



## AZƏRBAYCAN ELM FONDU

Azərbaycan Elm Fondunun “Elm-Təhsil-Sənaye”  
məqsədli qrant müsabiqəsinin  
(EİF/MQM/ETS-2020-1(35)) qalibi olmuş  
layihənin yerinə yetirilməsi üzrə

### YEKUN ELMİ-TEXNİKİ HESABAT

Layihənin adı: **Müxtəlif funksional qrupların insan ağciyər toxuması sağlam və karsinoma**

**xərçəng hüceyrə membranlarına dərman çatdırılmasındakı rolu**

Layihə rəhbərinin soyadı, adı və atasının adı: **Qasımov Oktay Kazım oğlu**

Qrantın məbləği: **297 000 manat**

Layihənin nömrəsi: **EİF-MQM-ETS-2020-1(35)-08/07/3-M-07**

Müqavilənin imzalanma tarixi: **01 mart 2021 - ci il**

Qrant layihəsinin yerinə yetirilmə müddəti: **24 ay**

Layihənin icra müddəti (başlama və bitmə tarixi): **01 aprel 2021-ci il – 01 aprel 2023-cü il**

**Diqqət! Bütün məlumatlar 12 ölçülü Arial şrifti ilə, 1 intervalla doldurulmalıdır**

**Diqqət! Uyğun məlumat olmadığı təqdirdə müvafiq bölmə boş buraxılır**

Hesabatda aşağıdakı məsələlər işıqlandırılmalıdır:

**1** Layihənin həyata keçirilməsi üzrə yerinə yetirilmiş işlər, istifadə olunmuş üsul və yanaşmalar

Layihə üzrə həyata keçirilən işlər Azərbaycan Elm Fondu (AEF) tərəfindən təsdiq edilmiş mərhələlər üzrə aparılmış və tam həcmdə yerinə yetirilmişdir.

İnsan toxuması ilə aparılan bütün tədqiqatlar Helsinki Bəyannaməsinin prinsiplərinə uyğun aparılıb. Hər bir xəstə (nümünə) üçün tədqiqatın təbiəti və mümkün nəticələri izah edildikdən sonra onlardan ağ ciyər toxumasının istifadəsi üçün razılıq alınmışdır. Bütün görülən prosedurlar və protokollar Azərbaycan Respublikası Səhiyyə Nazirliyinin Milli Onkologiya Mərkəzinin uyğun şurası tərəfindən təsdiq edilmişdir. Cərrahiyyə əməliyyatından sonra ağ ciyər nümunələri onkoloji patoloqa verilmiş və o histopatoloji müayinədən sonra nümunədən tədqiqat üçün lazım olan “xərçəng” və “sağlam” toxuma hissələrini ayırmışdır.

Müxtəlif təcrübələrdə istifadə olunan TEMPO spin zondları və onun müxtəlif analogları üzrə aparılan tədqiqatlar standartlaşdırılmışdır. Bu müxtəlif eksperimentlərin nəticələrini müqayisə etmək üçün mühüm əhəmiyyət kəsb edir. TEMPO və onun analogları üzrə təcrübələr aşağıdakı kimi aparılmışdır:

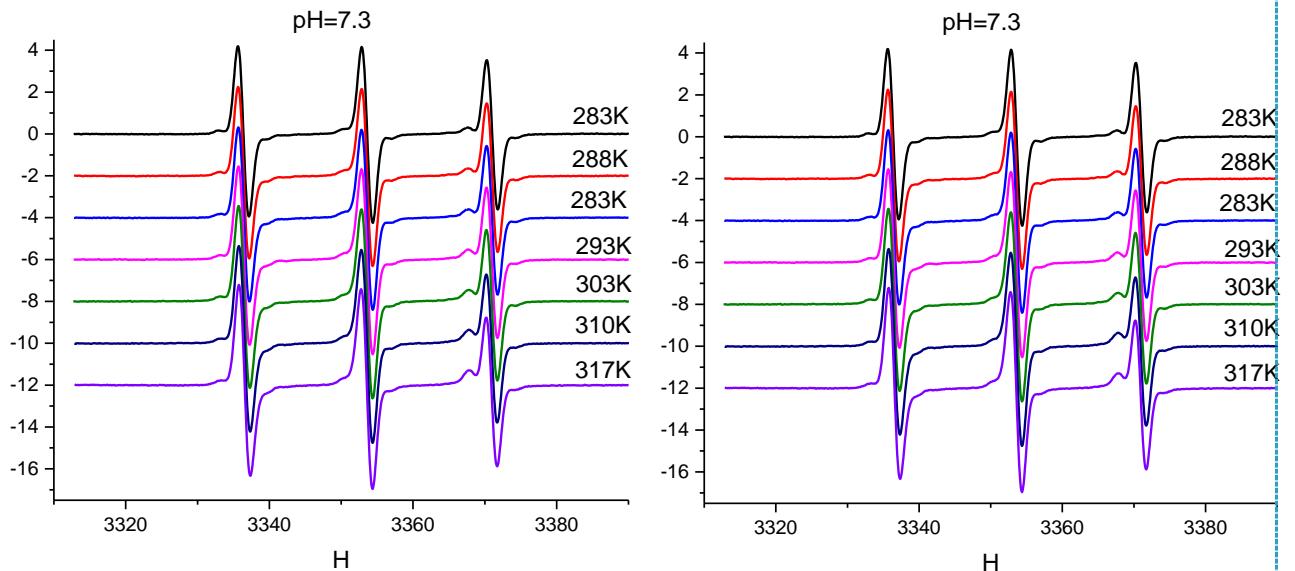
100 mg toxumaya 150uM TEMPO istifadə edilmişdir. TEMPO üzrə alınan nəticələrdən standart kimi istifadə edilmişdir. Yəni, TEMPO-dan fərqli bütün spin zondların ağciyər sağlamlıq və xərçəng hüceyrə membranlarına inkorporasiya dərəcəsi TEMPO-ile müqayisə edilmişdir.

Cərrahiyyə əməliyyatı zamanı alınmış ağciyər nümunələrindən hüceyrə toplusu aşağıdakı qaydada alınmışdır:

1. Cərrahiyyə əməliyyatından sonra ağciyər xərçəngi xəstələrinin nümunələri histopatologiya metodu ilə tədqiq edilmişdir. Hər bir xəstənin toxuması "xərçəng" və "sağlam" hissəyə ayrılmışdır. Qeyd etmək lazımdır ki, "sağlam" nümunə dedikdə histopatologiyada normal, sağlam hissə isə fərqlənməyən hissə nəzərdə tutulur.

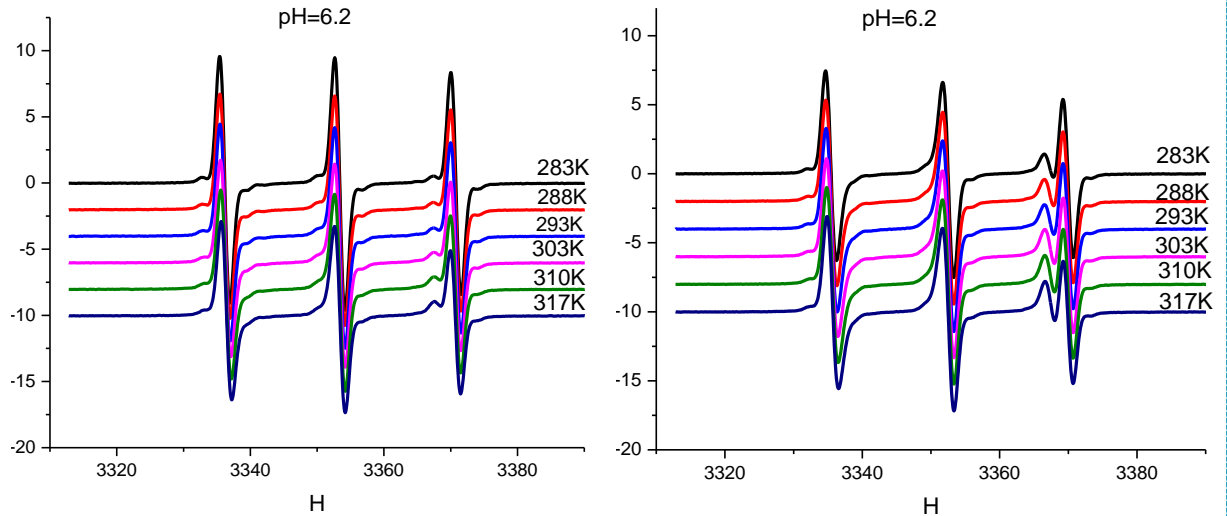
İki hissəyə (xərçəng və sağlam) bölünən nümunələrdən 300 mq toxuma kəsilərək qandan təmizlənməsi üçün PBS buferi (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) ilə yuyulub. Zədələnməyən (intakt) hüceyrə sistemini almaq üçün əvvəlcə toxuma nümunəsi şüşə homogenizatorunda homogenizə edilib və sonra izotonik bufer sistemi (PBS) vasitəsilə fərdi intakt hüceyrələr alınana qədər intensiv yuyulub. Bütün proses 20°C temperatur şəraitində aparılıb. Sonra isə nümunə sentrifüqada 10 dəqiqə müddətində çökdürülüb və supernatant hissəsi atılıb. Hüceyrəxarici maddələrin qalmaması üçün nümunələr ən azı 3 dəfə PBS buferi ilə yuyulub.

Hər bir hüceyrə toplusunun (istər xərçəng, istərsə də sağlam) Zeta-potensialı ölçülmüş və əmin olunmuşdur ki, hüceyrələr dağılmayıb. Laboratoriyanın bu sahədə təcrübəsi var və bu istiqamətdə məqalə çap etdirilib (Gasanova R.B., Melikova L.A., Gasymov O.K., Aliyev J.A., Zeta potentials of healthy and cancer cells of human lung: implication to cancer therapy, The Modern Achievements of Azerbaijan Medicine, 2020, 4, 112-117). Aşağıda TEMPO spin zondunun ağciyər toxuması sağlam və xərçəng hüceyrələrinə pH-in 7.3 və 6.2 qiymətlərində inkorporasiyasının nəticəsində alınan EPR spektrləri göstərilmişdir.



Səkil 1. Nümunə 1-in ağciyər toxuması sağlam (sol) və xərçəng (sağ) hüceyrələri (100mg) ilə 150uM TEMPO spin zonu ilə 30 dəqiqə inkubasiya edildikdən sonra pH 7.3-də EPR spektrləri.

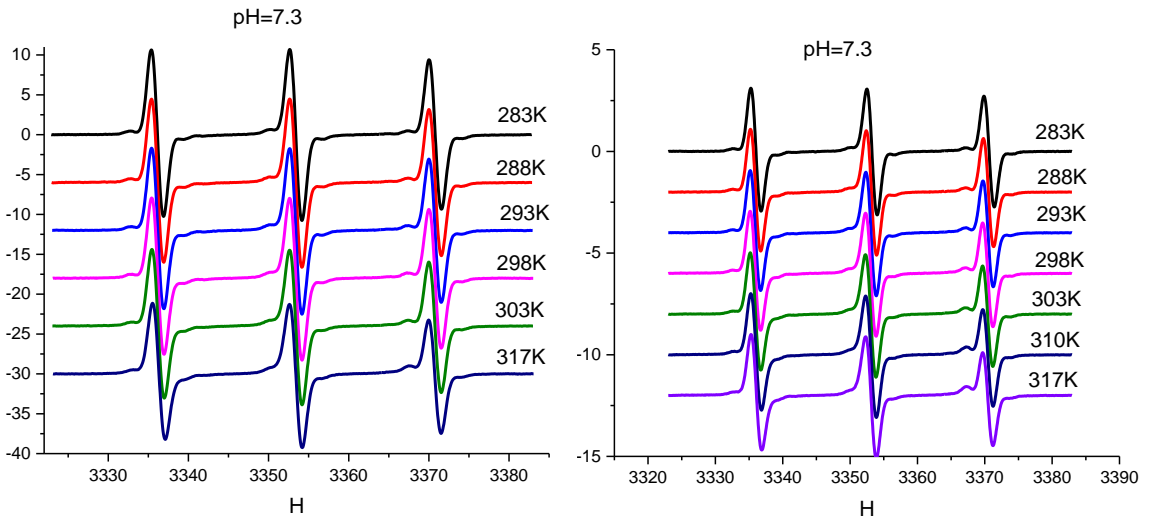
EPR spektrlərinin yuxarı maqnit sahəsində iki komponent görünür. Kiçik komponent hidrofob mühitə uyğun gəldiyi üçün hüceyrə membranına inkorporasiya olunmuş hissəyə uyğundur. 3-cü komponentin yüksək amplituda malik olan hissəsi isə hüceyrə ətrafı mühitə uyğundur.



Səkil 2. Nümunə 1-in ağciyər toxuması sağlam (sol) və xərçəng (sağ) hüceyrələri (100mg) ilə 150µM TEMPO spin zonu ilə 30 dəqiqə inkubasiya edildikdən sonra pH 6.2-də EPR spektrləri. PH 7.3-də olduğu kimi, nümunələr pH 6.2-də (Şəkil 2) TEMPO spin zondunun membran-məhlul mühitində paylanmasını göstərir və bu da özünü EPR spektrlərinin yuxarı maqnit sahəsində iki komponent halında göstərir. Lakin pH 7.3 ilə müqayisədə mühüm fərqlər vardır. Sağlam halda, TEMPO spin zondunun pH 6.2 və 7.3 halında paylanması demək olar ki, eynidir. Lakin, pH 6.2-də xərçəng toxumasında membrana daxil olan TEMPO zonu pH 7.3 ilə müqayisədə ən azı 3-dəfə çoxdur. Bu da xərçəng hüceyrələrinin pH 6.2-də daha dinamik olmasını göstərir.

Xüsusi qeyd etmək lazımdır ki, pH 6.2-də aparılan təcrübələrin çox mühüm praktiki əhəmiyyəti vardır. Belə ki, xərçəng xəstəliyi inkişaf etdikcə hipoksiya halı yaranır, və süd turşusunun metabolizmi artır və xərçəng toxuması ətrafında turş mühit yaranır. Hüceyrə xarici mühitin bufer tutumu çox aşağı olduğundan süd turşusunun kiçik konsentrasiya artımı mühitin pH 6.2-ə qədər sürüşdürə bilər. PH-in 6.2 qiymətində bəzi protezaların aktivliyi artır, hüceyrə xarici matrisanı dağıdır və bu da xərçəng hüceyrələrinin miqrasiyasının artmasına gətirib çıxarır. Digər tərəfdən turş mühit xərçəng hüceyrələrinin mezenximal transormasiya etməsinə kömək edir. Bu hadisələr xərçəng xəstələrində metastasin yaramasını və inkişafını təmin edir.

Bu tendensiya başqa nümunələrdə də yoxlanılıb.



Şəkil 3. Nümunə 2 üçün EPR spektrləri. 52-yaşlı kişi, G3 yüksək dərəcəli karsinoma, pH-nı 7.3 qiymətlərində.

Biz bu tendensiyanın başqa nümunələrdə də yoxlanılıb. Şəkil 3-də yüksək dərəcəli ağciyər karsinomu (G3) üzərində aparılan iş göstərir ki, yüksək karsinoma halında hətta pH 7.3-də TEMPO-nun paylanma dərəcəsi yüksəkdir. Bu iş onu göstərir ki, alınan nəticələr hər bir xəstə üçün spesifik ola bilər və onun müalicəsi üçün fərdi yanaşma vacibdir.

TEMPO spin zondunun membrana inkorporasiya dərəcəsi xərçəng hüceyrələrinin xarakterizə etmək üçün mühüm parametr olduğundan onun hesablanma metodu işlənmişdir.

### ***TEMPO spin zondunun ağciyər sağlam və karsinoma hüceyrələrinə inkorporasiya dərəcəsinin hesablanması metodu***

Sulu məhlulda həll olunan TEMPO, spinin azotla ifrat incə qarşılıqlı təsir nəticəsində 3 komponentli yaxşı məlum olan EPR spektrini göstərir. Bununla belə, hüceyrə mühitində inkubasiya edildikdə TEMPO EPR spektri kompozit xarakter daşıyır və üçüncü komponenti (güclü bir maqnit sahəsində yerləşir) qismən ayırd edilir. Üçüncü komponentin parçalanmasının səbəbi hidrofob (hüceyrə membranı) və hidrofilik (sulu) mühitdə TEMPO-nun spinin azot nüvə maqnit momenti ilə qarşılıqlı təsir nəticəsində parçalanma sabitindəki fərkdir. Nəticədə, sulu mühitdə hüceyrə sistemində inkubasiya edilmiş TEMPO -nun EPR spektrləri, TEMPO -nun hüceyrə membranının lipid hissəsində və sulu mühitdə paylanmasını əks etdirir. Spektral komponentləri dekonvolusiya etmək üçün TEMPO EPR spektrləri, FORTRAN -da yazılmış spektral modelləşdirmə kodundan istifadə edərək Christian Altenbach (<https://sites.google.com/site/altenbach/>) tərəfindən hazırlanmış LabVIEW proqramı ilə təhlil edilmişdir. Kompüter simulyasiyaları ilə yanaşı, TEMPO -nun fırlanma korrelyasiya vaxtları da birinci törəmə EPR spektrlərinin pik yüksəkliklərini və enindən istifadə edən aşağıdakı düsturla hesablanmışdır:

$$\tau_c = 6.5 \times 10^{-10} W_0 \left[ \left( \frac{h_0}{h_{-1}} \right)^{1/2} - 1 \right]$$

bu düsturda  $W_0$  mərkəzi komponentin eni (Gauss-la),  $h_0$  and  $h_{-1}$  isə EPR spektrinin 1-ci törəməsinin mərkəzi və yüksək maqnit sahəsindəki komponentlərin hündürlükləridir.

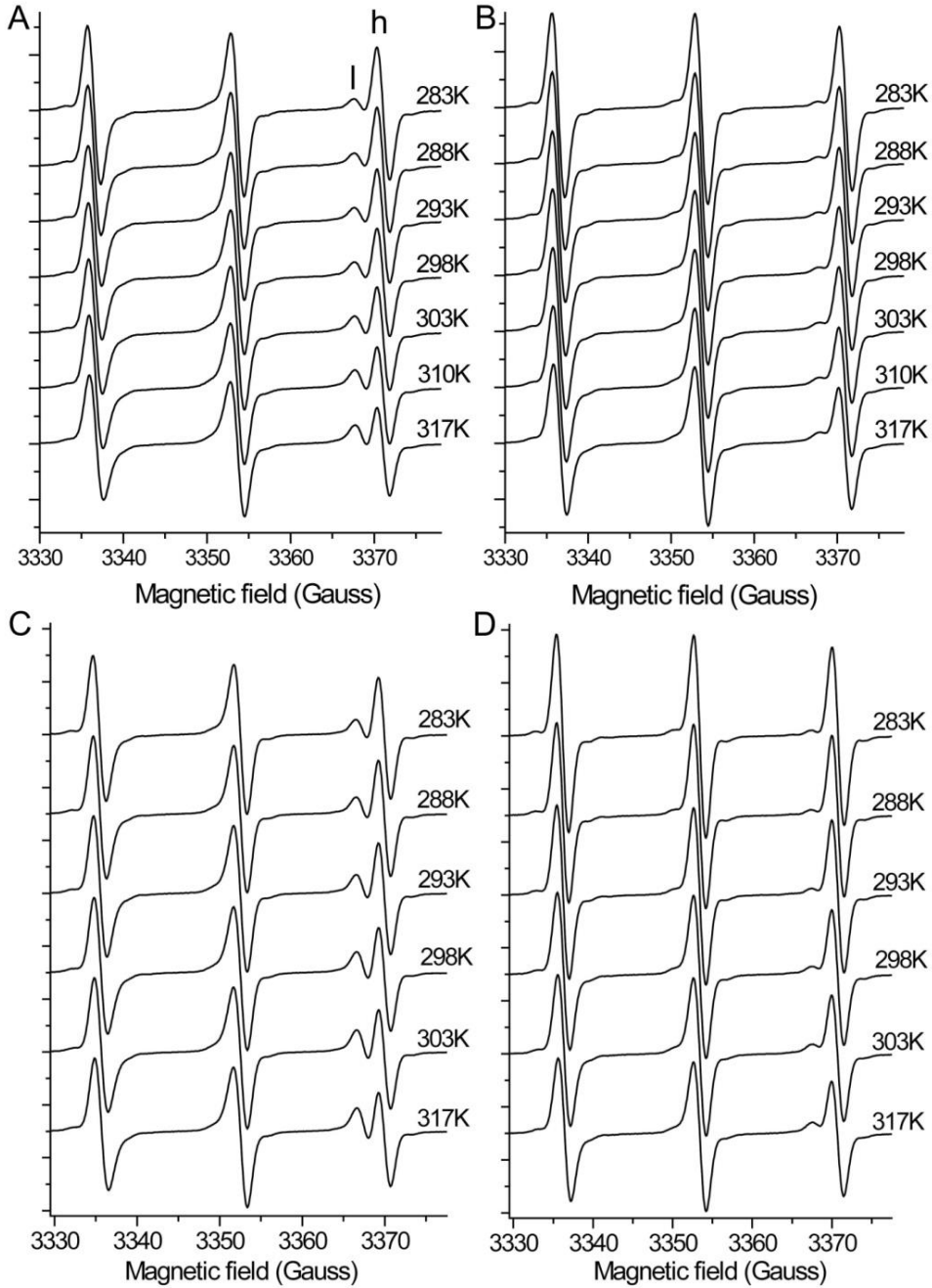
Yuxarıda qeyd edildiyi kimi, hüceyrə membranı və sulu mühitdə paylanması nəticəsində əldə edilən TEMPO EPR spektrləri kompozit xarakter daşıyır və iki komponentdən ibarətdir. Buna görə də, yuxarıdakı düstur EPR spektrlərinin lipofilik və hidrofilik komponentlərə ayırd edildikdən sonra tətbiq edilmişdir. Proqram və düsturla hesablanan fırlanma korrelyasiya zamanı çox oxşar olduğundan yalnız proqram əsasında hesablanan nəticələr göstərilir.

Aşağıdakı düsturdan istifadə edərək paylanma əmsalını hesablamaq üçün müvafiq spektrlərin ikiqat inteqralları (müvafiq olaraq membranda və sulu mühitdə lokallaşdırılmış  $I_{mbr}$  və  $I_{aq}$  TEMPO komponentləri) istifadə edilmişdir:  $K = I_{mbr} / (I_{mbr} + I_{aq})$ . EPR -nin spektral komponentlərini xarakterizə edərkən, membran və sulu mühit müvafiq olaraq lipofilik və hidrofilik olaraq təsvir edilmişdir. Göründüyü kimi, paylanma əmsalı sulu sistemdəki lipid fraksiyalarının konsentrasiyasından asılıdır. Paylanma əmsallarının düzgün müqayisə edilməsi üçün xərçəng və normal hüceyrə suspenziyalarının miqdarı (çəki ilə) eyni götürülmüşdür. TEMPO (ümumi konsentrasiyası 150  $\mu$ M) həm xərçəngli, həm də normal hüceyrə suspenziyasında təxminən 30 dəqiqə inkubasiya edilmişdir. Bu işdə istifadə olunan təcrübə şərtləri, normal və xərçəngli hüceyrələrin paylanma əmsallarını birbaşa müqayisə etməyə imkan verir.

### ***TEMPO spin zondunu insan ağciyərlərinin sağlam və xərçəng hüceyrələrinin***

### membranlarında paylanması

PH 7.3 -də insan ağciyər xərçəngi və sağlam hüceyrələr ilə inkubasiya edilmiş TEMPO -nun EPR spektrləri müvafiq olaraq Şəkil 3A və 3B -də göstərilmişdir.

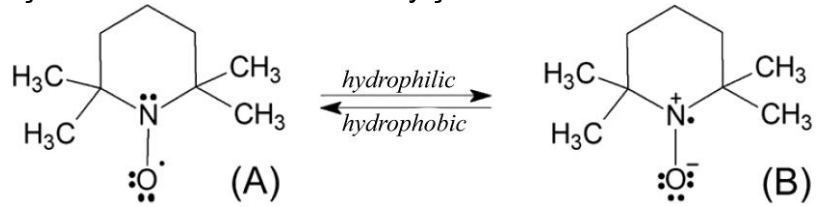


Şəkil 4. TEMPO spin zondunun insan ağciyər toxumasının sağlam və karsinoma hüceyrələrinə inkorporasiyasının temperaturdan asılılığı. (A) və (B) sağlam hüceyrələrdə müvafiq olaraq pH-ın 7.3 və 6.2 qiymətləri üçündür. (C) və (D) karsinoma hüceyrələrində müvafiq olaraq pH-ın 7.3 və 6.2 qiymətləri üçündür.

EPR spektrlərinin yüksək maqnit sahəsindəki komponentləri I (lipofilik) və h (hidrofilik) olaraq təyin olunan iki komponentə bölünür. Beləliklə, hər bir spektr TEMPO -nu hüceyrə membranı (lipofilik) və sulu (hidrofilik) fazalar arasında paylanması nəticəsində əldə edilmişdir. EPR spektrlərinin yüksək sahə komponentinin nisbi amplitudları göstərir ki, TEMPO spin zondunun paylanması

xərçəng və sağlam hüceyrələr üçün əhəmiyyətli dərəcədə fərqlidir (Şəkil 4). PH 7.3 -də xərçəng hüceyrələrinin membranındakı nisbi TEMPO miqdarı sağlam hüceyrələrdən əhəmiyyətli dərəcədə yüksəkdir. Maraqlıdır ki, TEMPO paylanmasında fərqlər pH 7.2 ilə müqayisədə pH 6.2 -də daha böyükdür (Şəkillər 4A və 4C). 283-317 K temperatur intervalında EPR spektrləri göstərir ki, temperaturun artması hər iki növ hüceyrənin membranlarında TEMPO nisbi miqdarını artırır. Bununla belə, sağlam hüceyrələrlə müqayisədə, xərçəng hüceyrə membranlarına uyğun şərtlərdə daha çox TEMPO molekulu daxil olur.

TEMPO -nun EPR spektrlərini əhəmiyyətli dərəcədə fərqli hidrofobiklik dəyərləri olan mühitdə təsvir etmək üçün onun aşağıdakı aspektlərini nəzərə almaq lazımdır. Komponentin yüksək maqnit sahəsində parçalanması, hər bir mühitdə izotrop ifrat yüksək qarşılıqlı təsirin ( $A_{iso}$ ) və g-faktorlarının sabitlərindəki kiçik fərqlərin nəticəsidir. Bu fərqlər, aşağıda göstəriləndiyi kimi, iki kanonik TEMPO quruluşunun nisbi töhfəsindəki dəyişikliklərlə izah edilir.



Suya oxşar polyar məhlullarda cütləşməmiş elektron sıxlığı daha çox azot atomunda lokallaşan (B) strukturunu stabilizə edir. Ona görə də bu hadisə azotun ifrat incə qarşılıqlı təsir konstantının artmasına səbəb olur. Bunun əksinə olaraq, cütləşməmiş elektron sıxlığının oksigen atomu üzərində yerləşdiyi (A) quruluşu, hidrofob mühitdə sabitləşir. Nəticədə, azotun ifrat incə qarşılıqlı təsir konstantının qiyməti daha aşağı olur.

Nümunə kimi 317K-da iki komponentli model istifadə edərək insan ağciyər xərçəng və sağlam hüceyrələri sistemində inkubasiya edilmiş TEMPO-nun EPR spektrlərinin dekompozisiyası Şəkil 5-də göstərilmişdir.

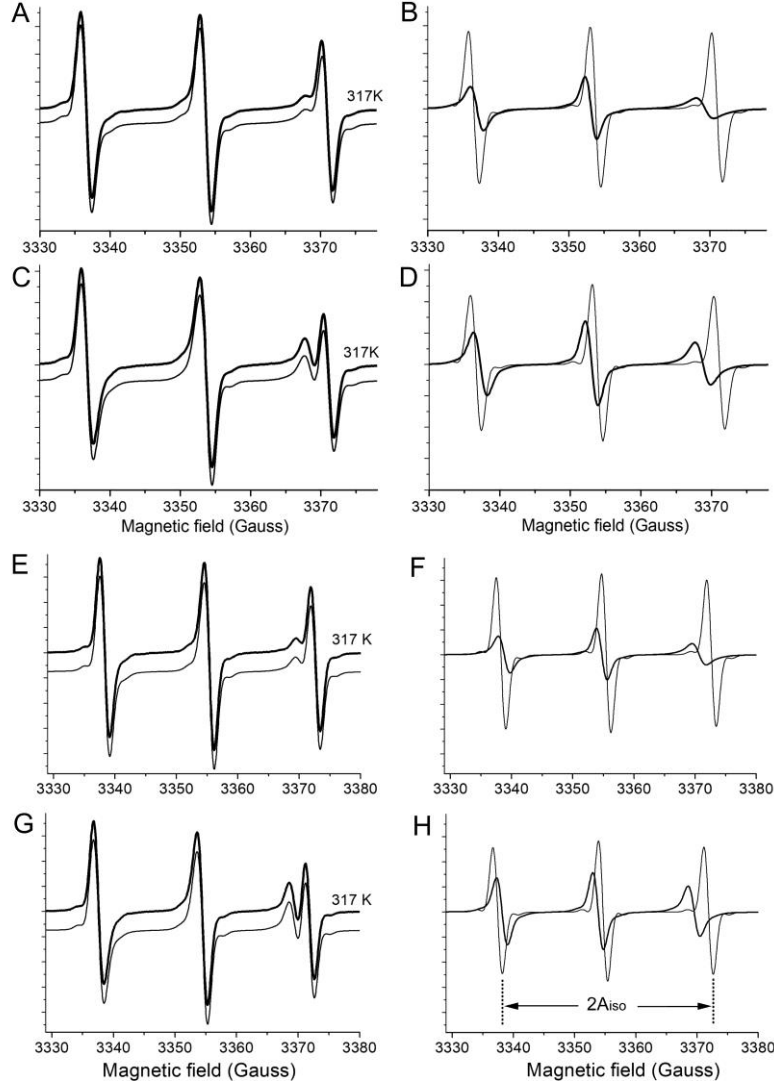
Təyin edilmiş parametrlərdən istifadə etməklə simulyasiya edilmiş kompozit EPR spektrləri eksperimental spektrlərdən demək olar ki, fərqlənmir (Şəkil 5A, 5C, 5E və 5G). Asan ayırd edilməsi üçün simulyasiya edilmiş kompozit EPR spektrləri vertikal sürüldürülmüşdür. Ayırd edilmiş komponentlərin EPR spektrləri (Şəkil 5B, 5D, 5F və 5H) yuxarıda qeyd edilənlərə tam uyğun gəlir. Həqiqətən, komponentlərin (g-qiymətlər) və azotla ifrat incə qarşılıqlı təsir sabitləri ( $2A_{iso}$ , Şəkil 5H) üzrə fərqlər yaxşı görünür. Bütün tədqiq edilən nümunələrdə, sulu mühitlərdə TEMPO -nun EPR spektrləri (pH-ın 7.3 və 6.2 pH qiymətlərində sağlam və xərçəng hüceyrələrini təmsil edən 4B, 4D, 4F və 4H -də nazik xətlər) eyni  $2A_{iso}$  qiymətinə, 34.5 Gauss malikdir ( Cədvəl 7).

Cədvəl 7. İnsan ağciyər sağlam və xərçəng hüceyrələrinə dair EPR tədqiqatlarından alınmış spektral parametrlər.

Sample	$2A_{iso}$ (Gauss) (sulu mühit)	$2A_{iso}$ (Gauss) (membran)	$\Delta G_T$ (kkal/mol)	$\Delta G_K$ (kkal/mol)
Sağlam hüceyrələri, pH 7.3	34.5	32.4	$1.9 \pm 0.2$	$3.1 \pm 0.1$
Xərçəng hüceyrələri, pH 7.3	34.5	31.5	$2.1 \pm 0.2$	$1.2 \pm 0.1$
Sağlam hüceyrələri, pH 6.2	34.4	31.9	$3.8 \pm 0.3$	$3.7 \pm 0.3$
Xərçəng hüceyrələri, pH 6.2	34.5	31.4	$2.6 \pm 0.3$	$1.7 \pm 0.1$

Buna baxmayaraq, hüceyrələrin membranlarına daxil olan TEMPO EPR spektrinin  $2A_{iso}$  qiyməti əhəmiyyətli dərəcədə azalır və 31.4-32.4 Gauss aralığına düşür. PH-n 7.3 qiymətində, sağlam və xərçəng hüceyrələrinin membranına daxil olan TEMPO -nun EPR spektrləri üçün

2A<sub>iso</sub> qiyməti müvafiq olaraq 32.4 Gauss və 31.5 Gauss-dur.



Şəkil 5. TEMPO -nun EPR spektrlərinin lipofilik və hidrofilik mühitləri əks etdirən komponentlərə parçalanması. 317K və pH 7.3 insan ağciyər sağlam və karsinoma hüceyrələrində TEMPO bölünməsinin EPR spektrləri. (A) və (B) iki komponentli analizin (Metodlara baxın) və sağlam ağciyər hüceyrələri üçün lipofilik (B, xəstə xətt) və hidrofilik (B, nazik xətt) uyğun komponentlərin analizinin nəticələridir. Uyğunlaşdırma prosedurundan (A, xəstə xətt) EPR spektri eksperimental spektrdən (A, nazik xətt) fərqlənmir, buna görə də daha yaxşı qiymətləndirmək üçün şaquli olaraq dəyişdirilir. Lakin karsinoma hüceyrələri üçün (C) və (D) isə (A) və (D) ilə eynidir. pH 6.2 qiymətində (E), (F), (G) və (H) müvafiq olaraq (A), (B), (C) və (D)-yə uyğun şərtləri göstərir.

Beləliklə, xərçəng hüceyrə membranının lipid hissəsi sağlam hüceyrələrə nisbətən daha hidrofobdur. Maraqlıdır ki, pH 7.3 ilə müqayisədə, EPR spektrlərinin  $A_{iso}$  qiymətləri, pH 6.2 -də xərçəng hüceyrələrində (təxminən 32.5 Gauss), sağlam hüceyrələrin membranlarında 32.4 Gauss -dan 31.9 Gauss alınmışdır ki, bu da hidrofobluqda kiçik bir artımı göstərir. Nəticədə, pH 6.2 -də sağlam və xərçəng hüceyrə membranları arasında hidrofobiklik dərəcələri arasında fərq azalır.

TEMPO zülallara heç bir birləşmə xüsusiyyətlərinə malik deyil. Buna görə də lipofilik faza təyin edilmiş TEMPO -nun EPR spektrləri membranın lipid fraksiyasının xüsusiyyətlərini bildirir. Nəticədə, TEMPO -nun paylanma xüsusiyyətləri və fərqli pH qiymətlərində sağlam və xərçəng hüceyrələrindəki hidrofobikliklərin xarakteristikası yalnız hüceyrələrin lipid fraksiyaları üçün

etibarlıdır.

### ***Hüceyrə membranlarının lipid fraksiyasının mikro-özlülüğü***

TEMPO -nun EPR spektrlərinin parçalanması ilə yanaşı, kompüter təhlili də müxtəlif mühitlərdə spektral komponentlərin fırlanma korrelyasiya zamanlarını təyin etməyə imkan verir. Müxtəlif temperaturalarda əldə edilən korrelyasiya zamanları üçün Arrhenius əyriləri Şəkil 6 A və 6B -də göstərilmişdir. İnsan ağciyərini sağlam və xərcəng hüceyrələrinin membranlarında pH 7.3 və 6.2 olan TEMPO ( $\Delta G_{\tau}$ ) fırlanma hərəkətinin aktivləşmə enerjiləri Cədvəl 7 -də göstərilmişdir. Xərcəng və sağlam hüceyrələr üçün  $\Delta G_{\tau}$  qiymətləri çox oxşardır ( $\Delta G_{\tau}$  qiymətləri sırasıyla  $1.9 \pm 0.2$  və  $2.1 \pm 0.2$  kcal/mol-dur), bu da onların lipid fraksiyalarının oxşar mikro-özlülüynü göstərir. PH 6.2 -də, hər iki hüceyrə növü üçün  $\Delta G_{\tau}$  qiymətlərinin artımı müşahidə edilir. Bununla birlikdə, sağlam ağciyər hüceyrələrinin mikro-özlülüynü xərcəng hüceyrələrinə nisbətən daha yüksəkdir ( $\Delta G_{\tau}$  qiymətləri müvafiq olaraq  $3.8 \pm 0.3$  və  $2.6 \pm 0.3$  kkal/mol).

### ***TEMPO molekullarının sulu mühitdən hüceyrə membranlarının lipid fazasına keçməsinin enerji aktivasiyası.***

Sağlam və xərcəng hüceyrələri ilə inkubasiya edilmiş TEMPO EPR spektrlərinin kompüter vasitəsi ilə dekompozisiyası onun paylanma əmsallarının qiymətləndirilməsinə imkan verir. Lipid kompozisiyaları, membran dinamikası və s. kimi müxtəlif faktorlar, molekulların sulu mühit - membran arasında paylanmasına (bu halda TEMPO) təsir göstərə bilər. TEMPO zülallara heç bir birləşmə xüsusiyyəti göstərmədiyindən, sağlam və xərcəng hüceyrələri üçün TEMPO -nun paylanma əmsalı hüceyrələrin lipid fraksiyasının xüsusiyyətləri haqqında məlumat verəcəkdir. Molekulların paylanmasında tarazlığa TEMPO -nun membranların lipid hissəsinə passiv daxil edilməsi ilə nail olunur. Passiv daxil olma termini, hüceyrə membranında lokallaşdırılmış zülalları TEMPO -nun hüceyrə membranına daxil edilməsində iştirak etməməsini və ya stimullaşdırmayacağını göstərmək üçün istifadə olunur.

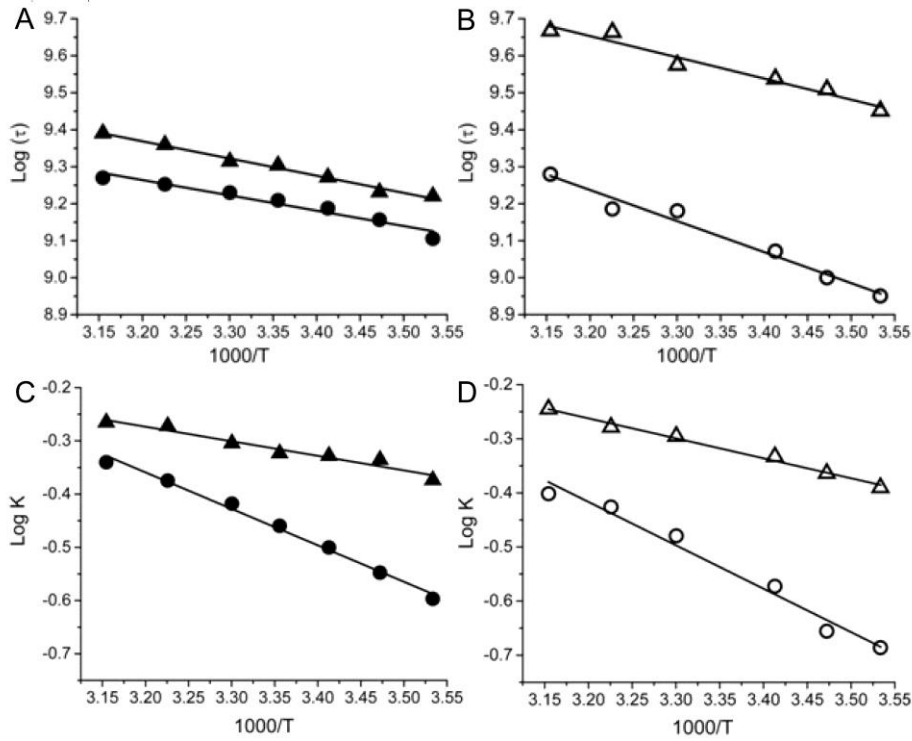
Müxtəlif temperaturda alınan paylanma (K) üçün Arrhenius əyriləri Şəkil 6 C və 6D -də göstərilmişdir. Sağlam və xərcəng hüceyrələrində TEMPO-nun sulu mühitdən membranının lipid fazasına keçməsinin standart Gibbs sərbəst enerji dəyişikliyi Cədvəl 7 -də göstərilmişdir.

PH 7.3-də TEMPO-nun transferi üçün sərbəst enerjinin dəyişməsi sağlam və xərcəng hüceyrələri üçün müvafiq olaraq  $3.1 \pm 0.1$  kcal/mol və  $1.2 \pm 0.1$  kcal/mol təşkil edir. PH 7.3 -dən pH 6.2 -ə qədər turş mühitə keçdikdə, TEMPO -nun sərbəst enerji dəyişiklikləri sağlam və xərcəng hüceyrə membranlarına keçidində təxminən 19% və 42% artaraq, müvafiq olaraq  $3.7 \pm 0.3$  kcal/mol və  $1.7 \pm 0.1$  kcal/mol qiymətlərinə çatır. Beləliklə, TEMPO -nu turş pH -da hüceyrə membranlarına köçürmək üçün daha çox enerji tələb olunur. Nəticələr göstərir ki, həm sağlam, həm də xərcəng hüceyrələrindən ibarət ağciyər toxumasında TEMPO daha asan xərcəng hüceyrələrinin membranlarına daxil olacaqdır.

Yaxşı məlumdur ki, xərcəng xəstəliyinin inkişafı zamanı hipoksik halda olan xərcəng hüceyrələrinin aerobik glikoliz (Warburg effekti adlandırılır) hadisəsi baş verir və nəticədə xərcəng toxumasında turş mikro-mühit yaranır.

Xərcəng hüceyrələri mezenximal keçid və metastaz üçün turş mikro-mühitdən səmərəli istifadə edir. TEMPO -nu müəyyən dərmanlar üçün bir model hesab etsək, dərmanların çatdırılması üçün xərcəng hüceyrələri üçün normal pH (7.3) şəraiti yaratmaq faydalıdır. Sağlam və xərcəng hüceyrələri üçün  $\Delta G_K$  qiymətlərindəki fərqlər pH 7.3 və pH 6.2 üçün demək olar ki, eynidir. Bununla belə,  $\Delta G_K$  qiyməti, pH 7.3 -də xərcəng hüceyrələri üçün ən kiçikdir və TEMPO -nun sulu məhluldan membrana köçürülməsi üçün daha az enerji tələb olunduğunu göstərir.

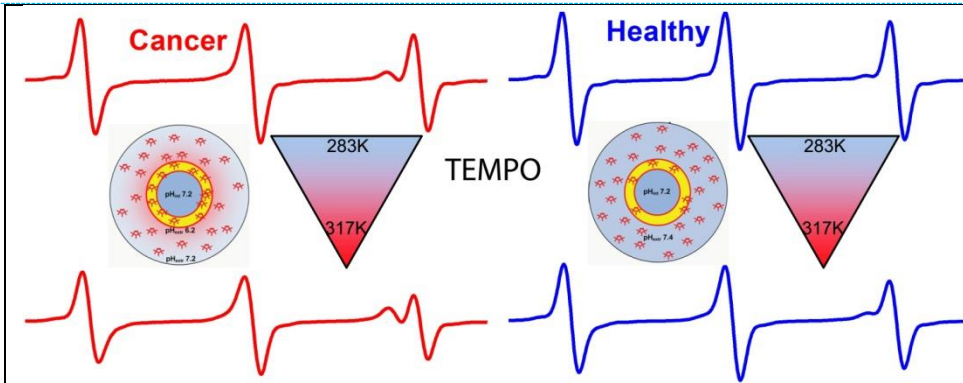




Şəkil 6. İnsan ağciyər toxumasının sağlam və karsinoma hüceyrələrində TEMPO paylanması nəticəsində yaranan EPR spektrlərindən əldə edilən parametrlər üçün Arrhenius əyriləri. Hüceyrə membranlarının mühitlərində pH 7.3 (A) və 6.2 (B) qiymətlərində TEMPO-nun fırlanma korrelyasiya zamanına görə Arrhenius əyriləri. (A) dolu dairələr və dolu üçbucaqlar uyğun olaraq sağlam və karsinoma hüceyrələrini təmsil edir. (B) -də açıq dairələr və açıq üçbucaqlar uyğun olaraq sağlam və karsinoma hüceyrələrini təmsil edir. Arrhenius 7.3 (C) və 6.2 (D) pH qiymətlərində sağlam və karsinoma ağciyər hüceyrələrində TEMPO paylanma əmsallarına uyğundur. (C) və (D) dəki simvolların təsnifi uyğun olaraq (A) və (B) dəki kimidir.

### Mühüm nəticə

İnsan ağciyərinin sağlam və xərçəng hüceyrələrinin membran və sulu fazalarında TEMPO paylanması göstərir ki, xərçəng hüceyrələrdə paylanma əmsalı sağlam hüceyrələrə nisbətən xeyli yüksəkdir. Hər iki hüceyrə növü üçün temperatur və paylanma əmsalı qiymətləri arasında müsbət korrelyasiya vardır.  $A_{iso}$  qiymətlərindəki fərqlər xərçəng hüceyrə membranlarının sağlam hüceyrələrə nisbətən daha hidrofob olduğunu göstərir. TEMPO üçün təyin olunan  $\Delta G_K$  qiymətləri sağlam hüceyrələrlə müqayisədə xərçəng hüceyrələrinin TEMPO molekullarını hüceyrə membranına daha asanlıqla daxil etdiyini göstərir. TEMPO -nu müəyyən dərman qrupları üçün bioloji model olaraq nəzərə alsaq, standart kimya terapiyasına əlavə olaraq, turş mikro-mühitin zəif qələviyə çevrilməsi üçün tamamlayıcı alkalizasiya müalicəsi xərçəng xəstələri üçün faydalı olar. Alınan mühüm nəticəni aşağıdakı qrafik təsvirlə göstərmək olar.



Şəkil 6. Alınan nəticələrin qrafik məzmunu

Beləliklə, TEMPO spin zondunu sağlam hüceyrələrə nisbətən karsinoma hüceyrələrinə daha asanlıqla daxil olur və bu hadisə temperaturdan asılıdır. TEMPO spin zonduna dərman modeli kimi baxsaq karsinoma hüceyrələrinin bu xüsusiyyətinin müalicə taktikasının seçilməsi üçün böyük əhəmiyyəti vardır. Ədəbiyyatdan məlumdur ki, xərçəng hüceyrələrinin membranını təşkil edən lipidlər sağlam hüceyrədə olanlardan fərqlənir. Belə hesab olunur ki, karsinoma hüceyrə membranının özünə məxsus xüsusiyyətləri məhz onun membranındakı fərqli lipidlərlə bağlıdır. Bunu yoxlamaq üçün biz insan ağciyər sağlam və karsinoma hüceyrələrindən lipidləri ekstraksiya edərək liposomlar yaratmışıq və sonra TEMPO benzoat molekullarının bu liposomlara inkorporasiya olma dərəcələri tədqiq edilib. Bu iş qrantda nəzərdə tutulmasa da, onun mühüm əhəmiyyəti nəzərə alınaraq həyata keçirilib. Qısa olaraq aşağıda lipid ekstraksiyası və liposom hazırlanması metodu göstərilmişdir.

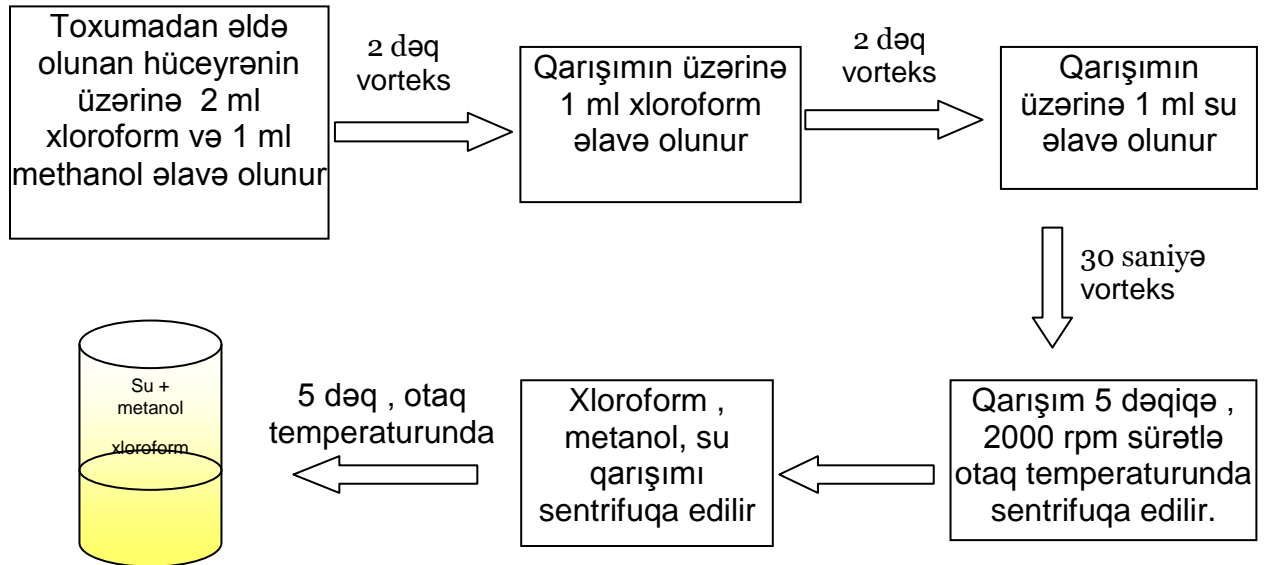
#### **Sonikatordan istifadə etməklə liposomun hazırlanması protokolu hazırlanıb və aşağıda şərh olunur.**

1. Milli Onkologiya Mərkəzindən əldə olunan toxuma ( sağlam və xəstə ( ağciyər karsinoması) nümunələri skalper vasitəsilə xırda hissələrə ayrılır. Toxuma qurumasın deyə bu zaman üzərinə PBS bufer ( pH 7.3 ) əlavə olunur.
2. Xırda-xırda doğranmış toxuma üzərinə PBS buferi ( pH 7.3 ) əlavə olunaraq homogenizator vasitəsilə homogen halına salınır.
3. Ağciyər materialının homogenatı 1.5 ml-lik Eppendorf tublara köçürülür. Əvvəlcə 5 dəqiqə 5000 dövr/dəq sürətlə sentrifuqa (Eppendorf, Centrifuge 5418) edilir. Supernatant atılır.
4. Hüceyrələrin üzərinə yenidən PBS bufer ( pH 7.3 ) əlavə olunur, vorteks vasitəsilə qarışdırılır və homogen hala gətirilir və 5 dəqiqə 10000 dövr/dəq sürətlə yenidən sentrifuqa (Eppendorf, Centrifuge 5418) edilir. Supernatant atılır.
5. Hüceyrələr 13 ml-lik şüşə tublara köçürülür.
6. Üzərinə 1 ml xloroform , 2 ml metanol əlavə olunur və 2 dəqiqə vorteks edilir.
7. Həmin qarışımın üzərinə 1 ml xloroform əlavə olunur daha 30 saniyə vorteks edilir.
8. Qarışımın üzərinə 1 ml su (distillə olunmuş su) əlavə olunur daha 30 saniyə vorteks edilir.
9. Qarışım 5 dəqiqə , 2000 dövr/dəq sürətlə otaq temperaturunda sentrifuqa (Eppendorf, Centrifuge 5804R ) edilir. Maye yığılır və tubun ortasında təbəqə şəkilində yığılan hüceyrə atılır.
10. Xloroform , metanol və sudan ibarət olunan qarışım yenidən 5 dəqiqə , 2000 dövr/dəq sürətlə otaq temperaturunda sentrifuqa (Eppendorf, Centrifuge 5804R )

edilir. Bu zaman 2 fazlı məhlul əldə olunur. Üst faza su və metanol qarışımından ibarət olur. Alt faza isə xloroformda həll olunmuş lipiddən ibarət olur. Üst faza atılır. Alt faza, yeni xloroform N<sub>2</sub> qazı vasitəsilə qurudulur və lipidin quru çəkisi təyin olunur.

11. Lipidin üzərinə PBS bufer ( pH 7.3 ) əlavə olunaraq və 25 mq/ml-lik məhlul əldə olunur.
12. Sonra məhlul ümumi olaraq 4 dəqiqə müddətində (2 saniyə titrəşim, 5 saniyə istirahət), 30 % amplitudla sonikasiya edilir, temperaturun 60 °C- dən aşağı düşməməsi üçün sonikasiya prosesi 65°C-lik su içərisində aparılır. ( Fisher Scientific, model: FB120, power: 120 W , freq: 20 kHz) edilir (bu proses 2 dəfə təkrar edilir).
13. Daha sonra həmin məhlul 1.5 ml-lik Eppendorf tublara köçürülərək 3 dəq, 10000 dövr/dəq sürətlə sentrifuqa (Eppendorf, Centrifuge 5418) edilir.
14. Supernatant təmiz Eppendorf tuba köçürülür.
15. Əldə olunan liposomun ölçüsünü təyin etmək üçün Zetasizer spektrofotometrindən istifadə olunur.
16. Supernatantı tez bir zamanda istifadə olunmayacağına, 4 °C-də saxlamaq lazımdır. Supernatant 16-20 saatdan artıq saxlanılmamalıdır. Əgər soyuducuda saxlanılıbsa, minimum 1 saat əvvəldən soyuducudan çıxarılmalı və otaq temperaturunda saxlanılmalıdır, daha sonra əlavə olaraq 3 dəq, 10000 rpm sürətlə sentrifuqa edilməli və supernatant başqa təmiz Eppendorf tuba köçürülməlidir.

### Lipid ekstraksiyasının sxematik təsviri



### ƏDƏBİYYAT

E.G. Blight and W.J.Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, The National Research Council of Canada, Volume 37, Number 8, August 1959

Monica D Rieth, Andrew Lozano, Preparation of DPPC liposomes using probe-tip sonication: Investigating intrinsic factors affecting temperature phase transitions, Biochem Biophys Rep. 2021 Jan 7;25:100901. doi: 10.1016/j.bbrep.2020.100901. eCollection 2021 Mar

### Sonikator vasitəsi ilə liposomun əldə olunması



Skalper vasitəsilə toxumanın xırda hissələrə ayrılması



Homogenizator vasitəsilə homogenatın əldə olunması

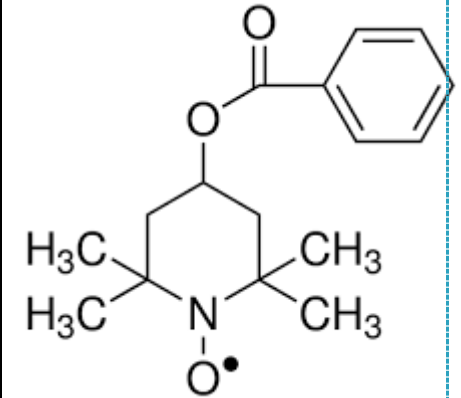


Sonikator vasitəsilə liposomun əldə olunması

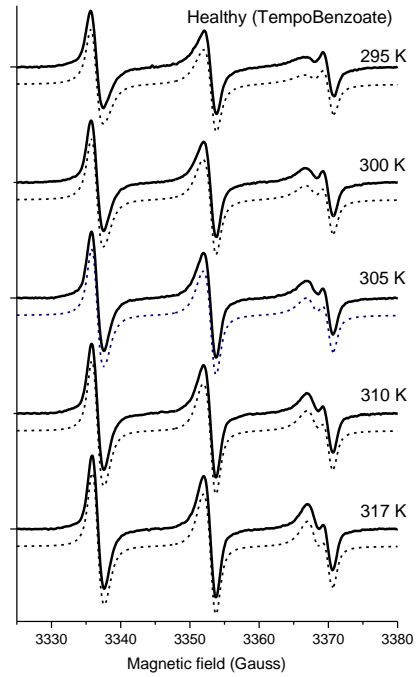
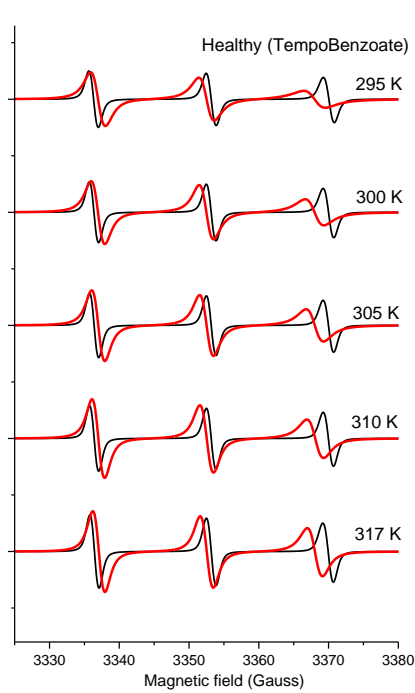
### Tempo benzoat spin zondunun (sağdakı şəkil) insan ağciyər sağlam hüceyrə lipidlərindən alınmış liposomlara inkorporasiyası.

Aşağıdakı şəkildə Tempo benzoat spin zondunun insan ağciyər sağlam hüceyrələrinin lipidlərindən alınmış liposomlara inkubasiyasından sonra müxtəlif temperaturlarda alınmış EPR spektrləri göstərilmişdir. Ekperimental spektrlər qalın qara xətlə göstərilmişdir. Göründüyü kimi 3-cü komponent (yuxarı maqnit sahəsində yerləşən) qismən ayırd edilmişdir. Spektrlərin iki komponentə ayrılması Tempo benzoat spin zondunun bir qisminin liposoma daxil olması ilə əlaqədardır. Bu spektrlərdə 2 komponentli modeli seçməklə kompüter analizi aparılmış və nəzəri spektrlər alınmışdır. Alınan nəzəri spektrlər demək olar ki, eksperimental spektrlərdən seçilmir. Bu spektrlərin aydın görülməsi üçün onlar vertikal sürüşdürülmüşdür (nöqtəvi xətlər göstərilən spektrlər).

Sağ tərəfdə göstərilən spektrlərdə nəzəri simulyasiyada alınmış komponentlər göstərilmişdir. Qırmızı xətlə qeyd olunan EPR spektrləri liposoma daxil olan Tempo benzoata, qara xətlə qeyd olunanlar isə buferdə qalan spin zonda aiddir. Spektrlərdən göründüyü kimi temperatur artdıqca membrana daxil olan hissənin payı artır. Bu hadisə insan ağciyər karsinoma hüceyrələrindən alınan liposomlar üçün də tədqiq edilmişdir.

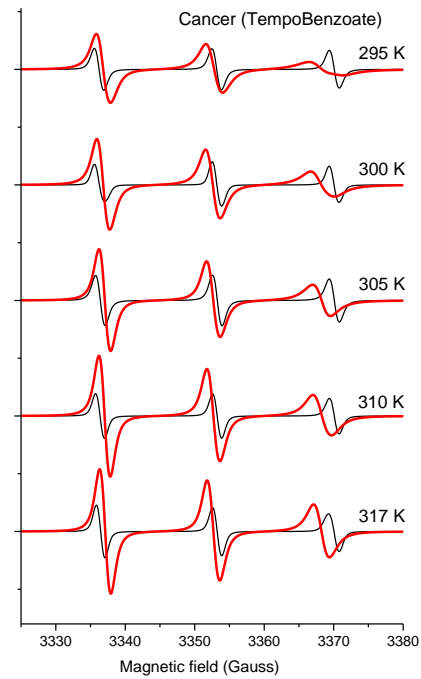
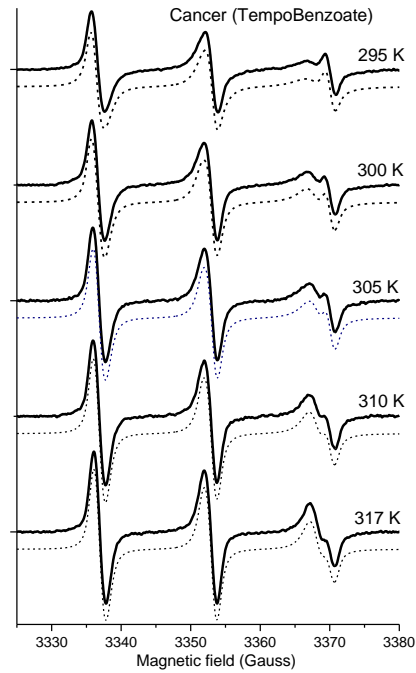


Tempo benzoate



### Tempo benzoat spin zondunun (sağdaki şəkil) insan ağciyər karsinoma hüceyrə lipidlərindən alınmış liposomlara inkorporasiyası.

Yuxarıda sağlam hüceyrələr üzrə görülən işlər karsinoma hüceyrələri üçün də yerinə yetirilmişdir.



Spektrlərdən görünür ki, 2 komponentli model spektrləri (qalın qara və nöqtələrlə qeyd olunan əyri) çox yaxşı təsvir edir. Sağ tərəfdə karsinoma hüceyrələrindən alınmış liposomlarla Tempo benzoat molekullarının inkubasiyasından sonra alınmış EPR spektrlərinin komponentləri göstərilmişdir. Qırmızı və qara xətlər müvafiq olaraq liposoma daxil olan və buferdə qalan hissələrə uyğundur. Normal hüceyrələrdən alınan liposomlarda

olduğu kimi, karsinoma hüceyrələrindən alınan liposomlarda da liposoma daxil olan Tempo benzoat temperaturdan asılı olaraq artır. Lakin çox mühüm fərq qeydə alınıb. Tempo benzoatın xərçəng hüceyrələrindən alınmış liposomlara daxil olma dərəcəsi (qırmızı spektrin amplitudunun qara spektrə nisbəti) sağlama nisbətən çox yuxarıdır. Beləliklə, Tempo benzoatın misalında dərman molekulların karsinoma hüceyrələrinə daxil olma dərəcəsinə təyin edən mühüm faktorlardan biri də hüceyrə membranının lipid kompozisiyasıdır.

### Tədqiq edilən materialların molekulyar-genetik analizi

Tədqiqata daxil edilən xəstələrinin klinik-laborator göstəriciləri Hesabat dövründə Milli Onkologiya Mərkəzinin (MOM) Molekulyar Onkologiya laboratoriyası (MOL) öhdəsinə düşən işləri yerinə yetirmək üçün MOM-un poliklinik, 1-ci kimyaterapiya, cərrahiyyə şöbələri ilə əlaqə saxlamışdır. Həkim klinisistlərə keçiriləcək elmi işin mahiyyəti izah edilmiş və biomaterialların laboratoriyaya çatdırılması yolları araşdırılmışdır. Qeyd etmək lazımdır ki, son vaxtlar ağ ciyərin bəd xassəli törəməsi diaqnozu qoyulan xəstələrin əksəriyyəti metastatik olub, əməliyyata götürülməmişdilər. Bəzi xəstələrdə paralel olaraq SARS-19 virusu problemi olduğu üçün xəstələr əməliyyat və müalicə üçün digər xəstəxanalara keçirilmişdir. Ağ ciyər karsinoması diaqnozu qoyulmuş xəstələrin klinik-laborator göstəriciləri haqqında məlumatlar aşağıdakı cədvəldə göstərilib.

Cədvəl 8. Ağ ciyər karsinoması xəstələrinin təsnifatı

Bio. material		Cinsi		Yaş həddi			Bəd xassəli şişin tipi				
q	t	Q	K	<35	35-65	65<	Adeno-karsinoma	Yastı hüeyrəli karsinoma	Atipik Karsinoid Tumor	Malign Epitelial Tumor	Biomaterial işləmədir
27	12	11	28	2	32	5	1	1	1	2	7

Göründüyü kimi 27 xəstədən qan, 12 xəstədən isə həm qan, həm də əməliyyatdan sonra bəd xassəli şiş materialı götürülüb. Bir xəstədən həm tumor, həm də normal toxuma götürülüb. Bir xəstənin materialı farmalinsiz (PS buffer) olub (fresh material). Kişi xəstələrin sayı 28, qadınların isə 11 olmuşdur. Ən çox 35-65 yaş həddində olan xəstələr müraciət etmişdir. Ağ ciyər törəməsinin tipi patamorfoloji laboratoriyada aşkarlanıb və cədvəldə göstərilib. Digər laborator göstəricilər MOL-da arxivində saxlanılır. Toplanan biomaterial iki hissəyə ayrılıb, bir hissə biofizik parametrlərin öyrənilməsi üçün Biofizika institutuna göndərilib, digər bir hissə molekulyar-genetik analizlərin keçirilməsi üçün MOL laboratoriyada -40°C saxlanılıb.

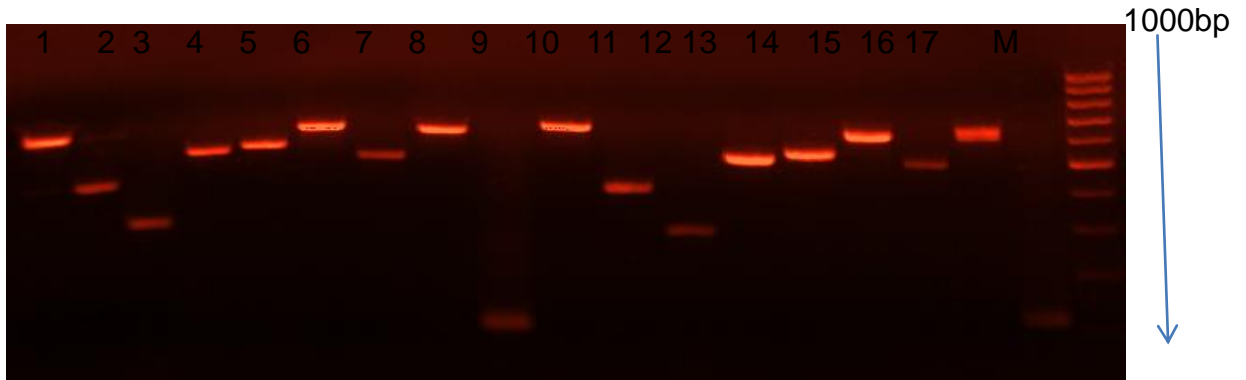
Molekulyar-genetik analizlər

Bəd xassəli törəmənin biologiyasına multidissiplinar yanaşma şişin yaranma mexanizminin öyrənilməsi, profilaktikası və müalicəsi üçün vacibdir. Təqdim edilən işdə ağ ciyər karsinomasının biofiziki parametrləri ilə yanaşı şişin bəzi molekulyar-genetik xüsusiyyətlərinin araşdırılması da nəzərdə tutulmuşdur. Ağ ciyərin bəd xassəli törəməsinin yaranmasında mühüm rol oynayan EGFR, BRAF kimi genlərin aktivləşdirici mütasiyaları, MSI və PDL-1/PD-1 kimi genlərin epigenetik dəyişikliyinə öyrənilməsi qərara alınıb. Qeyd etmək lazımdır ki, MSI və PDL-1/PD-1 kimi genlərin epigenetik dəyişiklikləri 30-55% bəd xassəli şişlərdə aşkar edilib [Kai, Li., 2020]. Molekulyar-genetik tədqiqatların keçirilməsi üçün daha ucuq və MOL-da artıq istifadə edilən

metodların tətbiqinə üstünlük verilməsi nəzərdə tutulmuşdur. Hesabat dövründə tədqiqatları aparmaq üçün metodlar seçilib və materiallar hazırlanıb.

EGFR və BRAF kimi genlərin aktivləşdirici mütasiyalarının primerləri dizayn edilmişdir. Bunun üçün "NCBI, nucleotide" saytıdan istifadə edilib. Primer yoxlanması BLAST vasitəsi ilə aparılıb. Primerlər Türkiyənin DNA-integration kompaniyasında sintez edilib. Amplifikasiyadan sonra alınmış fraqmentlərin aşkarlanması 1%-li aqaros-gel elektrofarezlə aparılacaq. Şəkil 1. 1% aqarosa gelində müxtəlif uzunluqlu fraqmentlərin aşkarlanmasını göstərir.

Genetik material Qiagen (Gr) kompaniyasının kətlərlə ayrılacaq və DNA materialı -40C, RNA materialı -85C saxlanılacaq. Genetik material həm qan, həm də şiş toxumasından ayrılacaq. Şəkil 7. Amplifikasiya olunmuş fraqmentlərin aqarosa gelində aşkarlanması



Epigenetik analizlərin keçirilməsi üçün primerlər PrimerBank (The centre) for computational and integrative biology, Harvard Medical School) istifadə edilib. mRNA üstündən alınan cDNA gen ardıcılığının üç hissəsindən ekspresion analiz keçirmək üçün primer seçilir. Şəkil 7. MSI genlərindən olan MSH1 üçün seçilən primerlər göstərilir.

Şəkil 7. MSH1 genin RT-PCR (reverse transcriptase) vasitəsi ilə alınmış cDNA ardıcılığı və primer seçimi göstərilir. Qırmızı rənglə R(reverse) və F(forward) primerlər, göy rənglə alınacaq fraqment göstərilir.

1 atgaatggtt acatatccaa tgcaaacctac tcagtggaaga agtgcattctt ctta**ctcttc**

**61 atcaaccatc gtctggtaga atcaactcc ttgagaaaag ccatagaaac agtgatgca**

**121 gcctatttgc** ccaaaaacac acaccattc ctgtacctca gttgagaaat cagtccccag

181 aatgtggatg ttaatgtgca cccacaaaag catgaagttc acttctgca cgaggagagc

241 atcctggagc ggggtgcagca gcacatcgag agcaagctcc tgggctccaa ttctccagg

301 atgtactca cccagacttt gctaccagga ctgctggcc cctctgggga gatggtaaa

241 atcctggagc ggggtgcagca gcacatcgag agcaagctcc tgggctccaa ttctccagg

301 atgtactca cccagacttt gctaccagga ctgctggcc cctctgggga gatggtaaa

361 tcca**caaca** **gtctgacctc** **gtcttctact** **tctggaagta** **gtgataaggt** **ctatgcccac**

**421 cagatggttc** **gtacagattc** **ccgggaacag** aagcttgatg catttctgca gcctctgagc

481 aaaccctgt ccagtcagcc ccaggccatt gtcacagagg ataagacaga tatttctagt

541 ggcagggcta ggcagcaaga tgaggagatg cttgaactcc cagcccctgc tgaagtggct

421 cagatggttc gtacagattc ccgggaacag aagcttgatg catttctgca gcctctgagc

**481 aaaccctgt ccagtcagcc ccaggccatt gtcacagagg ataagacaga tatttctagt**

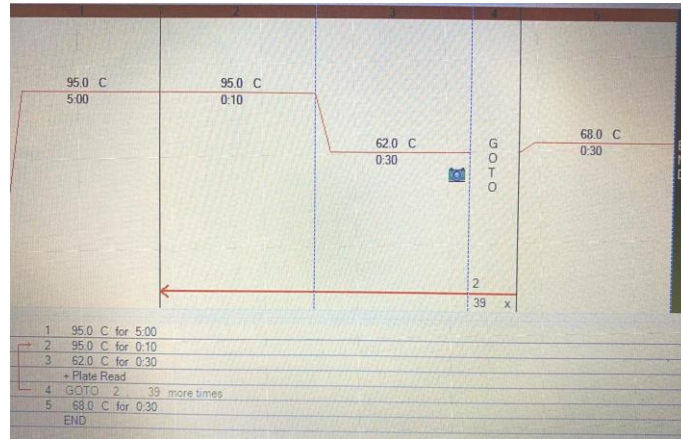
**541 ggcagggcta ggcagcaaga tgaggagatg cttgaactcc** **cagcccctgc** tgaagtggct

601 gccaaaaatc agagcttga gggggataca acaaagggga ctcagaaat gtcagagaag

661 agaggacctt cttccagcaa cccagaaaag agacatcggg aagattctga tgtggaaatg

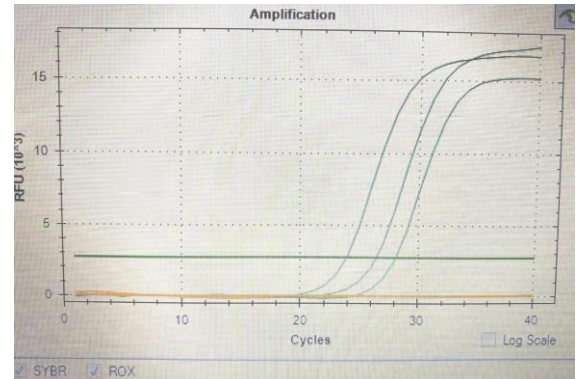
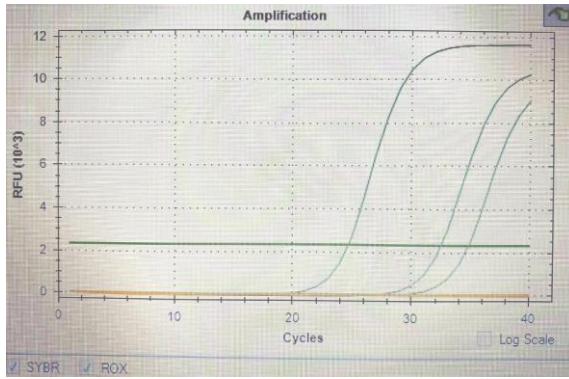
721 gtggaagatg attcccgaag gaaatgact gcagcttga cccccggag aaggatcatt

Seçilən primerlər sonradan DNA-integration (Tr) kompaniyasında sintez olunacaq. Analizlərin keçirilməsi üçün şərait Şəkil 8.-də göstərilib. Bu PrimerBank-ın təklif etdiyi şəraitdir. Şəkil 8. Ekspresion analizlərin keçirilməsi şəraiti.



Göründüyü kimi reaksiyanın dövr göstəricisi 39-40-dır. Genin ekspresiya səviyyəsi işarə olunan piklərin hansı dövrdə baza xəttini kəsməsi ilə ölçülür [Wang T., 2019].

Şəkil 9. Genlərin differensial ekspresiyası



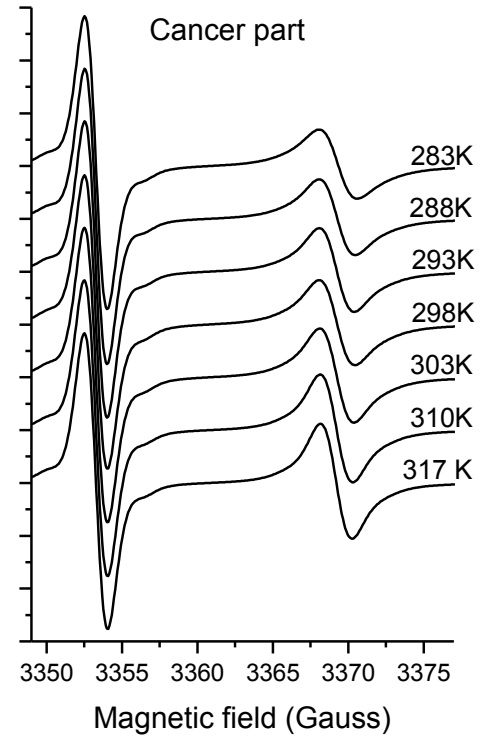
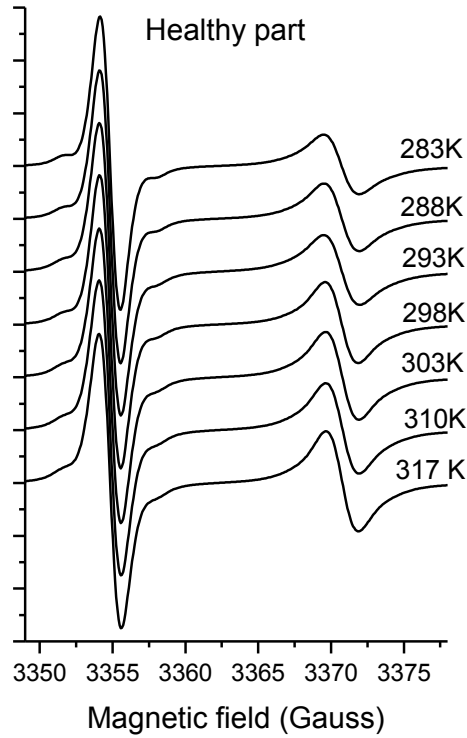
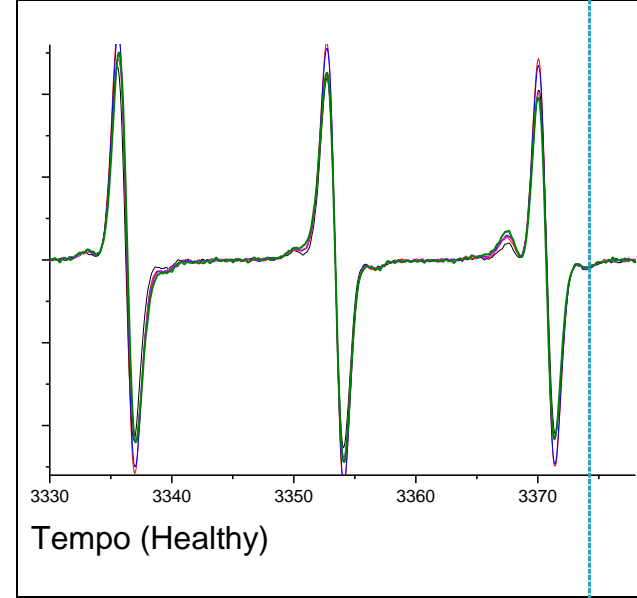
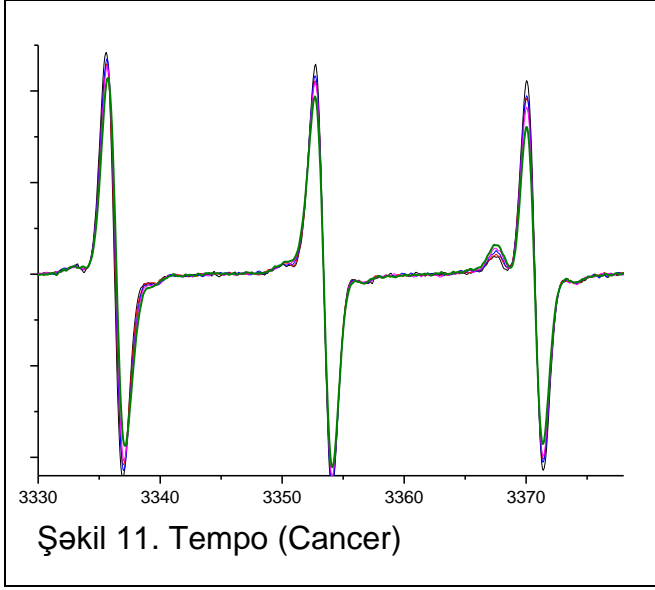
Göründüyü kimi yüksək ekspresiya səviyyəsi baza xəttini dövrünün 20-ci vəziyyətində olan genə aiddir. Digər gen (iki primerlə) dövrün 28 və 30-cu vəziyyətində görünüb. Bu şübhəli və ya orta ekspresiya verən genin olması hesab edilir.

Şəkil 10-də bir genin 3 primerlə yüksək ekspresiya səviyyəsi göstərilib.

Beləliklə, xəstələrin bəd xassəli şiş materialında və qanda keciriləcək molekulyar-genetik analizlərin parametrləri hazırlanmışdır və spektroskopiyanın tətbiqi ilə alınan nəticələrin təhlilində istifadə edilib.

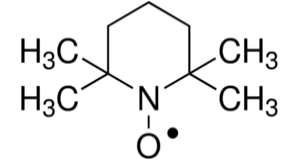
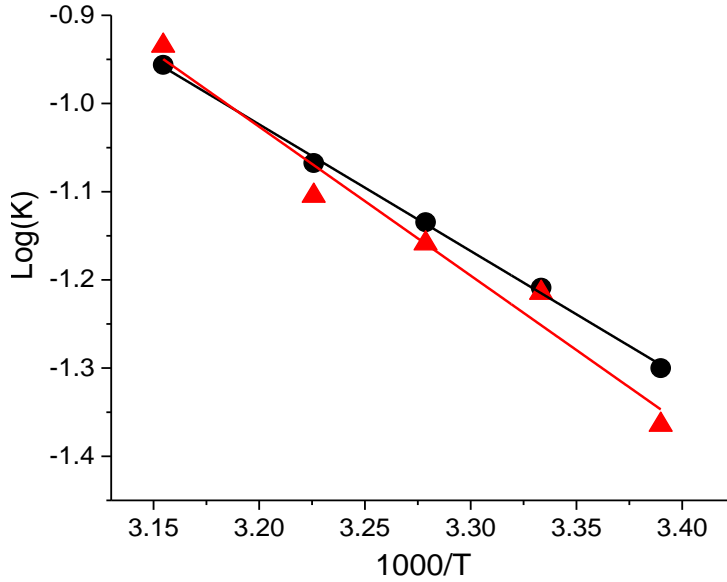
TEMPO bizim işlətdiyimiz spin zondlardan ən sadəsidir. Digər spin zondlar TEMPO molekuluna müxtəlif aktiv qrupların əlavə edilməsi nəticəsində alınıb. TEMPO spin zonduna görə xəstə və sağlam nümunələrdə inkorporasiya dərəcəsi bir-birinə yaxın halda TEMPO-benzoatın nümunələrə diskriminasiya etmək xüsusiyyəti tədqiq edilib. Bunun üçün elə nümunə seçilmişdir ki, onların sağlam və xərçəng hüceyrələrinin membranlarına TEMPO molekullarının inkorporasiya dərəcəsi bir-birinə yaxın olsun. Aşağıdakı şəkildə TEMPO spin zondunun sağlam və xərçəng nümunələrində müxtəlif temperaturlarda EPR spektrləri göstərilmişdir. Bu spektrlər kompüter vasitəsi ilə 2-komponentə dekonvolusiya edilmiş və bu spektrlərdən onların hüceyrə membranlarına inkorporasiya dərəcəsi hesablanmışdır.





Şəkil 12.

Şəkil 12.-də TEMPO spin nişanının hüceyrə membranlarına daxil olan hissəsinin EPR spektrlərinin son iki komponenti verilmişdir. Göründüyü kimi EPR spektrlərində son komponentin temperaturdan asılı nisbi artımı xərçəng və sağlam toxumaları üçün bir-birinə yaxındır. Bu məqam Arrhenius əyrilərində də öz əksini tapmışdır.



Incorporation energy for Tempo

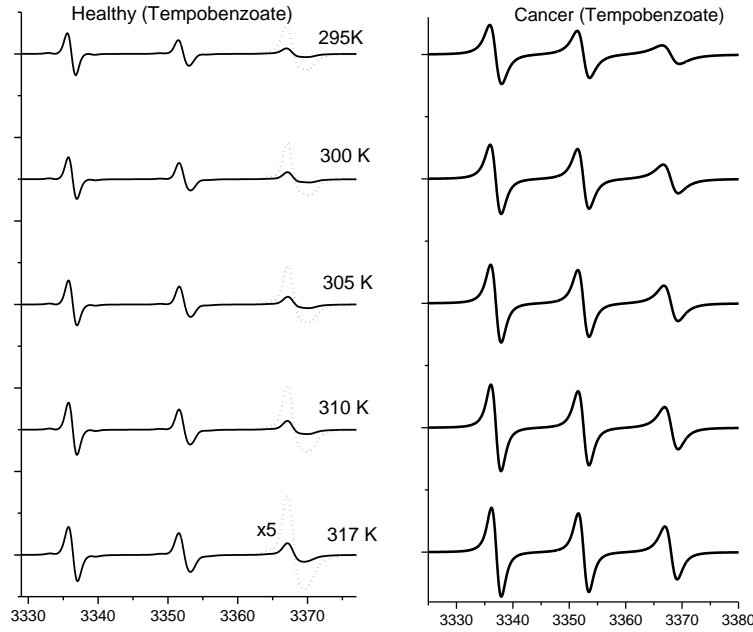
**6.6 ± 0.6 kcal/mol (healthy);**

**7.7 ± 0.6 kcal/mol (cancer)**

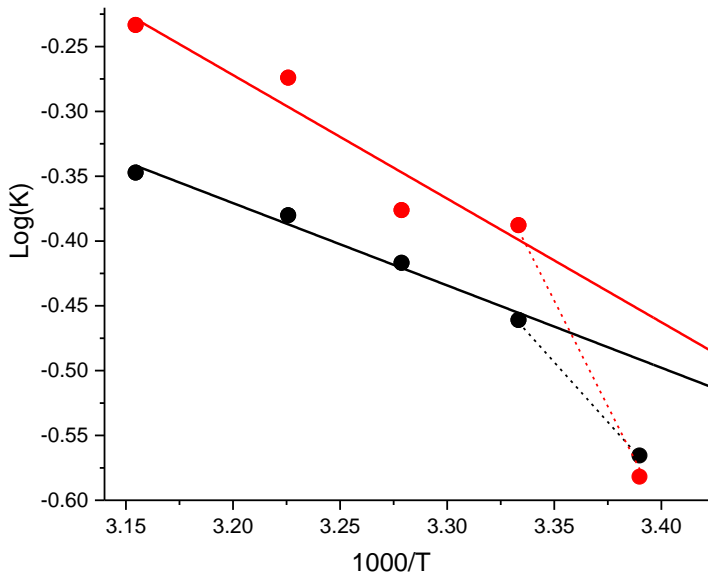
Şəkil 13-də TEMPO spin zondunun EPR spektral parametrlərindən hesablanmış Arrhenius ayrılması göstərilmişdir. Şəkildən görüldüyü kimi TEMPO spin zondunun sağlam və xərçəng toxuma hüceyrələrinə inkorporasiya dərəcəsi bir-birinə çox yaxındır və onların su mühitindən membran mühitinə köçürülməsi üçün lazım olan sərbəst enerji müvafiq olaraq  $6.6 \pm 0.6$  kcal/mol və  $7.7 \pm 0.6$  kcal/mol təşkil edir.

Beləliklə, bu nümunə üçün TEMPO spin zondunun sağlam və xərçəng toxumalarının hüceyrə membranlarına inkorporasiya dərəcəsinin bir-birinə yaxın olması göstərilmişdir. Aşağıda bu nümunələrdə TEMPO-benzoat molekullarının inkorporasiya dərəcəsi üzrə aparılan işlərin nəticələri göstərilmişdir. TEMPO spin zonu ilə aparılan işlərə uyğun olaraq xərçəng və sağlam toxuma hüceyrələri üçün kompüter analizləri edilmiş və 2-komponentli modelə uyğun olduğu göstərilmişdir. Şəkil 14-də TEMPO-benzoat molekullarının xərçəng və sağlam toxuma membranlarına inkorporasiya olunan hissələrinin EPR spektrləri göstərilmişdir. Eksperimental şərait (spin zond və toxumanın miqdarı) eyni olduğu üçün EPR spektrlərin intensivlikləri inkorporasiya dərəcəsi ilə mütənasibdir. Şəkil 14-dən görüldüyü kimi TEMPO spin zondundan fərqli olaraq, TEMPO-benzoat spin zonu xərçəng toxuma membranına inkorporasiya dərəcəsi sağlama nisbətən dəfələrlə yuxarıdır. Beləliklə, TEMPO spin zonduna benzol qrupu daxil edildikdə o xərçəng hüceyrələrini daha yaxşı fərqləndirə bilər. Bu nəticədən dərman maddələrinin sintezində də istifadə etmək olar. Belə ki, dərman maddəsinin toksik effektini azaltmaq üçün onların müəyyən nöqtəsinə benzol qrupu daxil etmək olar. Bu zaman, bizim nəticələrə görə benzol qrupu ilə modifikasiya edilmiş dərman sağlam toxumaya nisbətən xərçəng toxumasına daha çox daxil olacaq və beləliklə kənar toksik effektlər qat-qat azalacaq. Şəkil 15-də TEMPO-benzoat molekullarının xərçəng və sağlam toxumalara inkorporasiyanın Arrhenius ayrılması verilmişdir.

Şəkil 15-də Arrhenius ayrılırlarından görüldüyü kimi yuxarı temperaturlarda TEMPO-benzoatın xərçəng toxumalara inkorporasiya dərəcəsi sağlama nisbətən daha da artır. Xərçəng toxumalarında bu zondun inkorporasiya parametri temperatura daha həssasdır. Bu nəticə göstərir ki, yuxarı temperaturlarda TEMPO-benzoat xərçəng toxumalarına daha çox daxil olacaq. Bu da onu göstərir ki xərçəng xəstələrinin kimya-terapiyasında bəzi hallarda istifadə olunan haypertermiya effektiv olmalıdır.



Şəkil 14.



Incorporation energy for TempoBenzoate:  **$2.9 \pm 0.7$  kcal/mol (healthy);**  
 **$4.5 \pm 0.7$  kcal/mol (cancer)**

Şəkil 15.

Bundan əlavə biz TEMPO-benzoat molekulunun sağlam və xərcəng toxuma membranlarında fırlanma korrelyasiya müddətləri və onların temperaturdan asılılığı tədqiq etmişik. Şəkil 15-də sağlam və xərcəng toxuma membranlarına daxil olan TEMPO-benzoatın fırlanma korrelyasiya müddətinə uyğun Arrhenius əyriləri göstərilmişdir. İnkorporasiya dərəcəsindən fərqli olaraq TEMPO-benzoatın fırlanma hərəkəti üçün aktivasiya enerjisi sağlama nisbətən təqribən 2 dəfə azdır və uyğun olaraq  $7.4 \pm 0.9$  kcal/mol və  $15.1 \pm 2.8$  kcal/mol qiymətlərini alır. Bu fərq sağlam və xərcəng toxumalarında membranları təşkil edən lipidlərdə mühüm dəyişiklərdən xəbər verir. Göründüyü kimi xərcəng xəstəliklərinin müalicəsində onların lipid kompozisiyasında olan

fərqlərdən effektiv istifadə etmək olar və toksik effektləri də azaltmaq olar.

Görülən spektroskopik işlərlə yanaşı çox mühüm olan molekulyar-genetik tədqiqatlar da aparılıb və alınan nəticələr aşağıda göstərilmişdir.

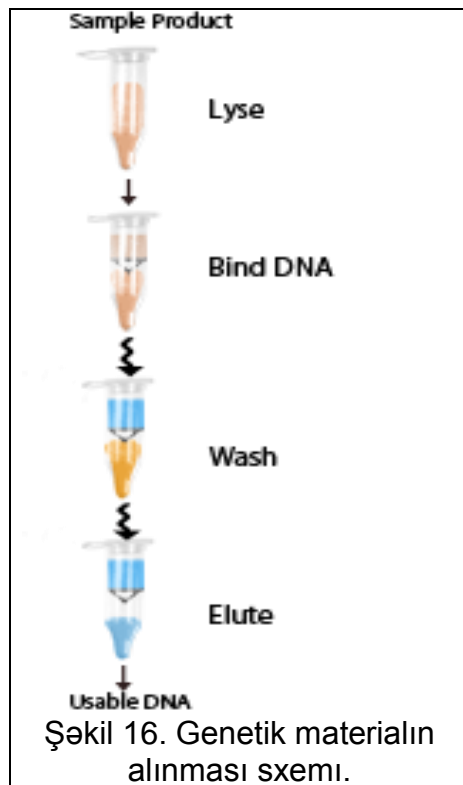
### Tədqiqat nümunələrinin molekulyar-genetik analizi

Cari dövrdə AMEA-nın Biofizika İnstitutunda aparılan spektroskopik tədqiqatlarla klinik tədqiqatlar arasında mümkün korrelyasiyanı təyin etmək üçün ağ ciyər karsinoması nümunələrinin klinik təsnifatı verilmişdir. Bunun üçün total olaraq ağ ciyər karsinoması diaqnozu qoyulmuş 54 xəstədən qan və toxuma olmaqla biomaterial toplanmışdır. Cədvəl 9 xəstələrin ümumi klinik-laborator təsnifatı verilib.

Cədvəl 9. Ağ ciyər karsinoması xəstələrinin təsnifatı

Bio. material		Cinsi		Yaş həddi			Bədən xassəli şişin tipi				
q	t	Q	K	<35	35-65	65<	Adeno-karsinoma	Yastı hüceyrəli karsinoma	Atipik Karsinoid Tumor	Malign Epitelial Tumor	Biomaterial İşləmədir
34	20	16	38	3	44	7	13	2	2	2	1

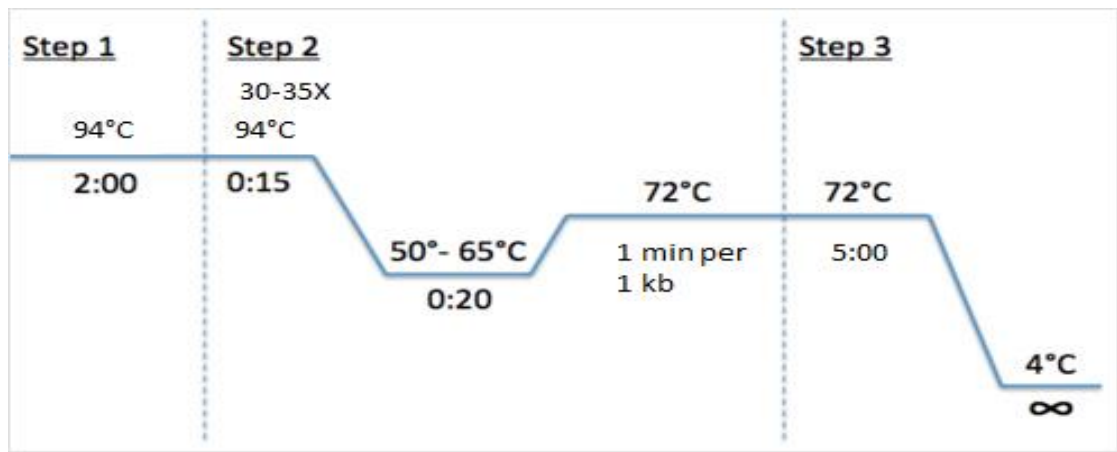
Ağ ciyər karsinoması diaqnozu qoyulmuş xəstələrin şiş materialında EGFR, ALK, ROS1 kimit genlərin aşkarlanması üçün molekulyar-genetik analizlər keçirilmişdir. Genetik materialın alınması Qiagen firmasının kitləri vasitəsi ilə aparılmışdır (Qiagen, Gr). Analizlər Qiagen Handbook (<https://www.qiagen.com>) protokolları əsasında aparılıb. Şəkil 16-də DNA və RNA colom metodla alınması sxemi göstərilib.



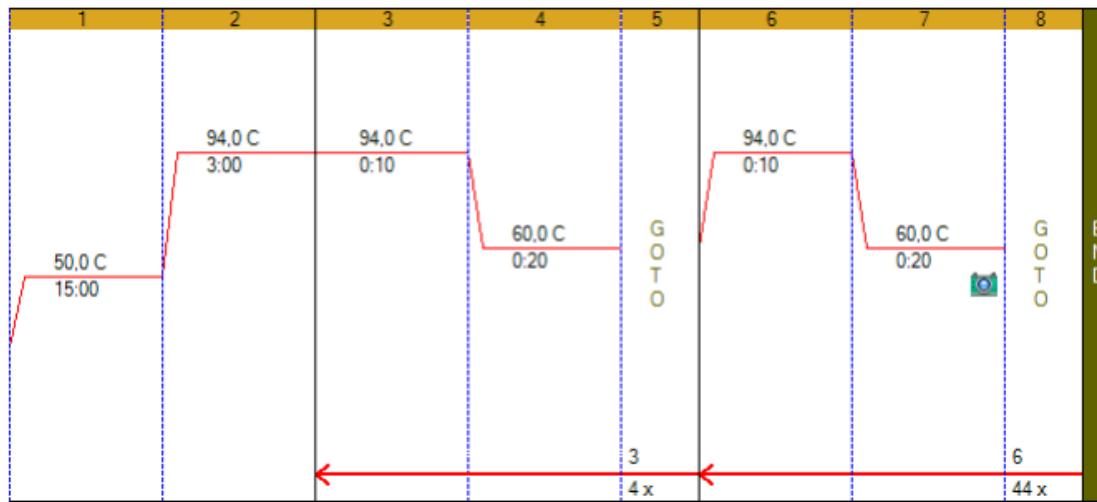
### Biomaterial və genetik material

Bu metodla parafin blokda fiksə edilmiş biomaterialdan 1saat 20 dəqiqə əzində genetik material almaq olur. Alınan genetik materialın kəmiyyət və keyfiyyəti NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, US) spektrofotometrində yoxlanılıb. Alınan məhsulun 260nm/280nm dalğa uzunluğunda olan ölçülər nisbətinin təqribən 1.8 bərabər olması genetik materialın iş üçün yararlı olmasını göstərmişdir. Bu yolla işləniləcək məhlulun 1 mikrolitrində olan genetik maddə miqdarı da aşkar edilir. Genetik materialın keyfiyyəti bəzi hallarda gel-elektroforez yolu ilə də yoxlanılıb. Alınmış DNT məhlulu arxivləşdirilib  $-40^{\circ}\text{C}$ , RNT məhlulu  $-85^{\circ}\text{C}$  saxlanılır.

Analizlər ABŞ-nin EntroGene firmasının kitləri vasitəsi ilə aparılıb (EntroGen, USA). EGFR geninin mutasiyaları DNA, ALK və ROS1 genin mutasiyaları isə RNA molekulları üstündə keçirilib. Analizlər istehsalçı firmanın təqdim etdiyi protokollar əsasında RT-PCR (BioRad, CFX96) cihazında keçirilib.



Şəkil 17. EGFR geninin genotipləməsi şəraiti (protokolu)



Şəkil 18. ALK və ROS1 genlərinin genotipləmə şəraiti (protokolu)

Göründüyü kimi RNA üstündən keçirilən ALK və ROS1 genotipləmə analizləri daha mürəkkəb şəraitdə keçirilir. Nəticələrin oxunması pozitiv və neqativ standartlara əsaslanır və reaksiyanın gedişi daxili kontrollarla yoxlanılır.

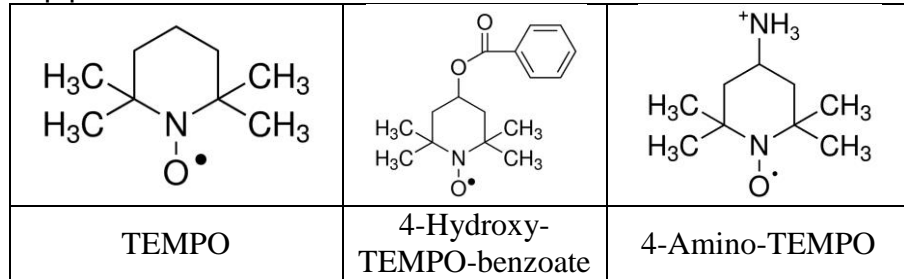
Cəmi 19 xəstənin şiş materialı adı çəkilən mütsasiyalara yoxlanılmış və nəticələr aşağıdakı cədvəl 2-də göstərilmişdir. Qeyd etmək lazımdır ki, ayrılmış genetik material digər analizlərin keçirilməsi üçün də kafi müqdardadır və dərin soyuducuda saxlanılır.

Cədvəl 9. Ağ ciyərin bədxassəli şiş diaqnozu qoyulmuş xəstələrdə klinik əhəmiyyətli mutasiyalar

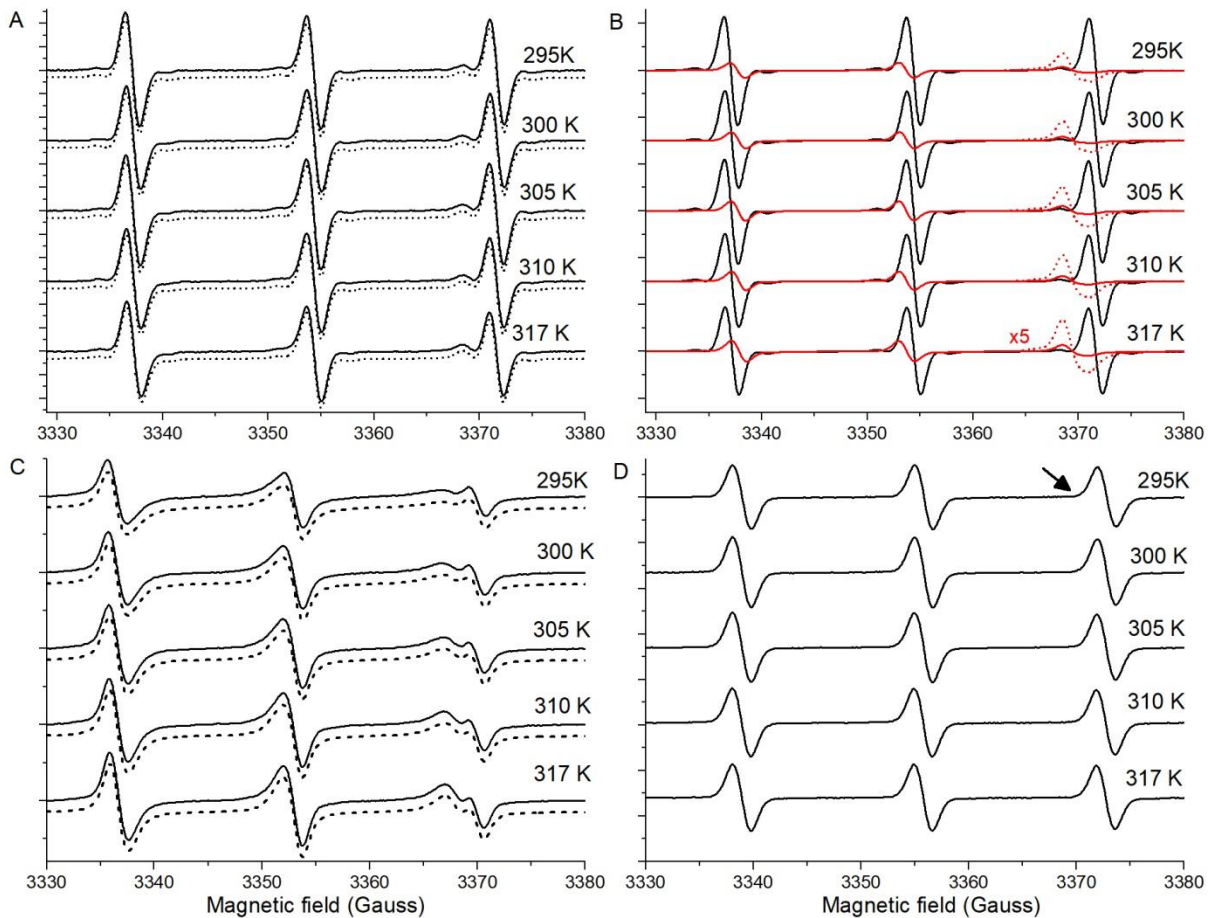
EGFR					
Xəstə sayı 19					
T790M	L858R	exon 18	exon 19	exon 20	exon 21
2	1		3		
ALK					
xəstə sayı 19					
Pozitiv			Neqativ		
2			17		

ROS1	
xəstə sayı 19	
Pozitiv	Negativ
-	19

Əvvəlki işlərimizdə TEMPO və TEMPO-benzoat spin zondlarının sağlam və xərcəng hüceyrələrinə inkoporasiya dərəcəsi öyrənilmiş və göstərilmişdir ki, hidrofob qrup olan benzoatın TEMPO-ya kovalent birləşməsi onu xərcəng hüceyrələrindən alınan liposomlara qarşı daha da həssas edir. Bu dövrdə amino-TEMPO spin zondundan istifadə etməklə müsbət yüklü amin qrupunun təsiri tədqiq edilib.



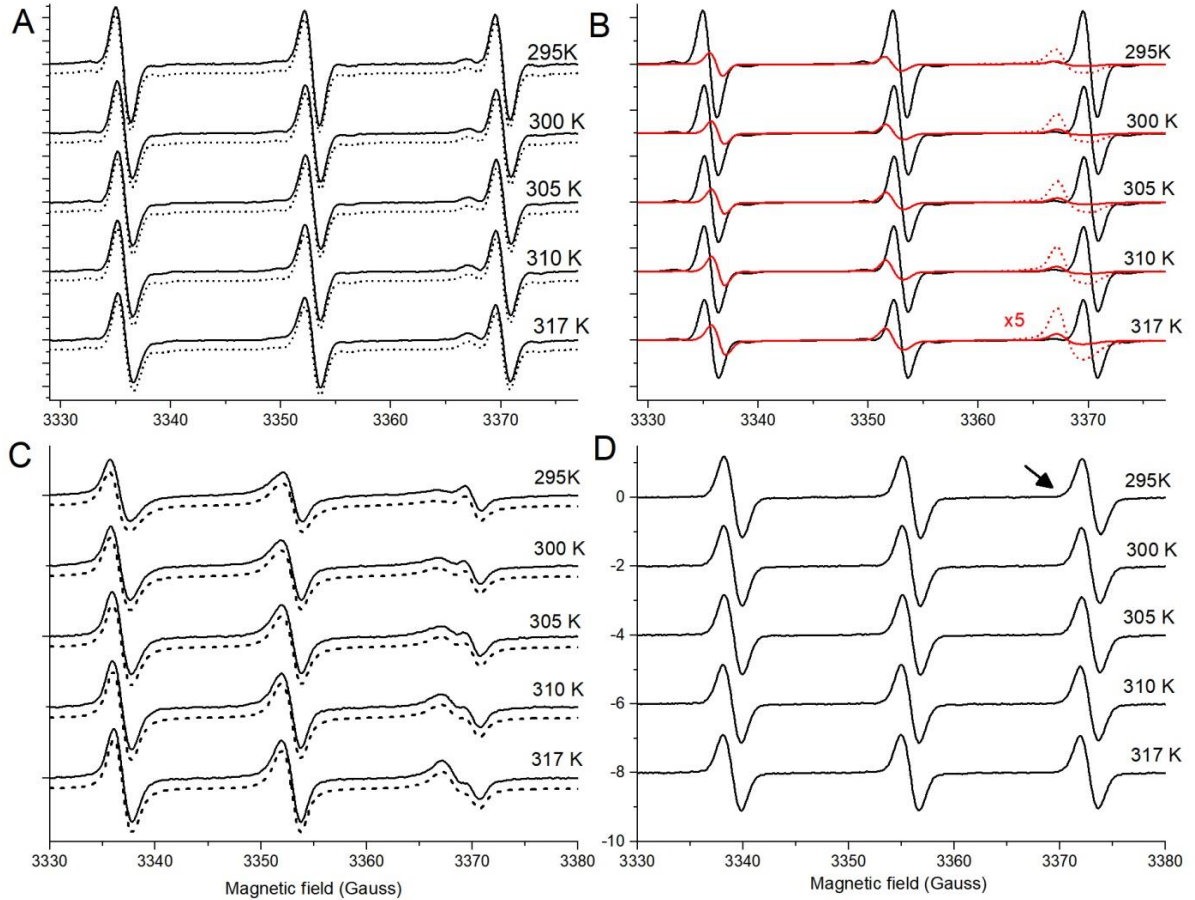
Sxemdə hər 3 spin zondun kimyəvi strukturu göstərilmişdir. Həqiqətən də bu spin zondları müqayisəli tədqiq etməklə benzoat və müsbət yüklənmiş  $-NH_3^+$  qrupunun təsiri öyrənilib.



Şəkil 19. TEMPO və onun törəmələrinin EPR spektrləri pH 7.3-də normal (sağlam) insan ağciyəri

hüceyrələrindən ekstraksiya edilmiş lipidlərdən istifadə etməklə hazırlanmış liposomlarda inkorporasiyası. (A) TEMPO EPR spektrləri (səliqə qara xətt) və iki komponentli modelle simulyasiya edilmiş spektrlər (nöqtələrlə verilən). Daha yaxşı aydınlıq üçün simulyasiya edilmiş spektrlər şaquli olaraq sürüşdürülüb; (B) (A)-da göstərilmiş EPR spektrlərinin ayırd edilmiş komponentləri. Qara və qırmızı xətlər müvafiq olaraq hidrofilye (sulu) və lipofilye (liposomal) mühitlərdə lokallaşmış TEMPO-nun EPR spektrlərini göstərir. Liposom mühitində TEMPO EPR spektrlərinin yüksək sahə komponentlərinin daha yaxşı mühakimə etmək üçün onların amplitudu 5 dəfə artırılmışdır (qırmızı xətlər); (C) (A) ilə eynidir, lakin 4-hidroksi-TEMPO-benzoat üçün; (D) (A) ilə eynidir, lakin 4-amino-TEMPO üçün. Heç bir temperaturda ayrılma müşahidə olunmadığından spektrlərin spektral modelləşdirilməsi aparılmamışdır.

Şəkil 19-dan aydın görünür ki, hər iki TEMPO və TEMPO-benzoat spin zondları sağlam ağciyər hüceyrələrindən alınmış liposomlara daxil ola bilər. TEMPO-benzoatın daxil olması isə əhəmiyyətli dərəcədə yüksəkdir. Hər iki spin zond üçün liposoma daxil olma dərəcəsi yuxarı temperaturlarda artır. Bunların əksinə olaraq, amino-TEMPO spin zonu üçün temperaturun heç bir qiymətində liposoma daxil olma müşahidə olunmur (Şəkil 19D). Beləliklə, hüceyrə səthinin mənfi yüklənməsinə baxmayaraq, hətta neytral TEMPO ilə müqayisədə, müsbət yüklənmiş amino-TEMPO spin zonu liposoma daxil ola bilər.



Şəkil 20. TEMPO və onun törəmələrinin pH 7.3-də insan ağciyər xərçəngi (karsinoma) hüceyrələrindən ekstraksiya edilmiş lipidlərdən hazırlanmış liposomlara inkorporasiya nəticəsində alınan EPR spektrləri. (A), (B), (C) və (D) Şəkil 1-dəki kimidir, lakin xərçəng hüceyrələri üçün həyata keçirilir.

Şəkil 20-də TEMPO və onun törəmələrinin ağciyər karsinoma hüceyrələrinin inkorporasiyası göstərilmişdir. İlk baxışda alınan nəticələr bir-birinə oxşayır. Lakin xərçəng hüceyrələrində mühüm fərqlər özünü biruzə verir. Həqiqətən də neytral TEMPO spin zondunun ağciyər xərçəng

hüceyrələrindən alınmış liposomlara daxil olma dərəcəsi demək olar ki, sağlam ilə eynidir. Lakin TEMPO-benzoatın xərçəng hüceyrələrindən alınmış liposomlara daxil olma dərəcəsi sağlamla müqayisədə xeyli yüksəkdir. Müsbət yüklənmiş amino-TEMPO spin zəndu xərçəng hüceyrələrindən alınmış liposomlara inkorporasiyası sağlam halda olduğu kimi heç bir temperaturda müşahidə olunmur. Alınan mühüm nəticə ondan ibarətdir ki, yüklü qrup deyil, məhz hidrofob qrup liposomlara inkorporasiyasını təmin edir.

Qeyd etmək lazımdır ki, yuxarıda göstərilən nəticələr bir hal üçün verilmişdir. Buna uyğun 5 iş görülmüş və hər birində alınan nəticələr göstərilənə uyğundur.

EPR tədqiqatlarından alınmış nəticələr uyğun olaraq termodinamik parametrlərdə öz əksini tapmışdır. Arrenius əyrilərindən alınmış parametrlər yuxarıdakı nəticələri bir daha təsdiq edir.

İnsan ağciyər xəstələrinin qan və şiş materiallarının molekulyar-genetik analizi Hesabat dövründə layihənin məqsədini yerinə yetirmək üçün ağ ciyər xəstələrindən qan və şiş materialı toplanmış və molekulyar-genetik analizlər keçirilmişdir. Eyni zamanda toplanan qan plazması üzərində maye biopsiyadan istifadə etməklə EGFR-mutasiyalarının (ikincili mutasiyalar) aşkarlanması üçün material işlənib hazırlandı. Məqsəd qan plazmasında bəd xassəli şişin müalicəsi üçün mühüm olan gen mutasiyalarının molekulyar-genetik və biofiziki yolla aşkarlanmasının müqayisə edilməsidir. Bu zaman istifadə ediləcək metodun daha ucuz və müalicə prosesində bir neçə dəfə təkrar olunması əsas şərt kimi götürülməlidir.

EGFR epidermal yetişmə faktoru reseptorudur. Bütün sağlam hüceyrələrdə mövcüddür. EGFR genində mutasiyanın aşkar olunması hüceyrəyə səhv məlumat göndərilməsinin işarəsidir. Bu isə sağlam hüceyrə bölünməsinin pozulmasına, bəd xassəli şişin əmələ gəlməyə başlamasına işarədir. Ağ ciyər, düz bağırsağ adenokarsinomasında, gliblastoma 18-25% arasınca rast gəlinir [Del Re M., 2019]. EGFR-reseptorların inhibitorları (tyrosine kinase inhibitors, TKIs) onkoloji praktikada geniş istifadə edilir. Ancaq müalicənin gedişində çox zaman TKIs dirənc əmələ gəlir, sonradan məlum oldu ki, bu dirənc EGFR reseptorunda yeni mutasiyaların əmələ gəlməsinə işarədir [Kuiper JL., 2014]. Kliniki praktikada EGFR-əsaslı terapiyanın keçirilməsi üçün analizlər ya ilkin şiş materialında, ya da metasdazlardan götürülmüş materialda olunur. Bu vaxt farmalında fiksə olunmuş bloklardan (FFPE) istifadə olunur [Ellison et al, 2013; Jung, 2013]. Bu metodla genetik materialların alınması əvvəlki hesabatda göstərilib.

Lakin son illər molekulyar metodların geniş vüsət alması onkoloji müalicə gedişinin kontrol edilməsini və genlərdə baş verən ikincili mutasiyaların aşkarlanması metodlarını sınaqdan keçirilməsi üçün tədqiqatlara başlandı. Bu metodlardan biri maye biopsiyadır. Maye biopsiyanın keçirilməsi üçün xəstənin periferal qan hüceyrələrində dövr edən sərbət bəd xassəli şişə aid DNT hissəciklərinin ( circulating-free tumor DNA) aşkarlanmasıdır. Metod əslində hələ tam təsdiqini tapmayıb və tədqiqatların 3-cü fazasındadır. Maliyyə cəhətdən bahalı metod olaraq göstəriləcəyi məlumdur.

Molekulyar Onkologiya Laboratoriyasında ilkin şiş materialı üzərindən keçirilən 404 ağciyər xəstələrindən TKIs-in target terapiyasına göstəriş olan 71-də xəstə seçilmişdir. Xəstələr MOM-2013-2021-ci illər arasında müraciət etmişlər. Onlardan 47-si TKIs-əsaslı target terapiyası almışdır. Xəstələrin yaşam sürəsi haqqındakı məlumat hələ işlənilib tam hazırlanmayıb.

Biofiziki yolla aparılan tədqiqatlardan toplanan qan plazması arxivdə (-40°C) saxlanılır. Əlavə ediləcək qanlar xüsusi qayda ilə dondurulub arxivdə saxlanılır.

Toplanılan 12 ağ ciyər xərçəngi xəstələrin periferal qan plazmasında maye biopsiya metodu ilə ikincili mutasiyanın aşkar edilməsi üçün analiz keçiriləcək. Xəstələrin ilkin şiş materialında TKIs-lə müalicə üçün uyğun mutasiya aşkarlanmışdır. Bu xəstələrin 7-də müalicə effekli olmuş, xəstələr müşahidə altında yaşayırlar. 5 xəstədə 6-13 aydan sonra dərmana dirənc (xəstəliyin proqresləşməsi) müşahidə edilib.

Maye biopsiya analizi keçirmək üçün plazmanın toplanması üçün şərtlər şəkil 1.-də göstərilib.



**Table 3.** Recommendations for blood processing and cfDNA isolation.

Factors	Recommendations
Blood collection	Cell-Free BCT Streck™ tubes for whole blood collection
Plasma isolation	Two-step centrifugation speed of 1000–2000g at 4°C for 10 min and 10,000–16,000g at 4°C for 10 for plasma separation
Plasma storage	4°C = For sample processed within 15 min; –80°C = for long-term storage

İstifadə ediləcək cihaz və metod Real-time effekti versə də (yəni genotipləmə), əslində Real-time PCR-da istifadə ediləcək metoddan əsaslı olaraq fərqlənir:

1. Cihaz olduqca kiçik və transport üçün sərfəlidir
2. Real-time metoddan fərqli olaraq temperatur dəyişikliyi tələb olunmur, sabit bir temperatur (67°C) seçilir, (Isothermal amplification)
3. Real-time PCR metoddan fərqli olaraq 2 yox, 6 primer seçilir (LAMP reaction)

Şəkil 21. Maye biopsiya keçirilməsi üçün istifadə ediləcək Doktor VIDA cihazı.

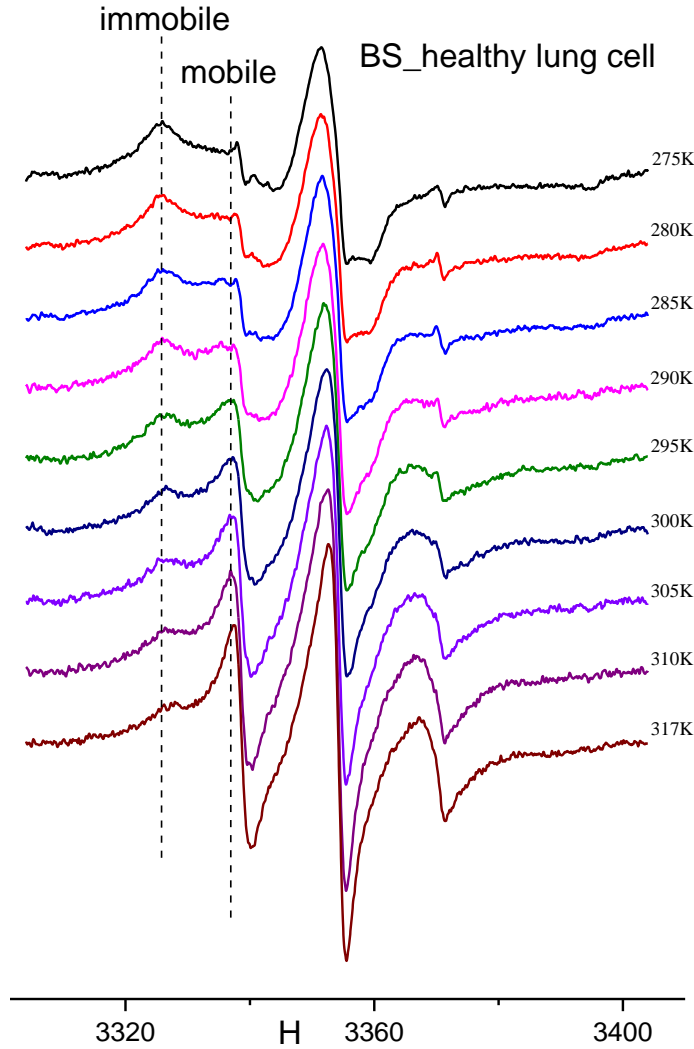


Doktor Vida tək kameralı olub, bir xəstənin analizini tək bir tubda etmək üçün işlədilir. Bu materialın zədələnməsinin, başqa genetik fraqmentlərlə qarışdırılmasının qarşısını ala bilir. Hal-hazırda laboratoriyada tədqiqatları aparmaq üçün hazırlıq gedir və gördüyünüz kimi optimal şəraitin seçilməsi üçün bir xəstə materialı 4 müxtəlif şəraitdə LAMP reaksiyon metoduna məruz qalacaq.

Alınan nəticələr biofiziki yolla keçirilən analizlərlə müqayisə ediləcək

Yuxarıda təqdim etdiyimiz işlərdə TEMPO, TEMPO-benzoat və amino-TEMPO spin zondlarının sağlam və xərçəng hüceyrələrinə inkorporasiya dərəcəsi öyrənilmiş və göstərilmişdir ki, hüceyrə membranına inkorporasiya dərəcəsi molekulun hidrofobluğundan asılıdır. Membran səthi mənfi yük daşdığına baxmayaraq müsbət yüklü amino-TEMPO zondunun inkorporasiyası çox zəif olub.

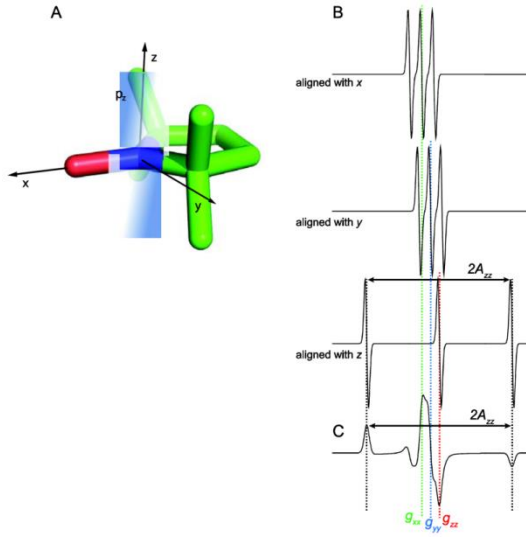
TEMPO-benzoatın, xərçəng hüceyrələrinə yüksək dərəcədə daxil olması mexanizmini təyin etmək üçün C12SL (12 asil qrupu vardır) spin nişanlanmış yağ turşusundan istifadə edilib. Bu yağ turşusu həm sağlam, həm də xərçəng ağciyər hüceyrələrinə yaxşı inkorporasiya olunur. Lakin kiçik molekulyar kütləyə malik TEMPO spin zondundan fərqli olaraq, ondan istifadə etməklə hüceyrə membranının dinamikasını (axıcılığını) təyin etmək olar.



Bu şəkildə insan ağciyərinin sağlam hissəsindən alınmış hüceyrə inkorporasiya olunmuş C12SL spin nişanlanmış yağ turşununun EPR (Elektron Paramaqnit Rezonansı) spektrləri göstərilmişdir. Qaydalara uyğun olaraq şəxsi məlumatları gizli saxlamaq məqsədi ilə nümunənin adı "BC Nümunələr Bruker ELEXSYS E580 spektrometrində çəkilmişdir. Spektrometrin parametrləri elə seçilmişdir ki, " həddindən artıq modulyasiya " və güc doyması halı baş verməsin. " Həddindən artıq modulyasiya " olduqda EPR spektral pikləri süni olaraq genişlənir və ona görə də fırlanma korrelyasiya müddətini təhrif edir. "Güç doyması" halında isə mikrodalğa gücü lazım olduğdan çox olanda spektral piklərin intensivlik nisbətini dəyişə bilər. Bu halda isə nisbi konsentrasiyalar təhrif olunacaq.

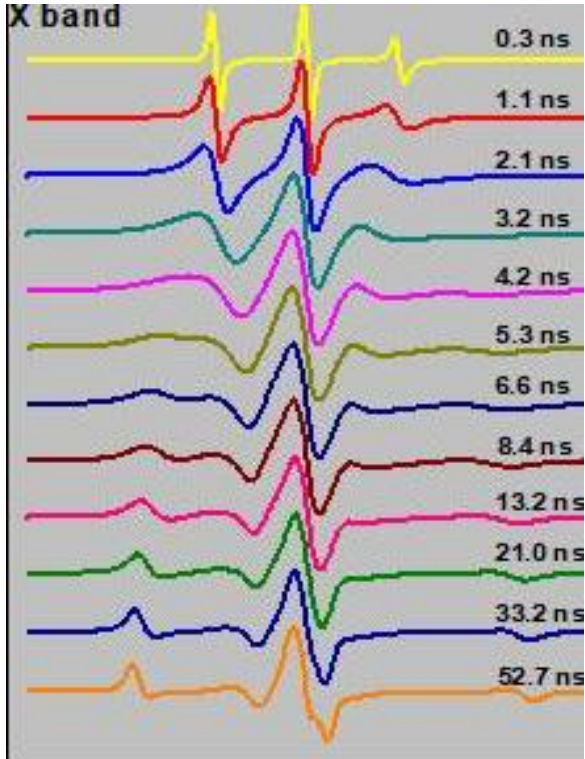
EPR spektrlərin nümunələrin müxtəlif temperaturunda çəkilməsi isə hüceyrə membranının dinamikası (axıcılığı, faza keçidləri) haqqında məlumat almağa imkan verir. Şəkildən görüldüyü kimi C12SL molekulları fiziki-kimyəvi xassələri bir-birindən kəskin fərqlənən iki domədə yerləşmişdir. Şəkildən görüldüyü kimi spektrlər "immobile" (hərəkətsiz) və "mobile" (hərəkətli) kimi qeyd olunan komponentlərin cəmindən ibarət kompozit xarakter daşıyır. Spektral dəyişikləri aşağıdakı kimi izah etmək olar. Niroksid spin nişanında sərbəst elektronla azot atomu (nüvənin spini 1-dir) arasında qaşılıqlı təsir anizotrop xarakter daşıyır (ifrat incə parçalanma konstatı  $A$ ) və

$A_{xx}$ ,  $A_{yy}$ ,  $A_{zz}$  müxtəlif qiymətlər alır. Aşağıdakı şəkildə bu komponentlər göstərilmişdir.  $A_{xx}$  və  $A_{yy}$  qiymətləri 5-6 G tərtibindədir. Lakin  $A_{zz}$  qiyməti 32 G. Spin nişanı sürətlə fırlanıqda spektr izotrop xarakter alır və  $A_{izo} = 1/3(A_{xx} + A_{yy} + A_{zz})$  olur.



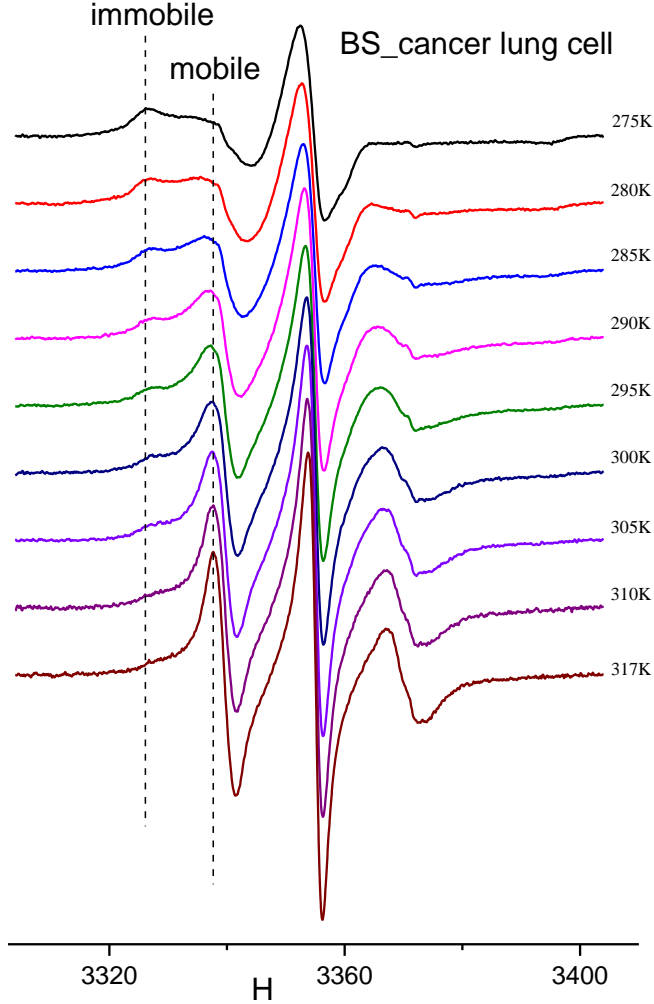
Fırlanma yavaşdıqda EPR spektrləri  $A_{zz}$ -ə doğru genişlənməyə başlayır.

Aşağıdakı şəkildə kompüter vasitəsilə spin nişanların müxtəlif korrelyasiya müddətinə malik olduqları halda EPR spektrləri simulyasiya edilmişdir. Həqiqətən də görüldüyü kim fırlanma korrelyasiya müddəti 0.3 ns-dən 52.7ns-yə qədər dəyişdikdə EPR spektrlərin forması dəyişməklə genişlənmə müşahidə olunur.



C12SL membran daxilində fırlanma korrelyasiya müddəti onun yaxın ətrafının özlülüyündən (dinamikasından) asılıdır. Özlülüyü aşağı olan (yəni daha axıcı) halda spin nişanın fırlanmasına maneə olmadığından (və ya az olduğundan) onun fırlanma korrelyasiya müddəti kiçik olur. Ətraf

mühitin dinamikası aşağı olduqda C12SL spin nişanının fırlanmasına sterik maneə artır və onun fırlanma korrelyasiya müddəti artır. Bu halda müvafiq olaraq EPR spektri genişlənir. Yuxarıda qeyd olunanlardan aydın olur ki, C12SL spin nişanı hüceyrə membranında dinamik cəhətdən bir-birindən kəskin fərqlənən iki domeni xarakterizə edə bilər. Temperaturu 275K-dən 317K-ə qədər artırıqda “immobile” domendə olan nişanların azalması və müvafiq olaraq “mobile” hissədə artması müşahidə olunur. Lakin hətta 317 K-də “immobile” hissənin yeni bu domenin kifayət qədər dayanıqlı olduğu görsənir.



Bu şəkildə həmin xəstənin ağciyərinin xərçəng hissəsindən alınan hüceyrə sistemində alınan EPR spektrləri verilmişdir. Bu halda da C12SL spin nişanı membranda iki domenin olduğunu göstərir (“immobile” və “mobile” kimi qeyd olunub). Sağlam hissədən kifayət qədər fərqlənən xüsusiyyət aydın görsənir. Xərçəng hüceyrə membranında “mobile” hissənin nisbi payı daha artıqdır. Bu da xərçəng hüceyrə membranının sağlama nisbətən dinamik hissəsinin daha çox olmasını göstərir. Bu təcrübələr əvvəlki işlərdə alınan nəticələrin mexanizminə aydınlıq gətirir. Belə nəticəyə gəlmək olar ki, TEMPO tipli kiçik molekulların xərçəng hüceyrələrinə daha yüksək inkorporasiya olmasının mühüm faktorlarından biri də onların membranlarının daha dinamik (axıcı) olmasıdır.

Xərçəng hüceyrələrində fərqli xüsusiyyətlər onlarda baş verən mutasiyalar nəticəsində baş verir. Ağciyər xərçəng xəstəliyinin 80%-dən çoxunda Epidermal Artım Faktoru Reseptorunda (ingilis dilində EGFR) mutasiyalar olur. Bu mutasiyanın olub-olmamasını vaxtında müəyyən edilməsinin çox mühüm əhəmiyyəti vardır. Mutasiyalardan asılı olaraq müalicə üçülü seçilir. Bununla yanaşı bu qrant layihəsi çərçivəsində aparılan işlərin xərçəng hüceyrələrinin müxtəlif dərmanlara qarşı həssaslığını təyin etmək olar və bu müalicənin düzgün aparılmasında mühüm rol oynaya bilər.

Mutasiyaları təyin etmək üçün əsasən toxuma biopsiyasından istifadə olunur. Bu metod invazivdir və müəyyən risklərlə bağlıdır. Müasir dövrdə qeyri-invaziv metodlara daha üstünlük verirlər.

Layihə çərçivəsində Milli Onkologiya Mərkəzində "Maye biopsiya" metodu DrVida cihazı ilə tətbiq etmək üçün "Təlimat" və istifadə üçün "Təlimat-Qıasa Protokol" hazırlanmışdır.

Qeyd etmək lazımdır ki, hər iki iş Milli Onkologiya Mərkəzində olan işlərə uyğunlaşdırılmış və ilk müsbət nəticələr əldə edilmişdir. Növbəti rübdə DrVida cihazı ilə olan nəticələr qeyd olunacaq.

## İSTİFADƏ ÜÇÜN TƏLİMAT

### İstifadə üçün lazım olan material

- Maqnit hissəciklər (istifadəyə kimi 2-8C temperaturda saxlamalı)
- Maqnit cihaz

### Xəbərdarlıq və ehtiyat tədbirləri

DNT izolyasiya materialını Bioloji təhlükəsiz şkaflın içərisində saxlamaq məsləhət görülür. Bu məqsədlə münasib individual qoruyucu ləvazimatdan istifadəyə əhəmiyyət verilir.

#### 1. Maqnit kürəciklərin hazırlanması

İstifadədən öncə maqnit kürəciklərin dayanıqlılığını təmin edilməsi məqsədilə maqnit hissəciklərin silkələmək vacib şərtlərdən biri hesab edilir. Beləliklə, maqnit kürəciklər istifadə üçün hazır vəziyyətə gətirilir.

#### 2. Plazmanın hazırlanması

**2.1** cfDNT izolyasiyası üçün münasib hesab edilən sınaq şüşələrinə bütöv qan 5ml həcmində götürülür. Belə bir prosesin həyata keçirilməsi DNT genomlarının aq qan hüceyrələrindən kənarlaşdırılması məqsədilə icra edilir.

**Qeyd:** K<sub>3</sub>EDTA standart sınaq şüşələrinin istifadə ediləcəyi təqdirdə plazma izolyasiya mərhələsini həyata keçirmək və yaxud bütöv qanı 2 saat müddətində 2-8C temperaturda saxlamaq lazımdır. Bu zaman yaranan qismən hemoliz hadisəsi (qan hüceyrələrinin lizisi) genomik DNT çirklənməsinin konsentrasiyasını artırır.

- 2.2** Plazma izolyasiyası prosesi iki yolla baş verir: 1) 10 dəqiqə ərzində 4C temperaturda 1000-2000g sürətilə təcrid olunma; 2) 10 dəqiqə ərzində 4C temperaturda 10000-16000 sürətilə təcrid olunma.

Təcrübənin qoyuluşundan asılı olaraq eləcə də plazmanın saxlanma şəraiti üçün müəyyən şərtlər mövcuddur.

- 2.3** Təcrübə qısa müddət ərzində həyata keçiriləcəksə, bu zaman plazma 15 dəqiqə ərzində 2-8C temperaturda saxlanılmalıdır.

- 2.4** Təcrübənin həyata keçirilməsi uzun müddətdən sonra baş verərsə bu zaman plazmanın soyuducuda saxlanma temperaturu -80C olaraq seçilməlidir.

- Soyuducudan donmuş vəziyyətdə götürülmüş plazma nümunələri bir qədər çalxalanaraq təcrübə üçün hazır vəziyyətə gətirilir.

#### 3. Maqnit hissəciklərin inkubasiyası ilə cfDNT çoxluğunun plazmadan ayrılması prosesi

- 3.1** 5uL maqnit hissəcikləri 1mL plazma üzərinə əlavə edilir. Əgər məhlulun həcmi 1mL-dən azdırsa bu zaman nukleaz mövcud olmayan suyu məhlul üzərinə əlavə edərək həcmi 1mL çatdırmaq lazımdır. Sonra isə sınaq şüşəsini kip bağlamaqla onu 10 dəfə tərs-düz istiqamətində hərəkət etdirmək lazımdır.

- 3.2** Daha sonra nümunəni maqnit hissəciklərlə inkubasiya etməklə əlavə olaraq 10 dəqiqə ərzində otaq temperaturunda qarışdıraraq çalxalamaq lazımdır.

**Qeyd:** çalxalama prosesini yüksək sürətlə aparmaq həddindən artıq köpüklənməyə səbəb olar ki bu da məhsuldarlığın aşağı düşməsinə gətirib çıxara bilər.

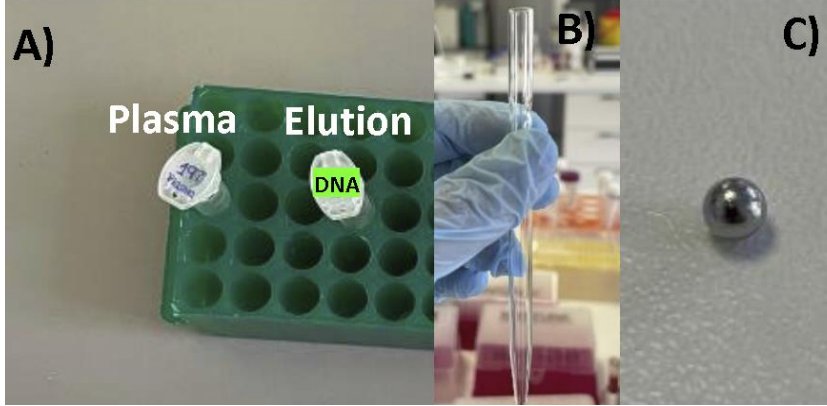
- 3.3** Nümunəni paypet vasitəsilə sınaq şüşəsinə daxil və xaric etməklə qarışdırın, daha sonra nümunədən ayrılmış 500uL həcmi başqa bir sınaq şüşəsinə tökməklə birinci şüşədə 500uL

həcmnin alınmasına nail olunur. Son olaraq iki sınaq şüşəsindən ibarət və hər birində maqnit hissəcikləri də daxil olmaqla 500uL həcmində olan plazma təcrübə üçün hazır vəziyyətə gətirilir.

#### 4. Plazmadan alınmış cfDNT çoxluğu üçün iki metodun qiymətləndirilməsi:

4.1 Metod 1. Paypet vasitəsilə cfDNT izolyasiyasının həyata keçirilməsi

4.1.1 Aşağıda təsvir edilmiş sxemə əsasən materialın hazırlanması



4.1.2 Daxilində maqnit olan 500mL plazmaya paypeti yerləşdirmək və daha sonra bütün maqnit hissəciklərin paypetin divarlarına hopdurulmuş vəziyyətinə kimi gözləmək. Belə hal məhlulun təmizlənməsi ilə müşahidə olunur.

4.1.3 Daha sonra divarlarına maqnit hissəcikləri hopdurulmuş paypeti yeni sınaq şüşəsinə yeni içərisində 60uL həcmində nukleazdan təcrid edilmiş suya daxil etmək lazımdır. Bu zaman yeni sınaq şüşəsinin həcmi 1,5mL olaraq seçilir.

4.1.4 Paypet daxilində maqnit təcrid edildikdən sonra maqnit hissəciklərin nukleaza olmayan suda tamamilə çökməsinə (kənarlaşdırılmasına) şərait yaratmaq. Daha sonra qənaətbəxş şəkildə qarışdırmaq lazımdır.

4.1.5 Daha sonra maqnit paypetə yenidən daxil etdikdən sonra məhlulun təmizlənməsinə kimi gözləmək lazımdır.

4.1.6 Növbəti mərhələdə paypeti maqnit hissəcikləri hopdurulmuş şəkildə nukleazsız sudan çıxartmaq lazımdır.

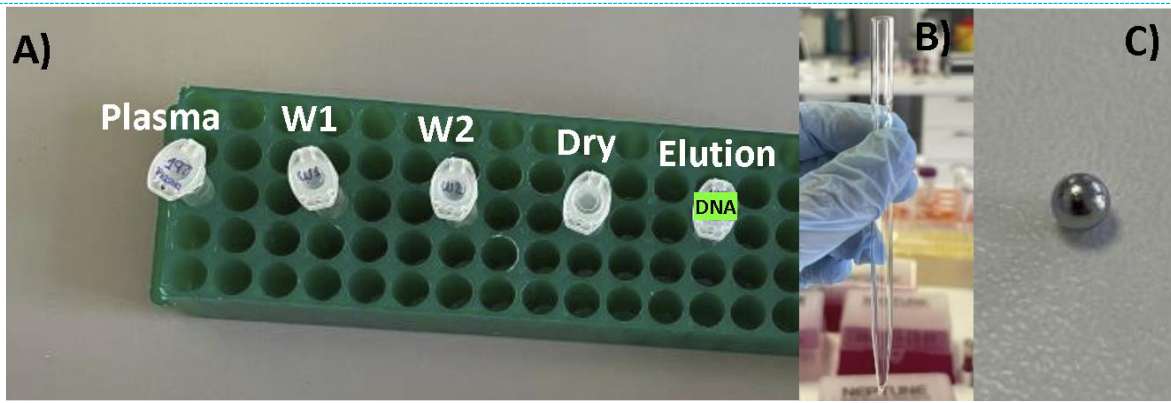
4.1.7 DNT nümunəsinin konsentrasiyası hesablanır.

**Qeyd:** DNT keyfiyyəti səciyyəvi olaraq spektrofotometrik əsaslı (NanoDrop) və yaxud flürometrik əsaslı (Qubit) metodlar vasitəsilə müəyyən edilir. Bu metodların hər ikisi DNT nümunəsinin kəmiyyət nöqtəyi nəzərindən təyində dəqiq olmayan üsullar sırasına daxil edilir. Səbəb isə hüceyrəsiz cfDNT nümunəsinin kiçik miqdarda olan məhlullarda təyini ilə bağlıdır. Bununla əlaqədar olaraq hər iki metod cfDNT və genomik DNT nümunələrinin fərqləndirilməsində qənaətbəxş hesab edilmir. cfDNT nümunəsinin kəmiyyət nöqtəyi nəzərindən dəqiq müəyyənləşdirilməsi üçün Agilent şirkətinin istehsalı olan Tape Station metodu mövcuddur. 100-300bp regionda DNT konsentrasiyası kəmiyyət xarakteristikasına əsaslanaraq Tape Station aksesuarları vasitəsilə müəyyən edilir.

4.1.8 Daha sonra DNT nümunəsi -20C temperaturda saxlanılır.

4.2 Metod 2. 4 mərhələli cfDNT izolyasiyası əməliyyatı (500uL plazma sınaq şüşəsindən başlayaraq).

4.2.1 Aşağıdakı təsvirdə göstərilən sxemə əsasən materialın hazırlanması qaydası:



**4.2.2** Daxilində maqnit olan 500mL plazmaya paypeti yerləşdirmək və daha sonra bütün maqnit hissəciklərin paypetin divarlarına hopdurulmuş vəziyyətinə kimi gözləmək. Belə hal məhlulun təmizlənməsi ilə müşahidə olunur.

**4.2.3** Maqnit hissəcikləri hopdurulmuş paypeti W1 sınaq şüşəsinə keçirmək.

**4.2.4** Paypet daxilindən maqnit hissəcikləri kənar etdikdən sonra maqnit hissəciklərin tamamilə W1 sınaq şüşəsində dayanmasına (çökdürülməsinə) nail olmaq.

**4.2.5** Yenidən məhlulun təmiz olunmasına nail olmaq üçün paypetin içərisinə maqnit yerləşdirmək.

**4.2.6** Divarlarına maqnit hissəcikləri hopdurulmuş paypeti W1 → W2 sınaq şüşəsinə keçirmək.

**4.2.7** Paypet daxilindən maqnit izolyasiya etdikdən sonra maqnit hissəciklərin W2 sınaq şüşəsində çökdürülməsinə nail olmaq.

**4.2.8** Maqnitə yenidən paypet tərkibinə daxil edərək məhlulun təmizlənməsini gözləmək.

**4.2.9** Maqnit hissəcikləri hopdurulmuş paypeti W2 sınaq şüşəsindən kənarlaşdırdıqdan sonra etanol qalıqlarının kənarlaşdırılması məqsədilə paypeti quru boş sınaq şüşəsinə daxil etmək.

**4.2.10** Maqnit hissəcikləri hopdurulmuş paypeti 60uL həcmində nukleazsız suya daxil etmək.

**4.2.11** Paypet daxilindən maqnitə kənar etdikdən sonra maqnit hissəciklərin tamamilə nukleazsız suda dayanıqlılığını təmin etmək.

**4.2.12** Paypetə yenidən maqnitə daxil etdikdən sonra məhlulun təmizlənməsinə kimi gözləmək.

**4.2.13** DNT nümunəsinin konsentrasiyasını hesablamaq

**4.2.14** DNT nümunəsini -20C temperaturda saxlamaq.

### **İSTİFADƏ ÜÇÜN TƏLİMAT-QISA PROTOKOL**

#### **Dr Vida vasitəsilə EGFR ekzon 19-un silinməsi analizi .**

Lazım olan material:

EGFR muatsiya testi

-20C temperaturda saxlamaq

EGFR nəzarət testinin aparılması

İstifadəyə kimi -20C temperaturda saxlamaq

Dr Vida cib ləvazimatı

Otaq temperaturunda saxlamaq

#### **Xəbərdarlıq və ehtiyat tədbirləri!**

LAMPA ifrat dərəcədə çirklənməyə qarşı həssasdır. DNT izolyasiyasını və LAMPA reaksiyasını təmiz şəraitdə və müxtəlif otaqlarda aparmaq məsləhət görülür. Individual qoruma cihazlarından istifadə uyğun hesab edilir.

1.1 Mobil telefona Dr Vida tətbiqini yükləyin

1.1 Hesab yaradın və sonra işə daxil olun. Tətbiq istifadə üçün hazırdır.

2. Nümunə hazırlanması

DNT nümunəsini tamamilə dondurduqdan sonra çalxalayın. Nümunə istifadə üçün hazırdır.

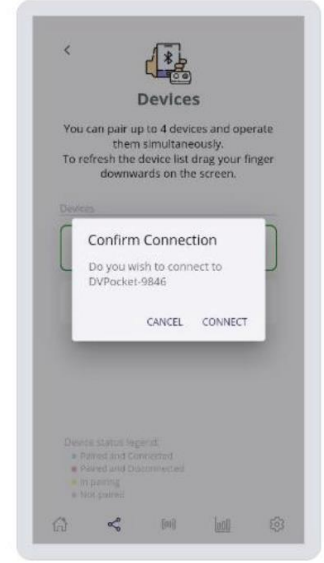
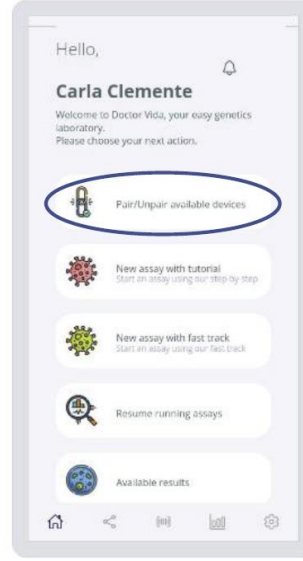
**Qeyd:** STAB.VİDA ilə Dr Vida cfDNR çoxluğu plazmadan təcrid edilir. əlavə olaraq, DNT toxumadan və yaxud plazmadan ümumi laboratoriya reagentləri ilə ekstraksiya edilir.

### 3. Reagentlərin hazırlanması

- Məhlul rəngsizləşənə qədər reagent tərkibli sınaq şüşəsini soyuducuda saxlayın. Bu əməliyyatlar nəzarət və digər EGFR mutasiya testi üçün aparılır. Daha sonra yenidən çalxalayın. Reagent sınaq şüşələri istifadəyə hazırdır.

### 4. Dr Vida eksperimentində nümunə analizi

4.1 Işıq mavi rəngdə olana kimi iki Dr Vida cihazını qoşun. Bunlardan biri EGFR mutasiyası digəri isə yoxlama testi üçün aparılır. Əgər sizdə bir cihaz varsa o zaman ilk olaraq EGFR mutasiyasını daha sonra isə yoxlama testini işə salın.



**Qeyd:** Temperatur stabilləşənə kimi bir neçə dəqiqə gözləyə bilərsiniz.

4.2 App Home menyudan "Pair/Unpair available devices"-a klik etmək və müvafiq cihazı seçmək lazımdır.

**Qeyd:** Bu mərhələdən sonra cihaz APP ilə cütləşdirilir, amma testin aparılması üçün hələ tam hazır vəziyyətə gətirilmir.

4.3 Home menyusunu seçməklə, "Protocol with tutorial" əmri seçilir.

**Qeyd:** Eləcə də "Protocol Fast track" əmrini seçərək daha sürətli prosesə başlaya bilərsiniz. Bunun üçün nümunəyə məxsus QR kodu bilmək kifayətdir.

4.4 Nümunəni reaksiya gedəcək sınaq şüşəsinə daxil edin.

a) Nümunənin və sınaq şüşəsinin tamamilə doldurulmasına əmin olmaq lazımdır. Bundan savayı paypet vasitəsilə nümunəyə 10 dəfəyədək müdaxilə etmək (daxil edib və çıxartmaq) və reagent olan sınaq şüşəsinə 10uL olan nümunədən əlavə etmək lazımdır. Kip bağlamaqla məhlul daxilində heç bir qabarcığın olmamasını yoxlamaq lazımdır. Ehmalca qarışdırın.

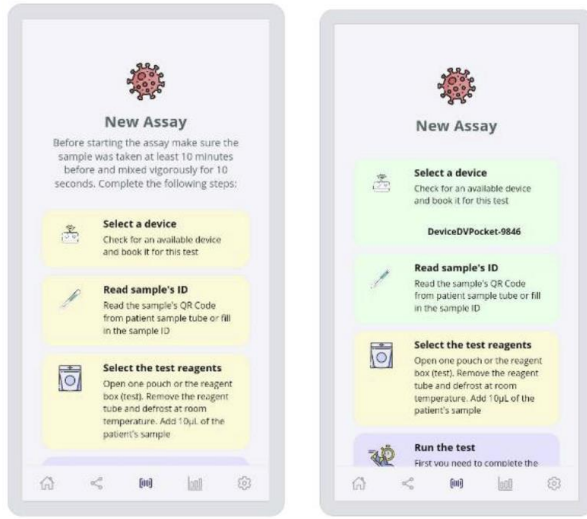
b) Otaq temperaturunda 5 dəqiqə müddətində inkubasiya edin. Bu arada növbəti mərhələyə keçici alırsınız.

Daha sonra ekranın yuxarisından aşağısına kimi hər bir xananı tələb olunan məlumatla doldurduqdan sonra xanaların "yaşıl" olmasını gözləmək lazımdır. Bütün xanalar "yaşıl" olduqdan sonra, "Run the test" xanasını klikləmək lazımdır.

**Qeyd:** əgər bəzi menyular "yaşıl" olmasa bu onunla izah edilir ki, bəzi məlumatlar istisna təşkil edir.

4.5 Məlumatların doğruluğunu yoxlayın sonra isə ekranın sonunda "Start assay" düyməsini sıxın.





**Qeyd:** əgər bəzi məlumatlar istisna təşkil edirsə və yaxud səhv olaraq daxil edilibsə, o zaman geri dönüş edin və məlumatı düzəldin. Bu məqsədlə yenidən “Run a test” xanasına tıklayın.

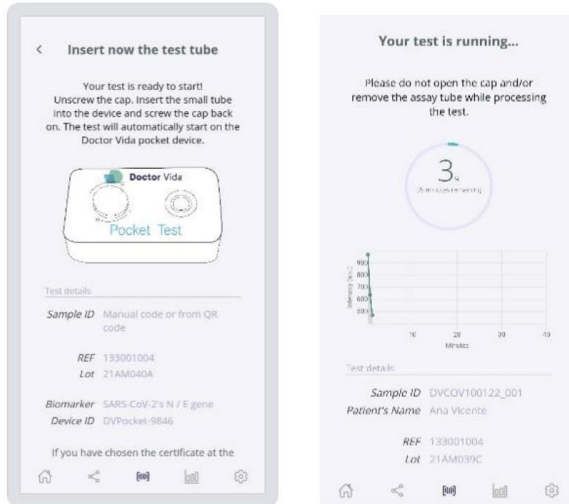
4.6 Cihaza reagent daxil olan sınaq şüşəsini və nümunəni daxil etdikdən sonra cihazın qapağını bağlayın. Test avtomatik olaraq başlayacaq.

➤ Yoxlama testi üçün əməliyyatı yenidən icra edin.

**Qeyd:** istinadlardan istifadəyə əmin olun. Bu zaman EGFR yoxlama testi aparılmalıdır, mutasiya EGFR testi deyil!

### Çalışan analizlər.

Ekrandan “Home” menyusunda “Resume running assays” düyməsini sıxmaqla işin icra müddəti ərzində nümunənin həqiqi vaxt müddətində nəticələrini yoxlayın.



### Nəticələr

Ektranda “Home” menyusunu seçdikdən sonra tamamlanmaqda olan nümunələrin nəticələrini analiz etmək üçün “Available Results” əmri seçilir.

Yuxarıda ağciyər xərçəng hüceyrə membranlarına kiçik molekulların inkorporasiya dərəcəsinin sağlam hüceyrələrə nisbətən yüksək olmasının mexanizmi verilmişdir. Yağ turşusu spin zəndü olan C12SL-dən istifadə edərək xərçəng və sağlam hüceyrə membranlarının dinamikası tədqiq edilmişdir. Göstərilmişdir ki, C2SL bu hüceyrələrdə iki domeni xarakterizə edə bilər. Hər iki domen xərçəng hüceyrə membranlarında daha dinamikdir. Yəni bu hüceyrə membranlarının özlülyü daha kiçidir. Kiçik molekulların xərçəng hüceyrələrinə daha yaxşı inkorporasiya olması bununla izah edilir. Ədəbiyyatda kifayət qədər məlumatlar vardır ki, xərçəng hüceyrələri inkişaf etdikcə

onların membranlarının lipid kompozisiyası dəyişir. Xərçəng hüceyrələrinə xas olan yuxarıda sadalanan xüsusiyyətlər birbaşa onların lipid kompozisiyası ilə bağlı ola bilər. Cari rübdə ağciyər sağlam və xərçəng xəstələrinin qan plazmasından lipidlər ekstraksiya edilmiş və onlarda olan fərqlər Furye Çevirici İnfraqırmızı (FÇİQ) spektroskopiya vasitəsilə tədqiq edilmişdir. Göstərilmişdir ki, həqiqətən də sağlam və xəstə qan plazması nümunələrinin lipidlərində kifayət qədər fərqlər vardır. Bu fərqlər öz növbəsində diaqnostika üçün daha yaxşı model qurulmasına xidmət edəcəkdir. Aşağıda bu istiqamətdə alınan əsas nəticələr göstərilmişdir.

Kiçik olmayan hüceyrə xərçənginin növlərindən biri hesab edilən ağciyər adenokarsinoması əsasən sürətli inkişaf xüsusiyyətinə görə səciyyəlidir. Ağciyər adenokarsinoması ağciyər toxumasının sekretor epitel hüceyrələrindən meydana gəlir. Qadın və kişilər arasında bu növ xərçəngə məruz qalma tendensiyası və coğrafi qanunauyğunluqlar mühüm əhəmiyyət kəsb etsə də, ilkin olaraq tütün istifadəsində tarixi, mədəni və regional fərqlər mühüm səbəb kimi göstərilir. Siqaret çəkməyən qadınlarda ağciyər xərçəngi xəstəliyinin artması bu istiqamətə marağı daha da gücləndirmişdir. Xərçəngin inkişaf mərhələsinə və əlamətlərinə əsaslanaraq demək olar ki, xəstəliyin inkişafı fərdi xarakter daşıyır və ətraf mühit eləcə də genetik risk faktorları mühüm rol oynayır. Xəstəliyin qeydə alınması vaxtından sonrakı 5 il müddətində sağqalma faizi xərçəngi erkən aşkar edilməsindən kəskin aslıdır.

İnfraqırmızı spektroskopiya kimyəvi rabitələrin müxtəlif tip rəqslərinə əsaslanaraq funksional qrupların təyininə və bununla da qandan toxumaya qədər baş verən dəyişiklikləri qeyd etməyi imkan verir. Beləliklə, FÇİQ ölçmələrinin ucuz, sürətli eyni zamanda yüksək həssaslığa malik olması nəzərə alsaq, bu metod xərçəng xəstəliklərinin ilkin vaxtlarda aşkarlanması üçün yaxşı skrining vasitəsi ola bilər.

Qan plazması, zərdab, tüpürcək və ya sidiyin toplanmasının asan və qeyri-invaziv olması səbəbindən onlar əsasında yaradılan diaqnostik metodların mühüm əhəmiyyəti vardır. Qan plazmasının və plazmadan alınmış lipid fraksiyasınının birgə FÇİQ spektral analizi ilə xərçəng xəstəliyinin klassifikasiyasının mümkünlüyü tədqiq edilmişdir.

İşdə aşağıdakı biokimyəvi və spektroskopik metodlardan istifadə edilmişdir.

**Qan plazma nümunələrin hazırlanması.** Venoz qan nümunələri AR Səhiyyə Nazirliyinin Milli Onkologiya Mərkəzi tərəfindən Helsinki bəyannaməsinin müddəalarına müvafiq qaydada 50 xəstə (yaş həddi 31-76) və 49 sağlam insandan (yaş həddi 29-72) toplanılmışdır. Qan laxtalanmasını qarşısını almaq üçün nümunələr EDTA (etilendiamintetraasetik) turşu tərkibli sınaq şüşələrinə yığılmışdır. Plazmadan başqa qanı təşkil edən digər komponentlər məsələn, eritrositlər, trombositlər, leykositlər 10 dəqiqə ərzində 10000 dövr/dəq olmaqla sentrifuqa vasitəsilə çökdürüldükdən sonra supernatant hissə təcrübəyə qədər  $-20^{\circ}\text{C}$  temperaturda saxlanılmışdır. Barmaq ucundan götürülən qana hüceyrəarası maye qarışdığına görə işdə yalnız venoz qan nümunələri istifadə edilmişdir.

**Qan plazmasından lipidlərin ekstraksiyası.** Lipidlərin ekstraksiyası üçün geniş istifadə olunan protokola uyğun olaraq xloroform/metanol qarışığından istifadə edilmişdir. Əvvəlcə, 300  $\mu\text{l}$  plazmanın üzərinə eyni həcmdə xloroform və 600  $\mu\text{l}$  metanol əlavə edilmişdir (məhlul 1:1:2). Bəzi zaman alınan bircins məhlul 2 dəqiqə ərzində "vorteks" edilmişdir. Lipid fraksiyasını ayırmaq üçün alınmış məhlulun üzərinə yenidən 300  $\mu\text{l}$  xloroform əlavə edərək (alınan məhlul 1:2:2) daha 30 saniyə ərzində "vorteks" edilmişdir. Sonra alınmış məhlulu 10 dəqiqə ərzində 1000 dövr/dəq sentrifuqada fırlatmaqla məhlul iki fazaya ayrılmışdır. Nəticədə, yuxarı fazada hidrofil birləşmələr əmələ gətirən su və metanolun qarışığı, aşağı fazada isə lipid fraksiyasının həll olduğu xloroform ayrılmışdır. Aşağı faza ehmalca götürüldükdən sonra xloroform qaz halında olan azotla buxarlandırılmışdır. Lipid çöküntüsü soyuducuda təcrübəyə kimi  $-20^{\circ}\text{C}$  temperaturda saxlanılmışdır.

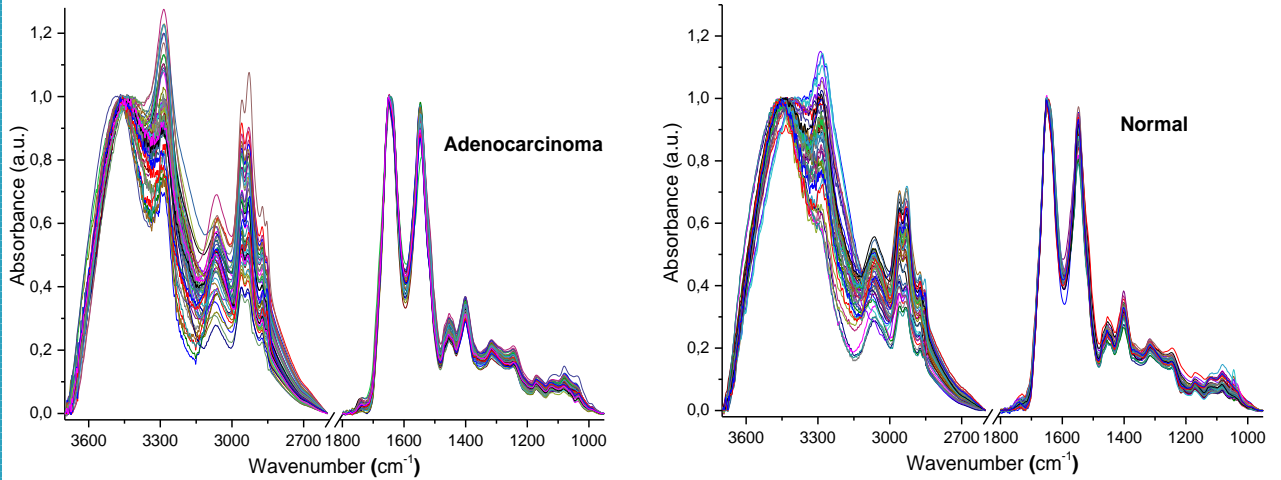
**Furye Çevirici İnfraqırmızı Spektroskopiya.** Ölçmələr FÇİQ spektrometri (VERTEX 70V Bruker, Almaniya) vasitəsilə BioATR (ZnSe) aksesuarında həyata keçirilmişdir. Qan plazması

sulu məhlul olduğuna görə, əvvəlki işlərimizə müvafiq qaydada 3µl həcmində öncə su, daha sonra plazma nümunələrinin infraqırmızı spektrləri çəkilmişdir. Suyun FÇİQ spektri qan plazmasının spektrlərində onun payını çıxmaq üçün istifadə edilmişdir. Hər bir lipid fraksiyasının ölçmələrində onların xloroform məhlulundan istifadə edilmişdir. Bu məqsədlə, plazma nümunələrinin FÇİQ spektrlərində suyun spektri çıxılır və onun intensivliyi elə dəyişdirilir ki, alınan spektrdə 2000-2370  $\text{sm}^{-1}$  hissə kifayət qədər hamar olsun. Qeyd edək ki, 2000-2370  $\text{sm}^{-1}$  spektral diapazonda yalnız suyun payı var. Nümunələr termostat vasitəsi ilə 20°C-ə temperaturda çəkilmişdir. Plazma nümunəsinin stabil temperaturu alması üçün 10 dəqiqə gözlənilmişdir. Bunu yanaşma spektral çıxılma zamanı kənar faktorların meydana gəlməsinin qarşısını alır. Hər bir lipid məhlulundan 3µl götürülərək ZnSe kristalının üzərinə tam yayılmışdır. Maye hissə buxarlandırıldıqdan sonra ölçmələrə başlanılmışdır.

Plazma və lipid nümunələri orta-infraqırmızı (400-4000  $\text{sm}^{-1}$ ) spektral diapazonda çəkilmişdir. Cihazın spektral ayırdetməsi 2  $\text{sm}^{-1}$  seçilmişdir. Hər bir nümunə üçün 512 sayda spektr ortalanmışdır.

Tədqiq edilmiş hər bir nümunənin FÇİQ spektrləri çəkildikdən sonra baza xəttini korreksiyası aparılmışdır. Daha sonra uyğun olaraq plazma və lipid nümunələrini təsvir edən hər bir spektr "barmaq izi" (890-1800  $\text{sm}^{-1}$ ) və "funksional qrup" (2600-3700  $\text{sm}^{-1}$ ) hissələrinə bölünmüşdür. Plazmadan alınan spektrlərdə, "funksional qrup" və "barmaq izi" hissələri uyğun olaraq 3500  $\text{sm}^{-1}$  və Amid I (1648  $\text{sm}^{-1}$ ) pik nöqtələrinə görə normallaşdırılmışdır. Lipid fraksiyalarının FÇİQ spektrlərində isə 2920  $\text{sm}^{-1}$  və 1740  $\text{sm}^{-1}$  pik mövqələrinə görə amplitudları görə normallaşdırılma aparılmışdır.

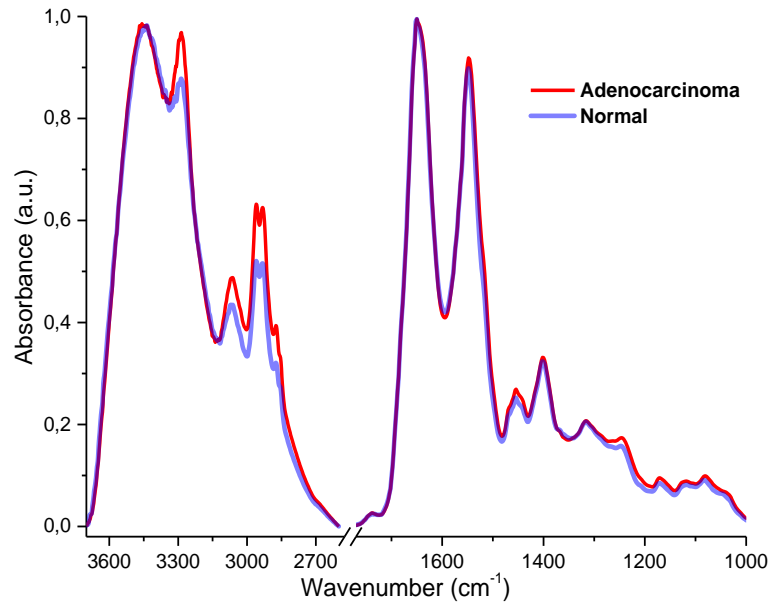
Metodlar hissəsində qeyd edildiyi kimi, həm sağlam, həm də xəstə qrup insanların qan plazması və ondan alınan lipid nümunələrini xarakterizə edən infraqırmızı spektrlər "barmaq izi" və "funksional qrup" hissə olaraq iki yerə ayrılmışdır. Seçilmiş diapozonlar plazma nümunələri üçün (950-1800  $\text{sm}^{-1}$ ) və (2600-3700  $\text{sm}^{-1}$ ) olmuşdur.



Şəkil 22. Ağciyər adenokarsinoması və sağlam qrupu təşkil edən insanların qan plazmasının 1648  $\text{sm}^{-1}$  və 3500  $\text{sm}^{-1}$  piklərinin amplitudlarına görə normallaşdırılmış infraqırmızı spektrləri.

Şəkil 22-də həm ağciyər adenokarsinoması, həm də sağlam insanların qan plazma nümunələrinin amplituda 3500  $\text{sm}^{-1}$  və Amid I (1648  $\text{sm}^{-1}$ ) qrupuna görə normallaşdırılmış infraqırmızı spektrləri verilmişdir. Göründüyü kimi hər iki qrupa məxsus piklərin mövqeyində kiçik variasiyaların müşahidə olunmasına baxmayaraq piklərin amplitudları ilə əlaqədar fərqli əhəmiyyətli dərəcədə nəzərə çarpır. Spektral diapozon boyunca müşahidə olunan fərqli hissələr əsasən 3280  $\text{sm}^{-1}$  (Amid A qrupunun O-H simmetrik uzanması), 2960  $\text{sm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  qrupunun asimmetrik C-H uzanması), 2930  $\text{sm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  asimmetrik uzanma), 2870  $\text{sm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  qrupunun C-

simmetrik uzanma) və  $1240 \text{ sm}^{-1}$  (nuklein turşularının  $PO_2^-$  simmetrik və antisimmetrik uzanması) pikləri ətrafındadır. Şəkil 22-də verilmiş ortalanan FÇİQ spektrlərində intensivliklə əlaqədar qeyd olunan fərqlər daha aydın görünür. Qeyd etmək lazımdır ki, ağciyər adenokarsinoması xəstələrinin qan plazmasının infraqırmızı spektrlərində komponentlərlə bağlı dəyişikliklər xəstəliyin mərhələsindən asılı olaraq onun çoxfaktorlu olması ilə əlaqədar ola bilər. Spektral diapozonun təxminən  $3460 \text{ sm}^{-1}$ ,  $3290 \text{ sm}^{-1}$ ,  $2960 \text{ sm}^{-1}$ ,  $2870 \text{ sm}^{-1}$ ,  $1730 \text{ sm}^{-1}$ ,  $1650 \text{ sm}^{-1}$ ,  $1540 \text{ sm}^{-1}$ ,  $1316 \text{ sm}^{-1}$ ,  $1170 \text{ sm}^{-1}$  pik ətraflarında fərqlər müşahidə olunmasa da, bu hissələrdə piklərin amplitudları ilə bağlı dəyişikliklər klassifikasiya üçün mühüm rol oynaya bilər. Qeyd olunan  $3280 \text{ sm}^{-1}$ ,  $3066 \text{ sm}^{-1}$  və  $1734 \text{ sm}^{-1}$  piklərin amplitudunda xəstə qrupda sağlam qrupa nəzərən artım müşahidə olunsada,  $3458 \text{ sm}^{-1}$  və  $1170 \text{ sm}^{-1}$  hissələrdə azalma vardır.



Şəkil 23. Ağciyər adenokarsinoması (qırmızı) və sağlam qrupu (göy) təşkil edən insanların qan plazmasının ortalananmış FÇİQ spektrləri (Şəkil 21-də göstərilmiş)

Həm xəstə, həm də sağlam insanların qan plazması spektrlərindəki piklərin sürüşmələri və intensivlikləri ilə əlaqədar xüsusiyyətlər və onların aid olduğu valent rəqsləri Cədvəl 5-də göstərilmişdir.

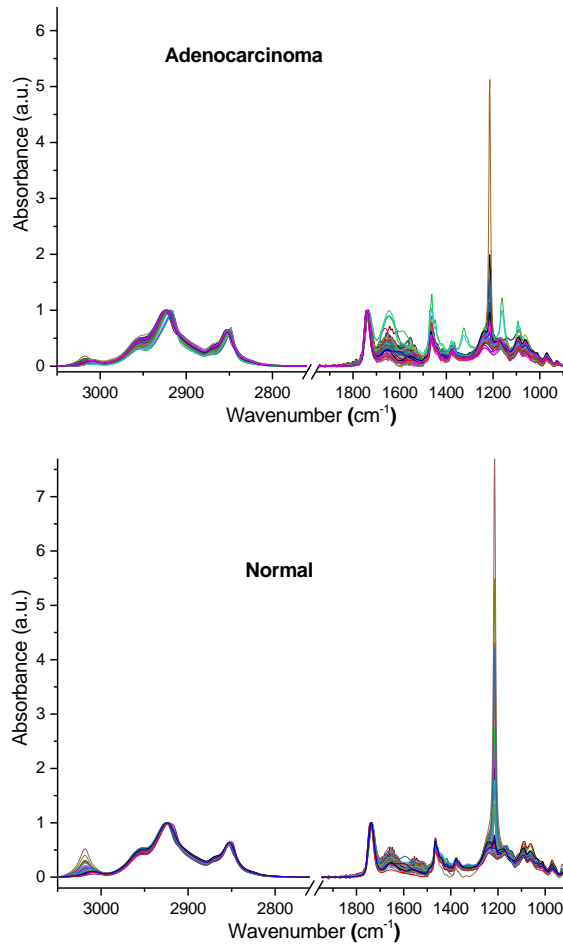
Cədvəl 10. Ağciyər karsinoması və sağlam insanların qan plazmasının infraqırmızı spektrlərində təsnifat üçün xarakteristik olan piklərin təsviri.

Pikin mövqeyi adenokarsinoma ( $\nu \text{ sm}^{-1}$ )	Pikin mövqeyi sağlam ( $\nu \text{ sm}^{-1}$ )	Spektral piklərin təsnifatı
3445	3450	O-H antisimmetrik uzanma
3286	3288	Amid A qrupunun O-H simmetrik uzanması
3066	3066	$C_2$ aromatik uzanma
2960	2958	$CH_2$ qrupunun antisimmetrik C-H uzanması
2932	2934	$CH_2$ antisimmetrik uzanma

2874	2874	CH <sub>2</sub> qrupunun C-H simmetrik uzanması
2856	2853	Lipidlərdə CH <sub>2</sub> uzanması
1734	1734	C=O uzanma
1650	1650	Zülalların Amid I qrupu
1548	1548	Zülalların Amid II qrupu
1454	1456	Antisimmetrik metil deformasiyası
1316	1316	Zülalların Amid III qrupu
1246	1247	Nuklein turşularının PO <sub>2</sub> <sup>-</sup> simmetrik və antisimmetrik uzanması
1170	1168	Zülallarda C-O(H) uzanma

Xolesterol, fosfolipidlər və zülallar hüceyrə komponentlərinin əsasını təşkil edir və b molekularda baş verən dəyişikliklər həmçinin 2800-3500 sm<sup>-1</sup> oblastında da görünür. Spektra diapozonda 3200-3500 sm<sup>-1</sup> oblastı su molekuluna aid simmetrik və antisimmetrik rəslər əlaqədar olduğundan bu hissə ətraflı təhlil üçün əlverişli hesab edilmir. 2960 sm<sup>-1</sup> dalğa ədəd ətrafında (CH<sub>2</sub> qrupunun antisimmetrik C-H uzanması) xərçəng xəstəliyini təsvir edən pikin sağlam ilə müqayisəsində daha intensiv olması karsinogenez zamanı hüceyrə proliferasiyası və ya hüceyrə prosesləri zamanı zülal artıqlığı ilə izah edilə bilər. Adenokarsinoma xəstələrində 1246 sm<sup>-1</sup> (nuklein turşularının PO<sub>2</sub><sup>-</sup> simmetrik və antisimmetrik uzanması) pikin amplitudu normal nisbətən daha böyükdür. Bu faktı xərçəng xəstələrində hüceyrələrin daha yüksək sürətlə dağılıp nuklein turşularının qana keçməsi ilə izah etmək olar. “Barmaq izi” oblastında müşahidə edilən və zülallara məxsus Amid I qrupu çox həssas hesab edilir və zülalların ikinci quruluşunu öyrənilməsində mühüm rola malikdir. Bu səbəbdən A<sub>1650</sub>/A<sub>1548</sub> nisbətinin sağlam qrupa nəzərə xəstə qrup üçün daha aşağı olması xəstəliyin təyində mühüm biomarker kimi istifadə edilə bilər. Qeyd edilən nisbət N-H əyilmə və karbonil qrupuna aid olan C-N rabitələrinin xəstə qrupda daha aşağı olması ilə səciyyələnir. Eləcə də, A<sub>2959</sub>/A<sub>1548</sub> nisbətinin xəstə qrupda sağlam qrupla müqayisədə böyük olması uyğun olaraq lipid miqdarının zülal miqdarına nisbətən çox olması ilə izah oluna bilər. Ağciyər adenokarsinoması və sağlam qrupun müqayisəsində uyğun pi amplitudalarının nisbətləri ilə əlaqədar ətraflı təhlil əvvəlki işimizdə öz əksini tapmışdır.

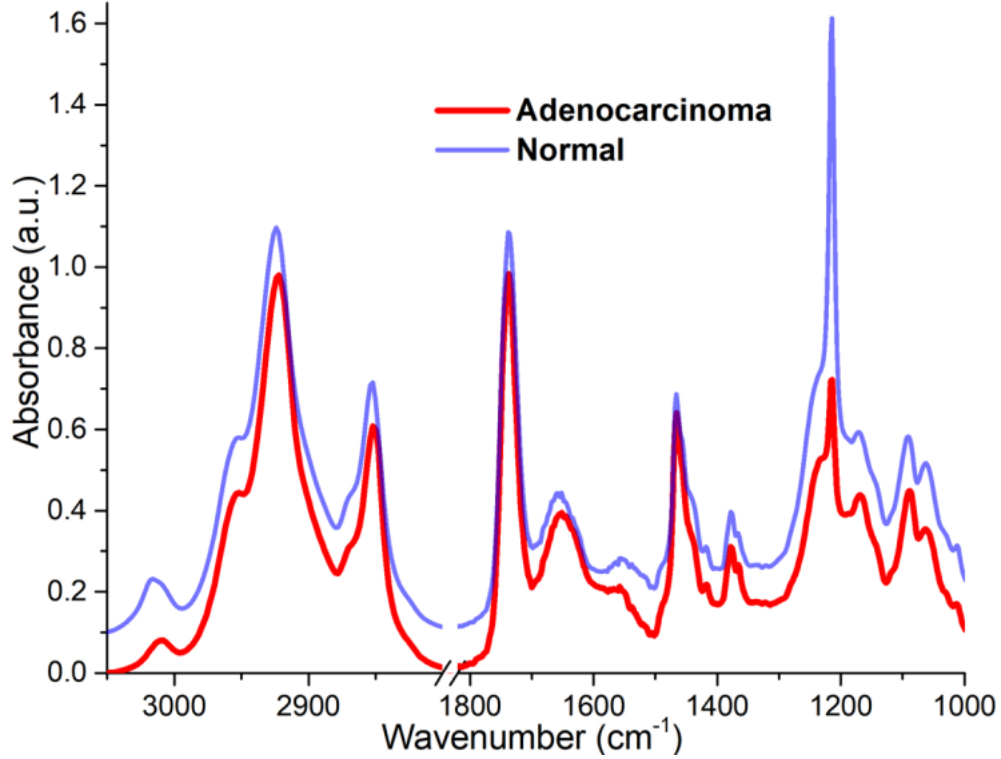
Lipid fraksiyalarının FÇİQ spektrlərinin statistik analizi qan plazması tədqiqatlarına müvafiq olaraq aparılmışdır. Lipid nümunələri üçün spektrlər (890-1800 sm<sup>-1</sup>) və (2750-3050 sm<sup>-1</sup>) diapozonlarına ayrılmışdır. Şəkil 24- də həm xəstə, həm də sağlam insanların qan plazmalarından ekstraksiya edilmiş lipid nümunələrinin amplituda yəni 2920 sm<sup>-1</sup> və 1740 sm<sup>-1</sup> pi ətraflarına görə normallaşdırılmış infraqırmızı spektrləri verilmişdir. Daha sonra hər iki diapozon yenidən birləşdirilərək tam spektr halına gətirilmişdir.



Şəkil 24. Ağciyər adenokarsinoması və sağlam qrupu təsvir edən qan plazması lipid fraksiyalarının amplituda görə normallaşdırılmış infraqırmızı spektrləri

Şəkil 25.-də analoji qaydada lipid nümunələrinin amplituda görə normallaşdırılmış spektrləri əsasında ortalanmış FÇİQ təsvirləri nümayiş etdirilmişdir. Həm xəstə, həm də sağlam qrupu təsvir edən spektr boyunca bəzi piklərin mövqeyi üst-üstə düşsə də, müəyyən hissələrdə sürüşmənin olması aydın görünür. Infraqırmızı diapozonun kiçik dalğa ədədlərinə doğru nəzər salsaq  $3016 \text{ sm}^{-1}$  (doymamış yağ turşuları C-H valent rəqsləri),  $2952 \text{ sm}^{-1}$  (doymuş yağ turşularının  $\text{CH}_3$  antisimmetrik valent rəqsləri),  $2924 \text{ sm}^{-1}$  (doymuş yağ turşularının  $\text{CH}_2$  antisimmetrik valent rəqsləri),  $1656 \text{ sm}^{-1}$  (sfinqolipidlər (Amid I qrupu)),  $1238 \text{ sm}^{-1}$  (fosfolipidlər, xolesterol ( $\text{PO}_2^-$ ) antisimmetrik valent rəqsləri), kimi bəzi pik mövqeləri sağlam qrup üçün xarakteristik olsa da, xəstə qrupda sürüşmə müşahidə olunmuş və müvafiq olaraq bu fərqlər  $3016 \text{ sm}^{-1}$ ,  $2954 \text{ sm}^{-1}$ ,  $2922 \text{ sm}^{-1}$ ,  $1652 \text{ sm}^{-1}$ ,  $1234 \text{ sm}^{-1}$  hissələrdə qeydə alınmışdır. Xəstə qrup ilə müqayisədə ən kəskin dəyişikliklər sağlam qrupda  $3016 \text{ sm}^{-1}$ ,  $2924 \text{ sm}^{-1}$ ,  $1656 \text{ sm}^{-1}$  və  $1214 \text{ sm}^{-1}$  pik mövqelərində müşahidə edilmişdir. Eləcə də, xəstə qrupa aid  $2922 \text{ sm}^{-1}$ ,  $2852 \text{ sm}^{-1}$  (doymuş yağ turşularının  $\text{CH}_2$  simmetrik uzanması),  $1464 \text{ sm}^{-1}$  (yağ turşularının  $\text{CH}_2$  deformasiya rəqsləri) pik amplitudlarında artma olsa da, sağlam qrupda  $3010 \text{ sm}^{-1}$ ,  $2953 \text{ sm}^{-1}$ ,  $1554 \text{ sm}^{-1}$  (sfinqolipidlər (Amid II qrupu)),  $1214 \text{ sm}^{-1}$  ( $\text{PO}_2^-$  antisimmetrik uzanma) və  $1065 \text{ sm}^{-1}$  (sfinqolipidlər, xolesterol (C-O-H valent rəqsləri)) mövqələrdə azalma qeydə alınmışdır. Amma buna baxmayaraq  $2868 \text{ sm}^{-1}$  (doymuş yağ turşularının  $\text{CH}_3$  simmetrik uzanması),  $1736\text{-}1737 \text{ sm}^{-1}$  (fosfolipidlər, xolesterol efirləri (C=O valent rəqsləri)),  $1652\text{-}1656 \text{ sm}^{-1}$ ,  $1378 \text{ sm}^{-1}$  (yağ turşularının  $\text{CH}_3$  deformasiya rəqsləri),  $970 \text{ sm}^{-1}$  (fosfatidilxolin, sfinqomiyelin;  $(\text{N}^+(\text{CH}_3)_3)$  antisimmetrik uzanma) və  $926 \text{ sm}^{-1}$

<sup>1</sup>(fosfatidilxolin, sfinqomiyelin;  $(N^+(CH_3)_3)$  simmetrik uzanma) hissələrdə hər iki qrupa məxsus piklərin amplitudalarının müqayisəsində fərqlər müşahidə edilməmişdir. Ümumiyyətlə, spektral diapozonun  $1800-700\text{ cm}^{-1}$  oblastı müxtəlif funksional qruplar töhvə verdiyinə görə daha informativdir. “Barmaq izi” zonası kimi xarakterizə olunan bu hissə dörd aromatik xolesterin halqası, fosfolipidlərin qliserin əsaslı birləşməsini, sfinqolipidlərin seramid özəyi, hidrofob yağ turşu zəncirinin C-H qrupları ilə səciyyələnir.



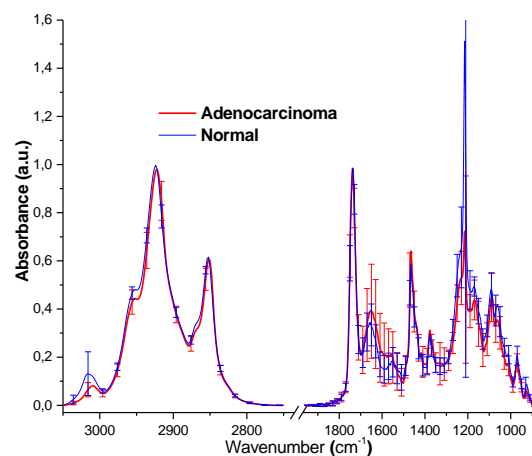
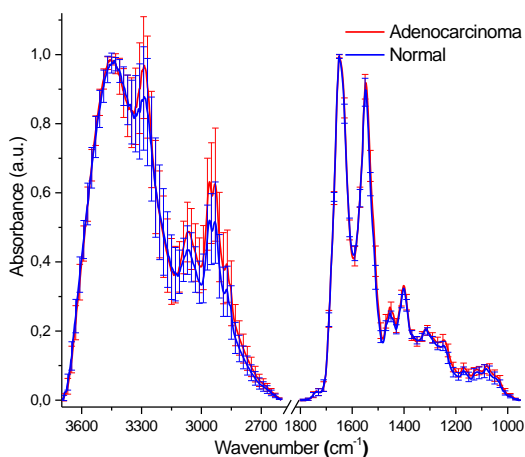
Şəkil 25. Ağciyər karsinoması (qırmızı) və sağlam qrupu (göy) təşkil edən insanların ekstraksiy edilmiş lipid nümunələrinin amplituda görə ortalanmış FÇİQ spektrləri. Spektrlərdəki fərqləri aydın görmək üçün sağlam nümunənin spektri vertikal sürüşdürülmüşdür.

Sadalanan valent rəqs piklərinə əsaslanaraq demək olar ki,  $A_{2924}/A_{2852}$  nisbəti sağlam və ağciyər karsinoması qrupunun fərqləndirilməsində biomarker rolunu oynayır və xərçəng qrupu üçün bu ədəd 1,88, sağlam qrup üçün isə 2,05-ə bərabərdir. Bu hal əsasən xərçəng hüceyrələrində metil qruplarının nisbi sayının azalması hesabına baş verir. Digər tərəfdən  $CH_2$  və  $CH_3$  qruplarına aid piklərin nisbəti lipidlərdə karbohidrat zəncirinin uzunluğu haqqında məlumat verir. Xərçəng hüceyrələrində metil qruplarının sayının azalması kanserogenez xəstəliyini yaranmasının əlamətləri ilə müşayət olunur. Eləcə də,  $1740\text{ cm}^{-1}$  pik ətrafında hüceyrə membran lipidlərində baş verən daha bir dəyişiklik sağlam və adenokarsinoma qruplarını fərqləndirilməsində mühüm əhəmiyyətə malikdir. Xərçəng xəstəliyini təsvir edən pikin intensivliyinin sağlam qrupla müqayisədə kiçik olması hüceyrə membran lipidlərində C=O qrupu hesabına baş verir. İntensivliklə əlaqədar baş verən azalma birbaşa fosfat turşusunun iştirak olmadan lipoik turşusunun O-H rabitəsinin karbonil qruplarının hidrogen rabitəsinin hesabına fosfolipidlərlə qarşılıqlı təsirinə əsaslanır. Sağlam qrupla müqayisədə  $1464\text{ cm}^{-1}$  pik mövqeyinə yaxın hissədə xəstə qrupu təsvir edən pikin intensivliyi  $1378\text{ cm}^{-1}$  hissədə olan pikin intensivliyindən nəzərə daha böyükdür və  $A_{1464}/A_{1378}$  intensivliklər nisbəti sağlam qrupa nəzərə xərçəng qrupu daha kiçik qiymətə malikdir.

Lipid nümunələrinin spektrləri boyunca meydana gələn piklərin xarakteristikaları və onların məxsus olduqları valent rəqsləri Cədvəl 11-də verilmişdir.

**Cədvəl 11. Ağciyər karsinoması və sağlam insanların qan plazmasından ekstraksiya edilmiş lipi nümunələrinin infraqırmızı spektrlərində təsnifat üçün xarakteristik olan piklərin təsviri.**

Pikin mövqeyi adenokarsinoma ( $\nu \text{ sm}^{-1}$ )	Pikin mövqeyi sağlam ( $\nu \text{ sm}^{-1}$ )	Spektral piklərin təsnifatı
3010	3016	Doymamış yağ turşuları C-H valent rəqsləri
2954	2952	Doymuş yağ turşularının $\text{CH}_3$ antisimmetrik valent rəqsləri
2922	2924	Doymuş yağ turşularının $\text{CH}_2$ antisimmetrik valent rəqsləri
2868	2868	Doymuş yağ turşularının $\text{CH}_3$ simmetrik uzanması
2852	2852	Doymuş yağ turşularının $\text{CH}_2$ simmetrik uzanması
1736	1738	Fosfolipidlər, xolestrol efiri (C=O valent rəqsləri)
1652	1656	Sfinqolipidlər (Amid I qrupu )
1554	1556	Sfinqolipidlər (Amid II qrupu)
1464	1464	Yağ turşularının $\text{CH}_2$ deformasiya rəqsləri
1378	1378	Yağ turşularının $\text{CH}_3$ deformasiya rəqsləri
1234	1238	Fosfolipidlər ( $\text{PO}_2^-$ ) antisimmetrik valent rəqsləri
1214	1214	$\text{PO}_2^-$ antisimmetrik uzanma
1088	1092	Fosfolipidlər, ( $\text{PO}_2^-$ ) simmetrik valent rəqsləri
1062	1062	Sfinqolipidlər, xolestrol (C-O-H valent rəqsləri)
970	970	Fosfatidilxolin, sfinqomiyelin; ( $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ antisimmetrik uzanma)
926	926	Fosfatidilxolin, sfinqomiyelin; ( $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ simmetrik uzanma)





**Şəkil 26. Ağciyər adenokarsinoması və sağlam qrupun plazma (sol) və ekstraksiya edilmiş lipid (sağ) nümunələrinin infraqırmızı spektrləri əsasında standart kənarə çıxma**

Şəkil 26.-də ağciyər adenokarsinoması və sağlam qrup üçün “barmaq izi” və “funksional qrup” oblastlarına görə plazma və ondan ekstraksiya edilmiş lipid nümunələrinin infraqırmızı spektrləri əsasında standart kənarə çıxma təqdim edilmişdir. Standart kənarə çıxma həddlərində xaricdə qalan hissələrə uyğun plazma və lipid piklərinə əsasən xəstə və sağlam qrupları diskriminasiya etmək mümkündür. Müvafiq olaraq plazma və lipid nümunələri üçün,  $3080-2770\text{ sm}^{-1}$  ( $\text{CH}_2$  qrupunun simmetrik və antisimmetrik uzanması) və  $1700-1500\text{ sm}^{-1}$  və  $1200-1090\text{ sm}^{-1}$  (sfinqolipidlərə məxsus Amid I, Amid II qrupları və fosfolipidlərə məxsus antisimmetrik, simmetrik uzanma) diapozonlarında xəstə və sağlam qrupu bir-birindən ayırd etmək üçün spektr həddlərindən xaricdə qalan hissələr mühüm fərq hesab olunur.

Beləliklə, ağciyər adenokarsinoması və sağlam insanların qan plazmasından ekstraksiya edilmiş lipid fraksiyalarının FÇİQ spektrlərinin müəyyən hissələrində mühüm fərqlər aşkarlanmış və onlar funksional qruplara görə interpretasiya edilmişdir. Alınan nəticələr göstərir ki, xərçəng xəstəliyi zamanı plazmanın lipid kompozisiyası dəyişir və bu dəyişiklik onun diaqnostik metod kimi istifadəsinə imkan yaradır. Lipid fraksiyasında olan dəyişikliklər plazmada təyin edilmiş fərqlərə komplementar olduğuna görə onların birgə analizi klassifikasiyanın dəqiqliyini artıracaqdır. Hal-hazırda iş davam edir və süni intellektin tətbiqi ilə klassifikasiya üsulu yaradılacaqdır.

Layihənin həyata keçirilməsi üzrə planda nəzərdə tutulmuş işlərin yerinə yetirilmə dərəcəsi (faizlə qiymətləndirməli)

- 2 Layihə üzrə nəzərdə tutulmuş işlər 100% həcmində yerinə yetirilmişdir. Bundan başqa layihədə nəzərdə tutulmayan lakin layihə üçün vacib olan əlavə işlər (qan plazması və onun lipid fraksiyasının FÇİQ spektroskopiyaya metodu ilə tədqiqi) görülmüşdür.

- 3 Hesabat dövründə alınmış **elmi nəticələr** (onların yenilik dərəcəsi, elmi və təcrübi əhəmiyyəti, nəticələrin istifadəsi və tətbiqi mümkün olan sahələr aydın şəkildə göstərilməlidir)

Hesabat dövründə aşağıdakı mühüm elmi nəticələr alınmışdır.

1. TEMPO spin zondundan dərman modeli kimi istifadə etməklə onun ağciyər toxuması normal və xərçəng hüceyrə membranlarına inkorporasiya dərəcəsi öyrənilmişdir. Göstərilmişdir ki, TEMPO-nun inkorporasiya dərəcəsi sağlam hüceyrələrə nisbətən xərçəng hüceyrələrdə daha yüksəkdir. Bu da xərçəng hüceyrələrinin membranının daha da dinamik olmasının göstərir.

2. Hər iki hüceyrə növü üçün temperatur və paylanma əmsalı qiymətləri arasında müsbət korrelyasiya vardır.  $A_{\text{iso}}$  qiymətlərindəki fərqlər xərçəng hüceyrə membranlarının sağlam hüceyrələrə nisbətən daha hidrofob olduğunu göstərir. TEMPO üçün təyin olunan  $\Delta G_K$  qiymətləri sağlam hüceyrələrlə müqayisədə xərçəng hüceyrələrinin TEMPO molekullarını hüceyrə membranına daha asanlıqla daxil etdiyini göstərir.

3. TEMPO üzrə aparılan tədqiqatların pH-in 7.3 və 6.2 qiymətlərində alınan nəticələrin müqayisəsi göstərir ki, bəzi xəstələrdə kimya terapiyasına əlavə olaraq turş mikro-mühitin zəif qələviyə çevrilməsi üçün tamamlayıcı alkalizasiya müalicəsi xərçəng xəstələri üçün faydalı olar.

4. TEMPO, amino-TEMPO, TEMPO-benzoat üzrə aparılan təcrübələrin müqayisəli analizi göstərir ki, TEMPO spin zonduna benzol qrupu daxil edildikdə o xərçəng hüceyrələrini daha yaxşı fərqləndirə bilər. Bu nəticə göstərir ki, yuxarı temperaturlarda TEMPO-benzoat xərçəng toxumalarına daha çox daxil olacaq. Bu da onu göstərir ki xərçəng xəstələrinin kimya-terapiyasında bəzi hallarda istifadə olunan haypertermiya effektiv olmalıdır.

5. TEMPO, amino-TEMPO, TEMPO-benzoat spin zondlarının ağciyər normal və xərçəng toxumalarından alınan liposomlarda paylanması göstərir ki, hüceyrə sistemə uyğun olaraq

	<p>TEMPO-benzoat liposomlarda da daha yüksək inkorporasiya ola bilər. Bu da membranların lipid fraksiyasındakı fərqlərin mühüm əhəmiyyət daşıdığını göstərir.</p> <p>6. Alınan nəticələr göstərir ki, TEMPO spin zondunu yüklü qrup ilə deyil, məhz hidrofob qrupla modifikasiyası onların liposomlara inkorporasiyasını təmin edir.</p> <p>7. Layihə üzrə alınan nəticələr hüceyrə membranının lipid kompozisiyasının mühüm rolunu göstərir. Ona görə də layihədə göstərilən işlərdən əlavə olaraq sağlam və xərçəng ağciyər hüceyrələrinin lipid fraksiyası Furiye Çevirici İnfraqırmızı (FÇİQ) spektroskopiyası metodu ilə tədqiq edilmişdir. Bu iş nəticəsində lipid fraksiyasının FÇİQ spektrlərində xərçəng hüceyrələrini diskriminasiya edə bilən “barmaq izi” regionu təyin edilmişdir. Lipid fraksiyasında olan dəyişikliklə əvvəlki işlərimizdə plazmada təyin edilmiş fərqlərə komplementar olduğuna görə onların birgə analizi klassifikasiyanın dəqiqliyini artıracaq. Hal-hazırda iş davam edir və süni intellektin tətbiqi ilə klassifikasiya üsulu yaradılacaqdır. Alınan bütün nəticələr yenidir. Bu işlərin tətbiqi ilə xərçəng xəstələrinin kimya terapiyasının aparılması üçün daha effektiv şəraitinin seçilməsinə imkan verər.</p>
4	<p>Layihə üzrə <b>elmi nəşrlər</b> (elmi jurnallarda məqalələr, monoqrafiyalar, icmallar, konfrans materiallarında məqalələr, tezislər) (dərc olunmuş, çapa qəbul olunmuş və çapa göndərilmişləri ayrılıqda qeyd etməklə, uyğun məlumat - jurnalın adı, nömrəsi, cildi, səhifələri, nəşriyyat, indeksi, İmpact Factor, həmmüəlliflər və s. bunun kimi məlumatlar - ciddi şəkildə dəqiq olaraq göstərilməlidir) (<i>surətlərini kağız üzərində və CD şəklinə əlavə etməli!</i>)</p> <p>1. M. Bakhishova, R.B. Aslanov, R.B. Gasanova, L. Melikova, J.A. Aliyev, O.K. Gasymov, Hydrophobic but not charged group attachment to TEMPO enhances discrimination of liposomes from human lung normal and carcinoma cells, Transactions of Azerbaijan National Academy of Sciences (Physics and Astronomy), 2022, XLII, 5, 56-63. <a href="http://physics.gov.az/Transactions/2022/journal2022(5).pdf">http://physics.gov.az/Transactions/2022/journal2022(5).pdf</a></p> <p>2. A.H. Aydəmirova, Sağlam və ağciyər adenokarsinoması xəstəliyində insan qan plazmasının FÇİQ spektrlərində fərqləndirici xüsusiyyətlər, AJP Fizika, v. XXVIII, No2, section:Az, 12-16. <a href="http://www.physics.gov.az/archaz.html">http://www.physics.gov.az/archaz.html</a></p> <p>3. Gasymov O.K., Bakhishova M.J., Gasanova R.B., Aslanov R.B., Melikova L.A., Aliyev J.A., Benzoate Group Attachment to Tempo Provides Enhanced Discrimination of Liposomes Fabricated Using Human Lung Normal and Carcinoma Cells, <i>Russian Journal of Biological Physics and Chemistry</i>, 2022, vol. 7, No. 2, pp. 261-267 <a href="https://cloud.mail.ru/public/xcQG/XeGkW53Xh">https://cloud.mail.ru/public/xcQG/XeGkW53Xh</a>;</p> <p>4. Aydəmirova A.H., Məlikova L.Ə., Qasımov O.K., Furiye Çevirici İnfraqırmızı spektroskopiyasının tətbiqi ilə insanın sağlam və ağciyər adenokarsinoması halında plazma-lipid modelinin diaqnostik mümkünlüyü, AJR Fizika, 2023, v. XXIX, n. 1, 3-9. <a href="http://www.physics.gov.az/archaz.html">http://www.physics.gov.az/archaz.html</a></p> <p>Qeyd etmək istəyirik ki, layihə üzrə yuxarıda göstəriləndən əlavə 2 məqalənin 2023-ü ildə çap olunması nəzərdə tutulur. Bu haqda AR Elm Fonduna əlavə məlumat veriləcək.</p>
5	<p>İxtira və patentlər, səmərələşdirici təkliflər</p> <p>Yoxdur</p>
6	<p>Layihə üzrə ezamiyyətlər (ezamiyyə baş tutmuş təşkilatın adı, şəhər və ölkə, ezamiyyə tarixləri, həmçinin ezamiyyə vaxtı baş tutmuş müzakirələr, görüşlər, seminarlarda çıxışlar və s. dəqiq göstərilməlidir)</p> <p>Yoxdur, layihədə nəzərdə tutulmamışdır</p>
7	<p>Layihə üzrə elmi ekspedisiyalarda iştirak (əgər varsa)</p> <p>Yoxdur, layihədə nəzərdə tutulmamışdır</p>
8	<p>Layihə üzrə digər tədbirlərdə iştirak</p> <p>Yoxdur</p>
9	<p>Layihə mövzusu üzrə elmi məruzələr (seminar, dəyirmi masa, konfrans, qurultay, simpozium və s.</p>

	çıxışlar) (məlumat tam şəkildə göstərilməlidir: a) məruzənin növü: plenar, dəvətli, şifahi və ya divar məruzəsi; b) tədbirin kateqoriyası: ölkədaxili, regional, beynəlxalq)
	(burada doldurulmalı) Layihə mövzusu üzrə elmi məruzələr Biofizika İnstitutunun Elmi Seminarında, AR Milli Onkologiya Mərkəzinin işçilərinin iştirakı ilə mütəmadi olaraq dinlənilmişdir. Praktiki məsələlər isə dəyirmi masada müzakirə edilmişdir.
10	Layihə üzrə əldə olunmuş cihaz, avadanlıq və qurğular, mal və materiallar, komplektləşdirmə məmulatları
	Təəssüf hissi ilə qeyd edirik ki, layihə üzrə cihaz və materiallara təqribən 145 000 azn ayrılmasına da, hələlik heçnə alınmayıb. Ümid edirik ki, Azərbaycan Elm Fondu Biofizika İnstitutunu nəzərdə tutulmuş cihazla təmin edəcəkdir.
11	Yerli həmkarlarla əlaqələr
	Yerli həmkarlarla (AR Milli Onkologiya Mərkəzinin müvafiq həkim və elmi işçiləri) mütəmadi əlaqə saxlanılıb.
12	Xarici həmkarlarla əlaqələr
	Türkiyəli həmkarla alınmış nəticələr müzakirə edilib və yüksək qiymətləndirilib.
13	Layihə mövzusu üzrə kadr hazırlığı (əgər varsa)
	Mətanət Baxışova və Arzu Aydınmırovanın fəlsəfə doktorluğu üzrə işlərinin bir hissəsi birbaşa layihə mövzusu ilə əlaqədardır.
14	Sərgilərdə iştirak (əgər baş tutubsa)
	Alınmış nəticələr AMEA-nın FRTEB və Rəyasət Heyətinin sabatı zamanı Biofizika İnstitutunun sərgi stolunda nümayiş etdirilmişdir.
15	Təcrübəartırmada iştirak və təcrübə mübadiləsi (əgər baş tutubsa)
16	Layihə mövzusu ilə bağlı elmi-kütləvi nəşrlər, kütləvi informasiya vasitələrində çıxışlar, yeni yaradılmış internet səhifələri və s. (məlumatı tam şəkildə göstərilməlidir)
	yoxdur

#### SİFARİŞÇİ:

**Azərbaycan Elm Fondu**

**Şöbə müdiri**

**Quliyeva Mülayim Sahib qızı**

(imza)

“ \_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_ -ci il

#### İCRAÇI:

**Layihə rəhbəri**

**Qasımov Oktay Kazım oğlu**

(imza)

“ \_\_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_ -ci il



## AZƏRBAYCAN ELM FONDU

MÜQAVİLƏYƏ ƏLAVƏ

Azərbaycan Elm Fondunun “Elm-Təhsil-Sənaye”  
məqsədli qrant müsabiqəsinin  
(EIF/MQM/ETS-2020-1(35)) qalibi olmuş  
layihənin yerinə yetirilməsi üzrə

### ALINMIŞ NƏTİCƏLƏRİN ƏMƏLİ (TƏCRÜBİ) HƏYATA KEÇİRİLMƏSİ VƏ LAYİHƏNİN NƏTİCƏLƏRİNDƏN GƏLƏCƏK TƏDQIQATLARDƏ İSTİFADƏ PERSPEKTİVLƏRİ HAQQINDA MƏLUMAT VƏRƏQİ

(Qaydalar üzrə Əlavə 16)

Layihənin adı: **Müxtəlif funksional qrupların insan ağciyər toxuması sağlam və karsinoma xərçəng hüceyrə membranlarına dərman çatdırılmasındakı rolu**

Layihə rəhbərinin soyadı, adı və atasının adı: **Qasimov Oktay Kazım oğlu**

Qrantın məbləği: **297 000 manat**

Layihənin nömrəsi: **EIF-MQM-ETS-2020-1(35)-08/07/3-M-07**

Müqavilənin imzalanma tarixi: **01 mart 2021 - ci il**

Qrant layihəsinin yerinə yetirilmə müddəti: **24 ay**

Layihənin icra müddəti (başlama və bitmə tarixi): **01 aprel 2021-ci il – 01 aprel 2023-cü il**

**Diqqət! Bütün məlumatlar 12 ölçülü Arial şrifti ilə, 1 intervalla doldurulmalıdır**

#### Layihənin nəticələrinin əməli (təcrübi) həyata keçirilməsi

**1** Layihənin əsas əməli (təcrübi) nəticələri, bu nəticələrin məlum analoqlar ilə müqayisəli xarakteristikası

Layihənin əsas təcrübi nəticələri aşağıdakılardır:

1. TEMPO spin zondunun anti-xərçəng xüsusiyyətlərinin olması əvvəlki illərdə göstərilmişdir. Biz bu spin zondunu dərman modeli kimi götürüb TEMPO-nun və onun müxtəlif analoqlarının ağciyər toxumasının normal və xərçəng hüceyrələrinə təsiri öyrənilmişdir. TEMPO-nun mühitin pH 7.3 və 6.2 qiymətlərindəki vəzqlər göstərilmişdir. Alınan nəticələrin analoqu yoxdur və yenidir. Göstərilmişdir ki, TEMPO-nun inkorporasiya dərəcəsi sağlam hüceyrələrə nisbətən xərçəng hüceyrələrdə daha yüksəkdir. Bu da xərçəng hüceyrələrinin membranının daha da dinamik olmasının göstərir.

2. Hər iki hüceyrə növü üçün temperatur və paylanma əmsalı qiymətləri arasında müsbət korrelasiya vardır.  $A_{iso}$  qiymətlərindəki fərqlər xərçəng hüceyrə membranlarının sağlam

hüceyrələrə nisbətən daha hidrofob olduğunu göstərir. TEMPO üçün təyin olunan  $\Delta G_K$  qiymətləri, sağlam hüceyrələrlə müqayisədə xərçəng hüceyrələrinin TEMPO molekullarını hüceyrə membranına daha asanlıqla daxil etdiyini göstərir.

3. TEMPO üzrə aparılan tədqiqatların pH-in 7.3 və 6.2 qiymətlərində alınan nəticələrin müqayisəsi göstərir ki, bəzi xəstələrdə kimya terapiyasına əlavə olaraq turş mikro-mühitin zəif qələviyə çevrilməsi üçün tamamlayıcı alkalizasiya müalicəsi xərçəng xəstələri üçün faydalı olar.

4. TEMPO, amino-TEMPO, TEMPO-benzoat üzrə aparılan təcrübələrin müqaisəli analizi göstərir ki, TEMPO spin zonduna benzol qrupu daxil edildikdə o xərçəng hüceyrələrini daha yaxşı fərqləndirə bilir. Bu nəticə göstərir ki, yuxarı temperaturlarda TEMPO-benzoat xərçəng toxumalarına daha çox daxil olacaq. Bu da onu göstərir ki xərçəng xəstələrinin kimya-terapiyasında bəzi hallarda istifadə olunan haypertermiya effektiv olmalıdır.

5. TEMPO, amino-TEMPO, TEMPO-benzoat spin zondlarının ağciyər normal və xərçəng toxumalarından alınan liposomlarda paylanması göstərir ki, hüceyrə sistemə uyğun olaraq TEMPO-benzoat liposomlarda da daha yüksək inkorporasiya ola bilər. Bu da membranların lipid fraksiyasındakı fərqlərin mühüm əhəmiyyət daşıdığını göstərir.

6. Alınan nəticələr göstərir ki, TEMPO spin zondunu yüklü qrup ilə deyil, məhz hidrofob qrupla modifikasiyası onların liposomlara inkorporasiyasını təmin edir.

Xərçəng xəstəliyinin inkişafı zamanı onların ətrafındakı mühitin pH-ı 7.3-dən 6.2-ə qədər düşür və turş mühit yaradır. Bu hadisə geniş öyrənilib və onun mezanximal transformasiyada, metastaz hadisəsində mühüm rol oyması göstərilib. Lakin bu mühitdə normal və xərçəng hüceyrələrinin dərmanı qəbul etmə xüsusiyyətləri tədqiq edilməmişdir. Biz TEMPO və onun analoqlarında istifadə edərək hər iki hüceyrə növünün bu pH-dakı xüsusiyyətlərini kəmiyyət cəhətdən qiymətləndirə bildik. Göstərmişik ki, bəzi hallarda xərçəng xəstəliyinin kimya terapiyası zamanı əlavə olaraq mühitin alkalizasiyası dərmanın təsir effektivini artırma bilər. Digər tərəfdən kimya və radiasiya terapiyası zamanı hipertermiyadan istifadə edərək orqanın lokal temperaturunu  $44^{\circ}\text{C}$ -ə qədər artırırırlar. Biz göstərmişik ki, hansı hallarda bu effektiv ola bilər. Nəticələr göstərir ki, xərçəng xəstəliyinin müalicəsində fərdi yanaşma çox mühümdür. Bizim yaratdığımız metod hər bir xərçəng xəstəsinin pH-a və temperatura həssaslığının qiymətləndirə bilir və effektiv müalicə üçün fərdi göstəriş (effektiv şəraitin) verilməsini təmin edə bilər.

2 Layihənin nəticələrinin əməli (təcrübi) həyata keçirilməsi haqqında məlumat (istehsalatda tətbiq (tətbiqin aktını əlavə etməli); tədris və təhsildə (nəşr olunmuş elmi əsərlər və s. – təhsil sistemə tətbiqin aktını əlavə etməli); bağlanmış xarici müqavilələr və ya beynəlxalq layihələr (kimlə bağlanıb, müqavilənin və ya layihənin nömrəsi, adı, tarixi və dəyəri); dövlət proqramlarında (dövlət orqanının adı, qərarın nömrəsi və tarixi); ixtira üçün alınmış patentlərdə (patentin nömrəsi, verilmə tarixi, ixtiranın adı); və digərlərində)

(burada doldurmalı)

İndiki durumda əməli tətbiq aktımız yoxdur. Lakin gələcəddə bu işin çox böyük tətbiq imkanları vardır.

### 1. Layihənin nəticələrindən gələcək tədqiqatlarda istifadə perspektivləri

1 Nəticələrin istifadəsi perspektivləri (fundamental, tətbiqi və axtarış-innovasiya yönü elmi-tədqiqat layihə və proqramlarında; dövlət proqramlarında; dövlət qurumlarının sahə tədqiqat proqramlarında; ixtira və patent üçün verilmiş ərizələrdə; beynəlxalq layihələrdə; və digərlərində)

Alınan nəticələrin istifadə perspektivləri çox yüksəkdir. Artıq aldığımız nəticələrdən bu ilki magistr işində (Ağca Qasımova, BDU-nun magistr tələbəsi, rəhbər: AMEA-nın müxbir üzvü Oktay K. Qasimov)  
Hal-hazırda yeni anti-xərçəng molekulunun təsir mexanizminin öyrənilməsində alınmış nəticələrdən və inkişaf etdirdiyimiz metodikalardan geniş istifadə olunur.

**SİFARIŞÇI:**

**Azərbaycan Elm Fondu**

**Şöbə müdiri**

**Quliyeva Mülayim Sahib qızı**

\_\_\_\_\_  
(imza)

“ \_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_-ci il

**İCRAÇI:**

**Layihə rəhbəri**

**Qasimov Oktay Kazım oğlu**

\_\_\_\_\_  
(imza)

“ \_\_ ” \_\_\_\_\_ 20\_-ci il





## AZƏRBAYCAN ELM FONDU

MÜQAVİLƏYƏ ƏLAVƏ

Azərbaycan Elm Fondunun "Elm-Təhsil-Sənaye"  
məqsədli qrant müsabiqəsinin  
(EİF/MQM/ETS-2020-1(35)) qalibi olmuş  
layihənin yerinə yetirilməsi üzrə

### ALINMIŞ ELMİ MƏHSUL HAQQINDA MƏLUMAT (Qaydalar üzrə Əlavə 17)

Layihənin adı: Müxtəlif funksional qrupların insan ağciyər toxuması sağlam və karsinoma xərçəng hüceyrə membranlarına dərman çatdırılmasındakı rolu

Layihə rəhbərinin soyadı, adı və atasının adı: Qasımov Oktay Kazım oğlu

Qrantın məbləği: 297 000 manat

Layihənin nömrəsi: EİF-MQM-ETS-2020-1(35)-08/07/3-M-07

Müqavilənin imzalanma tarixi: 01 mart 2021 - ci il

Qrant layihəsinin yerinə yetirilmə müddəti: 24 ay

Layihənin icra müddəti (başlama və bitmə tarixi): 01 aprel 2021-ci il – 01 aprel 2023-cü il

**Diqqət!** Bütün məlumatlar 12 ölçülü Arial şrifti ilə, 1 intervalla doldurulmalıdır

#### 1. Elmi əsərlər (sayı)

№	Tamliq dərəcəsi	Dərc olunmuş	Çapa qəbul olunmuş və ya çapda olan	Çapa göndərilmiş
	Elmi məhsulun növü			
1.	Monoqrafiyalar			
	həmçinin, xaricdə çap olunmuş			
2.	Məqalələr	4		2 hazırlanır

	həmçinin xarici nəşrlərdə	1		
3.	Konfrans materiallarında məqalələr O cümlədən, beynəlxalq konfrans materiallarında			
4.	Məruzələrin tezisləri həmçinin, beynəlxalq tədbirlərin toplusunda			
5.	Digər (icmal, atlas, kataloq və s.)			

## 2. İxtira və patentlər (sayı)

Nö	Elmi məhsulun növü	Alınmış	Verilmiş	Ərizəsi verilmiş
1.	Patent, patent almaq üçün ərizə			
2.	İxtira			
3.	Səmərələşdirici təklif			

## 3. Elmi tədbirlərdə məruzələr (sayı)

Nö	Tədbirin adı (seminar, dəyirmi masa, konfrans, qurultay, simpozium və s.)	Tədbirin kateqoriyası (ölkədaxili, regional, beynəlxalq)	Məruzənin növü (plənar, dəvətli, şifahi, divar)	Sayı
1.	Seminar	Ölkədaxili	Alınmış nəticələr ətrafında çıxışlar	3
2.	Dəyirmi masa	Dəyirmi masa		4
3.				



**SİFARİŞÇİ:**  
**Azərbaycan Elm Fondu**

**Şöbə müdiri**  
**Quliyeva Mülayim Sahib qızı**

\_\_\_\_\_  
(imza)  
" \_\_ " \_\_\_\_\_ 20\_-ci il

**İCRAÇI:**

**Layihə rəhbəri**  
**Qasimov Oktay Kazım oğlu**

\_\_\_\_\_  
(imza)  
" \_\_ " \_\_\_\_\_ 20\_-ci il

