირეცხებოდა დისტილირებული წყლით და შრებოდა ჰაერზე. მოვერცხლილი სეგმენტების ზომა ფასდებოდა 3 ბალიანი სისტემით: 0 - სეგმენტების არარსებობა, 1 - მცირე ზომის სეგმენტები (ქრომატინის სისქეზე პატარა), 2 - დიდი ზომის (ქრომატიდის სისქის ტოლი ამ მასზე დიდი).

### 3.2.9 G-ბენდირების მეთოდი

ადამიანის გენომში არსებული 24 ტიპის ქრომოსომის იდენტიფიკაციისთვის იყენებენ შეღებვის სხვადასხვა მეთოდს, რომელთაგან G-ბენდირება ყველაზე უფრო მისაღები და ხელსაყრელია ინდივიდუალური ქრომოსომების იდენტიფიკაციის მიზნით.

ქრომოსომასთან ასოცირებული ცილების დაშლის მიზნით, თავდაპირველად ქრომოსომული პრეპარატები მუშავდება ტრიფსინით, შემდეგ კი იფარება გიმზის საღებავებით. შედეგად, თითოეული ქრომოსომული წყვილი ღია და მუქ ზოლებად იღებება, რომლებსაც G-ბენდებს უწოდებენ. აღსანიშნავია, რომ გიმზით შეღებვის მეთოდის საშუალებით შესაძლებელია ინდივიდუალური ქრომოსომების ამოცნობა და ასევე დარღვევათა სხვადასხვა ტიპის დადგენა.

G-ბენდირებით შეღებილი ქრომოსომების კარიოტიპირება (იდენტიფიცირება) ხდებოდა IKAROS-ის კარიოტიპირების (MetaSystems) სისტემის საშუალებით, რომელიც წარმოადგენს თანამედროვე მეთოდს ქრომოსომათა იდენტიფიცირებისა და ანალიზისათვის (სურ.3).

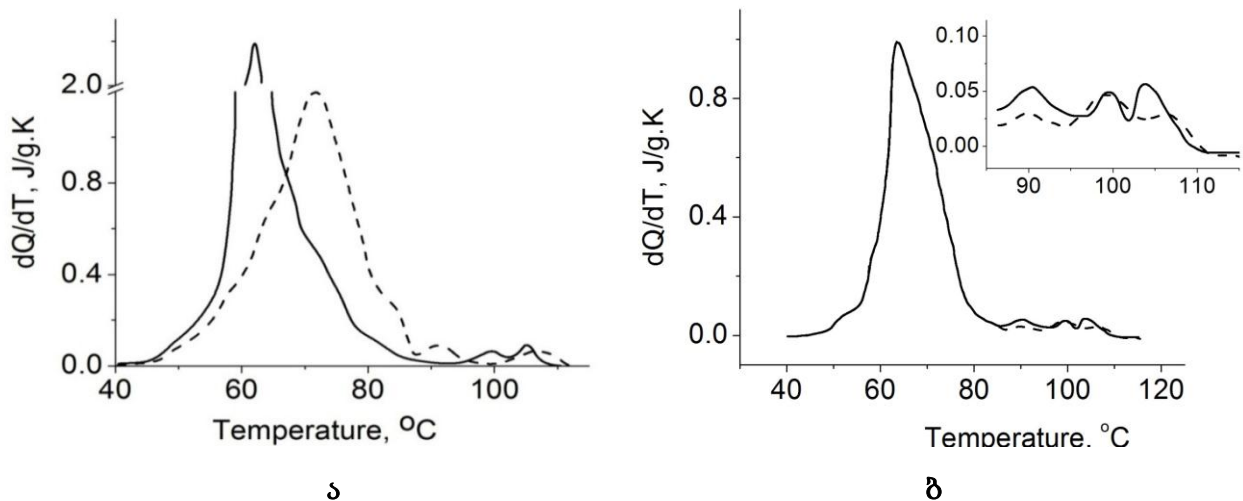


სურ.3.2.2.9.1. Ikaros-ის კარიოტიპირების სისტემა

## 4. მიღებული შედეგები და განსჯა

4.1. ჰეტეროქრომატინიზაციის დონის განსაზღვრა ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდებში დიფერენციული სკანირების მიკროკალორიმეტრული მეთოდის გამოყენებით

სამუშაოს მოცემულ განაკვეთში გამოკვლეულია პეპტიდური ბიორეგულატორის – ლივაგენის გავლენა ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტების შემადგენლობაში არსებული ზოგადი ქრომატინის მდგომარეობის ცვლილებაზე, მისი დენატურაციის პარამეტრებზე დაკვირვების გზით.



სურ. 4.1.1. ა. სითბოს შთანთქმის მიკროკალორიმეტრული მრუდები: უწყვეტი ხაზი - კლინიკურად ჯანმრთელი, 22-45 წლის ინდივიდები; წყვეტილი ხაზი - ძუძუს სადინროვანი კიბოს (1-ლი სტადია) მქონე პაციენტების პლაზმის შემადგენლობაში არსებული ლიმფოციტების (24 სთ-იანი კულტურა) სითბოს შთანთქმის მიკროკალორიმეტრული მრუდი;

ბ. ძუძუს სადინროვანი კიბოს (1-ლი სტადია) მქონე პაციენტების პლაზმის შემადგენლობაში არსებული ლიმფოციტების (24 სთ-იანი კულტურა) სითბოს შთანთქმის მიკროკალორიმეტრული მრუდი (წყვეტილი მრუდი), უწყვეტი ხაზი - ლივაგენით დამუშავებული იგივე ლიმფოციტების კულტურა

მრუდები გაანგარიშებულია ერთ გრამ მშრალ ბიომასაზე.

წყვეტილი ხაზი: დნმ-ს მშრალი მასა 82 მკგ;

უწყვეტი ხაზი: დნმ-ს მშრალი მასა 78 მკგ.

წარმოდგენილი კალორიმეტრული მრუდები წარმოქმნილია ლიმფოციტარული კულტურის გაცხელების პროცესში  $40-120^{\circ}C$  ტემპერატურულ ინტერვალში. როგორც

სურათიდან ჩანს, ინტაქტური ლიმფოციტარული კულტურის სითბოსშთანთქმის მრუდს გააჩნია დამოუკიდებელი პიკების საკმარისად რთული პროფილი. ბირთვის შემადგენლობაში არსებული ქრომატინი დენატურირებს 74–107 °C–ის ფარგლებში (Cavazza et al., 1991; Cardellini et al., 2000). ამიტომ, მიგვაჩნია, რომ ქრომატინის დენატურაციას შეესაბამება პიკები – I, II, III (სურ. 4.1.1). ამ გადასვლების დენატურაციის პარამეტრები შემდეგია: Td(I)=82,3°C, Qd(I)=33,8 J/g; Td(II)=95°C, Qd(II)=30,2 J/g; Td(III)=106,2°C, Qd(III)=28,0 J/g.

ლიტერატურული მონაცემების თანახმად (Cardellini et al., 2000), უჯრედშიდა და უჯრედშორისი ცილებილ ღვებიან 42-90 °C ტემპერატურულ ინტერვალში. კერძოდ, ციტოპლაზმური ცილები ღვებიან 42-85 °C, რნმ კომპლექსები 60-75 °C, ქრომატინი 95-115 °C. ძირითადი პლაზმური ცილები ღვებიან განცალკევებულად. მაგ. ფიბრინოგენის D და F დომენები ღვებიან 57 და 95 °C, ალბუმინი რომელიც შეადგენს მთელი პლაზმური ცილების 40-45%-ს, ღვება 62±1 °C. ჯანმრთელი ადამიანის ლიმფოციტების შემადგენლობაში არსებული ქრომატინი ღვება ორ ეტაპად - 102±1 °C და 105±1 °C -ზე.

რადგან ლიმფოციტების კულტურაში პლაზმური ცილების რაოდენობა შეადგენს მთელი ბიომასის ~90%-ს, შესაბამისად, ლიმფოციტების ცილებს, რნმ-კომპლექსს და მემბრანებს არ შეაქვთ მნიშვნელოვანი როლი დიფერენციული სკანირების კალორიმეტრით (დსკ) მიღებული მრუდის ფორმირებაში 40-95 °C -მდე. როგორც მკაფიოდ ჩანს, ქრომატინი დნება 95-115 °C ტემპერატურულ ინტერვალში, ე.ი. იმ ტემპერატურულ ინტერვალში, სადაც პლაზმური ცილები არ იღებენ მონაწილეობას. აღსანიშნავია, რომ კალორიმეტრულ მრუდზე (სურ.4.1.1), მკაფიო პიკი  $T_m=91\pm 1$  °C შეესაბამება ფიბრინოგენის F დომენის დნობას; ეს პიკი არ შეინიშნება ადამიანის სისხლის შრატს შემთხვევაში.

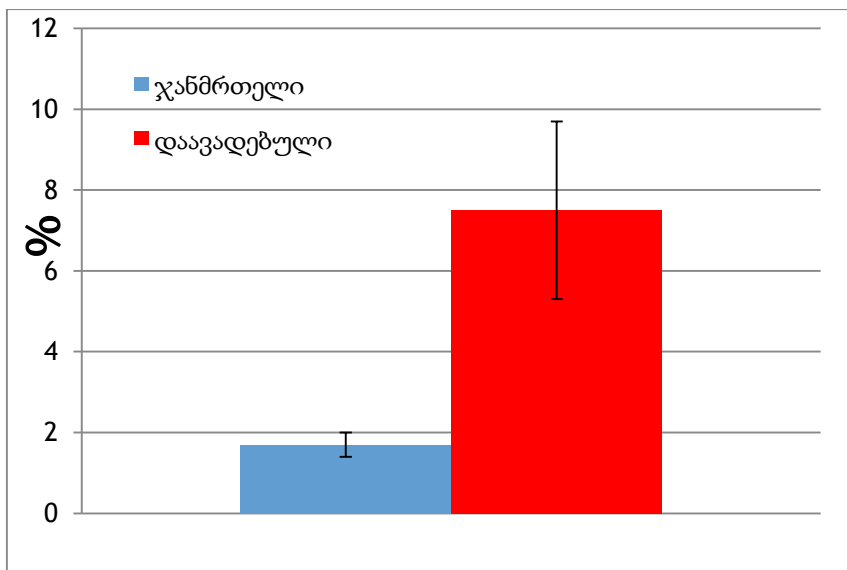
სურ. 4.1.1.-ზე,  $91\pm 1$  °C -ზე მკაფიოდ გამოხატული პიკი დსკ-ს მრუდზე, შეესაბამება F(I) და F(II) დომენების ღვობას. ლივაგენის დამატების შემთხვევაში აქტიური ქრომატინის ინტენსივობა და თერმოსტაბილობა უმნიშვნელოდ იცვლება, მაგრამ ჰეროქრომატინის ინტენსივობა იზრდება, ე.ი. მისი სტაბილობაც უახლოვდება ნორმას.



ამდენად, მიღებული შედეგები, ერთი მხრივ, მიუთითებენ ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა გენომის არასტაბილურობაზე და ქრომატინის მოდიფიკაციურ ცვალებადობაზე, და მეორე მხრივ, შესწავლილი პეპტიდური ბიორეგულატორის მოქმედების სპეციფიკურობაზე, რაც შესაძლოა, ამ პაციენტებში ქრომატინის მდგომარეობის მართვის პერსპექტივას სახავდეს.

**4.2. გენომის სტაბილურობის დონის ცვალებადობის შეფასება ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტებზე ბიორეგულატორისა და მეტალის განმხოლოებული და ერთობლივი მოქმედების დროს**

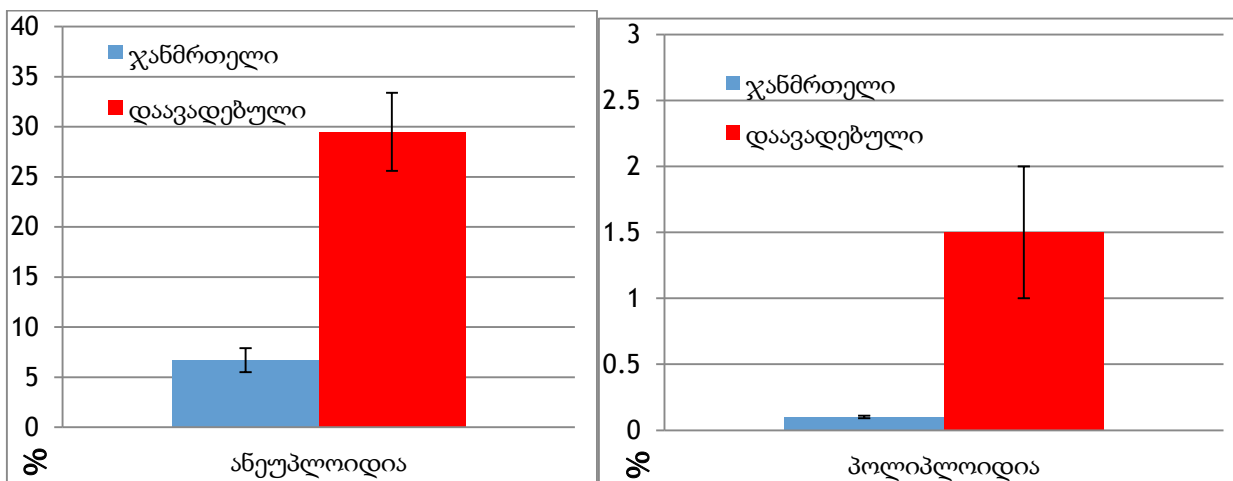
კვლევის პირველ ეტაპზე ჩატარდა გენომის სტაბილურობის დონის შეფასება ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა უჯრედებში, ქრომოსომული აბერაციების ტესტის მიხედვით. შედეგად გამოვლინდა ამ პარამეტრის სიხშირის სარწმუნო ზრდა დაავადებულებში ( $7.5 \pm 2.2$ ), ჯანმრთელ ინდივიდებთან შედარებით ( $1.7 \pm 0.3$ ) (სურ.4.2.1.).



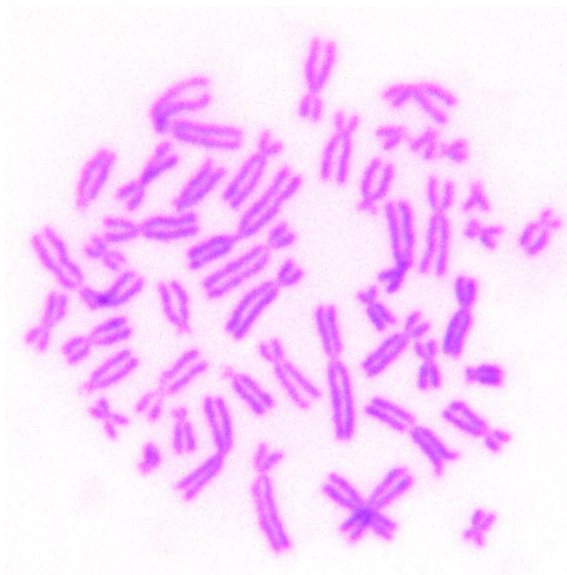
სურ.4.2.1. აბერაციების შემცველი მეტაფაზების პროცენტული მაჩვენებელი ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტურ კულტურებში ( $p < 0,01$ ).

ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულებისათვის დამახასიათებელია ასევე ანეუპლოიდიისა და პოლიპლოიდიის მაღალი მაჩვენებლები (სურ.4.2.2. ა; ბ).

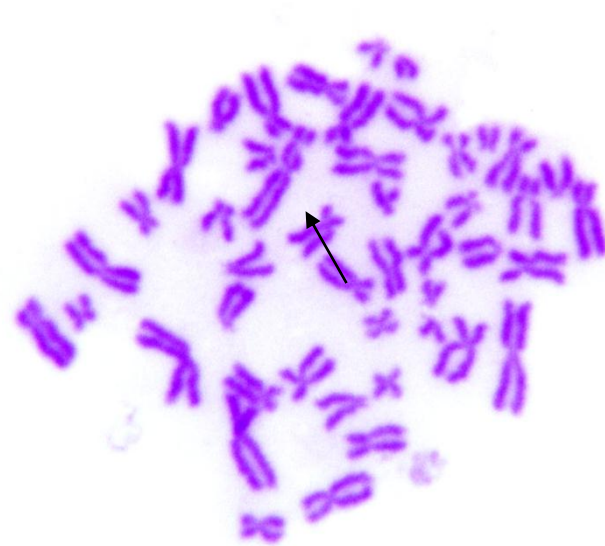
ანეუპლოიდური უჯრედების სიხშირემ ძუძუს კიბოთი დაავადებულებში შეადგინა  $29.5 \pm 3.9\%$ , ხოლო აღნიშნული მაჩვენებელი ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფში იყო  $6.7 \pm 1.2\%$ . პოლიპლოიდიის დონე სადინროვანი ძუძუს კიბოთი დაავადებულებში (პოლიპლოიდურ უჯრედთა სიხშირე -  $1.5 \pm 0.5\%$ ) მნიშვნელოვნად აღემატებოდა ჯანმრთელ ინდივიდთა ინტაქტური კულტურების მაჩვენებელს ( $0.1 \pm 0.01\%$ ).



სურ.4.2.2. ანეუპლოიდიის (ა) და პოლიპლოიდიის (ბ) მაჩვენებლები ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტურ კულტურებში ( $p < 0,01$ ).



ნორმალური მეტაფაზა



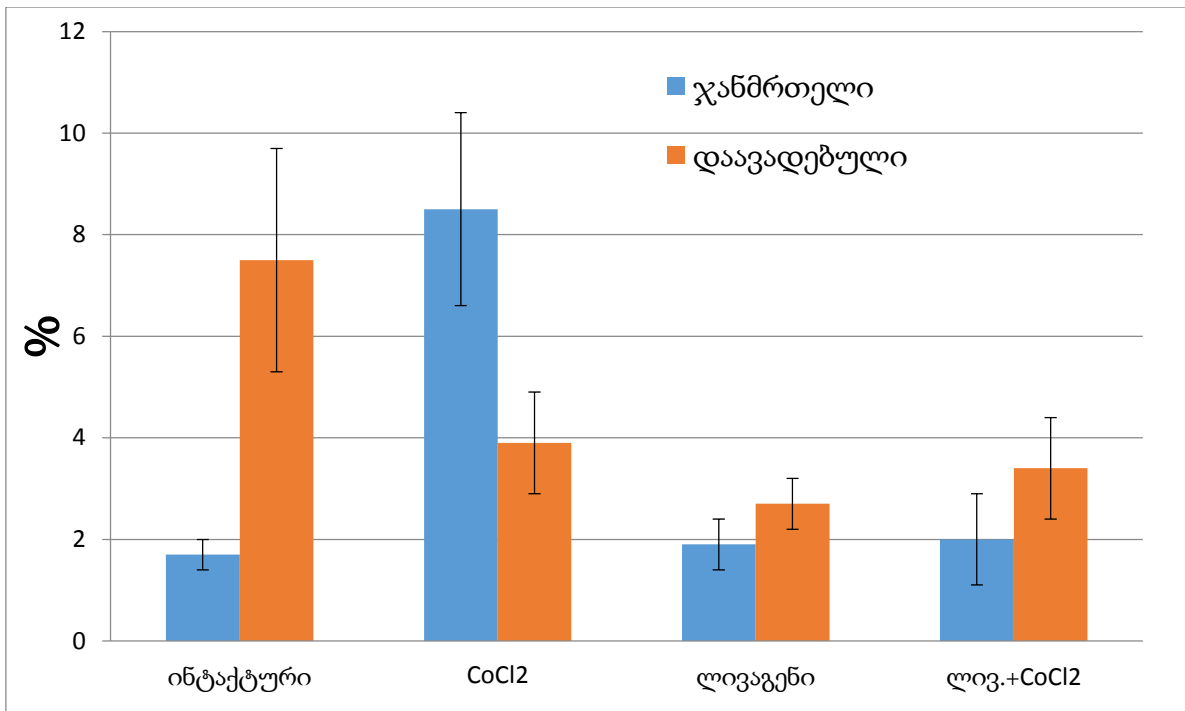
მეტაფაზა ქრომატიდული წყვეტით

ზოგადი გენომური არასტაბილურობა განაპირობებს როგორც უჯრედული, ისე ორგანიზმული ჰომეოსტაზის დარღვევას, იმუნური სტატუსის მკვეთრ დაქვეითებას. თავის მხრივ, არსებობს საფუძველი ვივარაუდოთ, რომ გენომური (ანქრომოსომული) არასტაბილურობის წინაპირობაა ქრომატინის რემოდელირება, რაც, ზოგ შემთხვევაში, შესაძლოა შექცევად ხასიათს ატარებდეს. შესაბამისად, იმ საშუალებათა ძიებას, რომლებსაც დმკ-ს დროს შეცვლილი ქრომატინის კორექციისა და გენომის ნორმალური ფუნქციონირების აღდგენის უნარი ექნებათ, პირველხარისხოვანი მნიშვნელობა ენიჭებათ.

კვლევის წინა ეტაპზე დადგენილი იყო, რომ დმკ-თი დაავადებულთა უჯრედებისათვის დამახასიათებელია გენომის სტაბილურობის დონის მნიშვნელოვანი დაქვეითება, რაც ქრომოსომათა სტრუქტურულ-რაოდენობრივი დარღვევების მაღალ სიხშირეში აისახა.

მოცემულ ეტაპზე გათვალისწინებული იყო პეპტიდური ბიორეგულატორის - ლივაგენისა და კობალტის იონების კომბინირებული მოქმედების შესწავლა ძუძუს დუქტალური კიბოთი დაავადებულების კულტურათა უჯრედებში.

ცნობილია, რომ პეპტიდური ბიორეგულატორების მაკორეგირებელი მოქმედება, შესაძლოა გაიზარდოს გარკვეულ მძიმე მეტალებთან კომბინირებული მოქმედებისას (მიუხედავად იმისა, რომ ამ მეტალებს შეიძლება საკუთარი მუტაგენური ეფექტი ჰქონდეთ), რაც დაზიანებული გენომის აღდგენისათვის ზემოქმედების უკეთესი ვარიანტების შერჩევის შესაძლებლობას იძლევა.



სურ.4.2.3. აბერაციების შემცველი მეტაფაზების პროცენტული მაჩვენებელი ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტურ კულტურებში ბიორეგულატორის - ლივაგენისა და კობალტის იონების განმხოლოებული და ერთობლივი ზემოქმედებისას.

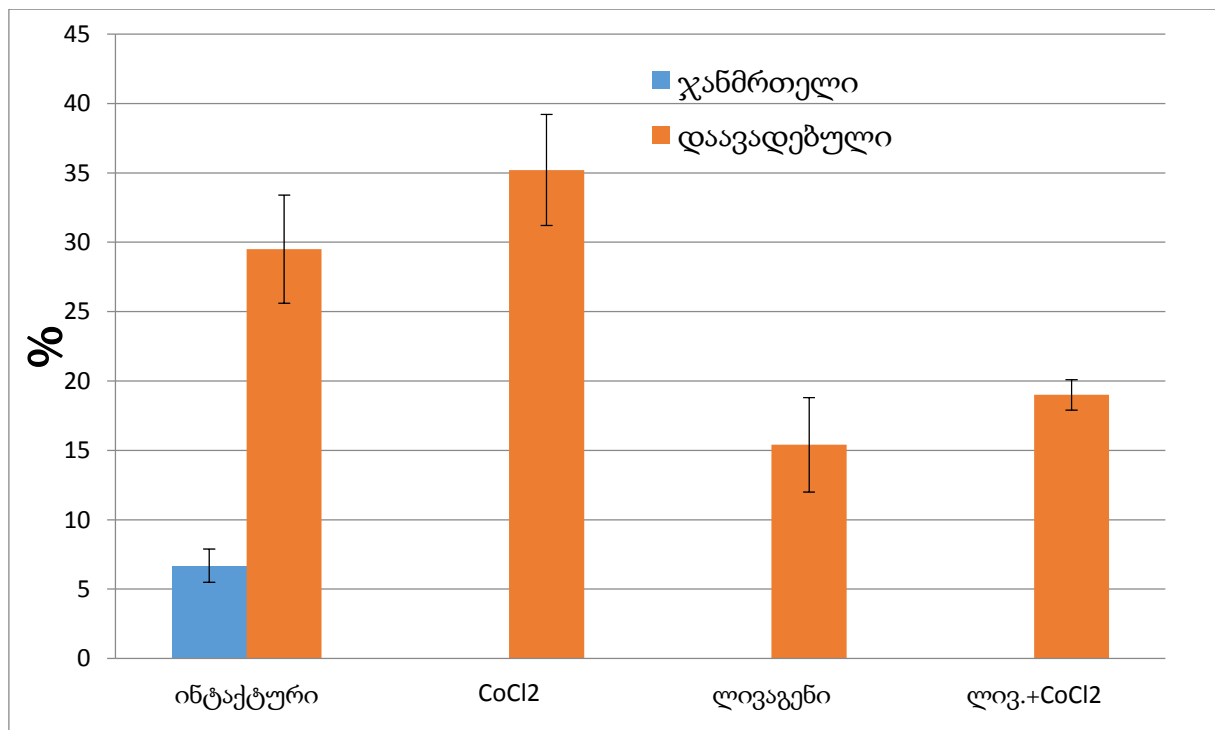
პირველ რიგში განისაზღვრა ტესტირებული მეტალის საკუთარი განმხოლოებული ზემოქმედების ეფექტი დაავადებულთა კულტურალურ უჯრედებში, კერძოდ, აღირიცხებოდა ქრომოსომათა სტრუქტურული აბერაციებისა და რაოდენობრივი დარღვევების (ანეუპლოიდია და პოლიპლოიდია) შემცველ უჯრედთა სიხშირეები. აღმოჩნდა, რომ კობალტის განმხოლოებული ზემომედებისას დარეგისტრირებულ აბერანტულ უჯრედთა სიხშირემ შეადგინა 3,95%, რაც სარწმუნოდ ნაკლებია ჯანმრთელ ინდივიდთა ანალოგიურ მაჩვენებლებთან შედარებით (8,4%). რაც განსაკუთრებით საყურადღებოა, ტესტირებულმა მეტალმა პროტექტორული მოქმედება გამოავლინა დძკ-თი დაავადებულთა კულტურებში - მკვეთრად დააქვეითა ინტაქტური კულტურებისათვის დაფიქსირებული მაჩვენებელი (სურ.4.2.3. ცხრ.1). გამოვლენილი ჯანმრთელ და დუქტალური ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა უჯრედების განსხვავებული მგრძობიანობა შესწავლილ მეტალთა იონებისადმი მეტყველებს იმაზე,

რომ სადინროვანი კიბოთი დაავადებულთა უჯრედები განსხვავებულ მოდელურ უჯრედულ სისტემას წარმოადგენენ.

ლივაგენის კობალტთან კომბინირებული მოქმედების შედეგი განსხვავებული აღმოჩნდა. კერძოდ, ლივაგენის დამცველობითი ეფექტი უფრო მნიშვნელოვანი იყო მისი განმხოლოებული გამოყენებისას (სურ. 4.2.3), ვიდრე მეტალთან კომბინაციაში, თუმცა ამ ორ მაჩვენებელს შორის სარწმუნო სხვაობა არ დაფიქსირდა.

ეს მონაცემები მიუთითებენ იმაზე, რომ უჯრედულ კულტურათა სხვადასხვა მოდელურ სისტემებში სხვადასხვა აგენტებს აქვთ ზემოქმედების მათთვის სპეციფიკური საიტები.

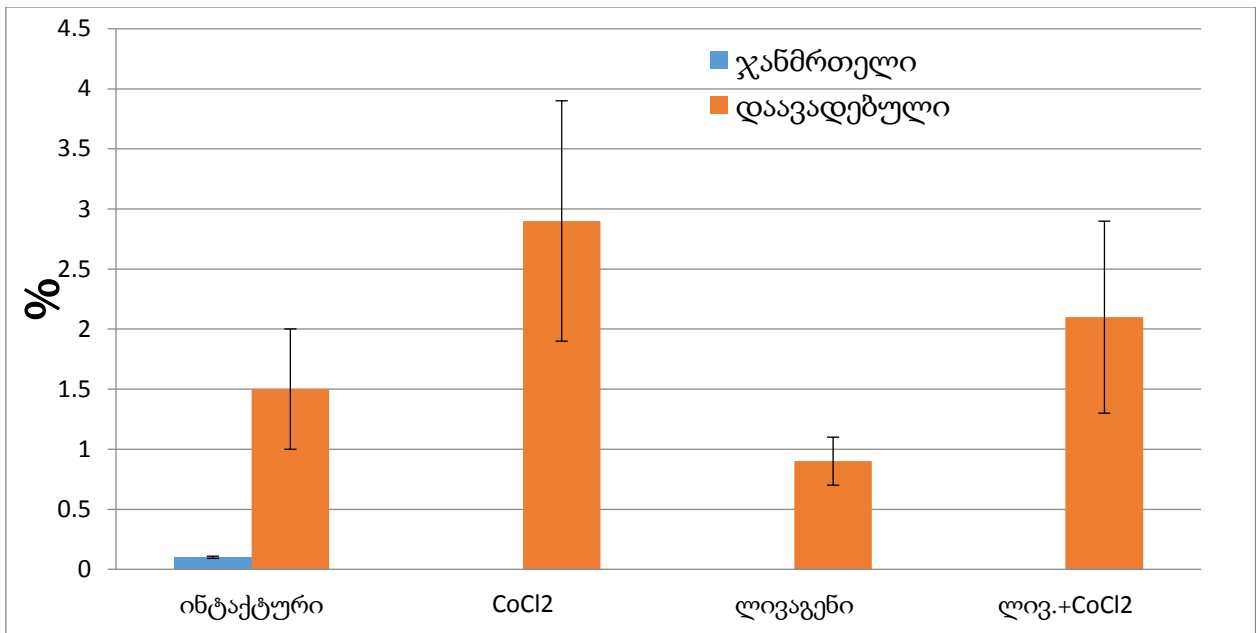
გენომის მდგომარეობის მნიშვნელოვან მაჩვენებელს წარმოადგენს ქრომოსომათა რიცხოვრივი დარღვევები. ანეუპლოიდიის შემთხვევაში ისინი ცენტრომერული ჰეტეროქრომატინის ცვალებადობაზე მიუთითებენ, რადგან სწორედ ცენტრომეროსთან არის დაკავშირებული ქრომოსომათა სეგრეგაციის სიზუსტე მიტოზის დროს.



სურ.4.2.4. ანეუპლოიდიის მაჩვენებელი ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტურ კულტურებში ბიორეგულატორის - ლივაგენისა დაკობალტი იონების განმხოლოებული და ერთობლივი ზემოქმედებისას.

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულებისათვის დამახასიათებელი ანეუპლოიდიის მაღალი მაჩვენებელი (ანეუპლოიდური უჯრედების სიხშირე დაავადებულთა ინტაქტურ კულტურებში შეადგენს 29%-ს; საკონტროლო ჯგუფის ჯანმრთელი ინდივიდების შემთხვევაში - 6,2%-ს), რომელიც მნიშვნელოვან ცვალებადობას განიცდის კულტურებზე ზემოქმედების განსხვავებულ პირობებში. თუ ტესტირებული ბიორეგულატორი - ლივაგენი, განმხოლოებული ზემოქმედებისას სტატისტიკურად სარწმუნოდ აქვეითებდა ანეუპლოიდიის დონეს, მეტალის ეფექტი მკვეთრად განსხვავებული აღმოჩნდა, კერძოდ კობალტი იწვევდა დაავადებულთა ინტაქტური კულტურებისათვის დაფიქსირებული მაჩვენებლის ერთგვარ მატებას, თუმცა ეს მაჩვენებელი არ იყო სტატისტიკურად სარწმუნო (სურ. 4.2.4, ცხრ.1). ლივაგენისა და კობალტის ერთობლივი მოქმედების შედეგად კი სარწმუნოდ ქვეითდებოდა ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ინტაქტურ კულტურებში აღრიცხული ანეუპლოიდიის დონე და შეადგენდა  $19 \pm 1.1\%$  (სურ. 4.2.4, ცხრ.1). შესაძლებელია დავასკვნათ, რომ ისევე როგორც შესწავლილი ბიორეგულატორის განმხოლოებული, მისი მეტალთან კომბინირებული ზემოქმედებისასაც, ადგილი აქვს ცენტრომერული ჰეტეროქრომატინის დეკონდენსაციას.

შესწავლილ იქნა გენომის რაოდენობრივი დარღვევების სხვა მაჩვენებელზე ბიორეგულატორის - ლივაგენისა და მძიმე მეტალის- კობალტის ზეგავლენა. ზოგადად პოლიპლოიდიის დონე დუქტალური ძუძუს კიბოთი დაავადებულებში, როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, მნიშვნელოვნად აღემატება (პოლიპლოიდურ უჯრედთა სიხშირე - 1,5%) ჯანმრთელ ინდივიდთა ინტაქტური კულტურების მაჩვენებელს (0,1%). პეპტიდური ბიორეგულატორი დაავადებულ ინდივიდებში ახდენს ამ მაჩვენებლის ნორმასთან მიახლოებას ( $0.9 \pm 0.2\%$ )(სურ. 4.2.5, ცხრ.1).



სურ.4.2.5. პოლიპლოიდის მაჩვენებელი ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტურ კულტურებში ბიორეგულატორის - ლივაგენისა დაკობალტის იონების განმხოლოებული და ერთობლივი ზემოქმედებისას.

ცხრილი 1. აბერაციების და ანეუპლოიდიის რაოდენობა ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების ინტაქტურ, ბიორეგულატორით და მეტალის იონებით დამუშავებულ ლიმფოციტარულ კულტურათა უჯრედებში

ცდის პირობა	მეტაფაზები აბერაციებით	აბერაციები ერთ უჯრედზე	ცნდ ერთუჯრედზე	ანეუპლოიდია % საერთო რაოდენობიდან±m	პოლიპლოიდია % საერთო რაოდენობიდან±m
	% საერთო რაოდენობიდან±m				
კონტროლი	1,7±0,3	0,017±0,001	0,03±0,01	6,7±1,2	0,1±0,01
დძკ პაციენტი (ინტაქტური)	7,5±1,2	0,08±0,02	0,16±0,03	29,5±3,9	1,5±0,05
დძკ+ლივაგენი	2,7±0,5	0,03±0,015	0,12±0,03	15,4±3,4	0,9±0,02
დძკ+CoCl2	7,9±1,0	0,08±0,01	0,2±0,01	35,2±4,0	2,9±1,0
დძკ+ ლივ-CoCl2	3,4±1,0	0,03±0,03	0,1±0,02	19±1,1	2,1±1,0

ბიორეგულატორ ლივაგენის განმხოლოებული და კობალტთან კომბინირებული მოქმედებისას ასევე მნიშვნელოვნად შემცირდა აბერაციების მაჩვენებელი ერთ უჯრედზე, რომელიც ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ინტაქტურ უჯრედებში შეადგენდა  $0,08 \pm 0,02$  აბერაციას ერთ უჯრედზე, ხოლო ჯანმრთელ ინდივიდებში იყო  $0,017 \pm 0,001$  აბერაცია /უჯრედზე. ლივაგენის მოქმედებამ ეს მაჩვენებელი შეამცირა  $0,03 \pm 0,015$  აბერაცია/უჯრედზე, რაც ზუსტად დაემთხვა ამ ბიორეგულატორის მეტალთან კომბინაციით მიღებულ მაჩვენებელს ( $0,03 \pm 0,03$ ) (ცხრ.1).

#### 4.2.1. ფრაგილური საიტების სიხშირისა და განაწილების შესწავლა ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტებზე ბიორეგულატორისა და მეტალის განმხოლოებული და ერთობლივი მოქმედების დროს

როგორც ცნობილია, გენეტიკურად დეტერმინირებულ დაავადებებს, რომელთაც სიმსივნეების ყველა სახე მიეკუთვნება, ხშირად ახასიათებთ გენომური არასტაბილურობის მაღალი დონე. მოცემული კვლევის ფარგლებში, წინა ეტაპებზე ჩატარდა გენომის სტაბილურობის შეფასება ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა უჯრედებში ქრომოსომული აბერაციების ტესტის მიხედვით და ნაჩვენები იყო ამ პარამეტრის სიხშირის სარწმუნო ზრდა ჯანმრთელ ინდივიდებთან შედარებით. გენომური არასტაბილურობის თავისებურ ფორმას წარმოადგენს ქრომოსომათა ფრაგილური ("მსხვრევადი") საიტები (ორმაფიანი დნმ-ს წყვეტები). „ზოგადი“ და „იშვიათი“ ფრაგილური საიტების ლოკუსები ქრომოსომებზე მოწესრიგებულად არის განლაგებული და სხვა საიტებთან შედარებით უფრო მგრძობიარეა გენეტიკური სტრუქტურის ცვლილების თვალსაზრისით (Debatisse et al., 2012). ფრაგილური საიტების გენეტიკური არასტაბილურობა მნიშვნელოვან როლს ასრულებს გენომის დარღვევების ფორმირებაში, რაც ხშირად ემთხვევა დარღვევებს, რომლებიც აღინიშნება ზოგიერთი სახის სიმსივნისას (Wang et al., 1999; Smith et al., 2007).

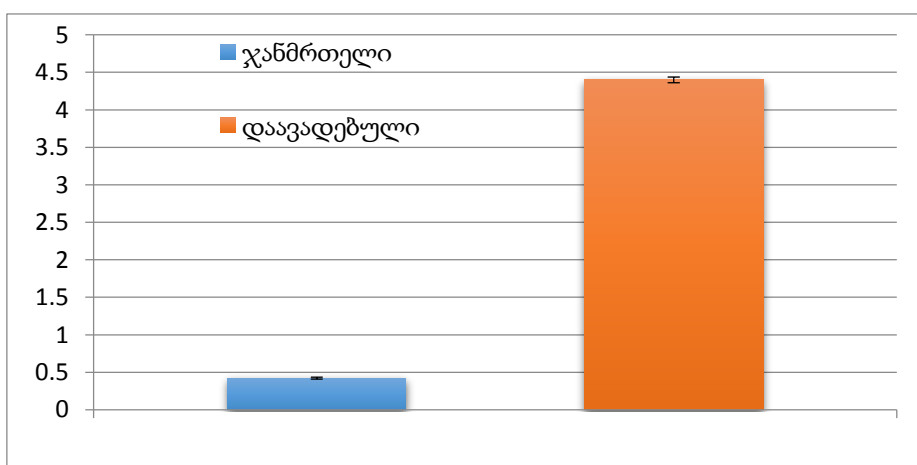
ფრაგილური საიტების გენეტიკური არასტაბილურობა უჯრედული ჰომეოსტაზის დარღვევის წინაპირობაა, რაც, თავის მხრივ, სიმსივნური დაავადების ფორმირების მიზეზი შეიძლება გახდეს. უჯრედული ჰომეოსტაზის შენარჩუნების ერთ-ერთ მექანიზმს



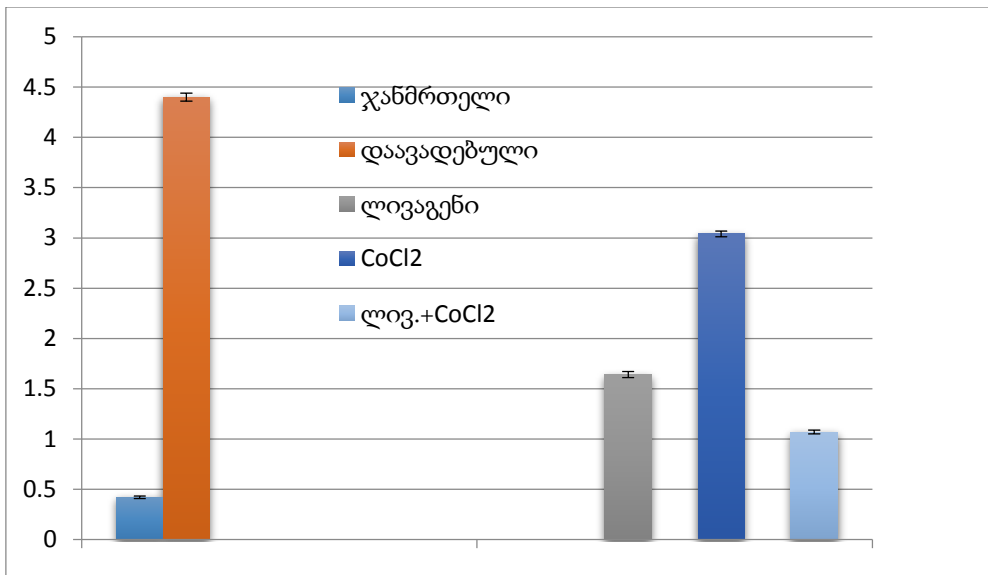
წარმოადგენს რეპარაცია - პროცესი, რომლის შედეგადაც ხდება დნმ-ს დარღვევების აღდგენა (Lezhava, 2001; Lezhava et al., 1979). საინტერესოა, რომ გენომის მდგომარეობის ეს ორივე პარამეტრი - ფრაგილური საიტების ექსპრესიის მაჩვენებელი და დნმ-ს რეპარაციის დონე, ექვემდებარება კორექციას სხვადასხვა ფაქტორებით ზემოქმედებისას (Lezhava et al., 2015).

მოცემულ ეტაპზე გათვალისწინებული იყო პეპტიდური ბიორეგულატორისა (ლივაგენის) და მეტალთა იონებს ( $\text{CoCl}_2$ ) განმხოლოებული და ერთობლივი ზემოქმედების გავლენის შესწავლა დაავადებულთა უჯრედებში ფრაგილური საიტების ექსპრესიის ცვალებადობასა და დნმ-ს არაგეგმიანი სინთეზის (რეპარაციის პროცესის) ინტენსივობაზე.

პირველ რიგში განისაზღვრა ფრაგილური საიტების სიხშირე ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ინტაქტურ უჯრედებში. აღმოჩნდა, რომ ამ მაჩვენებელმა შეადგინა  $4,4 \pm 0,04$  ს/უჯ, რაც მნიშვნელოვნად აღემატება მაჩვენებელს ჯანმრთელი ინდივიდებისათვის -  $0,42 \pm 0,013$  ს/უჯ (სურ.4.2.2.1, ცხრ.2). მიღებული შედეგი მიუთითებს, რომ შეფასების ამ ტესტის მიხედვითაც ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა უჯრედებისათვის დამახასიათებელია დნმ-ს დარღვევების მაღალი დონე, რაც შესაძლოა სიმსივნის ამ ფორმისათვის დამახასიათებელი იშვიათი საიტების ექსპრესიით იყოს განპირობებული.



სურ. 4.2.1.1. ფრაგილური საიტების რაოდენობა ერთ უჯრედზე ჯანმრთელ და ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ინტაქტურ კულტურებში.

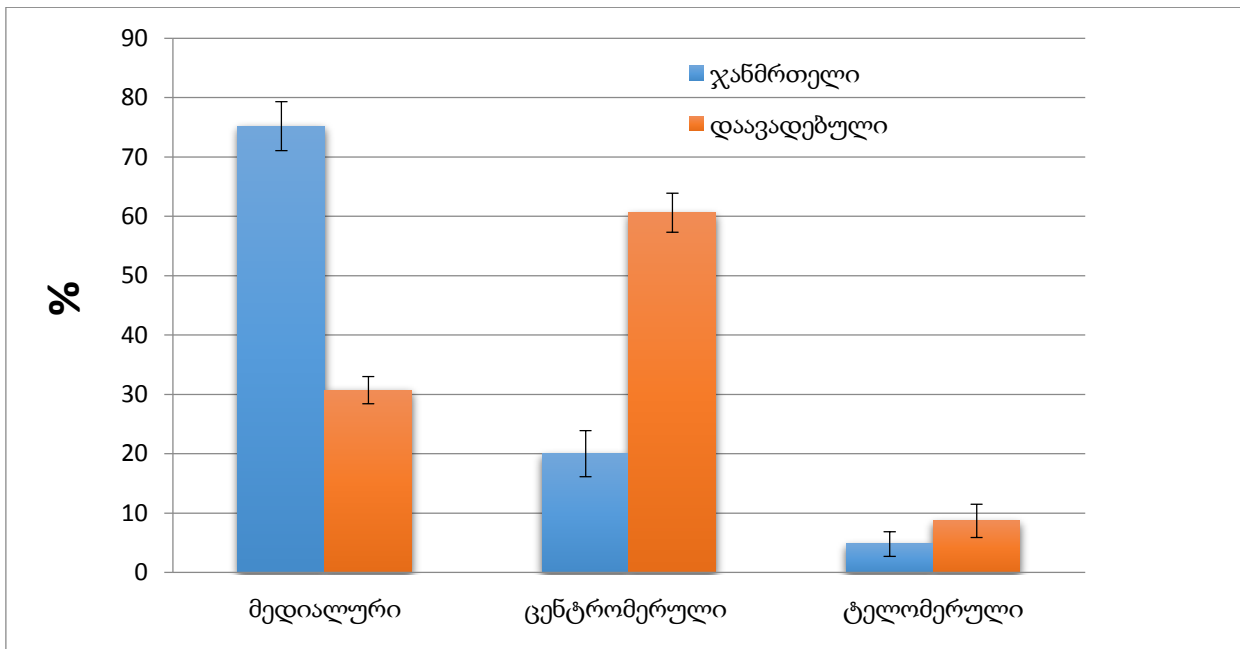


სურ.4.2.1.2. პეპტიდური ბიორეგულატორისა (ლივაგენი) და მეტალის იონების (CoCl<sub>2</sub>) განმხოლოებული და ერთობლივი გავლენა ფრაგილური საიტების გამოვლენის სიხშირეზე (ფრ.საიტი ერთ უჯრედზე) ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების უჯრედებში

პეპტიდური ბიორეგულატორით ზემოქმედებამ ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების უჯრედებზე განაპირობა ფრაგილური საიტების ექსპრესიის დონის სარწმუნო კლება. კერძოდ, ლივაგენით ზემოქმედებისას ერთ უჯრედზე საშუალოდ აღირიცხებოდა  $1,64 \pm 0,03$  საიტი (სურ. 4.2.1.2). გამოვლენილი დამცველობითი ეფექტი შესწავლილი ბიორეგულატორის მიერ ქრომატინის მოდიფიკაციის უნრით შეიძლება აიხსნას, რაც ლიტერატურის მონაცემებით დასტურდება (Lezhava et al., 2004; Khavinson et al., 2003). ლივაგენის შედარებითი ეფექტურობის გამო იგი გამოიცადა, აგრეთვე მეტალის იონებთან (CoCl<sub>2</sub>) ერთობლივი ზემოქმედებისას. კობალტის იონები განმხოლოებული ზემოქმედებისას რამდენადმე აქვეითებდნენ ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა უჯრედებში ფრაგილური საიტების გამოვლენის სიხშირეს ( $3,04 \pm 0,03$  ს/უჯ - კობალტის ზემოქმედებისას;  $4,4 \pm 0,04$  ს/უჯ. - ინტაქტურ კულტურებში). ლივაგენითან ერთობლივი გამოყენებისას დამცველობითი ეფექტი სარწმუნოდ მაღალი იყო ( $1,07 \pm 0,02$  ს/უჯ) (სურ.4.2.1.2, ცხრ.2).

ცხრილი 2. ფრაგილური საიტების რაოდენობა და განაწილება ქრომოსომაზე მდებარეობის მიხედვით, ჯანმრთელ და ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ინტაქტურ და ბიორეგულატორისა და მეტალის განმხოლოებული და ერთოლივი მოქმედებით დამუშავებულ კულტურებში

ცდის პირობა	ფრაგილური საიტები ერთ უჯრედზე	ფრაგილური საიტების ტიპები (% საერთო რაოდენობიდან)		
		მედიალური	ტერმინალური	ცენტრომერული
ჯანმრთელი ინდივიდები	0.42±0.5	75.2±4.1	4.8±2.07	20±3.88
ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების უჯრედები(ინტაქტური)	4.4± 0.04	30.7±2,3	8.7±2,8	60,6±3,3
Liv	1.64±0.02	40.3±2,3	5.8±1,5	53.9±3,5
Liv+CoCl <sub>2</sub>	1.07±0.02	50.11±3,0	5.81±1,5	44,08±3,2
CoCl <sub>2</sub>	3.04±0.03	25±3.4	5±2.11	70±3.4



სურ. 4.2.1.3. ფრაგილური საიტების განაწილება ქრომოსომათა სიგრძეზე ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა და ჯანმრთელ ინდივიდთა უჯრედებში.

საინტერესო სურათი გამოვლინდა ქრომოსომათა სიგრძის გასწვრივ ფრაგილური საიტების განაწილების შესწავლისას. აღმოჩნდა, რომ პაციენტთა უჯრედებში ფრაგილური საიტები უპირატესად აღირიცხებოდა ქრომოსომათა ცენტრომერულ უბნებში ( $60,6 \pm 3,3\%$  საიტების საერთო რაოდენობიდან), რაც მკვეთრად განასხვავდება მათ ჯანმრთელი ინდივიდების უჯრედებისაგან, სადაც ფრაგილური საიტების უდიდესი ნაწილი მოდიოდა მედიალურ უბნებზე ( $75,2 \pm 4,1$  - მედიალური საიტები;  $20 \pm 3,8$  - ცენტრომერული) (სურ. 4.2.2.3, ცხრ.2). მიღებული შედეგი დაავადებულთა უჯრედებში ცენტრომეროსთან მიმდებარე უბნების სპეციფიკურ დეკონდენსაციაზე უნდა მიუთითებდეს.

ჩვენს მიერ გამოვლენილ იქნა სპეციფიკურობა ფრაგილური საიტების ექსპრესიასთან დაკავშირებით კობალტის მოქმედებისათვის, რომელიც მაღალი სიხშირით ინდუცირებდა ფრაგილურ საიტებს პერიცენტრომერულ ქრომატინში (ცხრ.2). ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ კობალტი იწვევს ცენტრომერული უბნების გაშლას, დეკონდენსაციას. როგორც ავნიშნეთ, კობალტის იონებით ზემოქმედებისას პერიცენტრომერულ უბნებში იზრდება შვილეულ ქრომატიდთა გაცვლების სიხშირე, გაცვლები კი, უპირატესად ეუქრომატულ უბნებში ხდება. შესაბამისად, ეფექტი უნდა მივაწეროთ კობალტის იონების სპეციფიკურ ზემოქმედებას ქრომოსომის ამ ნაწილზე. კობალტით ზემოქმედებისას ასევე იზრდება პერიცენტრომერულ უბნებში ფრაგილური საიტების გამოვლენის სიხშირე.

ბიორეგულატორის როგორც განხილვებული, ასევე მეტალის იონთან კომბინირებული მოქმედებისას ხდებოდა აღნიშნული მაჩვენებლების ნორმასთან მიახლოება (ცხრ.2).

ცხრილი 3. ფრაგილური საიტების განაწილებას ქრომოსომული ჯგუფების მიხედვით, ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა და ჯანმრთელ ინდივიდთა როგორც ინტაქტურ უჯრედებში, ასევე ბიორეგულატორისა და მეტალის განმხოლოებული და კომბინირებული მოქმედებისას.

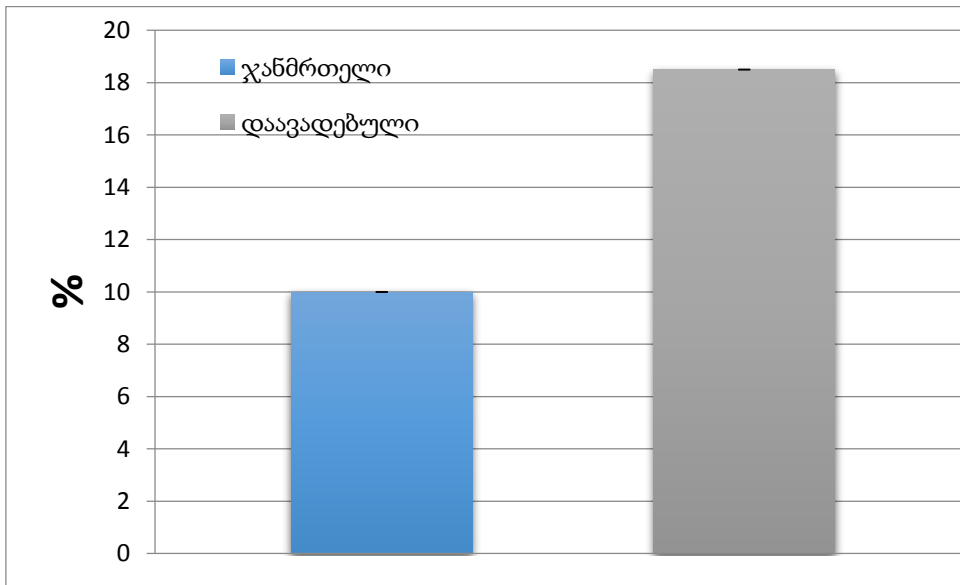
ცდის პირობა	ქრომოსომათა ჯგუფები						
	A	B	C	D	E	F	G
ჯანმრთელი ინდივიდები	24,1±0,1	21,7±0,5	40±0,3	12,6±0,05	1,5±0,01	-----	-----
ძუძუს კიბოთი დაავად. ინტაქტური	28,24±0,8	24,13±0,7	36,44±0,8	1,35±0,8	6,3±2,2	3,54±2,3	-----
Liv	20±1,6	13±1,5	46±2,4	8,8±0,8	2,2±0,5	2,2±0,5	-----
Liv+CoCl <sub>2</sub>	16±0,5	8,8±0,1	39±0,8	15±0,5	6,6±1,5	10±1,2	6,6±1,5
CoCl <sub>2</sub>	23,5±1,5	1,8±0,1	54,7±3,3	13,2±1,4	5,6±1,0	1,8±0,1	-----

რაც შეეხება ფრაგილური საიტების განაწილებას ქრომოსომული ჯგუფების მიხედვით, პაციენტების ინტაქტური კულტურების მაჩვენებელი ჯანმრთელი ინდივიდების კონტროლისაგან განსხვავდებოდა ქრომოსომათა A, E და F ჯგუფებისათვის (ცხრ.3). კობალტი განმხოლოებული გამოყენებისას დაავადებულებში სარწმუნოდ აქვეითებდა ინტაქტური კულტურების მაჩვენებელს B ჯგუფისათვის, თუმცა ლივაგენტან ერთობლივი ზემოქმედება ამ პარამეტრის ნორმალიზაციას ახდენდა (ცხრ.3).

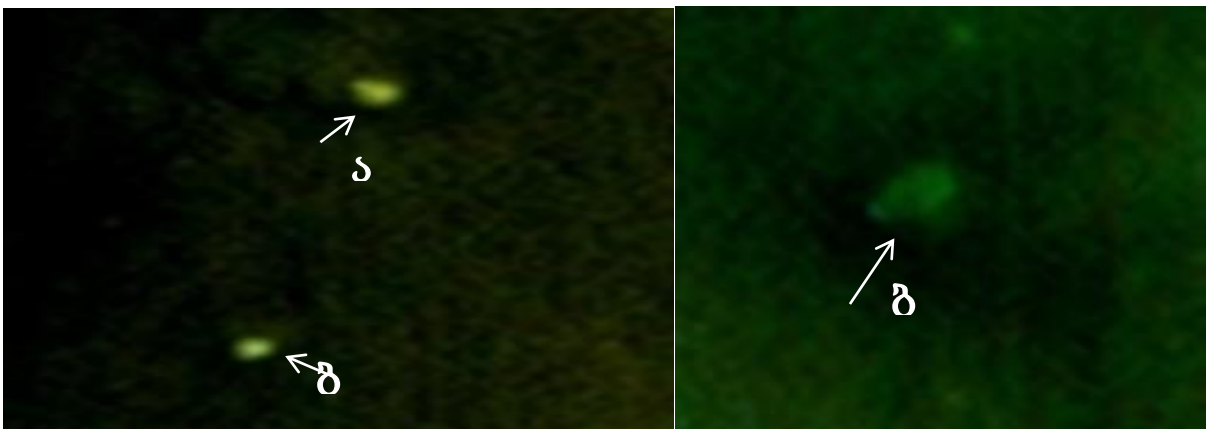
ამრიგად, ჩატარებული კვლევები საფუძველს გვაძლევს დავასკვნათ, რომ ძუძუს კიბოთი დაავადებული ინდივიდებისათვის დამახასიათებელია ფრაგილური საიტების ექსპრესიის როგორც ზოგადი, ისე მეტალის იონებით ინდუცირებული მაღალი დონე, რაც პეპტიდური ბიორეგულატორებით კორექციას ექვემდებარება.

#### 4.2.2 დნმ-ს ერთმაფიანი წყვეტების შემცველ უჯრედთა სიხშირის განსაზღვრა ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულ ინდივიდებში

ფლუორესცენტული მეთოდის (Comet assay) გამოყენებით შესწავლილ იქნა გენეტიკური მასალის - დნმ-ს მთლიანობის დაზიანების - ერთმაფიანი წყვეტების შემცველ უჯრედთა სიხშირეები ჯანმრთელთა და ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულთა უჯრედებში.



სურ. 4.2.2.1. ფლუორესცენტული მეთოდით (Comet assay) გამოვლენილი დნმ-ს ერთმაფიანი წყვეტების შემცველ უჯრედთა სიხშირე ჯანმრთელ და ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა კულტურებში.



სურ. 4.2.2.2. ფლუორესცენტული მეთოდით (Comet assay) გამოვლენილი ა. დნმ-ს ერთმაფიანი წყვეტების შემცველი უჯრედი; ბ. ნორმალური უჯრედი.

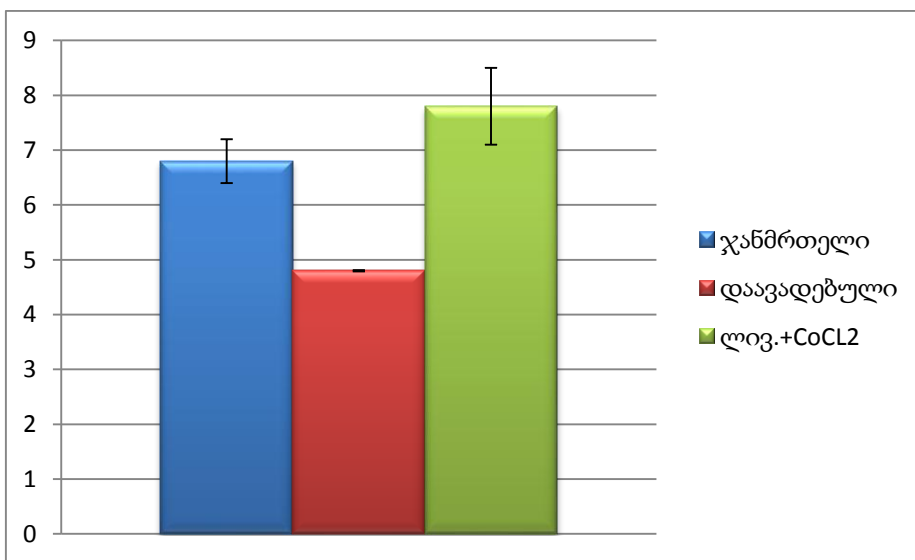
ჯანმრთელი ინდივიდების საშუალო მაჩვენებელმა შეადგინა  $10,0 \pm 0,01\%$ , ხოლო შუშს კიბოთი დაავადებულებში ერთმაფიანი წყვეტების შემცველ უჯრედთა რაოდენობა შეესაბამებოდა  $18,52 \pm 0,013\%$ -ს (სურ.4.2.2.1; 4.2.2.2.). შესაბამისად, ფლუორესცენციის მეთოდის გამოყენებამ დაადასტურა, რომ ძუძუს კიბოთი დაავადებულებში დაფიქსირებული ქრომოსომული არასტაბილურობის მაღალი დონე განპირობებულია მათ უჯრედებში დნმ-ის პირველადი დაზიანებების - ერთმაფიანი წყვეტების ზრდით ფლუორესცენტული მეთოდის გამოყენებისას დაავადებულთა კულტურებში გამოვლენილი დნმ-ს ერთმაფიანი წყვეტების ზრდა საშუალებას იძლევა აიხსნას ამ ინდივიდებისათვის დამახასიათებელი მაღალი გენომური არასტაბილურობა.

#### **4.3. შვილეულ ქრომატიდთაშორისი გაცვლების სიხშირისა და განაწილების შესწავლა ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტებზე ბიორეგულატორისა და მეტალის განმზოლოებული და ერთობლივი მოქმედებისას**

ტელომერათა სიგრძის ცვალებადობის შეფასება სადინროვანი ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა უჯრედებში ხდებოდა შვილეულ ქრომატიდთა შორის გაცვლების მეთოდის (შქგ) გამოყენებით. ამ მიზნით შქგ-ს ტესტის გამოყენება ემყარება იმ გარემოებას, რომ ქრომატიდთაშორისი გაცვლების ფორმირება ძირითადად ქრომოსომათა ეუქრომატულ უბნებში ხდება, შესაბამისად, გაცვლების რაოდენობის კლება ან ზრდა ქრომატინის დეკონდენსაციასა ან კონდენსაციის მატებაზე მიუთითებს (Лежава, 2001). მაკორეგირებელი ზემოქმედების ეფექტის შესაფასებლად, ამ შემთხვევაში გამოყენებული იყო ლივაგენითა და კობალტის იონებით ერთობლივი ზემოქმედება.

ცხრილი 4. შვილეულ ქრომატიდაშორისი გაცვლების სიხშირე და განაწილება ჯანმრთელ ინდივიდთა და ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტურ კულტურებში (ინტაქტური და ლივაგენ-კობალტის ერთობლივი ზემოქმედებისას).

ცდის პირობა	შქგ ერთ უჯრედზე	შქგ-ს ტიპები (% გაცვლების საერთო რაოდენობიდან)		
		მედიალური	ტერმინალური	ცენტრომერული
ჯანმრთელი ინდივიდები	6,8±0,4	57,9±0,7	18,7±0,5	23,3±0,6
ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების უჯრედები(ინტაქტური)	4,8±0,01	50,4±3,5	18,6±2,7	31±3,2
ძუძუს კიბოთი დაავადებული +ლივ.-CoCL2	7,8 ±0,7	53±2,7	22±2,1	25±2,3

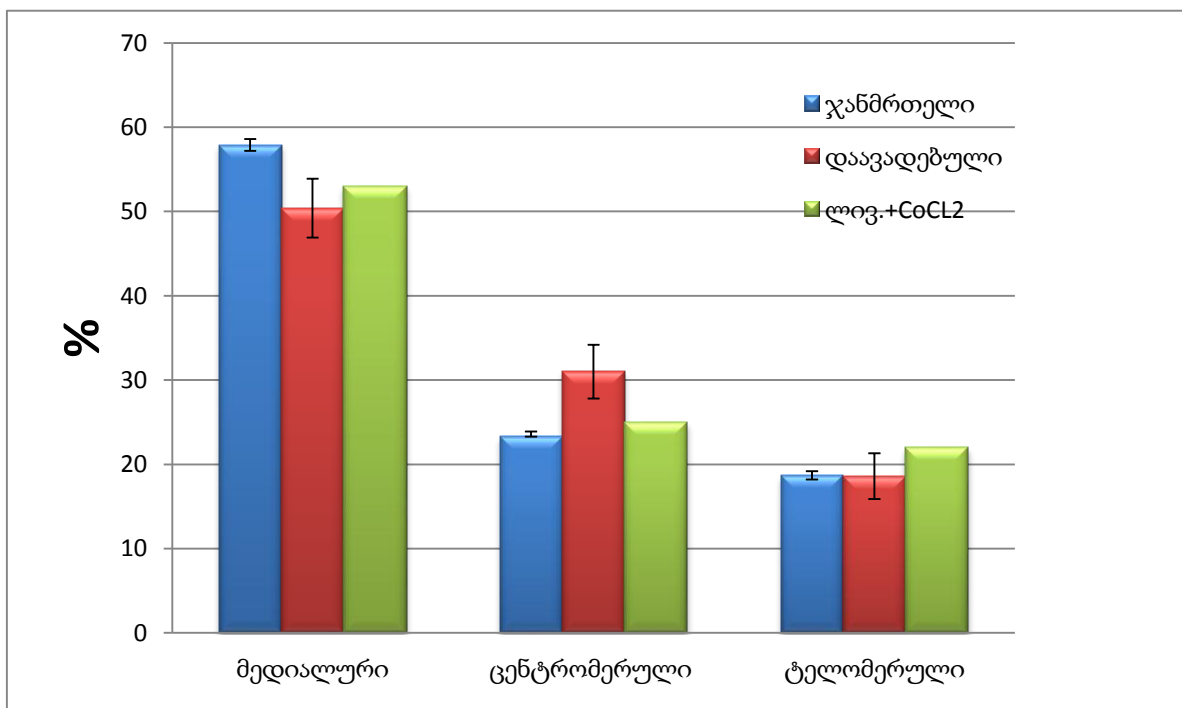


სურ.4.3.1. შვილეულ ქრომატიდაშორისი გაცვლების სიხშირე (გაცვ./უჯრედზე) ძუძუს კიბოთი დაავადებულ, ლივ.+CoCL2-ით დამუშავებულ და ჯანმრთელ ინდივიდთა უჯრედებში.

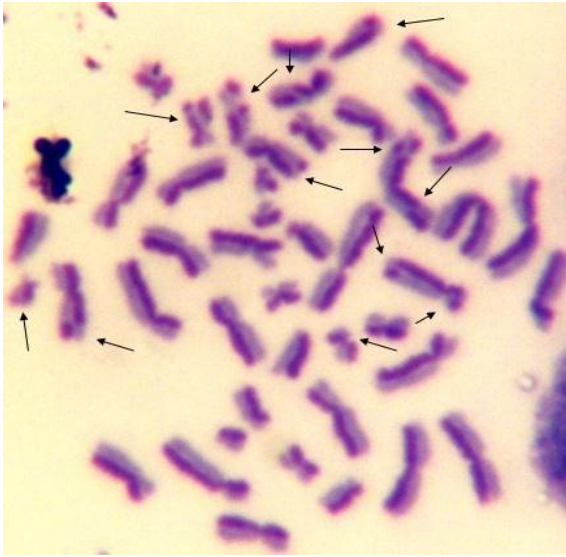
აღმოჩნდა, რომ ჩვენს მიერ გამოკვლეულ ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფში ქრომატიდაშორისი გაცვლების მაჩვენებელმა საშუალოდ 6,8±0,4 გაცვ./უჯრედზე შეადგინა. გაცვლების სიხშირე დაავადებულთა უჯრედებში



კონტროლთან შედარებით სარწმუნოდ დაქვეითდა ( $4,8 \pm 0,01$  გაცვ./უჯ) (სურ.4.3.1. ცხრ.4), რაც დაავადებულთა ქრომატინის ზოგად კონდენსაციაზე მიუთითებს და შესაბამისობაშია ქრომოსომული აბერაციების ტესტის გამოყენებით მიღებულ შედეგთან. დაავადებულთა ლიმფოციტური კულტურების ლივაგენ-კობალტით დამუშავებისას, გაცვლების მაჩვენებელი ინტაქტურ კულტურებთან შედარებით სტატისტიკურად სარწმუნოდ იზრდებოდა და საშუალოდ,  $7,8 \pm 0,7$  გაცვ./უჯ. შეადგინა, რაც იმ დასკვნის გაკეთების შესაძლებლობას იძლევა, რომ ლივაგენ-კობალტის ზემოქმედება ზოგადი მადეკონდენსირებელი ეფექტით ხასიათდება. ამ შემთხვევაშიც ლივაგენ-კობალტის მიერ გამოვლენილი მაკორეგირებელი სურათი თანხვედრაშია აბერაციების ტესტის გამოყენებით მიღებულთან.



სურ. 4.3.2. შვილეულ ქრომატიდათაშორისი გაცვლების განაწილება ქრომოსომათა სიგრძის გასწვრივ ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ინტაქტურ, ლივ.+CoCl<sub>2</sub>-ით დამუშავებულ და ჯანმრთელ ინდივიდათა უჯრედებში



მეტაფაზა შვილეულ ქრომატიდაშორისი გაცვლებით

სადინროვანი ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა უჯრედებში ქრომოსომათა ტელომერული უბნების სიგრძის ცვალებადობის დასადგენად შესწავლილ იქნა გაცვლების განაწილების სიხშირე ქრომოსომული უბნების მიხედვით. აღმოჩნდა, რომ ქრომოსომათა ჯგუფების ჯამური მაჩვენებლის მიხედვით ადგილი ჰქონდა განაწილების ზოგადი სურათის თანხვედრას ჯანმრთელ ინდივიდთა ინტაქტურ და დაავადებულთა ინტაქტურ და ლივაგენ-კობალტით დამუშავებულ კულტურათა უჯრედებში, კერძოდ, აღინიშნებოდა მედიალური გაცვლების საგრძნობი სიჭარბე, ცენტრომერული და ტელომერული გაცვლები გაცილებით უფრო დაბალი სიხშირით იყო წარმოდგენილი (სურ. 4.3.2, ცხრ.4).

როგორც ლიტერატურის მონაცემები მოწმობენ, ჯანმრთელ დონორებში ადგილი აქვს ტელომერათა სიგრძის ქრომოსომოსპეციფიკურ განაწილებას (Lansdorp, 1996). აღინიშნება, რომ ადამიანის ინდივიდუალური ტელომერული პროფილი ხასიათდება როგორც მნიშვნელოვანი სიგრძის მქონე ისე შედარებით მოკლე ტელომერებიანი ქრომოსომების არსებობით. საინტერესოა, რომ რიგი პათოლოგიების შემთხვევაში გამოვლენილია ტელომერათა შეფარდებითი სიგრძის განაწილების ცვალებადობა გარკვეული ჯგუფის ცალკეული ქრომოსომების მიხედვით.

ცხრილი 5. შქგ-ს ტიპების განაწილება ქრომოსომებისა და მდებარეობის მიხედვით, ჯანმრთელ და ძუძს კიბოთი დაავადებულთა ინტაქტური ლიმფოციტური კულტურების უჯრედებში

ქრომოსომ ათა ჯგუფები	ჯანმრთელი ინდივიდების უჯრედები			ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა უჯრედები ინტაქტური		
	მედ	ტელ	ცენტრ	მედ.	ტელ.	ცენტრ.
A1	6.8±1.3	1.3±0.5	1.6±0.6	7,3±1,8	0,9±0,6	4,4±1,4
A2	6.2±1.1	0.51±0.3	1.9±0.7	5,3±1,5	3.9±1.3	2.9±1.1
A3	1.6±0.6	1.6±0.5	1.9±0.7	3,4±1,2	0,9±0,6	1.9±0.9
B	8.8±1.4	2.4±0.8	2.5±0.8	5,3±1,5	2.4±1.0	4.9±1,5
C	24.2±2.2	8.5±1.4	10.2±1.5	18,3±2,6	5.8±1.6	9.8±2.0
D	4.9±1.1	2.2±0.7	1.12±0.5	5,3±1,5	0.9±0.6	-----
E	3.3±0.3	1.3±0.5	2.4±0.8	4,4±1,4	1.9±0.9	3.4±1.2
F	1.3±0.05	0.8±0.04	1.5±0.05	0,9±0,6	1.4±0.8	3.4±1.2
G	0.8±0.04	0.21±0.02	-----	-----	-----	-----

ძუძუს კიბოს სადინროვანი ფორმით დაავადებულთა უჯრედებში ტელომერული უბნების ცვალებადობის შესწავლის შედეგების შეჯამებისას უნდა აღინიშნოს, რომ, ერთი მხრივ, ამ ინდივიდებში ადგილი აქვს ტელომერათა სიგრძის ქრომოსომასპეციფიკურ ცვალებადობას, მეორე მხრივ, გამოვლინდა ლივაგენ-კობალტით ზემოქმედების მაკორეირებელი ეფექტი, რაც, აგრეთვე, ქრომოსომასპეციფიკურ ხასიათს ატარებს.

#### 4.4. Ag - დადებითი ბირთვაკმაორგანიზებელი უბნების გამოვლენის სიხშირე და განაწილების თავისებურება აკროცენტრულ ქრომოსომებზე ბიორეგულატორისა და მეტალის ერთობლივი და განმხოლოებული ზემოქმედებისას ძუძუს სადინროვანი დაავადებულებში

როგორც ცნობილია, უჯრედის ფუნქციური მდგომარეობისა და მისი დიფერენციაციის დონის მნიშვნელოვანი მახასიათებელია ბირთვაკების ზომა, ფორმა და რაოდენობა. ბირთვაკების წარმოქმნაში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ე.წ. ბირთვაკის ორგანიზატორი, ანუ ქრომოსომის ბირთვაკმაორგანიზებელი უბანი. ბირთვაკის ორგანიზატორები შეიცავენ 18S და 28S რიბოსომული რნმ-ს მაკოდირებელ ცისტრონებს და ლოკალიზებული არიან ქრომოსომათა მეორეული ჭიმის ზონებში. მათი რაოდენობა და ლოკალიზაცია სახეობასპეციფიკურ ნიშანს წარმოადგენს. როგორც უკვე აღინიშნა, ადამიანში ბირთვაკის ორგანიზატორთა ლოკალიზაციის ადგილს წარმოადგენს ათივე აკროცენტრული ქრომოსომის მოკლე მხრის მეორადი ჭიმების ზონები, ე.წ. თანამგზავრული ძაფები (Stalk). აკროცენტრული ქრომოსომები თანამგზავრული ძაფებით უკავშირდებიან ერთმანეთს - შედიან ასოციაციებში, რაც მათზე ლოკალიზებული ბირთვაკის ორგანიზატორების აქტივობის მაჩვენებელია. აქტიურ ბირთვაკის ორგანიზატორთა სიხშირე და თანამგზავრული ასოციაციები - ეს ორი ურთიერთდამოუკიდებელი პარამეტრია (Lezhava et al., 2008).

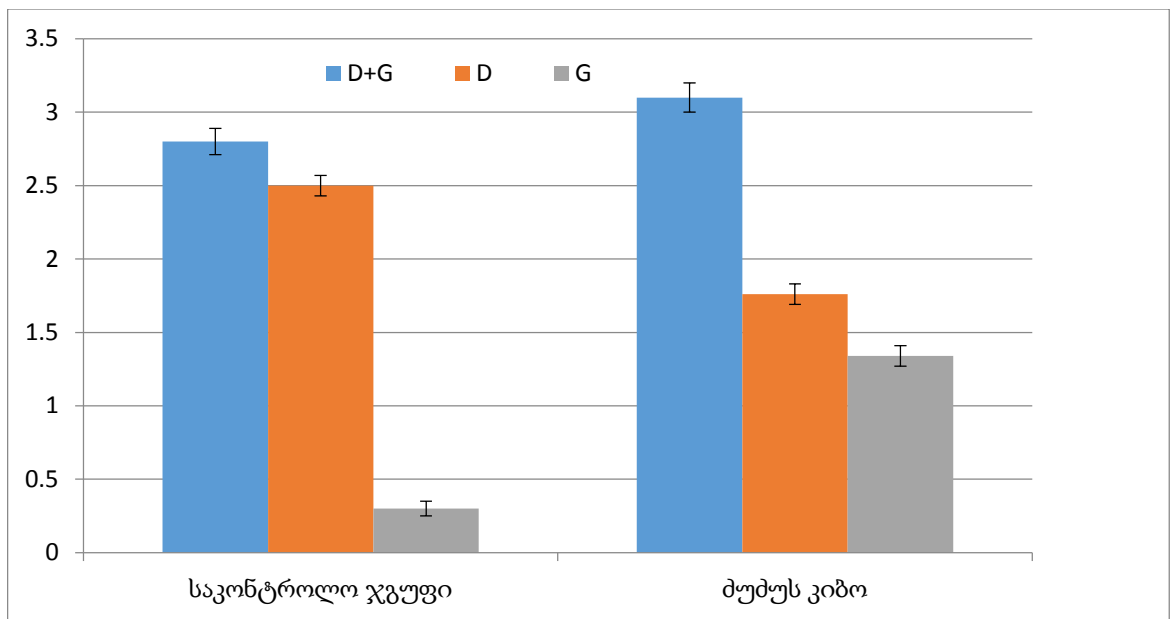
როგორც უკვე აღინიშნა, აქტიურ ბირთვაკის ორგანიზატორთა გამოსავლენად გამოყენებულ იქნა Ag-მეთოდი და აქტივობის შეფასება ხდებოდა მოვერცხლილი ბლოკების ზომის მიხედვით.

გამოკვლევულ იქნა აქტიურ ბირთვაკის ორგანიზატორთა სიხშირე ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულ ინდივიდებში, რის მიხედვითაც განისაზღვრა ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტურ კულტურებში სინთეზური პროცესების აქტივობის დონე.

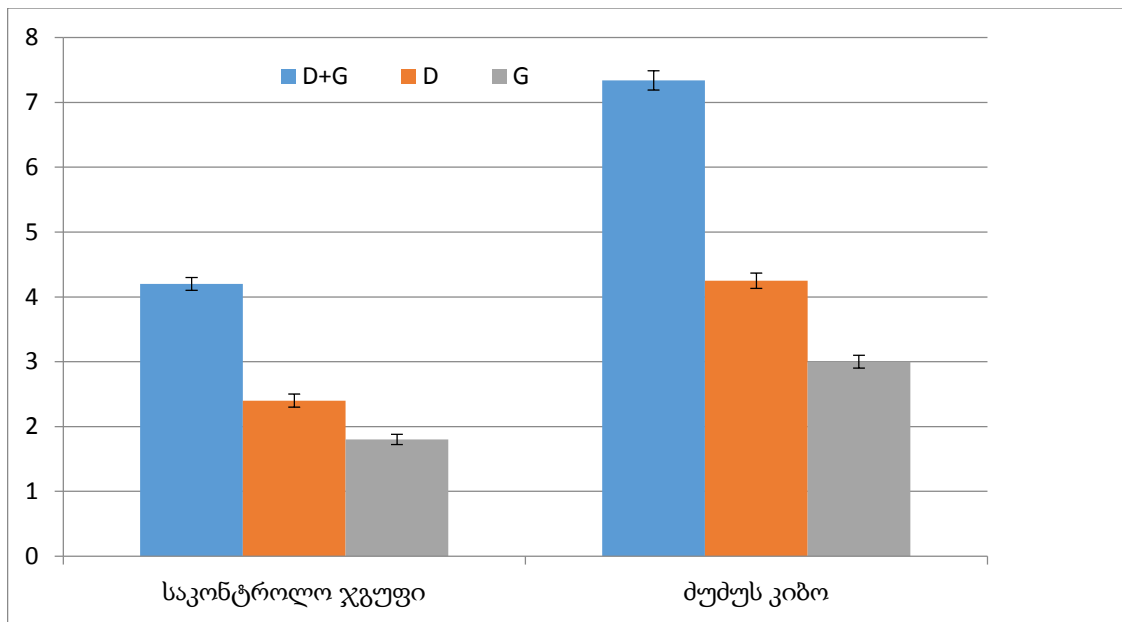
ცხრილი 6. Ag-დადებითი ასოცირებული და არასოცირებული ქრომატიდების რაოდენობრივი მაჩვენებლები ქრომოსომული ჯგუფების მიხედვით

ცდის პირობა	Ag-დადებითი ქრომატიდების რიცხვი ერთ უჯრედზე	ასოციაციაში შესული Ag-დადებითი ქრომატიდების რაოდენობა ერთ უჯრედზე			ასოციაციაში არ შესული Ag-დადებითი ქრომატიდების რაოდენობა ერთ უჯრედზე		
		D+G	D	G	D+G	D	G
საკონტროლო ჯგუფი	7.0±0.12	2.8±0.09	2.5±0.07	0.3±0.05	4.2±0.1	2.4±0.1	1.8±0.08
ძუძუს კიბოთი დაავად.	<b>10.45±0.19</b>	3.1±0.1	1.76±0.07	<b>1.34±0.07</b>	<b>7.25±0.15</b>	<b>4.25±0.12</b>	<b>3.0±0.1</b>

როგორც მიღებული მონაცემებიდან ჩანს, Ag-დადებითი ქრომატიდების რიცხვი ერთ უჯრედზე ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდებში სარწმუნოდ არის გაზრდილი (**10.45±0.19**) ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (7.0±0.12) (ცხრ.6). აღნიშნული მაჩვენებელი განვსაზღვრეთ ქრომოსომული ჯგუფების მიხედვითაც. აღმოჩნდა, რომ ასოციაციაში შესული ქრომატიდების ჯამური მაჩვენებელი ერთ უჯრედზე სარწმუნოდ იყო გაზრდილი G ჯგუფის ქრომოსომების შემთხვევაში, ხოლო ასოციაციაში არ შესული Ag-დადებითი ქრომატიდების რაოდენობა ერთ უჯრედზე გაზრდილი იყო როგორც D, ისე G ჯგუფის ქრომოსომებისათვის და შეადგინა **4.25±0.12** და **3.0±0.1**, შესაბამისად. აღნიშნული მაჩვენებელი საკონტროლო ჯგუფში იყო 2.4±0.1 – D ჯგუფის ქრომოსომების, ხოლო 1.8±0.08 – G ჯგუფის ქრომოსომების შემთხვევაში (ცხრ.6, სურ. 4.4.1; 4.4.2).



სურ. 4.4.1. ასოციაციაში შესული Ag-დადებითი ქრომატიდების რაოდენობა ერთ უჯრედზე ჯანმრთელ და ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტური კულტურების უჯრედებში



სურ. 4.4.2. ასოციაციაში არ შესული Ag-დადებითი ქრომატიდების რაოდენობა ერთ უჯრედზე ჯანმრთელ და ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტური კულტურების უჯრედებში

ცხრილი 7. ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფისა და ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტურ კულტურათა აკროცენტრული ქრომოსომების ასოციაციებში შესული Ag-დადებითი ქრომატიდები ქულების მიხედვით (%საერთო რაოდენობიდან)

აკროცენტრული ქრომოსომის ნომერ	13		14		15		21		22	
	1 ქ.	2 ქ.	1 ქ.	2 ქ.	1 ქ.	2 ქ.	1 ქ.	2 ქ.	1 ქ.	2 ქ.
Ag-დადებითი ქრომატიდები ქულების მიხედვით										
საკონტროლო ჯგუფის მონაცემები (%)	5.9±0.6	13.6±0.9	6.3±0.6	15.4±0.9	5.0±0.6	14.3±0.9	5.6±0.6	14.3±0.9	5.0±0.6	14.3±0.9
ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა მონაცემები (%)	10.6±1.0	8.2±0.9	10.2±1.0	6.8±0.9	15.9±1. 1	8.0±0.8	11.7±1. 0	12.7±1.0	7.7±0.8	8.0±0.8

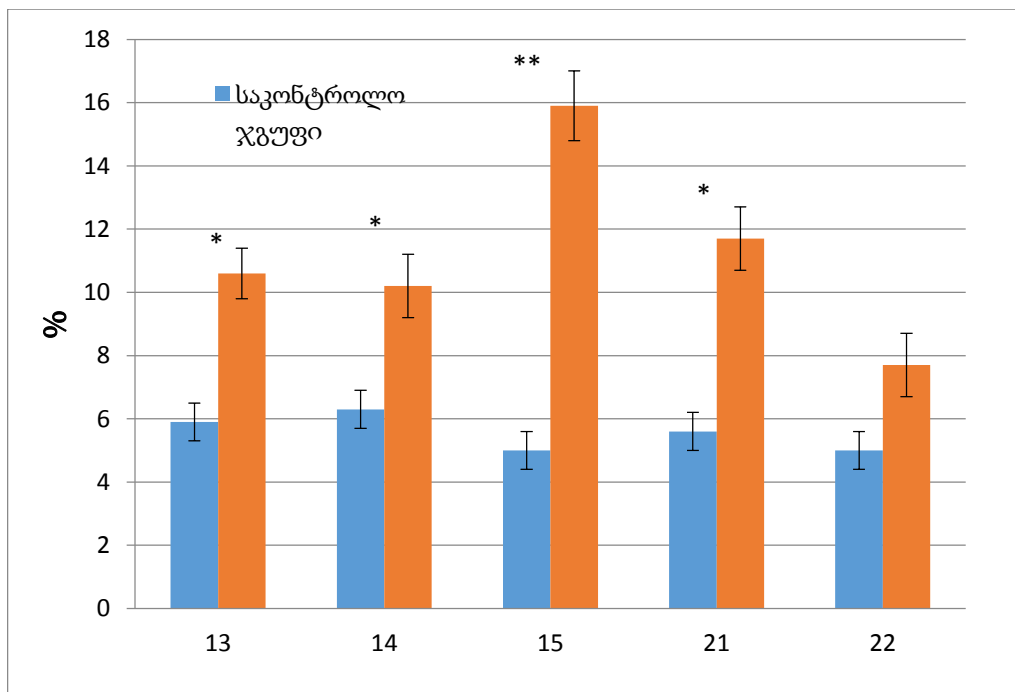
ცხრილი 8. ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფისა და ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტურ კულტურათა აკროცენტრული ქრომოსომების ასოციაციებში არ შესული Ag-დადებითი ქრომატიდები ქულების მიხედვით (% საერთო რაოდენობიდან)

აკროცენტრული ქრომოსომის ნომერი	13		14		15		21		22	
	1 ქ.	2 ქ.	1 ქ.	2 ქ.	1 ქ.	2 ქ.	1 ქ.	2 ქ.	1 ქ.	2 ქ.
Ag-დადებითი ქრომატიდები ქულების მიხედვით										
საკონტროლო ჯგუფის მონაცემები (%)	5.4±0.5	14.2±0.8	6.9±0.5	14.7±0.8	4.6±0.5	12.7±0.7	6.2±0.5	15.6±0.8	5.4±0.5	13.5±0.7
ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა მონაცემები (%)	9.2±0.5	8.3±0.5	11.2±0.6	8.2±0.5	11.7±0.6	8.3±0.5	15.5±0.7	8.9±0.5	11.4±0.6	8.4±0.5

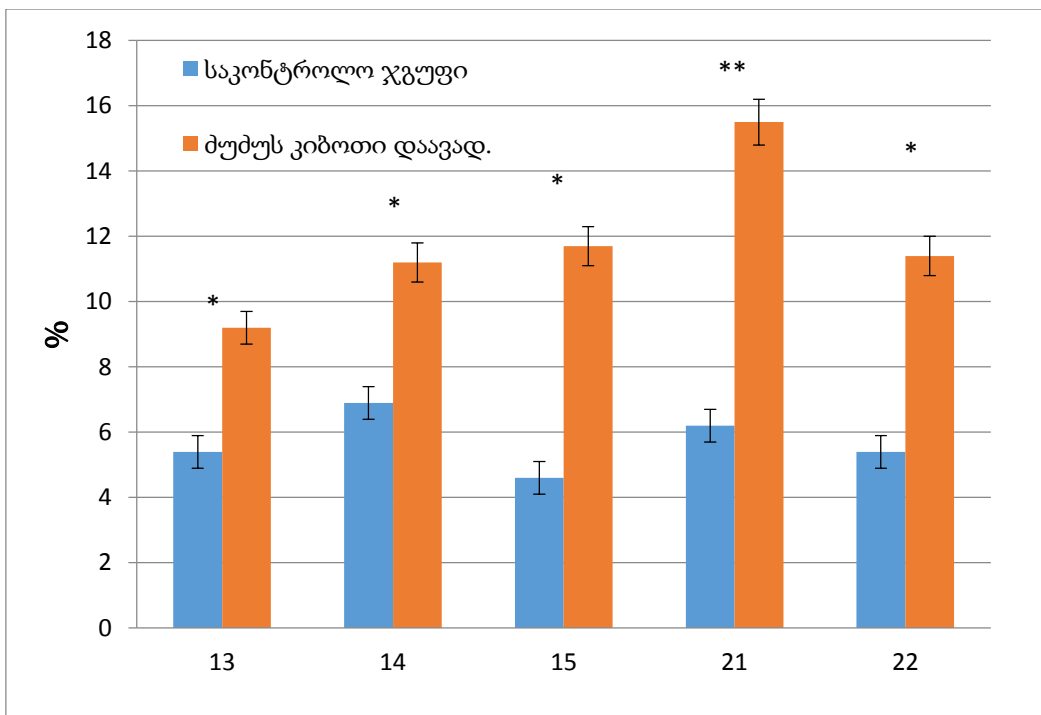


კვლევის ამავე ეტაპზე აღვრიცხავდით Ag-დადებითი სეგმენტების ზომას. როგორც აღვნიშნით, მოვერცხილი სეგმენტების ზომის შეფასება ხდება 3 ბალიანი სისტემით: 0 – სეგმენტების არარსებობა, 1 – მცირე ზომის სეგმენტები (ქრომატინის სისქეზე პატარა), 2 – დიდი ზომის (ქრომატიდის სისქის ტოლი ამ მასზე დიდი).

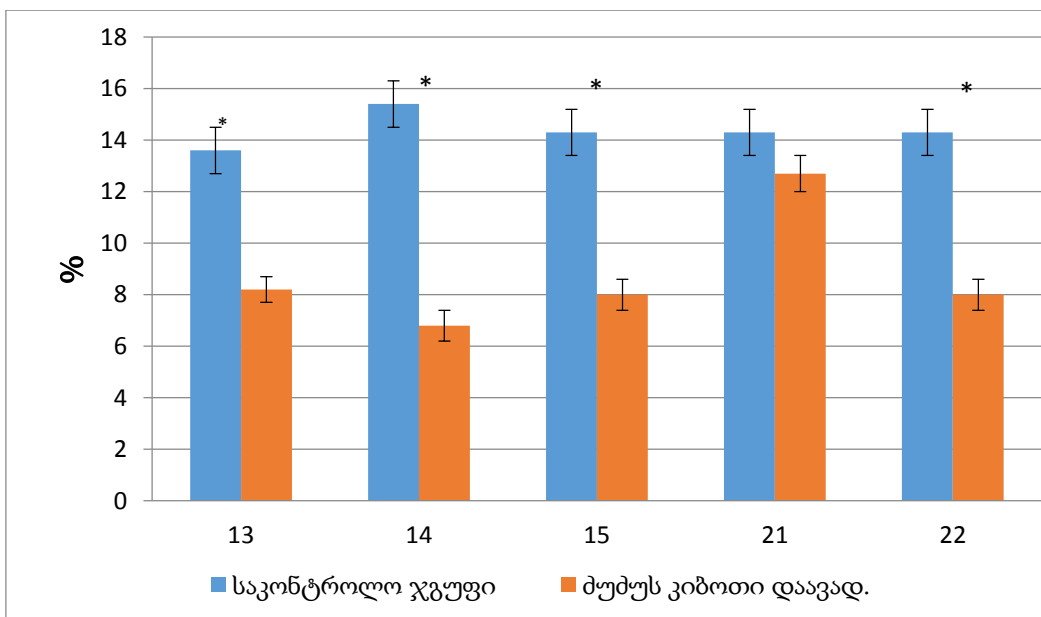
ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტურ კულტურებში მიღებული შედეგების შედარებისას ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფის მაჩვენებელთან, გამოვლინდა საინტერესო შედეგი: ისევე როგორც ასოციაციაში მონაწილე, ასოციაციაში არ მონაწილე Ag-დადებითი 1 ქულიანი ბირთვაკის ორგანიზატორების რაოდენობა სარწმუნოდ იყო გაზრდილი ძუძუს კიბოთი დაავადებულებში, ყველა აკროცენტრული ქრომოსომის შემთხვევაში. ასოციაციაში შესული ერთქულიანების შემთხვევაში აღნიშნული მაჩვენებელი განსაკუთრებით იმატებდა 15-ე ქრომოსომისათვის, ხოლო არასოცირებულების შემთხვევაში, 21-ე ქრომოსომისაზე იყო გაზრდილი ერთქულიანი Ag-დადებითი ბირთვაკის ორგანიზატორების სიხშირე (ცხრ. 7,8; სურ.4.4.3; 4.4.4).



სურ. 4.4.3. ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფისა და ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტურ კულტურათა აკროცენტრული ქრომოსომების ასოციაციებში შესული 1 ქულიანი Ag-დადებითი ქრომატიდების სიხშირე (\* p<0.01; \*\*p<0.001).

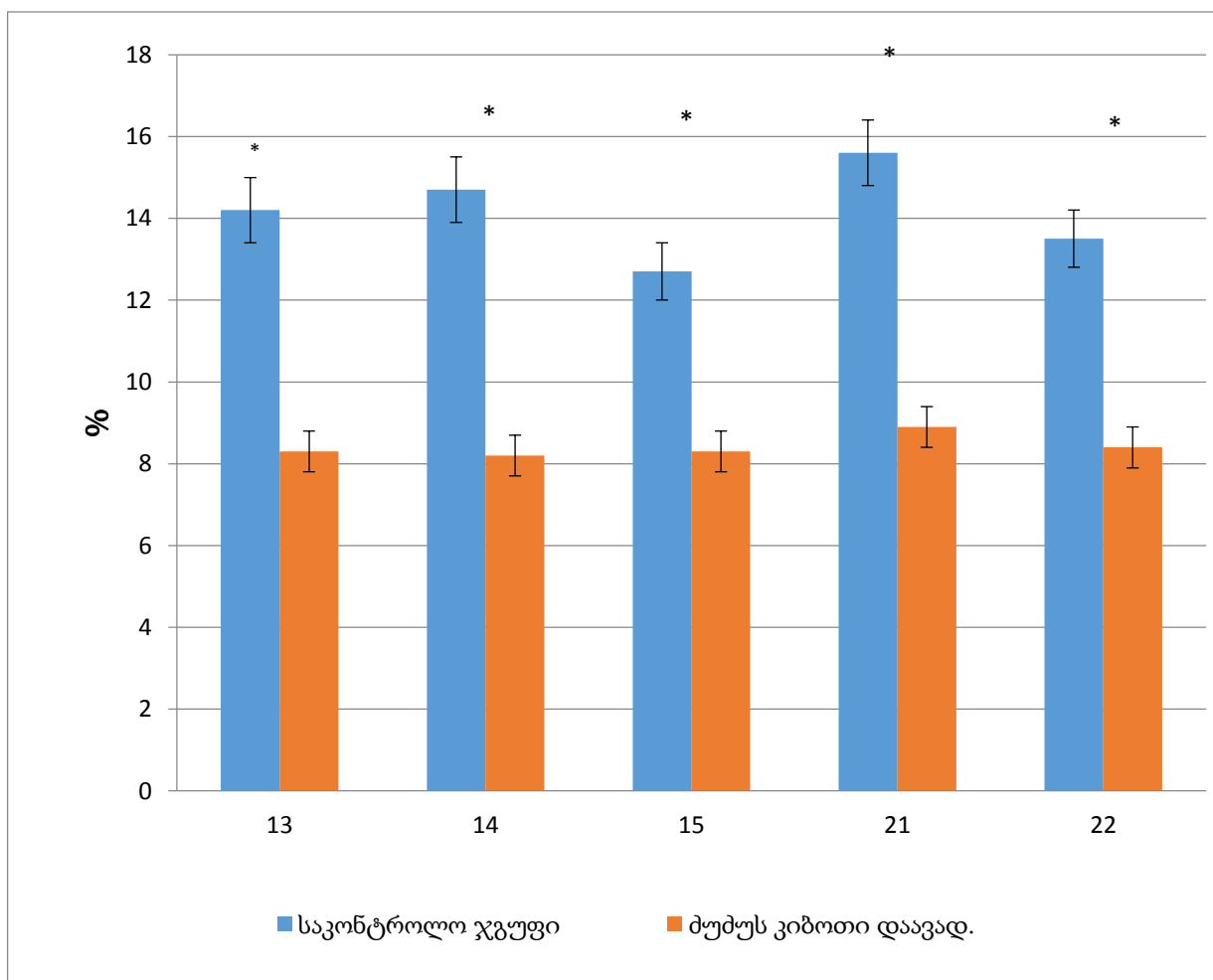


სურ. 4.4.4. ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფისა და ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტურ კულტურათა აკროცენტრული ქრომოსომების არასოცირებული 1 ქულიანი Ag-დადებითი ქრომატიდების სიხშირე(\* p<0.01; \*\*p<0.001).



სურ. 4.4.5. ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფისა და ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტურ კულტურათა აკროცენტრული ქრომოსომების ასოციაციებში შესული 2 ქულიანი Ag-დადებითი ქრომატიდების სიხშირე (\* p<0.01).

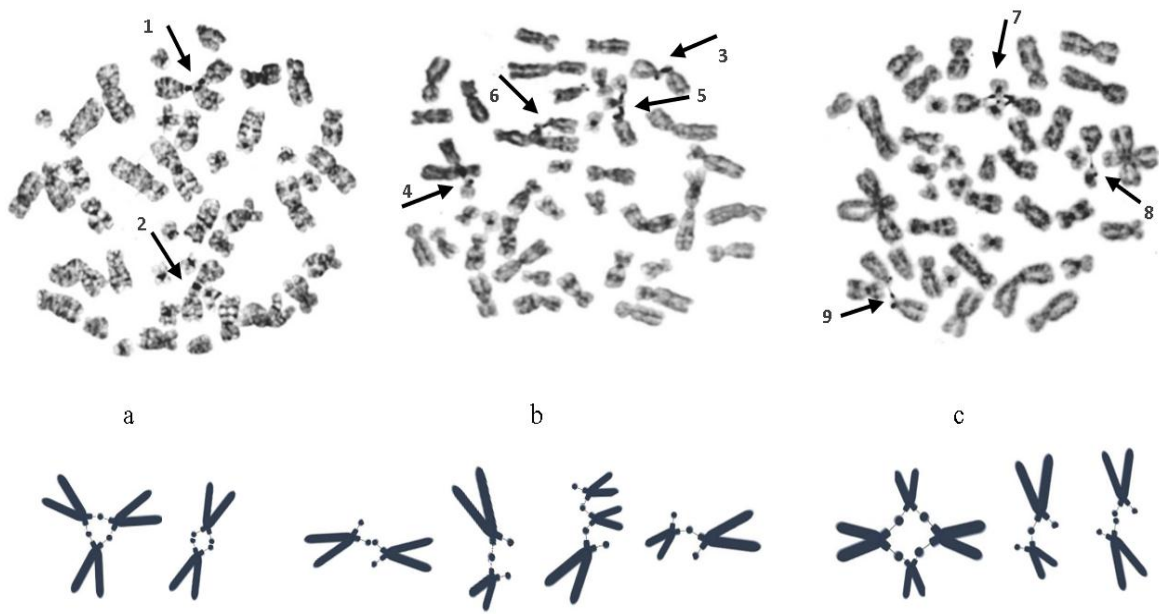
რაც შეეხება Ag-დადებითი 2 ქულიანი ბირთვაკის ორგანიზატორების რაოდენობას, ძუძუს კიბოთი დავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტარულ კულტურებში მიღებული მაჩვენებელი სარწმუნოდ დაბალი იყო ჯანმრთელ ინდივიდთა მაჩვენებელთან შედარებით, როგორც ასოცირებული, ასევე არასოცირებული აკრცენტრული ქრომოსომებისათვის. ადგილი ჰქონდა მხოლოდ ერთ გამონაკლისს, კერძოდ, ასოციაციაში შესული ბირთვაკის აქტიური ორგანიზატორების სიხშირე არ იკლებდა მხოლოდ 21-ე ქრომოსომისათვის, რაც ადასტურებს აღნიშნული ქრომოსომის გაზრდილ ასოციაციურ აქტივობას (ცხრ.7,8; სურ.4.4.5; 4.4.6).



სურ. 4.4.6. ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფისა და ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტურ კულტურათა აკრცენტრული ქრომოსომების არასოცირებული 2 ქულიანი Ag-დადებითი ქრომატიდების სიხშირე (\* p<0.01).

**4.5. ქრომატიდული ასოციაციების ტიპების სიხშირისა და რიბოსომული ცისტრონების აქტივობის შეფასება ბიორეგულატორისა და მეტალის იონების განმხოლოებული და ერთობლივი მოქმედებისას ძუძუს ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულებში**

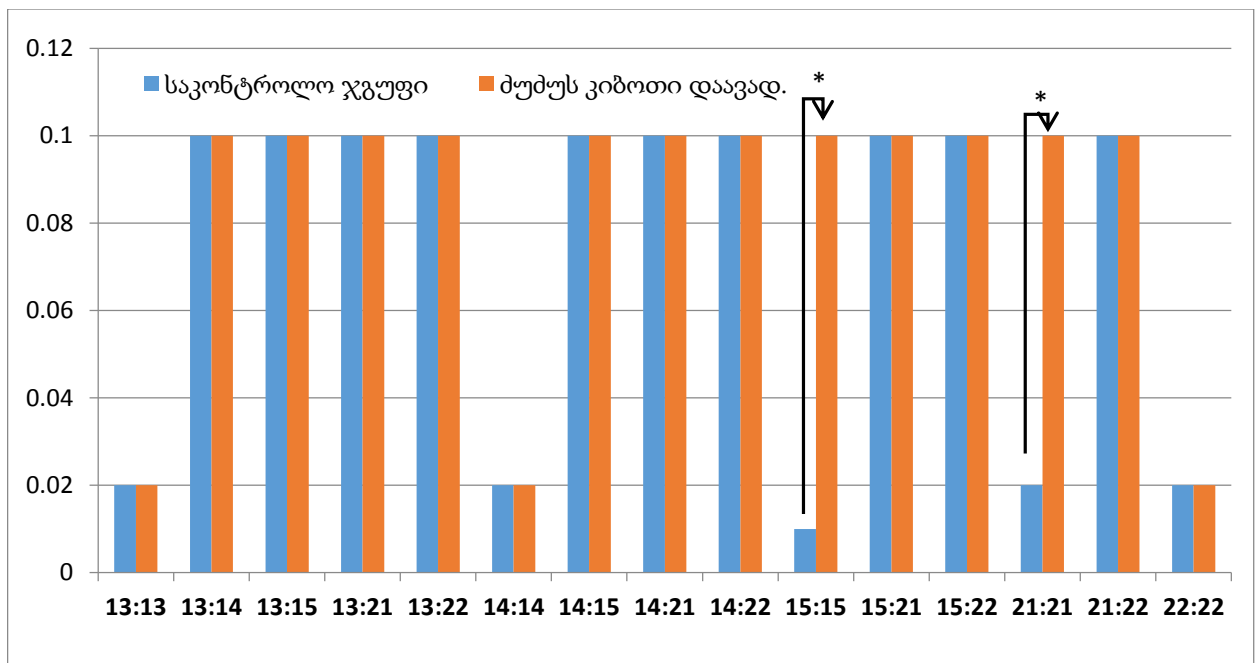
კვლევის შემდეგ ეტაპზე აღვრიცხეთ ქრომატიდული ასოციაციების ტიპების ინტენსივობა. აღრიცხულ იქნა როგორც ჰომოლოგიური, ასევე არაჰომოლოგიური ასოციაციები. გამოვლინდა ძალზედ საინტერესო სურათი: ასოციაციათა ტიპების ინტენსივობა ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო მაჩვენებელსა და ძუძუს კიბოთი დაავადებულებს ანალოგიურ მაჩვენებელს შორის განსხვავებას ავლენდა მხოლოდ 15:15 და 21:21 ჰომოლოგიური ასოციაციების შემთხვევაში, სადაც ფიქსირდებოდა აღნიშნული მაჩვენებლის სარწმუნო ზრდა ძუძუს კიბოთი დაავადებულებში. 15:15 ტიპის ასოციაციის ინტენსივობა დაავადებულ ინდივიდებში იყო  $0.1 \pm 0.01$  ხოლო ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფში აღნიშნული მაჩვენებელი შეესაბამებოდა  $0.01 \pm 0.003$  - როგორც მონაცემებიდან ჩანს, გაზრდილი იყო ათჯერ; რაც შეეხება 21:21 ჰომოლოგიური ასოციაციის ინტენსივობას, დაავადებულებში აღნიშნულმა მაჩვენებელმა შეადგინა  $0.1 \pm 0.01$ , მსგავსად 15:15 ტიპისა, მაშინ როდესაც ეს მაჩვენებელი საკონტროლო ჯგუფში იყო 5-ჯერ უფრო ნაკლები და შეესაბამებოდა  $0.02 \pm 0.005$  (ცხრ.9, სურ.4.5.1).



1 - 13:13; 13:14; 14:13 2- 14:15; 14:15 3 - 14:15; 4-15:22; 5 - 21:22; 21:13; 6 - 13:22; 7 - 14:21; 14:22; 13:21; 13:22; 8- 15:21; 9 - 13:14.

ცხრ.9 ქრომატიდული ასოციაციების ტიპების ინტენსივობა ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფისა და ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტურ კულტურათა უჯრედებში

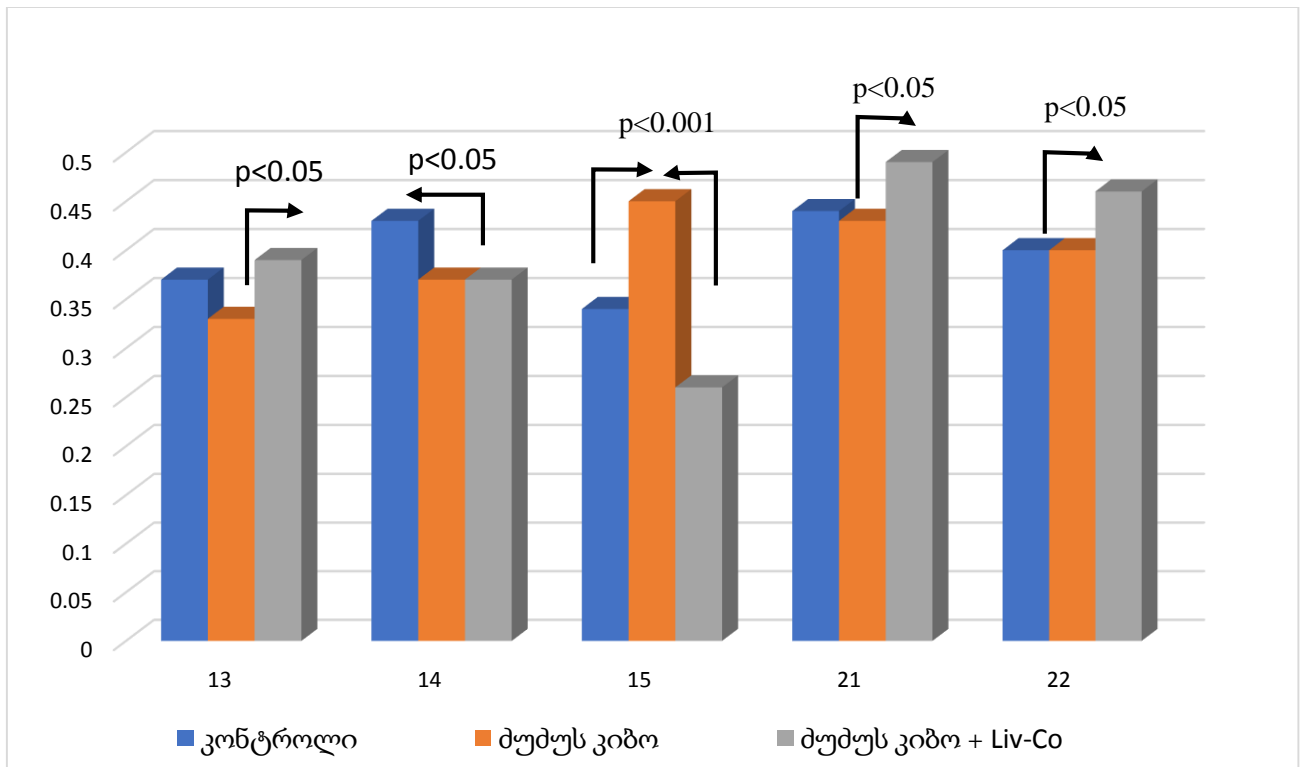
ცდის პირობა	ქრომატიდულ ასოციაციათა ტიპების ინტენსივობა														
	13:13	13:14	13:15	13:21	13:22	14:14	14:15	14:21	14:22	15:15	15:21	15:22	21:21	21:22	22:22
საკონტროლო ჯგუფი	0.02±0.004	0.1±0.01	0.1±0.02	0.1±0.01	0.1±0.01	0.02±0.004	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	<b>0.01±0.003</b>	0.1±0.01	0.1±0.01	<b>0.02±0.005</b>	0.1±0.01	0.02±0.005
ძუძუს კიბო	0.02±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.02±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	0.1±0.01	<b>0.1±0.01</b>	0.1±0.01	0.1±0.01	<b>0.1±0.01</b>	0.1±0.01	0.03±0.01



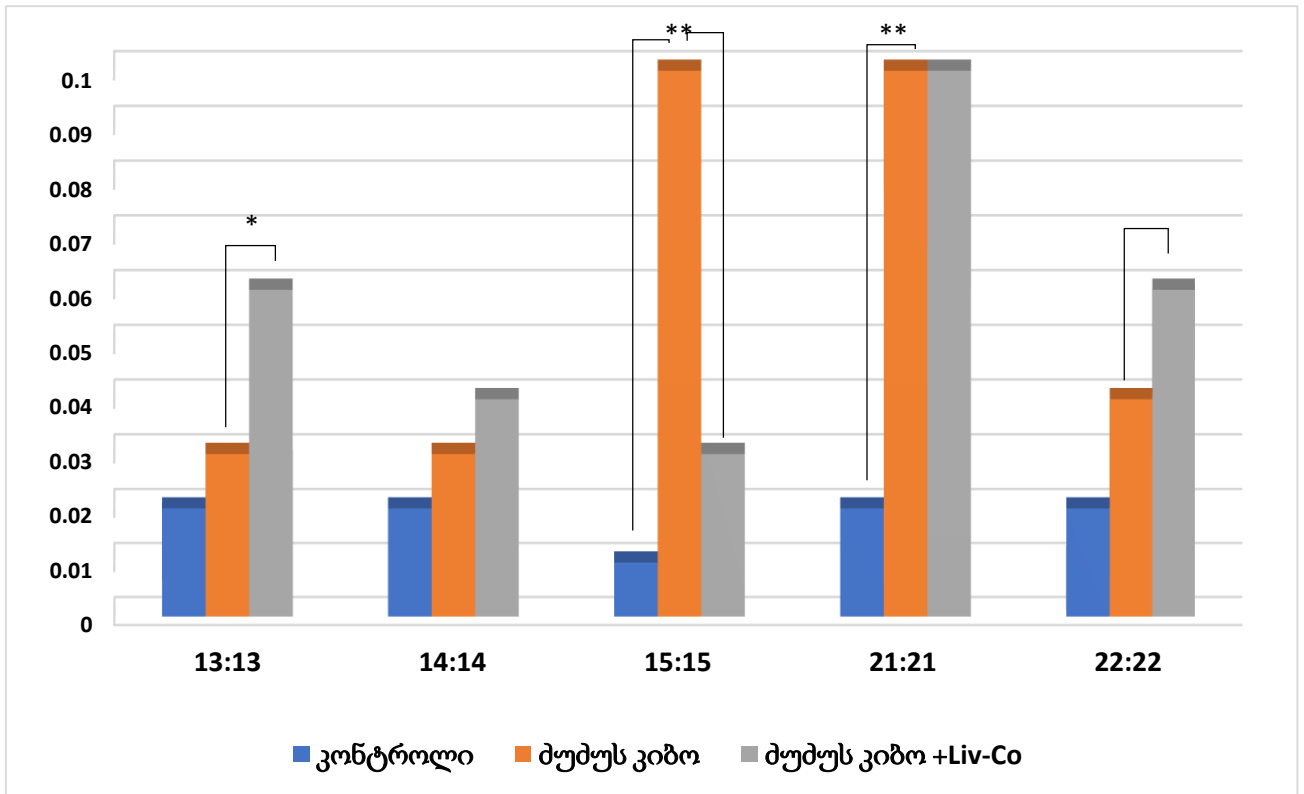
სურ. 4.5.1. ქრომატიდულ ასოციაციათა ტიპების ინტენსივობა ჯანმრთელ ინდივიდთა საკონტროლო ჯგუფისა და ძუძუს კიბოთი დაავადებული პაციენტების ლიმფოციტურ კულტურათა უჯრედებში (\*  $p < 0.001$ ).

#### 4.5.1 ბიორეგულატორისა და მეტალის იონების კომბინირებული მოქმედება ქრომატიდული ასოციაციების ტიპების ინტენსივობაზე ძუძუს კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტური კულტურების უჯრედებში

კვლევის ბოლო ეტაპზე, შვეისწავლეთ ბიორეგულატორ ლივაგენისა და კობალტის იონების კომბინირებული მოქმედება 13, 14, 15, 21 და 22 -ე ქრომოსომათა ქრომატიდების ასოციაციაში შესვლის სიხშირესა და ჰომოლოგიურ ქრომატიდულ ასოციაციათა ტიპების ინტენსივობა. როგორც კვლევის შედეგებისად ჩანს (სურ.4.5.1.1; 4.5.1.2), ლივაგენისა და კობალტის ერთობლივი მოქმედებისას ადგილი აქვს 15-ე ქრომოსომის გაზრდილი ასოციაციური აქტივობის ნორმალიზებას(სურ. 4.5.1.1).



სურ. 4.5.1.1. 13, 14, 15, 21 და 22 -ე ქრომოსომათა ქრომატიდების ასოციაციაში შესვლის სიხშირე ძუძუს კიბოდიით დაავადებულ ინდივიდთა ლიმფოციტებზე ლივაგენისა და კობალტის კომბინირებული მოქმედების პირობებში.



სურ. 4.5.1.2. ჰომოლოგიურ ქრომატიდულ ასოციაციათა ტიპების ინტენსივობა ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტურ კულტურებზე ლივაგენისა და კობალტის კომბინირებული მოქმედებისას (\*  $p < 0.001$ ).

ლივაგენისა და კობალტის ერთობლივი მოქმედებით ასევე ადგილი აქვს 15:15 ტიპის ჰომოლოგიური ასოციაციის გაზრდილი მაჩვენებლის ნორმალიზებას (სურ.23).

აკროცენტრულ ქრომატიდთა რიბოსომული ცისტრონების შესწავლა და მათი როლი არის მედიცინის ახალი მიმართულება, რომელიც გზას ხსნის მომავალში დაავადების დიაგნოსტიკის ახალი მიდგომისა და მკურნალობის ახალი სტრატეგიის განსაზღვრისათვის.



## 5. დასკვნა

კვლევის შედეგებიდან გამომდინარე შესაძლებელია დავასკვნათ:

- ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულთა უჯრედებში ადგილი აქვს ქრომატინის მოდიფიკაციურ ცვალებადობას - პროგრესულ ჰეტეროქრომატინიზაციას.
- ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტარული კულტურების უჯრედებში გაზრდილია ქრომოსომული არასტაბილურობის დონე (აბერაციები, ანეუპლოიდია, პოლიპლოიდია, ერთძაფიანი წყვეტები, ფრაგილური საიტები).
- პეპტიდურ ბიორეგულატორი ლივაგენი (Lys-Glu-Asp-Ala) ხასიათდება ძუძუს სადინროვანი კიბოთი დაავადებულ ინდივიდთა შეცვლილი გენომის მაკორეგირებელი უნარით.
- ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტურ კულტურებში გაზრდილია Ag-დადებითი ბირთვაკის ორგანიზატორების რაოდენობა, რაც მიუთითებს სინთეზური პროცესების გააქტიურებაზე.
- ძუძუს კიბოთი დაავადებულებში გაზრდილი ჰომოლოგიურ ქრომოსომათა 15:15 ტიპის ქრომატიდული ასოციაციების სიხშირე, გამოხატული რიბოსომული ცისტრონების გაზრდილი ექსპრესიით, წარმოადგენს აღნიშნული ავთვისებიანი სიმსივნისათვის სადიაგნოსტო მარკერს, რასაც მნიშვნელობა აქვს დიაგნოსტიკისა და მკურნალობის ახალი სტრატეგიის განსაზღვრისათვის.
- ლივაგენისა და კობალტის კომბინირებული მოქმედებით ადგილი აქვს ძუძუს კიბოთი დაავადებულთა ლიმფოციტური კულტურების უჯრედებში ჰომოლოგიურ ქრომოსომათა 15:15 ტიპის ქრომატიდული ასოციაციების სიხშირისა და რიბოსომული ცისტრონების გაზრდილი ექსპრესიის ნორმასთან დაახლოვებას.

## **რეკომენდაცია**

აკროცენტრულ ქრომატიდთა რიბოსომული ცისტრონების შესწავლა და მათი როლის დადგენა პათოლოგიებში არის მედიცინის ახალი მიმართულება, რომელიც გზას ხსნის მომავალში დაავადების დიაგნოსტიკისა და მკურნალობის ახალი სტრატეგიის განსაზღვრისათვის.

## 6. გამოყენებული ლიტერატურა

- Abshire M., Devor D., Diwan B., Shaughnessy J., Waalkes M. In vitro exposure to cadmium in rat L6 myoblasts can result in both enhancement and suppression of malignant progression in vivo. *Carcinogenesis*, 17(6), 1349-56, 1996.
- Anisimov V., Khavinson K., Provinciali M., et al. Inhibitory effect of the peptide epitalon on the development of spontaneous mammary tumors in Her-2/NEU transgenic mice. *Int. J. Cancer*, 101, 7-10, 2002.
- Anisimov V., Khavinson V., Anisimov V. Elucidation of the effect of brain cortex tetrapeptide cortagen on gene expression in mouse heart by microarray. *Neuro Endocrinol. Lett.*, 25(1-2), 87-93, 2004.
- Anisimov V., Khavinson V., Popovich I., et al. Effect of epitalon on biomarkers of aging, life span and spontaneous tumor incidence in female Swiss-derived SHR mice. *Biogerontology*, – 4, 93-202, 2003.
- Anisimov V., Khavinson V., Popovich I., Zabezhinski M. Inhibitory effect of peptide Epitalon on colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine in rats. *Cancer Lett.*, 183, 1-8, 2002.
- Anisimov V., Arutjunian A., Khavinson V. Effect of and pineal peptide preparation Epithalamin on free-radical processes in human and animals. *Neuroendocrinology Lett.*, 22, 9-18, 2001.
- Anisimov V., Khavinson V. Peptide bioregulations of aging: Results and prospects. *Biogerontology*, 11, 139-149, 2010.
- Arita A., Shamy M., Chervona Y., et al. The effect of exposure to carcinogenic metals on histone tail modifications and gene expression in human subjects. *J Trace Elem. Med. Biol.*, 26, 174-178, 2012.
- Arlt M.F., Casper A.M., Glover T.W. Common fragile sites. *Cytogenet Genome Res.*, 100(1-4), 92-100, 2003.

- Bartova, E. Structure and Epigenetics nucleoli compared with an unusual nucleola compartments. *J histochem Cytochem* 391, 4033-45, 2010.
- Belicchi-Ferrari M., Bisceglie F., Casoli C., Durot S., et al. Copper(II) and cobalt(III) pyridoxal thiosemicarbazone complexes with nitroprusside as counterion: syntheses, electronic properties, and antileukemic activity. *J Med Chem.*, 48(5), 1671-1675, 2005.
- Bloom S., Goodpasture C. An improved technique for selective silver staining of nucleolar organizer regions in human chromosomes. *Hum. Genet.*, 34, 199-206, 1976.
- Cardellini E., Cinelli S., et al. Differential Scanning calorimetry of chromatin at different levels of condensation. *Mol. Biol. Rep.*, 27, 3, 175-180, 2000.
- Cavazza B., Brizzolara G., Lazzarini G., et al. Thermodynamics of condensation of nuclear chromatin. A differential scanning calorimetry of the salt dependent structural transitions. *Biochemistry*, 30, 37, 9060-9070, 1991.
- Chen H., Ke Q., Kluz T., Yan Y., Costa M. Nickel ions increase histone H3 lysine 9 dimethylation and induce transgene silencing. *Mol. Cell Biol.*, 26, 3728-3737, 2006.
- Coffee B., Zhaug F., Ceman S., Warren S., Beius D. Histone modifications depict an aberrantly heterochromatinized FMR1 gene in fragile x syndrome. *Pum. Med.*, 71(4), 923-932, 2002.
- Collins A. The comet assay for DNA damage and repair (Review). *Molecular Biotechnology*. 26249-261, 2004.
- Costa M., Klein C. Nickel carcinogenesis mutation, epigenetics or selection. *EHP*, 107-109, 1999.
- Davidson T., Ke Q., Costa M. Selected molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenicity. In *Handbook on the Toxicology of Metals*, Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, Friberg LT, eds, Elsevier Science, New York, 79-100, 2011.
- de Silva A., Payaoa S., Borsatto B., et al. Quantitative evaluation of the rRNA in Alzheimer's disease. *Mech. Aging Dev.*, 120, 1-3, 57-64, 2000.
- Debatisse M., Tallec B., Letessier A., Dutrillaux B. and Brison O. Common fragile sites: mechanisms of instability revisited. *Trends in Genetics*. 28(1): 22-32, 2012.

- Dimitrova D.S. DNA replication initiation patterns and spatial dynamics of the human ribosomal RNA gene loci. *J Cell Sci* 124, 2743-52, 2011.
- Ellen T., Kluz T., Harder M., Xiong J., Costa M. Heterochromatinization as a potential mechanism of nickel-induced carcinogenesis. *Biochem.*, 48, 4626–4632, 2009.
- Evans H., Bucland R., Pardue M. Location of the genes coding for 18S and 28S ribosomal RNA in the human genome. *Chromosoma*, 48, 405-426, 1974.
- Guecheva T., Henriques J., Erdtmann B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). *Mutat. Res.*, 497(1-2), 19-27, 2001.
- Haaf T., Schmid M. Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.*, 91, 113-123, 2009.
- Hagelstrom R., Askin K., Williams A. et al. DNA-PKcs and ATM influence generation of ionizing radiation-induced bystander signals. *Oncogene*, 27, 6761–6769, 2008.
- Hecht F. Antibiotics containing trimethoprim and fragile (X) chromosome. *New Eng. J. Med.*, 308, 285, 1969.
- Heliot L., Mongelard F., et al. Nonrandom distribution of metaphase AgNOR staining pattern on human acricentric chromosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 48,13-20,2000.
- Helmrich A, Stout-Weider K, Hermann K, Schrock E, Heiden T. Common fragile sites are conserved features of human and mouse chromosomes and relate to large active genes. *Genome Res.*, 16(10), 1222-1230, 2006.
- Hens L., Kirsch-Volders M., et al. Relationship between measured chromosome distribution parameters and Ag-staining of the nucleolus organizer regions. *Hum. Genet.*, 53, 3, 363-370, 1980.
- Hoo J., Perslow I. Relation between the SCE points and the DNA replication bands. *Chromosoma*, 71, 3, 67-74, 1979.
- Joens C., Ahmed I., Commings M., Rosenthal I. Association of double NOR variant with Turner syndrome. *Amer. J. Med. Genet.*, 30, 3, 725-732, 1988.

- Karin M. Interactions of Heavy metal ions with the human genome. Crisp Data Base National Institutes of Health, 1997.
- Khavinson V., Linkova N., Dyatlova A, Kantemirova R, Kozlov K. Senescence-Associated Secretory Phenotype of Cardiovascular System Cells and Inflammaging: Perspectives of Peptide Regulation. *Cells*. 12(1):106, 2022.doi: 10.3390/cells12010106.
- Khavinson V., Goncharova N., Lapin B. Synthetic tetrapeptide epitalon restores disturbed neuroendocrine regulation in senescent monkeys. *Neuroendocrinology Lett.*, 22, 251–254, 2001.
- Khavinson V., Izmailov D., et al. Effect of epythalon on the lifespan avcrease in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.*, 120, 141-149, 2000.
- Khavinson V., Lezhava T., Malinin V. Effects of short peptides on lymphocyte chromatin in senile subjects. *Bull. Exp. Biol. Med.* 137(1), 78-81, 2004.
- Khavinson V., Lezhava T., Monaselidze J., et al. Effect of Livagen Peptide of chromosome activation in lymphocyte from old people. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 134, 389-392, 2002.
- Khavinson V., Lin'kova N., Polyakova V., Durnova A., Nichik T., Kvetnoi I. Peptides regulate expression of signaling molecules in kidney cell cultures during in vitro aging. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 157(2), 261-4, 2014.
- Khavinson V., Malinin V. Gerontological Aspects of Genome Peptide Regulation. Karger AG, Basel, Switzerland, -104, 2005.
- Khavinson V., Morozov V., Malinin V., Grigoriev E. Tetrapeptide stimulating the functional activity of neurons, pharmacological agent based thereon and method of use thereof.US Patent № 7,189,701 B1, 2007.
- Khavinson V., Ryzhak G., Grigoriev E., Ryadnova I. Peptide substance restoring myocardium function. EP Patent № 1 758 923 B1, 2008.
- Khavinson V., Ryzhak G., Grigoriev E., Ryadnova I. Peptide substance restoring function of respiratory organs. EP Patent № 1 758 922 B1, 2008.

- Khavinson V., Lin'kova N., Tarnovskaya S., Umnov R., Elashkina E., Durnova A. Short peptides stimulate serotonin expression in cells of brain cortex. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 157(1), 77-80, 2014.
- Khavinson V., Gapparov M., Sharanova N., Vasilyev A., Ryzhak G. Study of Biological Activity of Lys-Glu-Asp-Thr-NH<sub>2</sub> Endogenous Tetrapeptide. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 149, 3, 327-329, 2010.
- Khavinson V., Grigoriev E., Malinin V., Ryzhak G. Peptide substance stimulating regeneration of central nervous system neurons, pharmaceutical composition on its base, and the method of its application. European patent ER 2 024 388 B1 (international publication number WO 2007/139431 (06.12.2007. Gazette 2007/49), 2007.
- Khavinson V., Kuznik B., Ryzhak G. Peptide bioregulators: the new class of geroprotectors. Message 2. Clinical studies results. *Adv. Gerontol.*, 26(1), 20-37, 2013.
- Khavinson V., Lezhava T., et al. Peptide epythalon reactivates chromatin at seline age. 2003.
- Khavinson V. Peptide regulation of ageing. *St.-Ptb.: Humanistica*, -44, 2009.
- Kim, J., Dilthey, A., et al. Variation in human chromosome 21 ribosomal RNA genes characterized by TAR cloning and long-read sequencing. *Nucleic Acids Res* 46, 6712–25, 2018.
- Kuznik B., Lin'kova N., Tarnovskaia S., Khavinson V. Cytokines and regulatory peptides: age-related changes, atherosclerosis and thrombotic diseases. *Adv. Gerontol.*, 26(1), 38-51, 2013.
- Lam Y and Trinkle-Mulcahy L. New insights into nucleolar structure and function. *F1000Prime Rep.* 7: 48, 2015. doi: 10.12703/P7-48.
- Lansdorp P, Verwoerd N, F M van de Rijke, Dragowska V, Little M, Dirks R, Raap A, Tanke H Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet.* 5(5):685-91, 1996. DOI: 10.1093/hmg/5.5.685
- Leonard A., Lauwerys R. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of cobalt metal and cobalt compounds. *Mutat. Res. Rev. Genet. Toxicol.*, 239, 1, 17-27, 1990.

- Lezhava T, Prokofeva V, Mikhelson V. Weakening of the ultraviolet ray-induced unscheduled DNA synthesis in human lymphocytes in extreme old age. *Tsitologiya*. 21(11):1360-1363, 1979.
- Lezhava T. Human chromosomes and aging. From 80 to 114 years. Nova Biomedical, ISBN 1-60021-043-0, New York, USA, 2006.
- Lezhava T., Chitashvili R., Khmaladze E. Use of the mathematical "satellite model" for determining the frequency of associations of acrocentric chromosomes depending on human age. *Int J Biomed Comput*,3(3),181-99, 1972.
- Lezhava T., Jokhadze T. Activation of pericentromeric and telomeric heterochromatin in cultured lymphocytes from old individuals. *Ann N Y Acad Sci.*, 1100, 387-399, 2007.
- Lezhava T., Jokhadze T., Monaselidze J. The Functioning of "Aged" Heterochromatin. *Intech open science/Edited by Tetsuji Nagata/ Senescence Chapter 26*, 631-64, 2012.
- Lezhava T., Khavison V., Monaselidze J., Jokhadze T., et al. Bioregulator Vilon-induced reactivation of chromatin in cultured lymphocytes from old people. *Biogerontology*,5(2):73-79, 2004.
- Lezhava T., Monaselidze J, Jokhadze T., Gaiozishvili M. Epigenetic Regulation of "Aged" Heterochromatin by Peptide Bioregulator Cortagen. *Int. J. Pept. Res. Ther.*, 21, 157-163, 2015.
- Lezhava T., Tsigroshvili Z., Dvalishvili N., Jokhadze T. Mathematical model for satellite associations of human acrocentric chromosomes. *Georgian Med News*, (164), 90-9, 2008.
- Lezhava T. Chromosome and aging: genetic conception of aging. *Biogerontology*, 2(4),253- 60, 2001.
- Lezhava T. Chromosomes in very senile age: 80 years and over. M.: Nauka, -256, 1999.
- Li Q., Ke Q., Costa M. Alterations of histone modifications by cobalt compounds. *Carcinogenesis* 30, 1243-1251, 2009.
- Maggert, K.A, Golic, K.G. The Y chromosome of *Drosophila melanogaster* exhibits chromosome-wide imprinting. *Genetics* 162, 1245-58, 2002.



- Martin A, Weber B. Genetic and Hormonal Risk Factors in Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, No.14, Juli 19, 2000.
- Martin F. Arlit, Bo Xu, Sandra G. Durkin, Anne M. Casper, Michal Thomas W Glover. SRCA1 is Required for Common-Fragile-Site Stability via Checkpoint Function, *molecular and cellular biology*, 24(15);6701-6709, 2004.
- Matsui S., Fuke M., Chai L., Sandberg A., Ellassouli S. N-band proteins of nucleolar organizers: chromosomal mapping, subnucleolar localization and rDNA binding. *Chromosome*, 93,231-242, 1986.
- Matsui S., Sandberg A. Intranuclear compartmentalization of DNA-dependent RNA polymerases: association of RNA polymerase I with nuclear organizing chromosomes. *Chromosome*, 92, 1, 1-6, 1985.
- Mayer, C., Grummt, I. Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* 48, 6384-91, 2006.
- Mayer, C., Neubert, M., Grummt, I. The structure of NoRC-associated RNA is crucial for targeting the chromatin remodelling complex NoRC to the nucleolus. *EMBO Rep* 9, 774–80, 2008.
- McStay, B. and Grummt, I. The epigenetics of rRNA genes: from molecular to chromosome biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 131-35, 2008.
- Mello M., Kubrusly F., Randi M., Rodrigues V., Ferraz Filho A. Effect of heavy metals on chromatin supraorganization, nuclear phenotypes, and survival of *Triatoma infestans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 74(3), 209-218, 1995.
- Mirceta M., Shum N., Schmidt M., Christopher E. Fragile sites, chromosomal lesions, tandem repeats, and disease. *Neurogenomics*, 13: 985975. doi: 10.3389; 2022.
- Monaselidze J., Chanchalashvili Z., Madzhagaladze G. Cooperative nature of the denaturation process in tissues and cell nuclei. *Biofizika*, 23(1), 167-8, 1978.
- Nemeth A, Langst G. Genome organization in and around the nucleolus. *Trends in Genetics* 27:149-156, 2011.

- Nowosielska H., Pawlas N. Heavy metals in the cell nucleus - role in pathogenesis. *Acta Biochim. Pol.*, 62(1), 7-13, 2015.
- O' Halloran Th. Transitions metals in control of gene expression. *Science*, 261, 715-725, 1993.
- Olive P., Banáth J. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, v.1, p. 23–29, 2006.
- Olson M.O., Dundr M., Szebenin A. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.*, 10, 5, 189-196, 2000.
- Olson, M. The nucleolus. *Spinger Science, LLC*. 105-278, 2011.
- Ostling O, Johanson K. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 123291-8, 1984.
- Painter R. Effect of caffeine on DNA synthesis in irradiated and unirradiated mammalian cells. *J Mol Biol.*, 5, 143(3), 289-301, 1980.
- Porokhovnik, L. and Gerton, J. Ribosomal DNA-connecting ribosome biogenesis and chromosome biology. *Chromosome Research* 27, 1–3, 2019.
- Prokofyeva-Belgovskaya, A. Heterochromatin regions of chromosomes. *M. Nauka* 1986.
- Qin Q., Qin S., Wang L., Lei W. Immune responses and ultrastructural changes of hemocytes in freshwater crab *Sinopotamon henanense* exposed to elevated cadmium. *Aquatic Toxicology* 107, 140–146, 2012.
- Richards R., Sutherland G. Dynamic mutations: a new class of mutations causing human disease. *Cell*, 4, 70(5), 709-712, 1992.
- Santoro, S.W., Wang, L., Herberich B. et al. An efficient system for the evolution of aminoacyl-tRNA synthetase specificity. *Nat Biotechnol* 20, 1044-48, 2002.
- Schmitz, K., Schmit, N., Hoffman-robrer, U., et al. TAF12 recruits Gadd45a and the nucleotide excision repair complex to the promoter of rRNA genes leading to active DNA demethylation. *Mol Cell* 33, 344-53, 2009.
- Sharma A. Metal clastogenesity in relation to diseases and ageing. *Symp. Human Genet., Bombay*, 115-117, 1989.

- Sharma A., Talukder G. Effects of metals on chromosomes of higher organisms. *Environ Mutagen.*, 9(2), 191-226, 1987.
- Shiovitz S., Korde L. Genetics of breast cancer: a topic in evolution. *Ann Oncol.* 26(7): 1291–1299, 2015.doi: 10.1093/annonc/mdv022.
- Singh N. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175:184-91, 1988.
- Smith DI. Mcavoy S. Zhu y. Perez DS. Large common fragile site genes and cancer , *semin cancer boil.* 17(1):31-41, 2007.
- Stitou S., Diaz de la Guardia R., Jimenes R., et al. Inactive ribosomal cistrone are spread throughout the B chromosomes of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae). Implications for their origin and evolution. *Chromosome Res.*, 8, 4, 305-311, 2000.
- Sullivan, G., Bridger, G., Cuthbert, A., et al. Human acrocentric chromosomes with transcriptionally silent nucleolar organizer regions associate with nucleoli. *The EMBO Journal* 20, 2867-77, 2001.
- Sutherland GR. Rare fragile sites. *Cytogenet Genome Res.*, 100(1-4), 77-84, 2003.
- Trere D. Ag-NOR staining and quantification. *Micron.*, 31, 127-131, 2000.
- Vastenhouw N, Brunschwig K, Okihara K. et al. Gene expression. Long-term gene silencing by RNAi. *nature. brief communications.* 442, 882, 2006.
- Verma R., Rodriguez I. Structural organization of ribosomal cistrons in human nuclear organizing chromosomes. *Cytobios.*, 44, 175, 25-28, 1985.
- Verma R., Shah I., Dosic H. Frequencies of chromosome and chromatid types of associations of nucleolar human chromosomes demonstrated by the N-banding technique. *Cyto bios.*, 36, 25-29, 1983.
- Wang H. Clastogenicity of chromium contaminated soil samples evaluated by Vicia root-micronuclear assay. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 426, 2, 147-149, 1999.

- Weber J., Wong C. Mutation of human short tandem repeats. Hum Mol Genet., 2(8), 1123-1128, 1993.
- Yasseen A., Musavi T. Citogenetics Study in severaly mental retarded patients. Saudi med., 22,5, 444-449, 2001.
- Yasseen A., Musavi T. Metaphase acrocentric associations in mentally retarded patients. Neurosciences, 6(4), 233-237,2001.
- Васильева И., Чекова В., Львова Г., Чопикашвили Л. Стимуляциярепарации ДНК у рабочих, контактирующих с хлористим кадмием, витаминами, исрользуемими в качестве антимутагенов. ДАН СССР 318, 2,441-445, 1991.
- Виноградова И., Букалев А., Забежинский М., Семенченко А., Хавинсон В., Анисимов В. Геропротекторный эффект пептида ALA-GLU-ASP-GLY у самцовкрыс, содержащихся при разных режимах освещения. Бюл. exper. биол., 145, 4,455–460, 2008.
- Георгиев Г. П. Молекулярно-генетические механизми прогрессии опухолей. Соросовский образовательный журнал. 2000.
- Грабовская И., Мамаева С., Мамаев Н. Изучение способности к серебрению и асоциациям акроцентрических хромосом нормалных и лейкозных клеток человека. Цитология, 28, 6, 350-359, 1986.
- Девидзе М.Исследование мутагенного действия ионизирующего излучения и тяжелых металлов в клетках костного мозга белых мышей в условиях гипоксии и гипероксии. Автореф. Канд. Дис. Москва, 1983.
- ЖУКОВА Л. Клинические и фундаментальные аспекты прогноза и рационального лечения рака молочной железы с тройным негативным фенотипом; ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «РОССИЙСКИЙ ОНКОЛОГИЧЕСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР» Имени Н.Н. Блохина, 2012.
- Кузник Б., Морозов В., Хавинсон В. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований. СПб.: Наука. –310, 1998.

- Лазутка Ю. Сестринские хроматидные обмены в клетках высших эукариот. Цитология, 32, 10, 977-984, 1990.
- Львова Г., Чопикашвили Л., Васильева И., Засухина Г. Защитное действие аскорбиновой кислоты в клетках людей контактирующей с хлоридом кобальта. Генетика, 26,7, 1316-1319, 1990.
- Македонов Г., Евграфов О. Молекулярные механизмы образования Сестринских хроматидных обменов и структурных мутаций хромосомы В кн.: Мутагенез и репарация в системе вирус-клетка. М. Наука, 1989.
- Морозов В., Хавинсон В., Манилин В. Пептидные тимомиметики - СПб.: Наука, -158, 2000.
- Морозов В., Хавинсон В. Пептидные биорегуляторы (25-летний опыт экспериментального и клинического изучения). СПб.: Наука. -74, 1996.
- Поворознюк В., Хавинсон В., Макогончук А., Рыжак Г., Ереслов Е., Гопкалова И. Изучение влияния пептидных регуляторов на структурно-функциональное состояние костной ткани крыс при старении. Успехи геронтологии, 20, 2, 134-137, 2007.
- Прокофьева-Бельговская А. Гетерохроматические районы хромосом: старение и функции. М.: Наука, -431, 1986.
- Хавинсон В., Морозов В. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. СПб.: Фолиант, -159, 2001.
- Хавинсон В., Анисимов В. Пептидные биорегуляторы и старение. СПб.: Наука. -223, 2003.

## 7. განმარტებები

BRCA1--გენი რომლის მუტაცია ძუძუს კიბოს განვითარებასთანაა დაკავშირებული

BRCA2--გენი რომლის მუტაცია ძუძუს კიბოს განვითარებასთანაა დაკავშირებული

p-53-სიმსივნის სუპრესორი გენი

Ag-ბენდირება -აკროცენტრულ ქრომოსომათა ბირთვაკმაორგანიზებული უბნების

შეღებვის მეთოდი

შქგ-შვილეულ ქრომატიდაშორისი

ფჰა-ფიტოჰემაგლუტინინი

RPMI-საკვები არე

G-ბენდირება -დიფერენცირებული შეღების მეთოდი

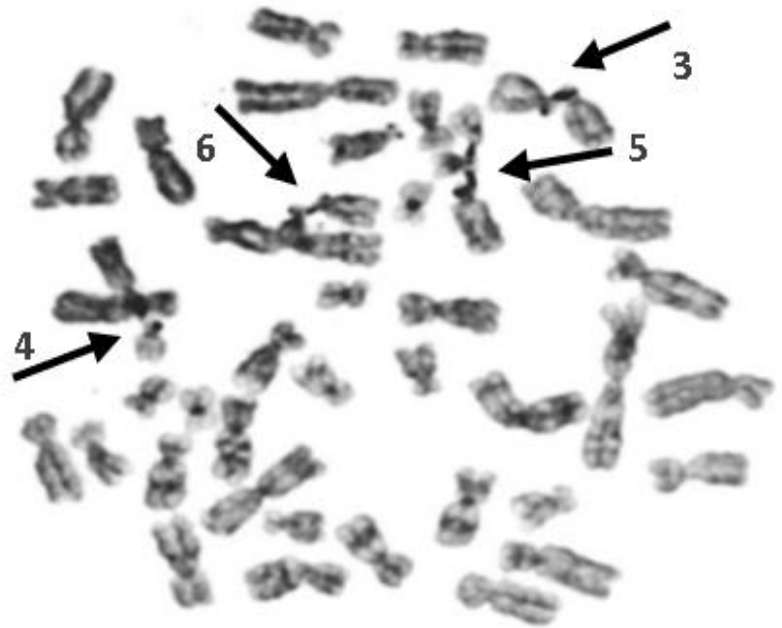
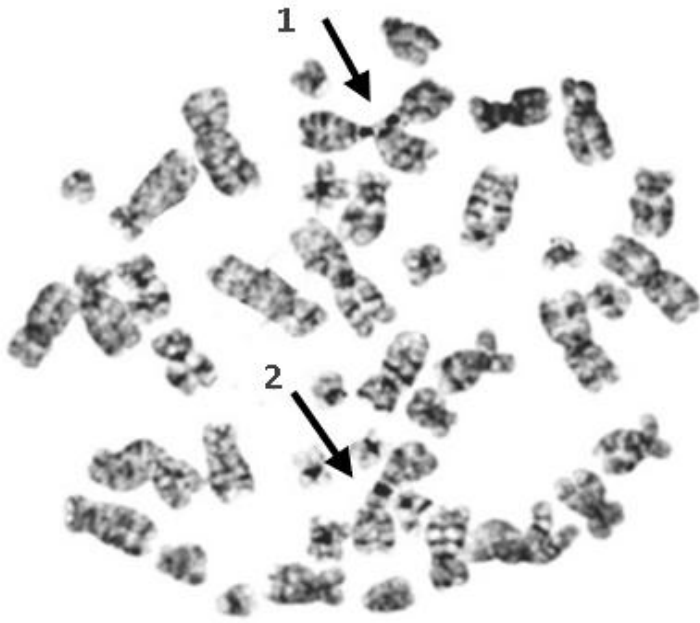
Comet assay-ფლორესცენტული მეთოდი

FISH-ფლორესცენტული ინსიტუჰიბრიდიზაცია

FMR1X-გენი,რომლის მუტაცია ც იწვევს ფრაგილური X სინდრომის 95%-ში

FRAX-ფრაგილური საიტი X ქრომოსომაზე

## 8. დაწართი



Ag-G ბენდირებით შეღებილი მეტაფაზები ქრომატიდული ასოციაციებით: 1(13:13; 13:14:14:13); 2(14:15;14:15) ; 3(14:15); 4(15:22); 5(21:22); 5(22:21; 21:13); 6(13:22);



G- ბენდირებით შეღებილი მეტაფაზაAg-დადებითი ქრომოსომებით



სადისერტაციო ნაშრომის ფარგლებში გამოქვეყნებული შედეგები, საერთაშორისო მაღალრეიტინგულ ჟურნალებში:

1. Epigenetic Activation of Ribosomal Cystrons in Chromatids of Acrocentric Chromosome 15<sup>th</sup> in Ductal Breast Cancer. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2023.
2. EPIGENETIC MODIFICATION UNDER THE INFLUENCE OF PEPTIDE BIOREGULATORS ON THE "OLD" CHROMATIN. Georgian Med News, 2023.
3. Epigenetic Variations in Chromatin Caused by the Combination of Bioregulators with Heavy Metals During Aging. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 2022.
4. EPIGENETIC MODIFICATION UNDER THE INFLUENCE OF PEPTIDE BIOREGULATORS ON "AGED" HETEROCHROMATIN. Georgian Med News, 2020.
5. Evaluation of Genomic parameters in ductal breast cancer patients and the ability of it's correction. Georgian Med News, 2017.