ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

მარიამ შენგელია

„ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესი და მისი შესაძლო პრევენციის მექანიზმი“

სამაგისტრო პროგრამა „ბიოლოგია“

სამაგისტრო ნაშრომი შესრულებულია ივანე ჯავახიშვილის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის, ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტის, ბიოლოგიის დეპარტამენტის, ბიოქიმიის მიმართულებაზე ბიოლოგიის მაგისტრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელი : ბ.მ.დ. პროფ. ნანა კოშორიძე

ბ.დ. ასისტ.პროფ. გიორგი ბურჯანაძე

თბილისი 2017

სარჩევი

ანოტაცია **3**

შესავალი 6

თავი I. ლიტერატურული მიმოხილვა 9

I.1 სტრესი და მისი გამომწვევი ფაქტორები 9

I.2 სტრესი და ანტიოქსიდანტური სისტემა 14

I.3 სტრესი და ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი 18

I.4 კრეატინი.....19

I.5 სტრესი და კრეატინით პრევენცია.....21

თავი II. კვლევის ობიექტები და მეთოდები.....24

II.1 კვლევის ობიექტი.....24

II.2 სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობის განსაზღვრა.....24

II.3. კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა.....25

II.4.გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობის განსაზღვრა.....26

II.5. აზოტის ჟანგის რაოდენობის განსაზღვრა.....26

II.6. Ca-ის რაოდენობის განსაზღვრა.....26

II.7. H_2O_2 -ის რაოდენობის განსაზღვრა.....27

II.8. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა MTT-ტესტით.....27

II.9. Ca^{2+}-ატფ-აზური აქტივობის განსაზღვრა.....27

II. 10. Na^{2+}, K^{+} -ატფ-აზური აქტივობის განსაზღვრა.....28

II. 11. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ლოურის მეთოდით.....28

სტატისტიკური ანალიზი.....29

თავი III. მიღებული შედეგები.....30

III.1. NO-სა, წყალბადის ზეჟანგისა და Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი ცვლილებების დადგენა.....30

III.2. კრეატინის ეფექტი სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედების ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობაზე.....32

III.3. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა ჰიპოკამპის Ca^{2+}-ATPase-ს აქტივობაზე.....35

თავი IV. მიღებული შედეგების განხილვა.....37

დასკვნა.....42

გამოყენებული ლიტერატურა.....43

ანოტაცია

სტრესი თანამედროვეობის გლობალური პრობლემაა. იგი განაპირობებს ადაპტაციურ ქცევით და ფიზიოლოგიურ პასუხებს, რომლებიც აღადგენს შიდა ჰომეოსტაზს. თუმცა სტრეს-ფაქტორების მოქმედების გახანგრძლივება უარყოფითად აისახება ჯანმრთელობის მდგომარეობაზე და იწვევს დეპრესიებს, პოსტტრამვულ სტრესულ აშლილობას და მთელ რიგ ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებს. ამ პროცესებისადმი განსაკუთრებით მგრძნობიარეა თავის ტვინი. შესაბამისად, ისეთი ნივთიერებების მოძიება რომლებთაც შესწევთ უნარი, მოახდინონ სტრესული მდგომარეობის პრევენცია, მნიშვნელოვანია განსაკუთრებით დღევანდელი საზოგადოების ყოველდღიური ცხოვრებისეული სტილის გათვალისწინებით. ამ მიმართულებით ჩვენი ყურადღება მიიპყრო კრეატინმა, რომელსაც გააჩნია ანტიოქსიდანტური თვისებები.

ზემოთთქმულიდან გამომდინარე, ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა კრეატინის პროტექტორული გავლენა სოციალური იზოლაციითა და დღე-ღამური ციკლის ხანგრძლივი დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის შედეგად განვითარებულ ცვლილებებზე თეთრი ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედებში. ნანახია, რომ ვირთაგვას ორგანიზმში 140მგ/კგ კრეატინის 30-დღიანი ყოველდღიური შეყვანა აუმჯობესებს ფსიქო-ემოციური სტრესის შედეგად გაუარესებულ როგორც ფიზიოლოგიურ მახასიათებლებს, ასევე ზოგიერთ ბიოქიმიურ მაჩვენებელსაც. კერძოდ, ადგილი აქვს ამ პირობებში გაზრდილი აზოტის ჟანგის, H_2O_2 და Ca^{2+}-ის იონის რაოდენობრივ შემცირებას. ამის პარალელურად, აღინიშნება დაქვეითებული ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების, კერძოდ სოდ-ისა და კატალაზას აქტივობის მატებაც. მიღებული შედეგების გათვალისწინებით, გამოთქმულია ვარაუდი, რომ კრეატინის შეყვანისას სტრესირებული ვირთაგების ჰიპოკამპის უჯრედებში ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობის მატების მიზეზი შესაძლებელია იყოს მისი მონაწილეობით უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და ზოგიერთი უჯრედშიდა სასიგნალო გზების გააქტივება, რასაც მოსდევს სინთეზური რეაქციების, მათ შორის ანტიოქსიდანტური ფერმენტების რაოდენობის მატებაც. სავარაუდოა, რომ ეს პროცესი განპირობებულია კრეატინის ზემოქმედებით NMDA-რეცეპტორზე, რაც იწვევს სტრესის პირობებში უჯრედში გაზრდილი Ca^{2+}-ის რაოდენობის დაქვეითებას და ასევე ამ იონის სიჭარბით გამოწვეული ციტოტოქსიკური ეფექტის განეიტრალებას, რაც თავის მხრივ,

ვლინდება სხვადასხვა პროცესების, მათ შორის ფერმენტების სინთეზისა და შესაბამისად, მათი რაოდენობის მატებით.

Annotation

Stress is a global problem of modernity. Stress often generate adaptive behavioral and physiological responses that restore internal homeostasis. However, when stressors are perceived as uncontrollable, prolonged or especially severe, they can lead to several negative health consequences, including major depression, panic disorder, posttraumatic stress disorder and neurodegenerative diseases. Disturbances in natural Circadian rhythm are well-known stress factors, affecting a range of metabolic pathways in the living body including the brain. Hence, discovery of natural compounds that could help to prevent and cure of adverse changes is very important. One of the recently discussed substances is creatine that is believed to have anti-stressor properties.

Recent paper describes the impact of intraperitoneally injected creatine (140 mg/kg) into rats with a disturbed natural circadian rhythm for an extended period of time (30 days). Markedly, creatine-treated animals show positive changes in open-field behavioral parameters, and an increase in certain antioxidant enzymes' (SOD, catalase) activity in the hippocampus, whereas the concentration of nitric oxide, H2O2, and Ca^{2+} are approximated to the control value. Similar findings were also observed in case of Na+/K+- and Ca^{2+}-ATP-ases.

To sum up, the recent findings allow the conclusion that oxidative stress induced by long-term disturbances in natural circadian rhythm is accompanied and likely provoked by an increase in Ca^{2+}-cytotoxicity, which is supposedly normalized by the creatine's indirect action on the NMDA receptor. Therefore, impact on energy mediating pathways has a positive effect on stabilization of antioxidant and various metabolic systems and protecting hippocampal cells from stress.

შესავალი

სტრესი ანუ „ორგანიზმის არასპეციფიური პასუხი გარეგან ცვლილებაზე“ და მისი მოქმედების ბიოქიმიური და ფიზიოლოგიური მექანიზმების შესწავლა თანამედროვე მეცნიერების ერთ-ერთ აქტუალურ საკითხს წარმოადგენს. მიუხედავად იმისა, რომ მსგავსი ზემოქმედება ხშირ შემთხვევაში აუცილებელი ფაქტორია მრავალი ადაპტაციური პროცესისათვის, ზოგადად, სტრესი არღვევს რა ორგანიზმის სხვადასხვა სისტემის ნორმალური მოქმედების რიტმს, უარყოფითად აისახება მათ ფუნქციონირებაზე. სტრესის უარყოფითი ეფექტის მიზეზი ორგანიზმზე გამოიხატება მთელი რიგი ფერმენტული სისტემების აქტივობის, ორგანიზმის ჰორმონალური სტატუსისა და ბიოლოგიურად აქტიური მოლეკულების რაოდენობრივ ცვლილებაში, ასევე უჯრედული, კერძოდ ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დარღვევაში, გენეტიკური აპარატის გააქტიურებასა და სხვა მნიშვნელოვან პროცესებში. აღსანიშნავია, რომ სტრესს-ფაქტორების ხანმოკლე ზემოქმედება, იწვევს რა უჯრედების გააქტიურებას, დადებითად აისახებამათ ფუნქციურ მდგომარეობაზე. თუმცა სტრესის გახანგრძლივების შედეგად განვითარებული მეტაბოლური ცვლილებები ხშირ შემთხვევაში სხვადასხვა პათოლოგიების გამომწვევი ფაქტორადა გვევლინება.

ცნობილია, რომ ორგანიზმის სხვადასხვა სისტემები განსხვავებულ მგრძნობელობას ავლენენ სტრესული პირობებისადმი და ამ კუთხით განსაკურებით აღსანიშნავია ნერვული სისტემა, კერძოდ თავის ტვინი. ამის მაჩვენებელია ის, რომ მრავალი ნეიროდეგენერაციულ დაავადებათა მიზეზად სწორედ სტრესი განიხილება. ამ დაავადებათა შორისაა ალცჰეიმერის დაავადება, პარკინსონის დაავადება, ჰანგტინტონის დაავადება და სხვ.

უჯრედში სტრესის ზემოქმედების საბოლოო ეტაპად მიიჩნევა იქ მიმდინარე ჟანგვითი პროცესების გაძლიერება და ოქსიდაციური სტრესის ჩამოყალიბება, რაც თავის მხრივ ცილოვანი მოლეკულების, მათ შორის ფერმენტების სტრუქტურულ-ფუნქციურ ცვლილებებსა და ასევე ლიპიდების შემადგენლობაში არსებული ცხიმოვანი მჟავების (განსაკუთრებით უჯერი ცხიმოვანი მჟავების) გაძლიერებულ ჟანგვასა და ე.წ. ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის აქტივაციას იწვევს. სტრესის ზემოქმედების ძირითადად მიზეზად ითვლება ამ პირობებში სხვადასხვა ბიოლოგიურად აქტიური მოლეკულებისა და იონების, მათ შორის განსაკუთრებით კალციუმის იონის ჭარბი რაოდენობით წარმოება, რაც უარყოფით გავლენას ახდენს ზოგადად უჯრედის და მათ შორის ნერვული სისტემის უჯრედების ფუნქციონირებაზე.

ზემოთ აღნიშნული ეფექტების გამომწვევი სტრეს-ფაქტორები საკმაოდ მრავალფეროვანია და მათ შორის აღსანიშნავია ე.წ. სოციალური იზოლაცია, რომელიც ფსიქო-სოციალური სტრესის ჩამოყალიბებას უწყობს ხელს. აღსანიშნავია, რომ სწორედ სოციალური ურთიერთობები წარმოადგენს ერთ-ერთ გადამწყვეტ ფაქტორს ინდივიდების განვითარებასა და ნორმალურ ცხოველქმედებაში, მათ შორის ადამიანშიც.

დადასტურებულია, რომ ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციით გამოწვეული ფსიქო - სოციალურ სტრესი ორგანიზმში მიმდინარეობს სხვადასხვა ნეიროტრანსმიტერებისა და გლუკოკორტიკოიდული ჰორმონების რაოდენობრივი ცვლილებების ფონზე, რაც თავის მხრივ, გავლენას ახდენს მეხსიერებისა და დასწავლის პროცესზე და ასევე ინდივიდთა ემოციურ მდგომარეობაზე და შესაძლოა ზოგ შემთხვევაში, ნეიროტოქსიკური ეფექტით ხასიათდებოდეს.

როგორც ცნობილია, ჰორმონთა უმრავლესობის სამიზნეს პლაზმურ მემბრანაზე არსებული რეცეპტორები წარმოადგენს, რომელთა სტრუქტურული და ფუნქციური ცვლილებები განსაზღვრავს უჯრედშიდა სასიგნალო კასკადების მიმართულებას და ეფექტს. უნდა აღინიშნოს, რომ ორგანიზმზე სტრესის ზემოქმედება, რომელიც სხვადასხვა მექანიზმით ხორციელდება, სწორედ უჯრედშიდა სასიგნალო სისტემაში მიმდინარე ცვლილებებში გამოიხატება, რაც უმეტეს შემთხვევაში მთავრდება ე.წ. ციტოტოქსიური ეფექტის მქონე ოქსიდაციური პროცესებისა და შესაბამისად, სხვადასხვა ხასიათის მქონე პათოლოგიური მდგომარეობის განვითარებით.

ცნობილია, რომ სტრესის ფონზე მიმდინარე ფიზიოლოგიური პროცესების საფუძველს უჯრედში მიმდინარე ბიოქიმიური ცვლილება წარმოადგენს, რაც აისახება ორგანიზმის ჰორმონალური სტატუსისა და სასიგნალო მოლეკულების რაოდენობრივი ცვლილებებით, ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის რღვევით, ორგანიზმის ანტიოქსიდანტური სტატუსის დაქვეითებით, ფერმენტებისაქტივობის შემცირებით, ტრანსკრიფციული და ტრანსლაციური პროცესების ინტენსივობის ცვლილებებითა და სხვა მნიშვნელოვანი პროცესებით [2; 25]. ამის გათვალისწინებით, ისეთი ნივთიერებების მოძიება, რომლებსაც შესწევთ უნარი მოახდინონ სტრესული მდგომარეობის პრევენცია, განსაკუთრებულ მნიშვნელობას იძენს. დღესდღეობით ცნობილია მთელი რიგი ნაერთებისა, რომლებიც ამ მიზნით აქტიურად გამოიყენება პრაქტიკაში [17; 68]. მათ შორის განიხილება კრეატინი (α-N-მეთილგუანიდინო აცეტილის მჟავა).

ჩართულია რა Cr/PCr/CK სისტემის ფუნქციონირებაში, კრეატინი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს უჯრედში მიმდინარე ენერგეტიკული ბალანსის ბუფერიზაციის პროცესში. ეს

პროცესი განსაკუთრებით აქტიურია ისეთი მაღალი ენერგეტიკული მოთხოვნილების უჯრედებისათვის, როგორიცაა ნერვული და კუნთოვანი უჯრედები. ცნს-ში Cr სავარაუდოდ სხვა ფუნქციებსაც ასრულებს, მათ შორის ნერვული იმპულსისა და უჯრედშიდა სიგნალებისგადაცემა, მემბრანული პოტენციალისა და იონური გრადიენტის შენარჩუნება, აქსონალური ტრანსპორტი და სხვა.ლიტერატურული მონაცემების გათვალისწინებით, კრეატინი ასევე შესაძლებელია განიხილული იქნას როგორც ნეირომოდულატორი, რომელსაც შეუძლა მოახდინოს ზოგიერთი პოსტსინაფსური რეცეპტორების აქტივობის მოდულირებაც.ნევროლოგიური დაავადებების მრავალფეროვნება, რომლებიც შეინიშნება კრეატინის დეფიციტის შემთხვევაში, მიუთითებს Cr-ის მნიშვნელობას ფსიქომოტორულ განვითარებასა და შემეცნებითი ფუნქციების რეალიზირებაში.

ბოლო ხანებია გამოჩნდა მონაცემები კრეატინის ანტიოქსიდანტური თვისებების შესახებაც. კერძოდ, ნანახია კრეატინით კვების პირობებში ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროცესის გაუმჯობესება ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივაციის შედეგად. ცნობილია, რომ უჯრედის ანტიოქსიდანტური სისტემის აქტივობის დაქვეითების მიზეზი შესაძლებელია გახდეს ნებისმიერი სახის ხანგრძლივი პერიოდით მიმდინარე სტრესი, მათ შორის ჩვენი ყურადღება მიიპყრო სოციალურმა იზოლაციამ, რომელიც მიმდინარეობს ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში. ამ პროცესისათვის დამახასიათებელია მთელი რიგი ბიოქიმიური პროცესების ცვლილები, კერძოდ ადგილი აქვს როგორც ანტიოქსიდანტური სისტემის, ასევე ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ფერმენტების აქტივობის დაქვეითებას, რაც გამოიხატება ატფ-ის დეფიციტითა და თავის ტვინის ენერგეტიკული პოტენციალისა და ფუნქციური მდგომარეობის გაუარესებით, უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის შემცირებით, აპოპტოზური და ნეკროზული პროცესების გაძლიერებით, იონების რაოდენობრივი შემცველობის ცვლილებით და სხვ.

ყოველივე ამის გათვალისწინებით, ჩვენი ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევითა დასოციალური იზოლაციით გამოწვეული სტრესის პირობებში ვირთაგვას თავის ტვინის ჰიპოფიზის უჯრედებში მიმდინარე მეტაბოლური ცვლილებების პრევენცია ეგზოგენურად შეყვანილი კრეატინის მონაწილეობით.

თავი I. ლიტერატურული მიმოხილვა

I.1 სტრესი და მისი გამომწვევი ფაქტორები

ცნება „სტრესი“, როგორც ორგანიზმის მთლიანობის მუდმივობის შენარჩუმებისადმი მიმართული ადაპტაციური რეაქცია, პირველად კანადელმა ფიზიოლოგმა ჰანს სელიემ განიხილა[24]. იგი სტრესს განმარტავს, როგორც ორგანიზმის სტერეოტიპულ, ფიზიოლოგიურად დაპროგრამებული არასპეციფიური რეაქციების ერთობლიობას, რომელიც აღიძვრება ნებისმიერი, ძლიერი და ექსტრემალური ზემოქმედებით და იწვევს ორგანიზმის დამცავი ძალების გარდაქმნებს. აღსანიშნავია, რომ სელიეს მიერ შემოთავაზებული განმარტება არ არის სრულყოფილი, რადგან ის ადეკვატურად არ ასახავს სტრესის გამომწვევ ფაქტორებს და ასევე იმ გარემოებას, რომ ორგანიზმის პასუხი სტრესზე გარკვეულწილად უშუალოდ ორგანიზმის ფუნქციურ მდგომარეობაზეა დამოკიდებული [39].

ტერმინი „სტრესი“–ს უფრო ფართე განმარტება მოწოდებულია ფურდუეს მიერ, რომელმაც სტრესი განმარტა, როგორც „ორგანიზმის არასპეციფიკური ბიოქიმიური, ფიზიოლოგიური და ფსიქოლოგიური რეაქციების ერთობლიობა სხვადასხვა ხასიათის და ბუნების გამღიზიანებლის მოქმედების საპასუხოდ და გამოწვეულია ძირითადად იმ ორგანოების ფუნქციური დატვირთვით, რომლებიც გაერთიანებულნი არიან არასპეციფიკურ ფუნქციონალურ სისტემაში და უზრუნველყოფენ ორგანიზმის ჰომეოსტაზის შენარჩუნებას ან მის ადაპტაციას“ [84].

ამჟამად, ყველაზე მისაღებად შეიძლება ჩაითვალოს სტეპტოუს მიერ შემოთავაზებული განმარტება: „სტრესის პასუხი ვლინდება მაშინ, როცა ინდივიდისადმი წაყენებული მოთხოვნები აღემატება იმ პერსონალურ და სოციალურ რესურსებს, რომლის მობილიზაციის უნარიც შესწევს ინდივიდს“ [74].

თავდაპირველად მიაჩნდათ, რომ სტრესს ორგანიზმზე ყოველთვის უარყოფითი გავლენა ჰქონდა. თუმცა მოგვიანებით სელიემ სტრესის გამომწვევი ფაქტორების - სტრესორების ბუნებისა და მათი ზემოქმედების ხასიათის მიხედვით გამოყო სტრესის ორი ტიპი, კერძოდ დადებითი და უარყოფითი სტრესი. ამასთან, მანვე შემოიღო განმარტებები, რომელთა მიხედვითაც დადებით სტრესს *ეუსტრესი* უწოდა, ხოლო უარყოფითს – *დისტრესი* [39].

სელიეს მიხედვით ეუსტრესს ორი ფუნქციური დატვირთვა გააჩნია, კერძოდ იგი გამოწვეულია დადებითი ემოციებით და იგი არ არის ძლიერი და იწვევს ორგანიზმის

მობილიზებას. რაც შეეხება დისტრესს (უარყოფითი სტრესი), ის წარმოადგენს სტრესის ისეთ ფორმას, რომელთანაც გამკლავება ორგანიზმის ძალებს აღემატება და მას მძიმე სომატური და ფსიქიკური დაავადებების გამოწვევა შეუძლია [5; 24] .

ზემოქმედების ტიპის მიხედვით სტრესი შეიძლება იყოს:

1. ფიზიოლოგიური/სისტემური - რომელიც უპირატესად გამოხატავს ბიოლოგიური სისტემების დაძაბულობას და მას თან ახლავს ორგანიზმის ფიზიოლოგიური დაქცევითი ცვლილებების კომპლექსი;
2. ფსიქიკური - ჩნდება ნებისმიერი ზემოქმედების შედეგად, რომელიც მოიცავს ინდივიდის ემოციურ სფეროს.

სტრესის განვითარებასა და ჩამოყალიბებაში განარჩევენ სამ ძირითად ფაზას:

1. *საბრძოლო განგაში სტადია,* რომელიც მიმდინარეობს ორგანიზმის შინაგანი და გარეგანი ძალების მობილიზაციის ფონზე და გულისხმობს, რომ ინდივიდი მზადაა ბრძოლის ან გაქცევისათვის. ასეთ პირობებში, სტრესორის ზემოქმედების საპასუხოდ ორგანიზმში იწყება ადრენალინის, ადრენოკორტიკოტროპული ჰორმონისა და გლუკოკორტიკოიდების გაძლიერებული სეკრეცია, რასაც მოსდევს სიმპათიკური ნერვული სისტემის აქტიურობის გაძლიერება და ამის პარალელურად პათოლოგიური პროცესების განვითარება, რაც გამოიხატება ისეთი დაავადებების ჩამოყალიბებასა და განვითარებაში, როგორიცაა ნეიროდეგენერაციული ცვლილებები, საჭმლის მომნელებელი სისტემის ფუნქციონირების მოშლა, იმუნური სისტემის დაქვეითება, გულ-სისხლძარღვთა სისტემის პათოლოგიები და სხვ. ეს ცვლილებები შეიძლება ისეთი სიღრმის იყოს, რომ ორგანიზმის სიცოცხლისათვის სახიფათოც კი გახდეს. იმ შემთხვევაში, თუ ორგანიზმმა დაძლია ყოველივე ეს, ვითარდება რეზისტენტობის ფაზა;

2. *რეზისტენტობის* (აქტივაციის) ფაზა, რომელიც ხასიათდება გლუკოკორტიკოიდების დახმარებით არაკეთილსასურველი ზემოქმედების მიმართ ორგანიზმის გამძლეობის გაზრდით;

3. *ადაპტაციის* ან *გამოფიტვის* (დისტრესის) ფაზა. მესამე ფაზის განვითარება დამოკიდებულია იმაზე, თუ ადაპტაციური ენერგიის რა მარაგი გააჩნია ორგანიზმს. გამოფიტვის სტადიაში თირკმელზედა ჯირკვლები წყვეტს გლუკოკორტიკოიდების გაძლიერებულ სეკრეციას, რომელიც თავის მხრივ, დაცვის ჰორმონებს წარმოადგენს, რასაც მოსდევს ორგანიზმის მდგომარეობის გაუარესება და დამძიმება [36; 37; 39].

მართალია, სტრესის დროს აქტიურდება ორგანიზმის მრავალი სისტემები, მაგრამ სტრეს-პასუხის ინტეგრაციაში განსაკუთრებული მნიშვნელობა თავის ტვინს აკისრია. კერძოდ,

სტრესზე კონტროლს და სხვადასხვა ნევროლოგიური/ფსიქიატრიული დაავადებების ექსპრესიას ემოციური ან ლიმბური სისტემის და სტრესის მაკონტრონტროლირებელი წრის (სტრეს-ღერძი) „ინტერფეისი“ განსაზღვრავს. მაგალითად, თუ სტრესზე კონტროლი ვერხერხდება ან ის ქრონიკულ ხასიათს იღებს, ორგანიზმში შეიძლება განვითარდნენ ფსიქიატრიული დარღვევები დეპრესიების, შფოთვის და სხვა ტიპის ემოციური მოშლილობების და შიზოფრენიის ჩათვლით. ამგვარად, ქრონიკული სტრესი ფსიქიატრიული დაავადებების უმნიშვნელოვანესი ტრიგერია [55].

სტრესი არღვევს რა ორგანიზმის ჰომესტაზს, იწვევს მთელ რიგ ცვლილებებს. მაგალითად, სხვადასხვა ფსიქო-სიციალური და ფიზიკური სტრესორების ზემოქმედებით ადგილი აქვს პერიფერიული სიმპატო-ადრენომედულარული და ცენტრალური მონოამინერგული სისტემისაქტივირებას. ლიმბური სისტემის ისეთი კომპონენტები, როგორიცაა ჰიპოკამპი, ამიგდალა და კორტექსი, მგრძნობიარეა ისეთი სტრესორების მიმართ, როგორიცაა შიში, შეზღუდვა და დაუცველობა გარემოსთან მიმართებაში. დადგენილია, რომ ლიმბური სისტემა და ჰიპოთალამუსი ის მთავარი კომპონენტია სტრესის პირობებში, რომელიც აკავშირებს ნეიროენდოკრინულ და ემოციურ კომპონენტებს და თავისთავად განსაზღვრავს სტრესის პასუხის ხანგრძლივობას და მაგნიტუდას [20].

სტრესის გამომწვევი უამრავი ფაქტორი არსებობს და ყველა ეს ფაქტორი *სტრესორის* სახელითაა ცნობილი. ეს ფაქტორები შესაძლებელია იყოს *გარეგანი* (გარემო არეს დაბინძურება, ემოციური პრობლემები, ახლობლის დაკარგვით გამოწვეული ტკივილი, ხმაური, ულტრაიისფერი გამოსხივება და სხვ.) ან *შინაგანი* (აუტოიმუნური დაავადებები, შაქრისა და ქოლესტერინის შემცველობის ცვლილება სისხლში, ალერგია, ჰორმონალური სტატუსის რღვევა, მინერალების ნაკლებობით გამოწვეული დეპრესია, ცუდი კვება და სხვ.) [39]. შესაბამისად, სტრესის სხვადასხვა ფორმა ერთმანეთისაგან განსხვავდება ორგანიზმში მიმდინარე ბიოქიმიური ცვლილებების მიხედვით. ამის მიხედვით განასხვავებენ რამდენიმე ტიპის სტრესს. ესენია

- ქრონიკული სტრესი, რომელიც ვითარდება ორგანიზმზე მუდმივი დაძაბულობის (ფიზიკური ან მორალური) საპასუხოდ, რაც იწვევს ძლიერ ზემოქმედებას ინდივიდზე;
- მწვავე სტრესი, რომელიც წარმოადგენს კონკრეტული მდგომარეობის, მაგალითად კონფლიქტის ან ჩხუბის შედეგს;

• ფიზიოლოგიური სტრესი , როგორც ძლიერი ფიზიკური დატვირთვის ან გარეგანი ფაქტორების (ტემპერატურა, ხმაური და ა.შ.) შედეგი;

• ფსიქოლოგიური სტრესი, რომელიც ვითარდება ინდივიდზე ფსიქოლოგიური ზემოქმედებით;

• ინფორმაციული სტრესი, რომელიც წარმოადგენს ჭარბი ინფორმაციული ნაკადის ან პირიქით, ინფორმაციული ნაკლებობის შედეგს [38].

მიუხედავად ასეთი მრავალფეროვნებისა, ნებისმიერი სტრესორის ზემოქმედებაზე ორგანიზმის საპასუხო რეაქციები თითქმის იდენტურია. მაგალითად, სტრესის შედეგად ერთ–ერთ პირველ რეაქციას წარმოადგენს თირკმელზედა ჯირკვლიდან კატექოლამინებისა და კორტიკოსტრეოიდების გამოყოფის გაძლიერება.

XX საუკუნის 80-იან წლებში სტრეს-ფაქტორთა სიას დაემატა ე.წ. სოციალური იზოლაცია. ინდივიდის იზოლაცია სოციალური მოვლენაა, რომლის დროსაც კონტაქტებისა და ურთიერთობების შეწყვეტის ან მკვეთრი შემცირების შედეგადად ხდება ინდივიდის ან სოციალური ჯგუფის მოწყვეტა სხვა ინდივიდებისგან. ამ პერიოდში ჩატარებული კვლევებით დადგინდა მსგავსიზემოქმედების უარყოფითი გავლენა ორგანიზმზე, მის ფუნქციონირებასა დასიკვდილიანობის მაჩვენებელზე. სოციალური იზოლაცია წარმოადგენს ერთდროულად პოტენციურ მიზეზს და სიმპტომს ემოციური და ფსიქოლოგიური პრობლემებისთვის. მიზეზად გვევლინება კომუნიკაციის უუნარობა გარე სამყარისთან. როგორც სიმპტომი, იზოლაციის პერიოდი შეიძლება იყოს ქრონიკული ან ეპიზოდური და დამოკიდებულია ამ ხასიათის ცვლილებების ფორმებზე [8; 28].

დადგენილია, რომ სოციალური იზოლაცია გავლენას ახდენს ორგანიზმის ფუნქციონირების სამ ძირითად მარეგულირებელ სისტემაზე, კერძოდ ნერვულზე, ენდოკრინულსა და იმუნურზე. ცნობილია, რომსოციალური იზოლაციით გამოწვეული სტრესის შედეგად ვითარდება მთელი რიგი შემეცნებითიფუნქციის დარღვევები, რასაც მოსდევს გარკვეული პათოლოგიური პროცესების განვითარება. მაგალითად, ქალებში სოციალური იზოლაციის შედეგად გაზრდილია ძუძუს კიბოს განვითარების ალბათობას.

სოციალური იზოლაცია არის ის ერთერთი ძირითადი რისკ-ფაქტორი, რომელიც ადამიანში დეპრესიის განვითარების მიზეზად გვევლინება და რასაც მოსდევს სოციალური სტიმულის დაქვეითება, რომელიც თავის მხრივ, ახალ სიტუაციებში ადაპტაციური რეაქციების წარმოქმნას განაპირობებს [27].

სტრესის განვითარების რისკ-ფაქტორს მიეკუთვნება ასევე ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევაც. ცირკადული რიტმის ცნება შემოიღო ამერიკელმა ფიზიოლოგმა ფრანც ჰალბერგმა. იგი მომდინარეობს ლათინური სიტყვიდან „ circa dies", რაც ნიშნავს „ დღის შესახებ". ცირკადული რიტმი რეგულირდება თავსი ტვინის ჰიპოთალამუსში, კერძოდ, სუპრაქიაზმატურ ბირთვში, რომელიც ამავე დროს არეგულირებს ძილ-ღვიძილის ციკლს და სხეულის ტემპერატურას [35]. ყველა ცოცხალი ინდივიდი განიცდის დღე-ღამის ბუნებრივი რიტმის ზემოქმედებას. იგი ცოცხალი სისტემის ორგანიზაციის უჯრედულ, ორგანოთა, ორგანიზმულ და პოპულაციურ დონეებზე ვლინდება [34]. სისხლის წნევა, მეტაბოლური პროცესები, გულისცემის სიხშირე, სხეულის ტემპერატურა და ჰორმონალური აქტივობა შინაგანი საათის მიხედვით იცვლება. გარდა ამისა, ცირკადული რიტმი არეგულირებს ათასობით გენის ექსპრესიას ქსოვილსპეციფიკური ეფექტებით და წარმოადგენ უჯრედული მეტაბოლიზმის ერთერთ მთავარი რეგულატორს როგორც სტრეს-ფატორების, ასევე სხვა მრავალი ფაქტორის ზემოქმედების საპასუხოდ. ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ცვლილებას შეუძლია გამოიწვიოს ისეთი პათოლოგიები, რომლებიც დაკავშირებულია კოგნიტურ და ქცევით დარღვევებთან, მეხსიერებისა და დასწავლის გაუარესებასთან და სხვა. აღსანიშნავია, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევა ხშირად აღინიშნება ისეთი ნეიროდეგენერაციული დაავადებების მქონე პაციენტებში, როგორიცაა ალცჰეიმერის დაავადება, პარკინსონის დაავადება, ჰანტინგტონის დაავადება და სხვა [57].

დადგენილია, რომ როგორც ინდივიდის იზოლაცია, ასევე მისი ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევა წარმოადგენს მძლავრ სტრეს-ფაქტორს, რომლის ზემოქმედების შედეგად ორგანიზმში აღინიშნება რიგი ჰორმონალური ცვლილებები, აგრესიისა და შფოთვის მატება, ასევე ადგილი აქვს დეპრესიის განვითარებას, რაც თავის მხრივ, ფსიქო-ემოციური სტრესის მიზეზი ხდება. სულ უფრო მეტი სამეცნიერო მონაცემი მიუთითებს ფსიქო-ემოციური სტრესის შედეგად ნორადრენერგული და სეროტონინერგული სისტემების ჰიპერაქტივაციასა და γ-ამინოერბომჟავაერგული (GABA) სისტემის ინჰიბიციაზე [59; 70].

სტრესის შედეგად უჯრედში განვითარებული ბიოქიმიური პროცესები ვლინდება ჰორმონალური და სასიგნალო მოლეკულების რაოდენობრივი ცვლილებებით, ასევე ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დარღვევით, მთელი რიგი ფერმენტული სისტემების აქტივობის შეცვლით, რასაც მოსდევს ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროცესის გაძლიერება,

ანტიოქსიდანტური სისტემის აქტივობის დაქვეითება და სხვა მნიშვნელოვანი სისტემების აქტივობის ცვლილება, რაც უარყოფითად აისახება ორგანიზმის ფუნქციურ მდგომარეობაზე.

I.2 სტრესი და ანტიოქსიდანტური სისტემა

ცნობილია, რომ ნებისმიერი სახის სტრესს შეუძლია ცოცხალ ორგანიზმში გამოიწვიოს მთელი რიგი მეტაბოლური პროცესების ცვლილება, რაც შესაბამისად გამოიხატება თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნით, უჯრედშიდა კალციუმის რაოდენობრივი ცვლილებებით, ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დაქვეითებით და სხვა მნიშვნელოვანი უჯრედული ცვლილებებით.

ორგანიზმში მიმდინარე მრავალ სასიცოცხლო პროცესთა შორის განსაკუთრებული ადგილი თავისუფალ რადიკალური ჟანგვას უკავია. თავისუფალი რადიკალი წარმოადგენს მოლეკულას, რომელსაც აქვს გაუწყვილებელი ელექტრონი გარე ელექტრონულ ორბიტალზე და ხასიათდება მაღალი რეაქციის უნარიანობით და მათი მუდმივი კონცენტრაცია უჯრედში ყოველთვის ძალიან ცოტაა.

ორგანიზმში თვისუფალი რადიკალები შეიძლება დავყოთ: ბუნებრივ და გარეშე ფაქტორებით წარმოქმნილ რადიკალებად. ამ უკანასკნელთა ინიცირება ხდება ფიზიკური და ქიმიური ფაქტორების მოქმედებით. მაგალითად, მაიონიზირებელი (რენტგენის სხივები) და ულტრაიისფერი რადიაცია (ფიზიკური) და ქსენობიოტიკები (ორგანიზმისათვის უცხო ქიმიური ნაერთი).

ბუნებრივი რადიკალები თავის მხრივ იყოფა: პირველად, მეორეულ და მესამეულ რადიკალებად (ანტიოქსიდანტების რადიკალები). პირველად რადიკალებს მიეკუთვნება სუპეროქსიდი (·OO-), ნიტროქსიდი (NO), უბიქინონი (·Q). სუპეროქსიდის მეტაბოლური გარდაქმნის შედეგად შეიძლება წარმოიქმნას აქტიური მოლეკულური ნაერთები: წყალბადის ზეჟანგი, ჰიპოქლორიდი და ლიპიდების ჰიდროზეჟანგი [46; 81; 82].

პირველადი რადიკალების ურთიერთქმედებისა და ცვლადი ვალენტობის მეტალების თანაობისას (განსაკუთრებით Fe^{2+}) წარმოიქმნება სხვადასხვა ტიპის რადიკალები, მაგალითად ჰიდროქსილის (·OH), ლიპიდის რადიკალი (L · LOO·) და სხვა, რომლებიც წარმოადგენენ მეორეულ რადიკალებს. ეს უკანასკნელნი სახიფათოა ორგანიზმისთვის. ისინი წარმოიქმნებიან პირველადი რადიკალების უკონტროლო ზრდითა და მათი შემდგომი მოდიფიცირებით [4; 83].

თავისუფალი რადიკალების ჭარბი რაოდენობა აზიანებენ ცილებს, თავისუფალ ამინომჟავეებს, ლიპიდებს, ლიპოპროტეინებს, ნუკლეინის მჟავეებს, იწვევენ ლიპიდების ზეჟანგვით დაჟანგვას, რაც ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას, უჯრედის დაზიანებას და და საბოლოოდ ორგანიზმის დაღუპვას იწვევს [33]. უჯრედის დაღუპვის მიზეზი ლიპიდების პეროქსიდაციის დროს ხდება წარმოქმნილი თავისუფალი რადიკალების სიჭარბე, რომლებიც აზიანებენ უჯრედულ სტრუქტურებს, განსაკუთრებით მემბრანას და იწვევს მისი ფუნქციონირების ცვლილებას. აღსანიშნავია, რომ პეროქსიდაციის პროცესი ორგანიზმში მუდმივად მიმდინარეობს, რასაც განსაკუთრებული მნიშვნელობა გააჩნია, ვინაიდან მისი საშუალებით ხდება დაბერებული და დაავადებული უჯრედებისა და მოლეკულების დაშლა და მათი დაგროვების აცილება, თუმცა იმ შემთხვევაში, როცა ეს პროცესები განსაკუთრებით აქტიურდება, ადგილი აქვს ე.წ. *ოქსიდაციური სტრესის* გააქტიურებას და განვითარებას.

ორგანიზმში მუდმივად მიმდინარეობს თავისუფალ-რადიკალური პროცესები და შესაბამისად, აღნიშნული რეაქციების ხელშემწყობი ფაქტორების ანუ *პროოქსიდანტური სისტემის* გაძლიერება, იწვევს ორგანიზმის ჰომეოსტაზის მოშლას, რაც მრავალი პათოლოგიის ჩამოყალიბების საწინდარია. აღნიშნული ნეგატიური მოვლენის თვიდან აცილების მიზნით ორგანიზმში ჩამოყალიბებულია მძლავრი *ანტიოქსიდანტური სისტემა*, რომელიც არეგულირებს უჯრედში თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის ინტენსივობას და ამ უკანასკნელების მომატების შემთხვევაში, ახდენს აქტიური რადიკალების გაუვნებელყოფას და ორგანიზმის დაცვას. ცოცხალი სისტემის ანტიოქსიდანტური სისტემა წარმოდგენილია ფერმენტული და არაფერმენტული კომპონენტებით, რომლებსაც შეუძლიათ მოახდინონ ჭარბი რაოდენობის აქტიური რადიკალების დაჭერა და მათი განეიტრალება. ნორმაში პროოქსიდანტური და ოქსიდანტური სისტემის აქტივობა წონასწორობაშია. ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტებია სუპეროქსიდდისმუტაზა (სოდ), კატალაზა, გლუტათიოდამოკიდებული პეროქსიდაზები და სხვ.

სუპეროქსიდდისმუტაზა წარმოადგენს ანტიოქსიდანტური სისტემის ძირითად ფერმენტს, რომელიც ახდენს პეროქსიდაციის პროცესში წარმოქმნილი სუპეროქსიდის დისმუტაციას ჟანგბადად და წყალბადის ზეჟანგად და ამდენად იგი გვხვდება პრაქტიკულად ყველა უჯრედში.

$$O^{2-} + O^{2-} + 2H^{+} \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

ცნობილია სოდ-ის 4 ძირითადი ტიპი, რომლებიც განსხვავდებიან ლოკალიზაციითა და კოფაქტორის მიხედვით. მაგნიუ-დამოკიდებული სოდ (MnSOD) ძირითადად

ლოკალიზირებულია მიტოქონდრიის მატრიქსში, Cu/Zn-დამოკიდეგული სოდ (Cu/ZnSOD) გვხვდება ეუკარიოტული უჯრედების ციტოზოლში, რკინა-დამოკიდებული იზოფორმა (FeSOD) წარმოადგენს მცენარეული უჯრედის ციტოზოლურ ფორმას, ხოლო ექსტრაცელულარული (ECSOD) ფორმა - ძუძუმწოვრების სითხეებში ან მემბრანაში. Cu/ZnSOD მკვეთრად განსხვავდება MnSOD-ის ან FeSOD -გან. Cu/ZnSOD დიმერული ფერმენტია, რომელიც ორი სუბერთეულითაა წარმოდგენილი (თითოეული მათგანი 16კდალტონი) და შეიცავს 153 ამინომჟავურ ნაშთს. სუბერთეულების დისოციაცია გამოწვეულია მოლეკულის შიგნით არსებული HS-ჯგუფების ალკილირებით ან თუთიისა და სპილენძის იონების გამოდევნით. Cu/ZnSOD-ის გენის ექსპრესია მიიღწევა ოქსიდაციური სტრესის მედიატორებით ან სულფჰიდრილური ანტიოქსიდანტებით და ასევე ინტერლეიკინი 1-ით და სიმსივნის ნეკროზის ფაქტორით [32; 56; 65].

კატალაზა წარმოადგენს ასევე ანტიოქსიდანტურ ფერმენტს, რომელიც აკატალიზირებს ბიოლოგიური ჟანგვის შედეგად წარმოქმნილი წყალბადის ზეჟანგის დაშლას $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$. ფერმენტი გვხვდება ყველა ტიპის ორგანიზმში და აქტიურადაა ჩართული ქსოვილოვანი სუნთქვის პროცესში. ქიმიური აგებულებით წარმოადგენს ჰემოპროტეინს, რომელიც შედგება ოთხი იდენტური სუბერთეულისაგან, სადაც თითოეული მათგანი პროსთეტული ჯგუფის სახით შეიცავს სამვალენტია რკინას (Fe^{3+}). ფერმენტის ცილოვანი ნაწილი სახეობრივად სპეციფიკურია [71].

*გლუტათიონპეროქსიდაზა (*GPx*)* ასრულებს კატალიზატორის როლს ლიპიდების პეროქსიდაციის პროცესში წარმოქმნილი ზეჟანგის განეიტრალებაში აღდგენილი გლუტათიონის დახმარებით, რომელიც რეაქციის პროცესში იჟანგება. იგი კატალაზას ანალოგიურად ახდენს ზეჟანგის განეიტრალებას, თუმცა ამ უკანასკნელისაგან განსხვავებით გაცილებით მგრძნობიარეა წყალბადის ზეჟანგის დაბალი კონცენტრაციების მიმართ. ზოგიერთ ქსოვილში (გული, თავის ტვინი), სადაც განსაკუთრებით დაბალია კატალაზას აქტივობა, გლუტათიონპეროქსიდაზა ასრულებს ძირითადი ანტიოქსიდანტური ფერმენტის როლს. რეაქციის შედეგად წარმოქმნილი დაჟანგული გლუტათიონი მყისიერად აღდება მეორე ფერმენტის - *გლუტათიორედუქტაზას* დახმარებით, რომელიც რეაქციისათვის იყენებს პენტოზოფოსფატური ციკლის დროს წარმოქმნილ $NADPH_2$-ს.

$$2G\text{-}SH + H_2O_2 \quad GS\text{-}SG + 2H_2O$$

$$GS\text{-}SG + NADPH + H^+ \quad 2G\text{-}SH + NADP^+$$

ასეთი პროცესის შედეგად დაჟანგული ლიპიდები მთლიანად აღდებიან ან გარდაიქმნებიან ნაკლებად ტოქსიკურ ნაერთებად, რაც იცავს უჯრედის გარსის ლიპიდებს თავისუფალი რადიკალების მოქმედებისაგან. GPx, ისევე როგორც სოდი, წარმოადგენს მეტალოფერმენტს, რომლის თითოეული მოლეკულის წარმოქმნისათვის აუცილებელია 4 ატომი სელენის (Se) არსებობა. სელენის არ არსებობისას ადგილი აქვს მეორე ფერმენტის გლუტატიონ-S-ტრანსფერაზას წარმოქმნას, რომელიც მიუხედავად იმისა, რომ წარმოადგენს მნიშვნელოვან ფერმენტს, ვერ ასრულებს GPx-ს ფუნქციას. ცნობილია GPx-ს რამდენიმე იზოფორმა, რომლებიც სხვადასხვა გენების მოქმედების პროდუქტს წარმოადგენენ და ახასიათებს მაღალი ხარისხის ქსოვილსპეციფიკურობა [11].

ორგანიზმიზმის ანტიოქსიდანტური სისტემა ანტიოქსიდანტური ფერმენტების გარდა, წარმოდგენილია ასევე ზოგიერთი ნაერთითა და მინერალით, რომლების ასევე აქტიურად არიან ჩართული ანტიოქსიდანტური სისტემის ფუნქციონირებაში. ასეთ ნაერთებს მიეკუთვნება ასევე ზოგიერთი ვიტამინი, მაგალითად ტოკოფეროლი (ვიტამინი E), ასკორბინის მჟავა (ვიტამინი C), ვიტამინი A (რეტინოლი) და კაროტინოიდები. ამ ვიტამინების მოქმედების ხასიათი განსხვავებულია. მაგალითად ვიტამინი E, რომელიც უჯრედის მემბრანში „ჩაშენებით“ თავიდან იცილებს უჯრედზე თავისუფალი რადიკალების შემოტევას და მათ დამაზიანებელ ეფექტს. იგი ასევე აჩერებს ზეჟანგურ პროცესებს და ასტაბილიზირებს უჯრედშიდა პროცესებს. ეს ანტიოქსიდანტი ანელებს დაბერების პროცესს და ხელს უწყობს რიგი დაავადებების ჩამოყალიბების შეჩერებას. ისეთი ანტიოქსიდანტი, როგორიცაა ვიტამინი C, თავის მხრივ ხელს უშლის თავისუფალი რადიკალების მოქმედებას წყლიან გარემოში. მისი დეფეციტი პირველ რიგში აისახება იმუნური სისტემის ფუნქციონირებაზე.

ანტიოქსიდანტური სისტემის ფუნქციონირებაში განსაკუთრებული მნიშვნელობა ენიჭება სხვადასხვა ანტიოქსიდანტურ მინერალებს. მაგალითად სელენი, რომელიც გლუტატიონპეროქსიდაზას აქტიური ცენტრის შემადგენელი კომპონენტია, უზრუნველყოფს ბიოლოგიური მემბრანების დაცვას თავისუფალი რადიკალების ზემოქმედებისაგან. სელენის ანალოგიურად, ანტიოქსიდანტური თვისებებით გამოირჩევა თუთია, რომელიც მრავალი ფერმენტის (დაახლოებით ასი ფერმენტი) შემადგენელი კომპონენტია. უწყობს რა ხელს დნმ-ისა და რნმ-ის რეპლიკაციას, იგი აქტიურადაა ჩართული ახალი უჯრედების წარმოქმნის პროცესში. ანალოგიური როლი ენიჭება სპილენს, რომელიც ასევე სხვადასხვა ფერმენტის, მათ შორის სოდ-

ის კომპონენტია და მისი ქრონიკული დეფიციტი აქვეითებს ორგანიზმის წინააღმდეგობის უნარს სხვადასხვა ტიპის ინფექციების მიმართ.

I.3 სტრესი და ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი

ცნობილია, რომ ყველა უჯრედი ცხოველქმედებისათვის საჭიროებს ენერგიას, რომლის ძირითად წყაროს წარმოადგენს ატფ. ნორმალურ პირობებში ატფ-ის 95% სინთეზირდება მიტოქონდრიაში ჟანგვითი ფოსფორილირების გზით. დარჩენილი 5% წარმოიქმნება გლიკოლიზის შედეგად. უჯრედის ყოველგვარი აქტივობა ხორციელდება ატფ-ის ჰიდროლიზის შედეგად გამონთავისუფლებული ენერგიის ხარჯზე [40; 58].

ატფ-ს ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაში მთავარი როლი კრეატინ/კრეატინკინაზა/ფოსფოკრეატინის (Cr/CK/PCr) სისტემას ენიჭება. ეს სისტემა კრეატინკინაზული სისტემის სახელწოდებითაა ცნობილი და განსაკუთრებით აქტიურია ნერვულ და კუნთოვან ქსოვილში. Cr სისტემა სწრაფად და დინამიურად აღადგენს დახარჯული ატფ-ს დონეს, პროცესი მიტოქონდრიული აერობული მეტაბოლიზმის გვერდის ავლით მიმდინარეობს. რეაქციას ფერმენტი კრეატინკინაზა ახორციელებს. ეს სისტემა მიჩნეულია უჯრედის ფუნქციონირების მნიშვნელოვან მეტაბოლურ რეგულატორად, რომლის მოშლა მთელი რიგი პათოლოგიის განვითარების მიზეზი შეიძლება გახდეს. ამ სისტემის ეფექტიანი მუშაობა ფერმენტ კრეატინფოსფოკინაზას მოქმედებაზეა დამოკიდებული და ხორციელდება კრეატინსა (შეუცვლელი ბუნებრივი ნივთიერება, რომელიც ადამიანის და ცხოველის კუნთებში ინახება და საჭიროა ენერგეტიკული მიმოცვლისთვის და ამასთან იგი კუნთების ენერგიის წყაროა) და ფოსფოკრეატინს შორის მიმდინარე ტრანსფოსფორილირების საშუალებით [28].

აღსანიშნავია, რომ CK-ს აქტივობის დაქვეითება განიხილება, როგორც ასაკთან დაკავშირებული ნეიროდეგენერაციული დაავადებების მნიშვნელოვანი მარკერი და მისი ფუნქციონირების დარღვევა წარმოადგენს ერთ-ერთ საკვანძო საფეხურს ნეიროდეგენერაციული ცვლილებების გზაზე.

ექსპერიმენტულად ნაჩვენებია, რომ ხანგრძლივი სტრესის შედეგად თავის ტვინში ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი მცირდება. ეს გამოიხატება ამ პროცესში მონაწილე ფერმენტების (სუქცინატდეჰიდროგენაზა, ფუმარაზა, აკონიტაზა, ალდოლაზა) და Cr/CK/PCr სისტემის აქტივობის დაქვეითებით.

I.4 კრეატინი

კრეატინი წარმოადგენს ნიტროგენულ ორგანულ მჟავას. იგი ძირითადად ღვიძლში, პანკრეასსა და თირკმელში სინთეზირდება და შემდეგ სისხლის მიმოქცევის სისტემის მეშვეობით ტვინს, გულს, კუნთს და სხვა ორგანოებს მიეწოდება.

კრეატინის დამატებითი წყაროა ხორცეული და თევზეული საკვები. ვინაიდან სისხლი კრეატინს მიკრომოლარული რაოდენობით შეიცავს (10-50 მიკრომოლი), ხოლო მისი შიდაუჯრედული კონცენტრაცია ათობით მილიმოლს აღწევს (5-25 მილიმოლი), ბუნებრივია კრეატინის უჯრედში შეღწევა მხოლოდ აქტიური სატრანსპორტო მექანიზმის საშუალებითაა შესაძლებელი. ამ პროცესს აწარმებს სპეციალური სატრანსპორტო ცილა - კრეატინის ტრანსპორტერი (შემოკლებით CrT).

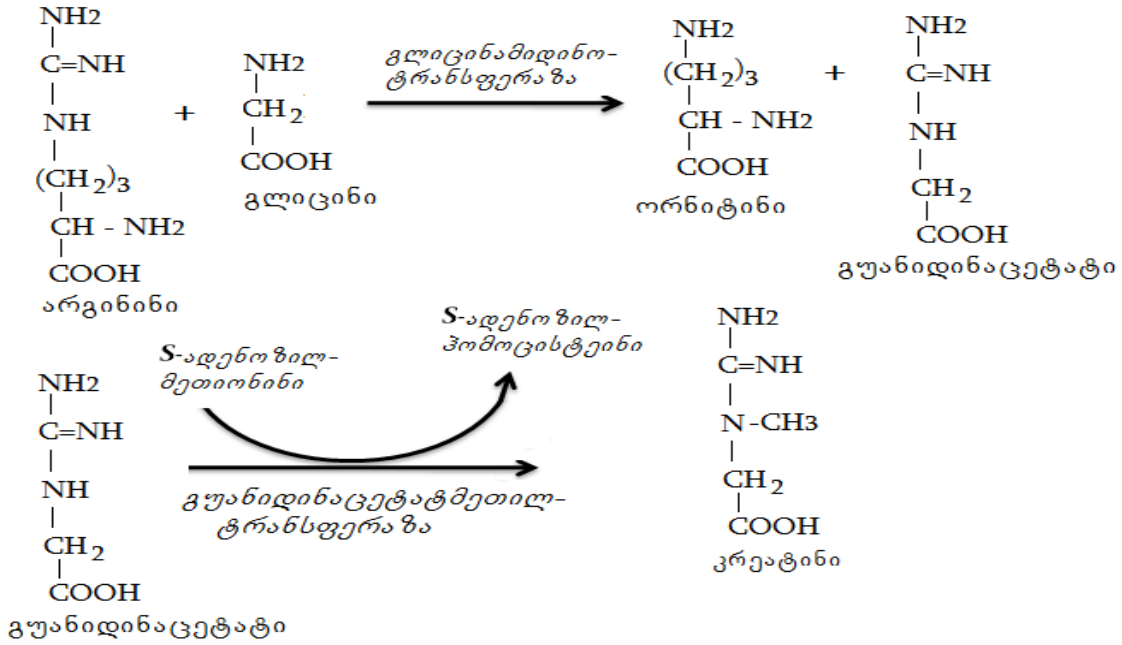
ენერგეტიკული ფუნქციის გარდა, Cr სავარაუდოდ სხვა ფუნქციებსაც ასრულებს, მათ შორის ნერვული იმპულსის გადაცემა, მემბრანული პოტენციალისა და იონური გრადიენტის შენარჩუნება, უჯრედშიდა სიგნალების გადაცემა, აქსონალური და დენდრიტული ტრანსპორტი და ცნს-ის მიმდინარე სხვა მნიშვნელოვანი პროცესები. ლიტერატურული მონაცემების გათვალისწინებით, კრეატინი ასევე შესაძლებელია განიხილული იქნას როგორც ნეირომოდულატორი, რომელსაც შეუძლა მოახდინოს ზოგიერთი პოსტსინაფსური რეცეპტორების მოდულირება. მიღებულია მონაცემები, რომლებიც მიუთითებს Cr-ის მნიშვნელობას ფსიქომოტორული განვითარებისა და შემეცნებითი ფუნქციების რეალიზირების და ემბრიონულ განვითარების პროცესშიც. მისი დეფიციტი ცნს-ში უარყოფითად აისახება ტვინის ფუნქციონირებაზე და ზოგიერთი ნეიროდეგენერაციული დაავადებების თანხვედრ მოვლენას წარმოადგენს. ანალოგიური თვისებები ახასიათებს Cr-ს ზოგიერთი ფსიქიატრიული დაავადებებისადმისადმიც, მაგალითად, ეპილეფსიის, შიზოფრენიის, ფსიქოლოგიური სტრესის მიმართაც [9].

ითვლებოდა, რომ ტვინის Cr ძირითადად პერიფერიული წარმოშობისაა. თუმცა მის სინთეზში მონაწილე ფერმენტების L-არგინინი:გლიცინ-ამიდინოტრანფერაზას (AGAT) და გუანიდინოაცეტატმეთილტრანსფერაზას (GAMT) ცნს-ში არსებობა ადასტურებს, რომ ტვინს შეუძლია მოახდინოს Cr -ის ენდოგენური სინთეზი . ამავე დროს, კრეატინის სპეციფიკური ტრანსპორტერი SLC6A8 საშუალებას იძლევა მოხდეს მისი იმპორტი ჰემატოენცეფალური ბარიერის (BBB) გავლითაც.

Cr-ის რაოდენობრივ შემცველობაზე გავლენას ახდენს სხვადასხვა ფაქტორები. კერძოდ, თავის ტვინის ფუნქციური მდგომარეობა, ნეიროდეგენერაციული პროცესები, ოქსიდაციური სტრესი და მისი შედეგები და ასევე CK აქტივობა, რომლის ცვლილება შეინიშნება ცნს-ის მთელი რიგი დაავადებისას

აღნიშნული სატრანსპორტო ცილის მოქმედება ნატრიუმისა და ქლორის იონურ ტუმბოსთანაა შეუღლებული. ტუმბოს მიერ უჯრედში გადატანილი ნატრიუმის ყოველ ორ იონზე კრეატინის თითო მოლეკულის თანატრანსპორტი ხდება. ამდენად CrT-ის ფუნქციაა სისხლიდან კრეატინის უჯრედში გადაქაჩვა, რაც კონცენტრაციული გრადიენტის საწინააღმდეგოდ ხორციელდება. უჯრედში კი კრეატინი ფერმენტ კრეატინკინაზას სუბსტრატს წარმოადგენს და ფოსფორილირების შედეგად ფოსფოკრეტინად გარდაიქმნება.

უჯრედში კრეატინის ბიოსინთეზი ორსაფეხურიანი პროცესია. რეაქციის პირველ საფეხურზე არგინინიდან ფერმენტ *L-არგინინ:გლიცინამიდინოტრანსფერაზის (AGAT)* მიერ ამინომჟავა გლიცინის ამიდინირება ხდება. რეაქციის შედეგად L-ორნიტინი და გუანიდინოაცეტატის მჟავა (GAA) მიიღება. ბიოსინთეზის მეორე და საბოლოო საფეხურზე GAA-ის მეთილირებით ფერმენტ *S-ადენოზილ-L-მეთიონინ-N-გუანიდინოაცეტატ:მეთილტრანსფერაზის (GAMT)* მონაწილეობით წარმოიქმნება კრეატინი.



კრეატინის სინთეზის მიმდინარეობა უჯრედში

კრეატინის ნორმალურ მეტაბოლიზმს კრიტიკული მნიშვნელობა გააჩნია ცოცხალი სისტემის ნორმალური ფუნქციონირებისთვის. Cr/CK/PCr სისტემისა და კრეატინის მეტაბოლიზმის დარღვევები აღინიშნება შემდეგი ტიპის დაავადებების დროს როგორიცაა: კუნთოვანი დისტროფია, ჰიპოქსიურ-იშემიური ენცეფალომიოპათია და სხვ.ზოგიერთ ამ დაავადებას კრეატინის ცხადად გამოხატული დამცველობით-პროფილაქტიკური ეფექტი ახასიათებს. ის წარმოადგენს მეტაბოლური სტრესით, გლუტამატის ტოქსიკურობითა და ჟანგვითი დაზიანებით გამოწვეული უჯრედების კვდომის თავიდან აცილების საკმაოდ ეფექტურ საშუალებას. თუ რა გზით მიმდინარეობს ეს პროცესი დღემდე გაურკვეველია [23].

I.5 სტრესი და კრეატინით პრევენცია

სტრესი თანამედროვეობის გლობალური პრობლემაა, რომელიც მჭიდროდაა დაკავშირებული ინდუსტრიალიზაციის პროცესთან. როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, სტრესს შეუძლია გამოიწვიოს ან მნიშვნელოვნად გააღრმავოს ადამიანის ისეთი დაავადებები, როგორიცაა გულ-სისხლძარღვთა, იმუნური სისტემისა და ნეიროდეგენერაციული პროცესები, ასევე ავთვისებიანი სიმსივნეები და სხვა. ბოლო წლებში აქტიური ყურადღება ექცევა ისეთი ნივთიერებების მოძიებას, რომლებსაც შესწევთ უნარი მოახდინონ სტრესული მდგომარეობის პრევენცია. მათ შორის აქტიურად განიხილება კრეატინი, რომელიც ასრულებს მნიშვნელოვან როლს უჯრედების ენერგეტიკული მოთხოვნილების დაკმაყოფილების პროცესში. გარდა ამისა, იგი ცნს-ში სხვა ფუნქციებსაც ასრულებს, მათ შორის განიხილება ნერვული იმპულსის გადაცემა სინაფსებში, იონური გრადიენტის შენარჩუნება, უჯრედშიდა სიგნალების გადაცემა და სხვა.

მრავალი კვლევების შედეგად დასტურდება მისი ანტიოქსიდანტური ეფექტიც . მაგალითად, არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ in vitro სისტემაში კრეატინი ბოჭავს თავისუფალ რადიკალებს, იცავს მიტოქონდრიულ დნმ-ს ოქსიდაციური დაზიანებისგან; ასევე ახორციელებს იმ ფერმენტების up-რეგულაციას, რომლებიც ჩართული არიან უჯრედში დაჟანგვითი პროცესების წინააღმდეგ ბრძოლაში. პაციენტები, რომელთაც აღენიშნებათ კრეატინის დეფიციტი, მათ ორგანიზმში მკვეთრად მატულობს ოქსიდაციური სტრესი.

არსებობს ჰიპოთეზა, რომ კრეატინს შეუძლია სუპეროქსიდ-ანიონის შებოჭვა, ასევე პეროქსინირტიტის, ლიპიდური პეროქსიდებისა და ჰიდროპეროქსიდის. თუმცა ცდებით

დადგინდა, რომ მას არ შეუძლია მნიშვნელოვნად შეამციროს ჰიდროპეროქსიდი და ლიპიდური პეროქსიდები.

კრეატინის უნარი გააუმჯობესოს ანტიოქსიდანტური ეფექტი ვლინდება იმაშიც, რომ მის წინამორბედ არგინინს გააჩნია დამცველობითი როლი ოქსიდაციური სტრესის დროს ლიპოპროტეინების დაჟანგვის შეზღუდვით ენდოთელურ უჯრედებში. ასევე დამატებითი მონაცემები გვიჩვენებს, რომ არგინინს შეუძლია დათრგუნოს თავისუფალი რადიკალები. არსებობს ჰიპოტეზაც, რომ კრეატინმა და არგინინმა შეიძლება გააუმჯობესოს კარდიოვასკულარული დაავადებების მკურნალობა, თუმცა ეს მოსაზრება ჯერ კიდევ არ არის შესწავლილი და შესაძლოა მომავალში შესწავლის საკითხი გახდეს.

მეცნიერებმა კრეატინის პოტენციური ანტიოქსიდანტური ეფექტი განსაზღვრეს სხვადასხვა უჯრედული კულტურის შტამებზე, როგორიცაა ადამიანის პრომონოციტი, ენდოთელური უჯრედები და კუნთოვან მიობლასტომა. ისინი აკვირდებოდნენ ციტოტოქსიურ ეფექტს გამოწვეულს ოქსიდანტური აგენტებით. შედეგებით დადგინდა, რომ უჯრედული დაცვა დაკავშირებული იყო უჯრედშიდა თავისუფალი კრეატინის შემცველობასთან, განსხვავებით ფოსფოკრეატინის დონისაგან.

ასევე მეცნიერი გუიდი აფასებდა კრეატინის ანტიოქსიდანტურ ეფექტს მუტაგენეზთან მიმართებაში. მათ დაადგინეს, რომ კრეატინის დამატებამ გამოავლინა სპეციფიკური გენოპროტექტორული აქტივობა მიტოქონდრიულ დნმ-ში და უზრუნველყოფს გენომის სტაბილურობას. კრეატინს შეუძლია მონაწილეობა მიიღოს მიტოქონდრიული ფუნქციების შენარჩუნებაში, როგორიცაა ჟანგბადის მოხმარება, ატფ-ს გენერაცია და საბოლოოდ, უჯრედის გადარჩენა.

არსებობს რამდენიმე კვლევა, რომელიც ცდილობდა შეემოწმებინა კრეატინის ეს ეფექტი იმ შემთხვევაში, როცა მოქმედებს სტრეს-ფაქტორი, რომელიც ზრდის ოქსიდანტური აგენტების წარმოქმნას. დემინიკმა და ჯორდაომ დაადგინეს, რომ კრეატინის დამატებამ შეძლო შეემცირებინა ოქსიდაციური სტრესის მარკერები პლაზმასა და კუნთში.

აღმოჩნდა, რომ კრეატინის დამატებამ კუნთების დისტროფიის მქონე პაციენტებში, რომლებსაც აღენიშნებათ ცილის სინთეზისა და ზრდის შემცირება ჩონჩხის მიოფიბრილების დეგრადაციის გამო, გაზარდა ხელის მოჭერის ძალა და სხეულის მასა. თუმცა არსებობს მოსაზრებაც, რომ ჩონჩხის კუნთების მიერ კრეატინის შეწოვა საკმარისად არ ხდება, რაც ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზეც აისახება.

კრეატინი დადებით ეფექტს ახდენს ნეირომუსკულატორული და ნეიროდეგენერაციული დაავადების მიმდინარობაზე. ასევე გამოიყენება ართრიტისა და დეპრესიის მკურნალობაში. ექსპერიმენტებში პარკინსონით დაავადებულ ვირთაგვებში ეგზოგენურად შეყვანილი კოენზიმი Q და კრეატინის კომბინაცია იცავს ნეირონებს დაზიანებისაგან. ალცჰაიმერის დაავადების შემთხვევაში კრეატინი იცავს ჰიპოკამპის ნეირონებს ბეტა-ამილოიდის ტოქსიკური ეფექტისგან და შესაბამისად ამცირებს ამილოიდური ფოლაქების წარმოქმნას. ამიოტროფული სკლეროზისას კრეატინის დადებითი ეფექტი ვლინდება ოქსიდაციური სტრესის შემცირებაში. კლინიკური ცდები ადასტურებს, რომ კრეატინის მოხმარებით იზრდება კუნთების სიმტიცე და ძალა, კლებულობს დაღლილობის შეგრძნება. ჰანტინგტონის დაავადებისას იგი აქვეითებს ლაქტატის დონეს, აუმჯობესებს სხეულის წონას , მოტორულ ფუნქციებს და აფერხებს ტვინში მიმდინარე ატროფიულ პროცესებს [6; 23; 41].

თავი II. კვლევის ობიექტები და მეთოდები

II.1 კვლევის ობიექტი

ექსპერიმენტები ტარდებოდა მამრობითი სქესის, თეთრ, ლაბორატორიულ 45 ვირთაგვებზე, რომლებიც დაყოფილი იყვნენ სამ ჯგუფად (თვითოეულ ჯგუფში 15 ვირთაგვა). I ჯგუფს შეადგენდა საკონტროლო G1 ჯგუფის ვირთაგვები, რომლებიც მოთავსებულნი იყვნენ ერთად, საერთო გალიაში, ჩვეულებრივ პირობებში (თანაფარდობა სიბნელესა და სინათლეს შორის შეადგენდა 10.00/14.00სთ.). G2 ჯგუფის ინდივიდებს წარმოადგენდა ასევე 15 ვირთაგვა, რომლებიც სოციალური იზოლაციის მიზნით განთავსებული იყვნენ ინდივიდუალურ გალიებში, სიბნელის პირობებში (თანაფარდობა სიბნელესა და სინათლეს შორის შეადგენდა 23.5სთ/0.5სთ.). ცხოველები იმყოფებოდნენ სრულ მხედველობით იზოლაციაში.G3 ჯგუფის ინდივიდები, ასევე იმყოფებოდნენ სოციალურ იზოლაციასა და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში, თუმცა სტრესის პარალელურად, ინტრაპერიტონიალურად მიეწოდებოდათ 140მგ/კგ კრეატინი. არც ერთი ჯგუფისათვის ყნოსვა და სმენა შეზღუდული არ იყო. ცხოველებს საკვები და წყალი ეძლეოდათ შეუზღუდავად. ასეთ პირობებში ვირთაგვები იმყოფებოდნენ 30 დღის განმავლობაში, რის შემდგომაცსამივე ჯგუფის ვირთაგვებს ვაძინებდით ქლოროფორმით და ვახდენდით მათ დეკაპიტაციას.

II.2. სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობის განსაზღვრა

მეთოდის პრინციპი მდგომარეობს ნიტროლურჯი ტეტრაზოლიუმის აღდგენის რეაქციის შებოჭვის ხარისხის განსაზღვრაში[69].

3 მლ საინკუბაციო არეს, რომელიც შეიცავდა ნიტროლურჯ ტეტრაზოლიუმს (0.41 mM), EDTA-ს (0.33 mM) და მეთილფენაზოლსულფატს (0.01 mM; pH=8.3), ვუმატებდით 0.02 მლ საკვლევ სუსპენზიას.

შემდგომ ეტაპზე ვსაზღვრავდით მიღებული ხსნარის შუქშთანთქმის სიდიდეს სპექტოფოტომეტრულად (λ=540 ნმ), რის შემდეგაც ვუმატებდით 0.1 მლ ნადH-ის ხსნარს (0.8 mM), ვურევდით და ვახდენდით ინკუბაციას 20´-ის განმავლობაში (t=37°C).

ინკუბაციის შემდეგ ვსაზღვრავდით ხსნარის შუქშთანთქმას სპექტროფოტომეტრულად (λ=540 ნმ).

რეაქციის ინტენსივობაზე ვმსჯელობდით I და II მაჩვენებელს შორის სხვაობით და ფერმენტული აქტივობას ვადგენდით ფორმულებით:

$$T\% = \frac{E_0 - E_{20}}{E_{20}} \times 100\%$$

$$A_{\text{აქტივობა}} = \frac{T\%}{100\% - T\%}$$

ფერმენტ სუპეროქსიდდისმუტაზას კატალიზურ აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა).

II.3. კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი დამყარებულია წყალბადის ზეჟანგის (H_2O_2) თვისებაზე, წარმოქმნას მოლიბდატის მარილებთან მყარი ფერადი კომპლექსი[46]. ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე 0.1 მლ საკვლევ მასალას (100 მგქსოვილი/1 მლტრის-HCl (0.05 M), pH=7.8) ვუმატებდით 2 მლ წყალბადის ზეჟანგს (0.03%), ხოლო ბრმა ცდისთვის განკუთვნილ სინჯარაში საკვლევი მასალის ნაცვლად შეგვქონდა 0.1 მლ დისტილირებული წყალი. მიღებულ ნარევს ვაყოვნებდით 10 წუთი, რის შემდეგაც, ვახდენდით რეაქციის შეჩერებას 1 მლ ამონიუმის მოლიბდატის 4% -იანი ხსნარის დამატებით და წარმოქმნილ შეფერილობას ვსაზღვრავდით სპექტოფოტომეტრულად (λ=410 ნმ).

საკონტოლო სინჯარაში წყალბადის ზეჟანგის ნაცვლად შეგვქონდა 2 მლ დისტილირებული წყალი. ფერმენტის აქტივობას ვითლიდით ფორმულით:

$$E = (A_{\text{ბრმა ცდა}} - A_{\text{ცდა}}) \times V \times t \times K \ (\mu kat/L)$$

სადაც:

E - ფერმენტის აქტივობაა
Aბრმა ცდა - შუქშთანთქმის სიდიდე ბრმა ცდისთვის
Aცდა -შუქშთანთქმის სიდიდე ცდისთვის
V - შეტანილი ნიმუშის მოცულობა (0.1 მლ)
t - ინკუბაციის დრო (10 წთ)
K - წყალბადის ზეჟანგის მილიმორალური კოეფიციენტი (22.2 x 10^3 mM-1 x cm^{-1}).

ფერმენტ კატალაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა).

II.4. გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობის განსაზღვრა

გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობის განსასაზღვრავად გამოვიყენეთ კიტი(Glutathione Reductase Assay Kit, Sigma-Aldrich), რომლის რეაქტივებით სფექტროფოტომეტრულად ისაზღვრება გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობა. აღსანიშნავია, რომ შემდგომო აბსორბციის შემცირების მიზეზი არის NADPH-ს დაჟანგვა 340 ნმ ტალღის სიგრძეზე ან აბსორბციის გაზრდა განპირობებულია დითიობის (2-ნიტრობენზოლის მჟავა) გარდაქმნით 412 ნმ ტალღის სიგრძეზე (კოლორიმეტრული კიტი).

II.5. აზოტის ჟანგის რაოდენობის განსაზღვრა

NO-ის შემცველობას ჰიპოკამპის უჯრედებში განსაზღვრული იყო მირანდასა და სხვ. მეთოდი [60]. ამისათვის ჰიპოკამპის ჰომოგენატის ყოველ 100 µl ემატებოდა თანაბარი რაოდენობის 0.3 M-ის NaOH. მიღებულ ნარევს ვანჯღრევდით ოთახის ტემპერატურაზე 5წთ-ის განმავლობაში. ნარევს ემატებოდა 100 µl 5%-იანი ZnSO4 დაკვლავ ვანჯღრევდით 5 წთ-ის განმავლობაში. ამ დროის გასვლის შემდგომ მიღებული ნარევი ცენტრიფუგირდებოდა 3000ბრ.წთ-ის სიჩქარეზე 15 წთ-ის განმავლობაში. ყოველ 100 µl სუპერნატანტს ემატებოდა 200 µl გრისის რეაქტივი. გრისის რეაქტივი მზადდება ცდის წინ და შეიცავს 0.5 M HCl-ზე დამზადებულ VCl3-სადა 0.1%-იან სულფამიდამიდს. საკონტროლო სინჯარა შეიცავდა ყველა რეაქტივს, თუმცა ჰომოგენატის მაგივრად სარეაქციო არეში შეტანილი იყო 100 µl დისტილირებული წყალი. მიღებული ნარევი ყოვნდებოდა 30წთ 37°C-ზე და შეფერილი ხსნარი იზომებოდა 540ნმ ტალღის სიგრძეზე სპექტროფოტომეტრიულად (Multiscan GO, Thermo Fischer Scientific, Finland). მიღებული მონაცემები ითვლებოდა $NaNO_2$-ის სტანდარტულ მრუდზე.

II.6. Ca-ის რაოდენობის განსაზღვრა

საკვლევ ნიმუშებში კალციუმის კონცენტრაციის განსაზღვრისათვის გამოყენებული იქნა კოლორიმეტრიული კიტი (Sigma-Aldrich, cat. # MAK022, St. Louis, MO, USA). იონის კონცენტრაცია ისაზღვრებოდა ქრომოგენური კომპლექსის რაოდენობის მიხედვით, რომელიც წარმოიმნება კალციუმის იონსა და o-კრეზოლფტალეინს შორის. ფერადი Ca^{2+}–კრეზოლფტალეინის კომპლესის შუქშთანთქმა იზომებოდა 575ნმ ტალღის სიგრძეზე და მიღებული სიდიდე პირდაპირპროპორციულია კალციუმის იონების შემცველობისა.

II.7. H_2O_2 -ის რაოდენობის განსაზღვრა

H_2O_2 -ის რაოდენობის დადგენისათვის გამოყენებული იქნა წყალბადის პეროქსიდის Assay Kit (ab102500). Horse Radish Peroxidase (HRP) თანაობით the OxiRed Probe ურთიერთქმედებს H_2O_2 და წარმოქმნის შეფერილ პროდუქტს (E = 570 nm).

II.8. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა MTT-ტესტით

კრეატინის გავლენას უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე ვსწავლობდით MTT-ტესტის საშუალებით, რომელიც დამყარებულია მიტოქონდრიული დეჰიდროგენეზების შესაძლებლობაზე, მოახდინოს ხსნადი 3(4,5-დიმეთილთიაზოლ 2-ილ)-2,5 დიფენილ--ტეტრაზოლიუმის ბრომიდის (**MTT**) გადაყვანა იისფერ უხსნად ფორმაზანში, რომელც კრისტალიზირდება ციტოპლაზმაში (Nathet al. 2005). ამისათვის ნატიურ ჰიპოკამპს ვაჰომოგენიზირებდით ტრის-HCl-ის ბუფერში, ვუმატებდით 0.5 მლ MTT -ს (5 მგ/მლ), ვაყოვნებდით 1 სთ-ის განმავლობაში და შემდგომ ბუფერს ვაცილებდით ცენტრიფუგირებით. მიღებულ ნალექს ემატებოდა100მკლ DMSO-ს ხსნარი ფორმაზანის კრისტალების გასახსნელად და კვლავ ყოვნდებოდა 2სთ-ის განმავლობაში და შემდგომ ვახდენთ ოპტიკური სიმკვრის განსაზღვრას 530 და 620 ნმ ტალღის პლანშეტური ანალიზატორის (Multiscan GO, Thermo Fischer Scientific, Finland) საშუალებით. სიცოცხლის უნარიანი უჯრედების რაოდენობას ვითვლიდით ფორმული:E =A570-A620, სადაცE-ოპტიკური სიმკვრივეა, ხოლო A570 და A620 მნიშვნელობა შესაბამის ტალღის სიგრძეზე. სტრესისა და კრეატინის გავლენა ჰიპოკამპის უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე გამოითვლებოდა ფორმულით: **Nж** = $E_{ექსპერიმენტი}$ / $E_{საკონტროლო}$*100%.

II.9. Ca^{2+}-ატფ-აზური აქტივობის განსაზღვრა

Ca^{2+}-ატფ-აზას აქტივობას ვსაზღვრავდით რეაქციის შედეგად წარმოქმნილი არაორგანული ფოსფატის (PO3-) რაოდენობის მიხედვით [13]. საკვლევი არე (1 მლ) შეიცავდა 50 mM ტრის-HCl-ის ბუფერს (pH 7.5), 0,4 mM CaCl2, 2mM ატფ და ნიმუში (0,05 მგ ცილა). 15 წთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ 37°C-ზე რეაქციას ვაჩერებდით 1,2მლ ცივი ტრიქლორძმარმჟავას დამატებით. ფერმენტის

აქტივობას ვითვლიდით განსხვავებით სარეაქციო არეში Ca^{2+}-ის იონის არსებობა/არარსებობისას მიღებულ შედეგებს შორის.

II. 10. Na^+/K^+ -ატფ-აზური აქტივობის განსაზღვრა

Na/K-ATPაზური აქტივობა განისაზღვრება, როგორც ჯამური ATPაზას უაბაინმგრძნობიარე ნაწილი. ჯამური ATPაზასთვის საინკუბაციო არე შეიცავს-ს NaCl-ს 120-145 mM კონცენტრაციის ფარგლებში, KCl–ს 5-20 mM, $MgCl_2$–ს 2-3 mM და ATP–ს 2-3 mM, 50mM ტრის-HCl ბუფერს (pH=7.7), რაც შეესაბამება Na/K-ATPაზას მუშაობის ოპტიმალურ პირობებს. არეში ფერმენტული პრეპარატის რაოდენობა არ აღემატება 100-150 mg-ს.

ოუაბაინ–მგრძნობიარე ნაწილი განისაზღვრება ზემოთაღნიშნულ არეში 0,2mM ოუაბაინის დამატებით, რაც Na^+-ის უბნის სრული დაკეტვის გარანტიას იძლევა. ჯამური და ოუაბაინმგრძნობიარე აქტივობას შორის სხვაობა შეადგენს Na,K-ATPაზურ აქტივობას და გამოითვლება ფორმული: μMPi/მგ ცილა/წთ.

სინჯარებს ყველა რეაგენტი ემატება 0-4^0 -ზე, რის შემდგომაც სინჯარები ინჯღრევა და თავსდება წყლიან აბაზანაში საინკუბაციოდ 37^0C-ზე. ინკუბაცია გრძელდება 10-15 წთ. რეაქცია ჩერდება ტემპერატურის სწრაფი ცვლილებით, სინჯარების ერთდროული გადატანით თერმოსტატიდან ყინულიან აბაზანაში, სადაც ყოვნდება 5 წთ, რის შემდგომაც იზომება არაორგანული ფოსფორი.

ATP-აზურ აქტივობაზე მსჯელობა ხდება ფერმენტის მიერ გამოყოფილი არაორგანული ფოსფორის რაოდენობის მიხედვით ფისკე-სუბაროუს მეთოდით [64].

II. 11. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ლოურის მეთოდით

ფოლინ-ჩოკალტეუს ფენოლურ რეაქტივთან ცილის მოლეკულის შემადგენლობაში არსებული ამინომჟავები (ცისტეინი, თიროზინი) წარმოქმნიან ლურჯი შეფერილობის კომპლექსს. ეს უკანასკნელი ფოლინის აღდგენის შედეგად წარმოიქმნება [76].

ექსპერიმენტის პირველ ეტაპზე 0.4 მლ მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ვუმატებდით 2 მლ C რეაქტივს, რომელიც თავის მხრივ მზადდება A (NaHCO3-ის (უწყლო) 2%-იანი ხსნარი

დამზადებული 1 N NaOH-ზე) და B (0.5%-იანი $CuSO_4 \times 5H_2O$ დამზადებული 1 %-იან ნატრიუმის ციტრატზე) რეაქტივების ურთიერთშერევით (50:1). ვურევდით და ვაყოვნებდით 10 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე.

შემდგომ ეტაპზე ნარევს ვუმატებდით 200 μლ ფოლინის რეაქტივს, ვურევდით და ვაყოვნებდით 30 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემერატურაზე.

მიღებულ შეფერილობას ვზომავდით სპექტროფოტომეტრულად (λ=750 ნმ) და ვითვლიდით ცილის კონცენტრაციას შემდეგი ფორმულით:

C = K x Eსაშ.(mg/ml)

სადაც:
C - ცილის კონცენტრაცია,
Eსაშ - მიღებული შუქშთანთქმების საშუალო,
K - მუდმივა.

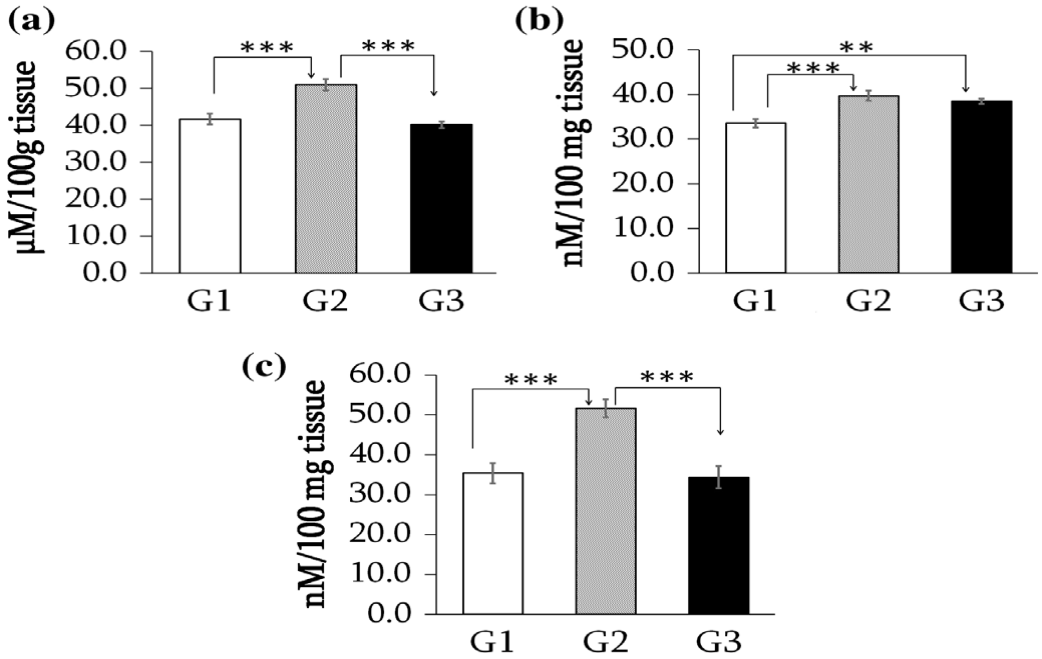
სტატისტიკური ანალიზი

მონაცემთა სტატისტიკური ანალიზი ჩატარდა One-way ANOVA-ს სტატისტიკური მეთოდის გამოყენებით (SPSS statistics, version 23, Chicago, IL). საშუალოთა შორის სარწმუნო განსხვავებების დასადგენად გამოყენებულ იქნა Tukey HSD და Games-Howell post hoc ტესტები. შედეგები მოცემულია საშუალო±SEM სახით. შედეგები, რომელთა P მნიშვნელობა იყო 0.05–ზე ნაკლები მიჩნეულ იქნა სტატისტიკურად სარწმუნოდ.

თავი III. მიღებული შედეგები

III.1. NO-სა, წყალბადის ზეჟანგისა და Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი ცვლილებების დადგენა

ჩატარებულმა ექსპერიმენტმა აჩვენა, რომ ხანგრძლივი დროით ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში სოციალურად იზოლირებული ვირთაგვების თავის ტვინში შეინიშნება ზოგიერთი ბიოქიმიური მახასიათებლების ცვლილება, მაგალითად ექსპერიმენტის 30-ე დღეს სტრესირებული ვირთაგვების (G2 ჯგუფი) ჰიპოკამპის უჯრედებში, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით NO-ს შემცველობა სარწმუნოდაა მომატებული. ამის პარალელურად, იმ ვირთაგვებში, სადაც სტრესი მიმდინარეობდა 140მგ/კგ კრეატინის ყოველდღიური შეყვანის პირობებში (G3 ჯგუფი), ექსპერიმენტის 30-ე დღეს NO-ს რაოდენობა საკონტროლოჯგუფის მაჩვენებელს უახლოვდა (სურ.1)თუმცა ცვლილებები ვერ იქნა ნანახი H_2O_2-ს შემთხვევაში. კერძოდ, სტრესის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში შეინიშნება მისი რაოდენობის ზრდა და ორგანიზმში ეგზოგენური კრეატინის ყოველდღიური მოწოდება მის რაოდენობას სარწმუნოდ არ ცვლის.

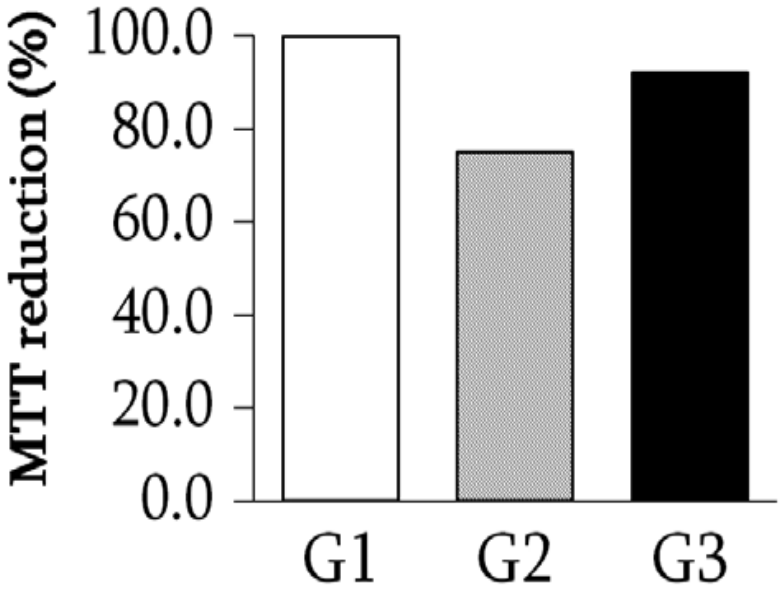


სურათი 1. კრეატინის გავლენა სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედებში NO-ს, H_2O_2-ისა და Ca^{2+}-ს რაოდენობრივ შემცველობაზე

-G1ჯგუფი(საკონტროლო); -G2 ჯგუფი(სტრესირებული); - G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი ჯგუფი) ($^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$, $^{***}p < 0.001$.)

წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, რომ ცვლილებები იქნა ნანახი ასევე Ca^{2+}-ის იონის რაოდენობაშიც. კერძოდ, G2 ჯგუფის ცხოველების ჰიპოკამპის უჯრედებში საკონტროლო 1ჯგუფთან შედარებით Ca^{2+}-ის რაოდენობა მნიშვნელოვნადაა გაზრდილი. ამის პარალელურად, კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა (G3 ჯგუფი) ამცირებს მის რაოდენობას.

იმის გათვალისწინებით, რომ ცნობილია უჯრედშიდა Ca^{2+}-ის ჭარბი რაოდენობის ციტოტოქსიკური ეფექტი უჯრედის ფუნქციონირებაზე, შესწავლილი იქნა კრეატინის გავლენა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის მაჩვენებელზე (სურ. 2). აღმოჩნდა, რომ სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპშისაკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით, შემცირებულია უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობა , იმ დროს როცა G3 ჯგუფის ინდივიდებში იგი საკონტროლო მაჩვენებელს უახლოვდება.

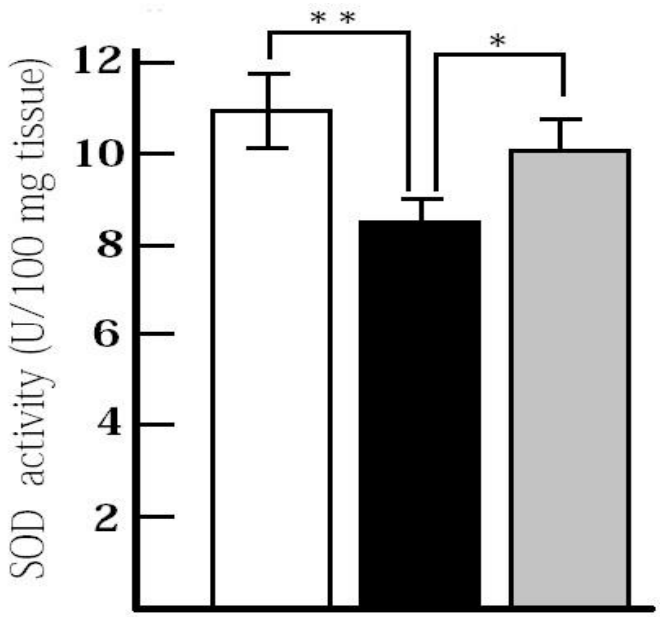


სურათი 2. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის ცვლილება სტრესირებული ვირთაგვებში ეგზოგენური კრეატინის შეყვანით

-G1ჯგუფი(საკონტროლო); -G2 ჯგუფი(სტრესირებული); - G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი ჯგუფი)(*$p<0.05$)

III.*2. კრეატინის ეფექტი სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედების ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობაზე*

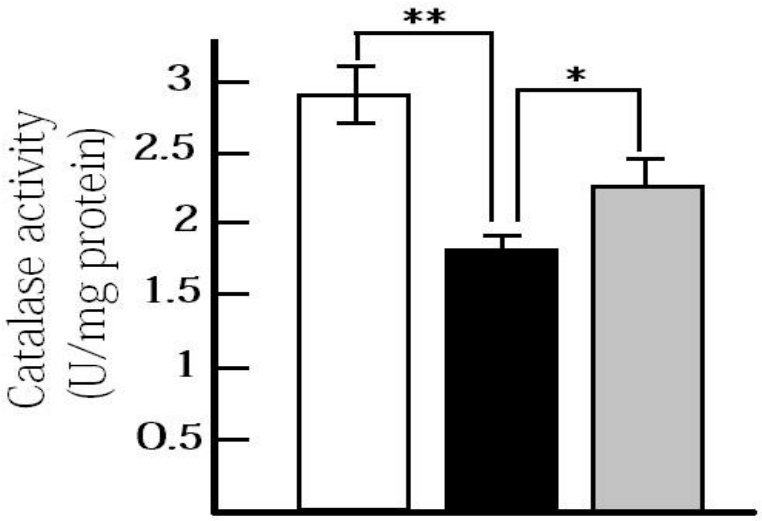
ექსპერიმენტის შემდგომ ეტაპზე შესწავლილი იყო საკვლევ ჯგუფებში ანტიოქსიდანტური სისტემის ისეთი ფერმენტების აქტივობა, როგორიცაა სუპეროქსიდდისმუტაზა (სოდ), კატალაზა და გლუტათიონრედუქტაზა. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 3, 4 და 5.



სურათი 3.ეგზოგენური კრეატინის გავლენა სტრესირებული ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედების სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობაზე

-G1ჯგუფი (საკონტროლო); -G2 ჯგუფი (30-დღიანი სტრესი);
- G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი ჯგუფი) .(*p<0.05, **p<0.001)

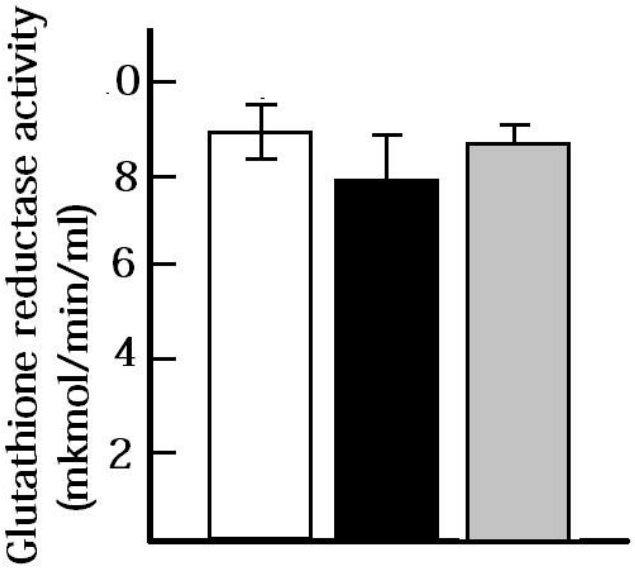
ორდინატთა ღერძზე – ფერმენტის აქტივობა, გამოსახული U/100mg ქსოვილზე



სურათი 4.ეგზოგენური კრეატინის გავლენა სტრესირებული ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედების კატალაზას აქტივობაზე

-G1 ჯგუფი (საკონტროლო); -G2 ჯგუფი (30 დღიანი სტრესი); - G3 ჯგუფი (სტრესირებული+ კრეატინი). (*p<0.05, **p<0.001)

ორდინატთა ღერძზე – ფერმენტის აქტივობა, გამოსახული U/mg ცილაზე



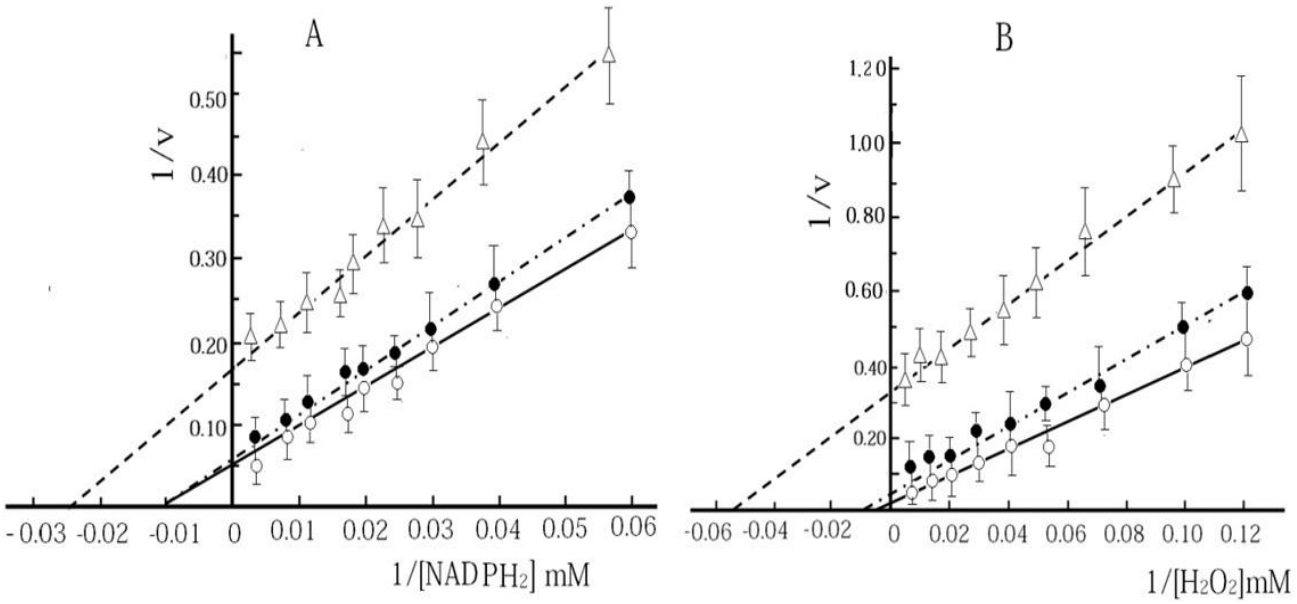
სურათი 5.ეგზოგენური კრეატინის გავლენა სტრესირებული ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედების ფერმენტ გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობაზე

-G1ჯგუფი(საკონტროლო); -G2 ჯგუფი(30 -დღიანი სტრესი); - G3 ჯგუფი (სტრესირი + კრეატინი) (*p<0.05, **p<0.001)

ორდინატთა ღერძზე – ფერმენტის აქტივობა, გამოსახული mkmol/min/ml

მიღებული მონაცემები აჩვენებენ, რომ ექსპერიმენტის 30-ე დღეს სტრესირებულ ვირთაგვებში (G2 ჯგუფი) სოდ-ის აქტივობა საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით სარწმუნოდაა შემცირებული (≈20%) , ხოლო G3 ჯგუფის ინდივიდების ჰიპოკამპში შეინიშნება ფერმენტის აქტივობის დაახლოებით 30%-იანი ზრდა (სურ. 3). მსგავსი ცვლილებებია ნანახი კატალაზას შემთხვევაშიც. კერძოდ, ხანგრძლივი სტრესის პირობებში ფერმენტული აქტივობა ≈40%-ით კლებულობს და სოდ-ის ანალოგიურად, კრეატინის შეყვანის პირობებში მიმდინარე ქრონიკული სტრესის პირობებში მისი აქტივობა სარწმუნოდაა მომატებული (სურ.4). სოდ-სა და კატალაზასაგან განსხვავებით, არ იქნა ნანახი სარწმუნო ცვლილება გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობის შემთხვევაში (სურ. 5).

სოდ-სა და კატალაზას კინეტიკური მაჩვენებლების (V_{max}, K_m) შესწავლამ აჩვენა, რომ ხანგრძლივი იზოლაციისა და დღე-ღამური ციკლის დარღვევის პირობებში მიმდინარე სტრესის შემთხვევაში ადგილი აქვს ფერმენტების როგორც V_{max}-ის დაქვეითებას, ასევე K_m-სიდიდის გაზრდას. მიღებული მონაცემების ანალიზი გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ სტრესის პირობებში სოდ-ისა და კატალაზას აქტივობის დაქვეითების მიზეზს წარმოადგენს როგორც ფერმენტების რაოდენობრივი შემცირება, ასევე ფერმენტების თვისობის დაქვეითება შესაბამისი სუბსტრატების მიმართ (სურ. 6A,B).

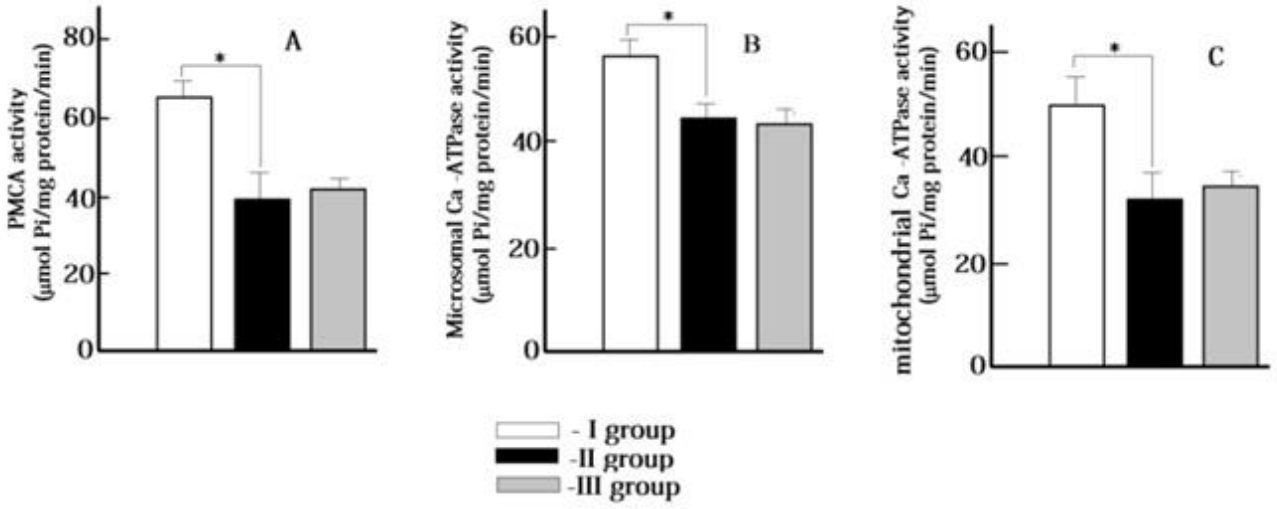


სურათი 6. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა სოდ-ის (A) და კატალაზას (B) კინეტიკურ პარამეტრებზე (V_{max}, K_m)

◌-G1 ჯგუფი(საკონტროლო); △-G2 ჯგუფი (30-დღიანი სტრესი); ●- G3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი).
ორდინატთა ღერძზე -(A) SOD-ის აქტივობა და (B) კატალაზას აქტივობის შებრუნებული სიდიდე (1/v)
აბსცისათან ღერძზე -(A) $NADH_2$(mkmol) და (B) H_2O_2-ის (mM) რაოდენობა

III.3. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა ჰიპოკამპის Ca^{2+}-ATPase-საქტივობაზე

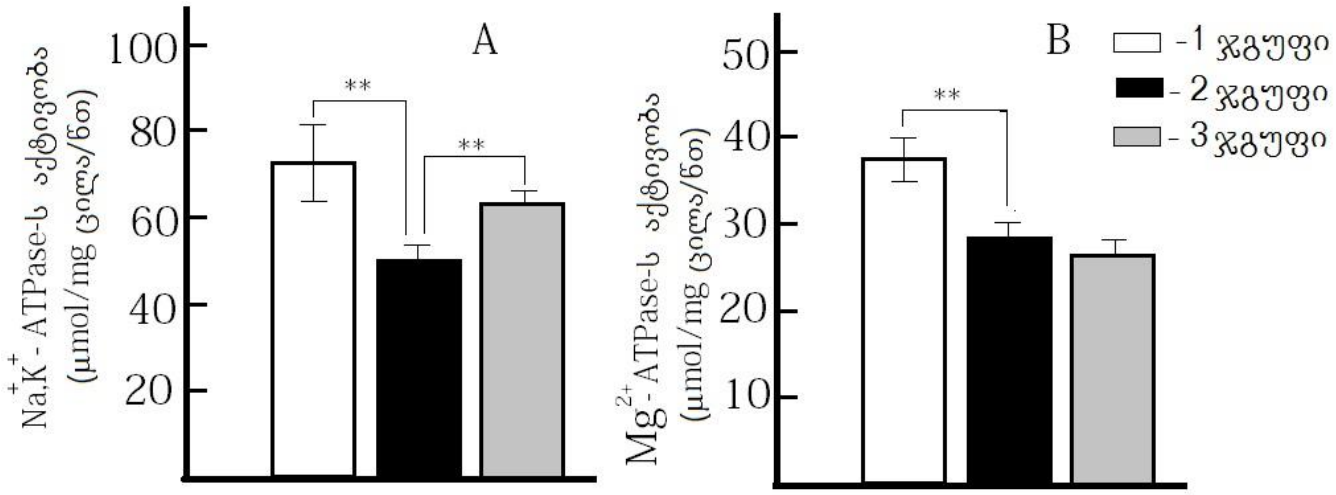
იმის გათვალისწინებით, რომ უჯრედშიდა Ca^{2+}- ის შემცველობა რეგულირდება პლაზმური მემბრანის, ასევე მიკროსომული და მიტოქონდრიული Ca^{2+}-ATPase-ებით, შემდგომში განსაზღვრული იქნა ამ ფერმენტების აქტივობა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევითა და იზოლაციით გამოწვეული სტრესის პირობებში. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 6. ჩანს, რომ ამ პირობებში ადგილი აქვს მხოლოდG2 ჯგუფის პლაზმური მემბრანისCa^{2+}-ATPase-ს(PMCA) აქტივობის სარწმუნო დაქვეითებას, თუმცა ინდივიდებში, რომლებსაც 30დღიანი სტრესის პირობებში ყოველდღიურად ინტრაპერიტონიალურად იღებდნენ კრეატინის, ეს მაჩვენებელი არ ეცვლებოდათ. რაც შეეხება ამ ფერმენტის მიკროსომულ და მიტოქონდრიულ იზოფორმებს, მათი აქტივობა არ დაფიქსირდა (სურ. 7A,B,C).



სურათზე 7. ქრონიკული სტრესის პირობებში პლაზმური მემბრანის (A) , მიკროსომული (B) და მიტოქონდრიული (C) Ca^{2+}ATPase-აზებისაქტივობის ცვლილება ეგზოგენური კრეატინის შეყვანის პირობებში

ორდინატთა ღერძზე - ფერმენტის აქტივობა (µmol Pi/mg protein/min). (*$p < 0.05$)

შემდგომ ექსპერიმენტში შესწავლილი იქნა ეგზოგენური კრეატინის გავლენა Na,K-ATPase-ს აქტივობაზე (სურ.6D). მიღებული შედეგები აჩვენებენ, რომ სოციალური იზოლაცია და ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევადაახლოებით 40%-ით სარწმუნოდ ამცირებს მის აქტივობას და კრეატინის 30-დღის განმავლობაში ინტრაპერიტონიალური შეყვანა, Ca^{2+}-ATPase-გან განსხვავებით, ზრდის მის აქტივობას. აღსანიშნავია, რომ Na,K-ATPase-საგან განსხვავებით, კრეატინის ეფექტი ვერ იქნა ნანახი Mg^{2+}- ატფ-აზაზე (სურ. 6B). კერძოდ სტრესი შედეგად დაქვეითებული ფერმენტული აქტივობა კრეატინის ყოველდღიური შეყვანის შედეგად პრაქტიკულად რჩება უცვლელი.



სურათზე8. ქრონიკული სტრესის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედების Na,K-ATPase-სა და Mg^{2+} -ATPase-ის აქტივობის ცვლილება ეგზოგენური კრეატინის შეყვანის პირობებში

ორდინატთა ღერძზე - ფერმენტის აქტივობა (µmol Pi/mg protein/min). (**p<0.001)

თავი IV. მიღებული შედეგების განხილვა

როგორც ცნობილია, ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევა და სოციალური იზოლაცია განიხილება როგორც სტრეს-ფაქტორები, რომელიც ცვლის რა უჯრედულ მეტაბოლიზმს, გავლენას ახდენს ორგანიზმის ფუნქციონირებაზე [13; 57]. ამ პროცესისადმი განსაკუთრებით მგრძნობიარეა თავის ტვინი და მისი გახანგრძლივება ქცევით მახასიათებლების ცვლილებისა და მთელი რიგი ნეიროდეგენერაციული პათოლოგიების მიზეზი ხდება. ამდენად, ისეთი ნივთიერებების მოძიება, რომლებსაც შესწევთ უნარი მოახდინოს სტრესული მდგომარეობის პრევენცია, მნიშვნელოვანია განსაკუთრებით დღევანდელი საზოგადოების ყოველდღიური ცხოვრებისეული სტილის გათვალისწინებით. ამ მიმართულებით ჩვენი ყურადღება მიიპყრო კრეატინმა რამდენიმე მოსაზრებით. კერძოდ, იგი აქტიურადაა ჩართული უჯრედის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში როგორც ენერგიის ბუფერიზაციის პროცესის აქტიური მონაწილე და ასევე მისი, როგორც ენდოგენური ანტიოქსიდანტური თვისებების გათვალისწინებით. ზემოთთქმულიდან გამომდინარე, ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა გამოგვეკვლია ორგანიზმში ეგზოგენური გზით დამატებული კრეატინის პროტექტორული როლი სოციალური იზოლაციითა და დღე-ღამური რიტმის დარღვევით გამოწვეული ქრონიკული სტრესის პირობებში .

ცნობილია, რომ ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციითა და ცირკადული რიტმის დარღვეით გამოწვეულ ქრონიკულ სტრესს თავის ტვინში თან ახლავს ოქსიდაციური სტრესის ჩამოყალიბება. იმ რადიკალებს შორის, რომელებიც ოქსიდაციური პროცესების განვითარების მიზეზი ხდება, მნიშვნელოვანია პეროქსიდნიტრიტი ($ONOO^-$) და სუპეროქსიდი. ცნობილია, რომ პეროქსიდნიტრიტის ძირითად წყაროს აზოტის ჟანგის (NO) წამოადგენს. ამ პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში NO-ს მატება ნანახია როგორც ჩვენს წინა კვლევებშიც, ასევე სხვა ავტორების მიერაც [13; 15; 29; 51]. 1 სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები მიუთითებენ, რომ NO-ს ჭარბი რაოდენობა სარწმუნოდაა შემცირებული 3 ჯგუფის ვირთაგვების უჯრედებში. ცხრილიდან ასევე ჩანს, რომ კრეატინის ხანგრძლივი პერიოდით ინტრაპერიტონიალური მიწოდება არ ცვლის სტრესის პირობებში გაზრდილი H_2O_2-ს რაოდენობას. ცნობილია, რომ H_2O_2 მნიშვნელოვან როლს ასრულებს უჯრედის ჰომეოსტაზში, მონაწილეობს რა გენების ექსპრესიაში, მათ შორის ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების სინთეზშიც [42]. აღსანიშნავია, რომ ანალოგიური მონაცემებია მიღებული სხვა მკვლევარების მიერაც [6; 52], რაც

იძლევა საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ კრეატინის ეფექტი ანტიოქსიდანტურ სისტემაზე შერჩვითი ხასიათისაა და დამოკიდებულია აქტიური რადიკალის კონკრეტულ ფუნქციაზე უჯრედში.

როგორც ცნობილია, ფერმენტ NO-სინთაზას აქტივატორს წარმოადგენს Ca^{2+} [79]. ამის გათვალისწინებით, შემდგომში შესწავლილი იქნა Ca^{2+} -ის იონის რაოდენობრივი ცვლილებები სამივე ჯგუფის ვირთაგვების უჯრედებში. მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ 2 ჯგუფის უჯრედებში სარწმუნოდ იზრდება Ca^{2+}-ის შემცველობა (ცხრ.1), რაც ემთხვევა ლიტერატურულ მონაცემებს, რომლებიც ადასტურებენ ხანგრძლივი ქრონიკული სტრესის დროს Ca^{2+}-ის რაოდენობის ზრდას [18; 54]. ცხრილში 1 წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებენ, G3 ჯგუფის ვირთაგვების უჯრედებში Ca^{2+}-ის რაოდენობა საკონტროლო მაჩვენებლის ფარგლებშია. აღსანიშნავია, რომ კრეატინის ანალოგიური გავლენა Ca^{2+}ის რაოდენობაზე ნანახია ჩონჩხი კუნთებშიც Duchenne muscular dystrophy-ს და თავის ტვინში ზოგიერთი ნეიროდეგენერაციული ცვლილებისას [43; 62]. როგორც ცნობილია, Ca^{2+}ის ჭარბი რაოდენობა ციტოტოქსიკურია უჯრედებისათვის, რაც აისახება სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების რაოდენობაზე [22]. როგორც სურათი 2-დან ჩანს, G2 ჯგუფის ვირთაგვების ჰიპოკამპში შეინიშნება სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების შემცირება, თუმცა კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანისას შემთხვევაში ექსპერიმენტის 30-ე დღეს სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების რაოდენობასარწმუნოდაა მომატებული (3 ჯგუფი).

ოქსიდაციური სტრესს თან სდევს ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დაქვეითება, აქტიური რადიკალების სიჭარბე, ჰორმონალური სტატუსის ცვლილება, ასევე მიტოქონდრიული დისფუნქციები და ანაბოლური პროცესების, მათ შორის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების სინთეზის და აქტივობის შემცირებაც [13; 47; 50; 51]. ჩვენს ექსპერიმენტში ნანახი იქნა, რომ ამ მოდელის ქრონიკულ სტრესს ჰიპოკამპის უჯრედებში თან ახლავს Cu,Zn-SOD-ის და კატალაზას აქტივობის სარწმუნო დაქვეითება. მათგან განსხვავებით ვერ იქნა ნანახი სარწმუნო ცვლილებები გლუტათიონრედუქტაზას შემთხვევაში (სურ.3 A,B). თუმცა სტრესის პირობებში კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა ორგანიზმში მნიშვნელოვნად ზრდის ამ ფერმენტების აქტივობას ჰიპოკამპის უჯრედებში (3 ჯგუფი).

იმის დასადგენად, თუ რა განაპირობებს ფერმენტული რეაქციების ცვლილებას კრეატინის ინტრაპერიტონიალურად მიწოდებისას, შესწავლილი იქნა ამ ფერმენტების კინეტიკური მახასიათებლები (V_{max},Km). როგორც ცნობილია, ზოგადად ბიოქიმიური რეაქციების აქტივობის

დაქვეითების ერთერთი მიზეზია როგორც ფერმენტების სტრუტურული, ასევე მათი რაოდენობრივი ცვლილებები [12]. სურათზე 4A და 4B წარმოდგენილი მონაცემები მიუთითებენ, რომ სტრესის პირობებში მცირდება როგორც რეაქციების V_{max}, ასევე ამ ფერმენტების თვისობა სუბსტრატებისადმი. ამდენად სავარაუდოა, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მიმდინარე სოციალური იზოლაციისას ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობის შემცირების მიზეზი იყოს როგორც ოქსიდაციური სტრესის შედეგად ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და შესაბამისად, ანაბოლური რეაქციების ინტენსივობის დაქვეითება, ასევე აქტიური რადიკალებით გამოწვეული ფერმენტების სტრუქტურული ცვლილებებიც [56; 67].

როგორც სურათი 4A და 4B-დან ჩანს, კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა (3 ჯგუფი) ზრდის ამ ფერმენტების V_{max}-ს. ზოგიერთი ავტორი კრეატინის ამ ეფექტს უკავშირებს მის მონაწილეობას Cr/CK/PCr სისტემის ფუნქციონირებაში, რაც ზრდის უჯრედის ენერგეტიკულ პოტენციალს და ანაბოლური პროცესების ინტენსივობა და ხელს უწყობს სხვადასხვა ცილების, მათ შორის ანტიოქსიდანტური ფერმენტების რაოდენობის მატებას [7; 19; 44; 52]. თუმცა არსებობს განსხვავებული მოსაზრებაც, რომ კრეატინის ეს ეფექტი განპირობებულია მხოლოდ მისი თვისებით, მოახდინოს ენდოგენური რეაქტიური რადიკალების შებოჭვა და მათი განეიტრალება ისე, რომ არ იმოქმედოს ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობაზე [26]. კრეატინის ეს უკანასკნელი ეფექტი გამოჩნდა ჩვენს ექსპერიმენტშიც, რომელიც აჩვენებს, რომ კრეატინის შეყვანის პირობებში იზრდება არა მარტო რეაქციების V_{max}, არამედ სოდ-ისა და კატალაზას თვისობა (1/Km) სუბსტრატებისადმი (სურ.4A,4B). ამდენად, მიღებული მონაცემები გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ კრეატინის ანტიოქსიდანტური ეფექტი განპირობებულია ორი ძირითადი მიზეზით. პირველი გულისხმობს კრეატინის დამატებით უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის გაძლიერებასა და შესაბამისად, ფერმენტების რაოდენობის გაზრდას, ხოლო მეორე მიზეზს წარმოადგენს მის უშუალო მონაწილეობა აქტიური რადიკალების განეიტრალების პროცესში.

ცნობილია რა უჯრედში Ca^{2+}-ის ტრანსპორტირების მექანიზმი, მისი რაოდენობრივი ცვლილების მიზეზი შესაძლებელია იყოს კრეატინის პირდაპირი ზემოქმედება Ca^{2+}-ატფ-აზებზე ან პოტენციალ-მგრძნობიარე არხებზე, კერძოდ იონოტროპულ NMDA-რეცეპტორზე [72; 80]. სურათი 4 A,B,C -ზე წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებს, რომ ბუნებრივი დღე-ღამური ციკლის

დარღვევის შემთხვევაში შემცირებულია მხოლოდ პლაზმური მემბრანის Ca^{2+}-ATPase-ს აქტივობა, იმ დროს, როცა მიტოქონდრიული და მიკროსომული იზოფორმების აქტივობა უცვლელია, რაც ასევე ემთხვევა ლიტერატურულ მონაცემებს [10; 66; 73]. თუმცა კრეატინის შეყვანა არ ცვლის არც ერთი იზოფორმის აქტივობას (3 ჯგუფი), რაც გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოდ, რომ Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი შემცველობის ცვლილება არაა დამოკიდებული ამ ფერმენტების მოქმედებაზე და ამდენად, განპირობებული უნდა იყოს Ca^{2+}-ის არხების ფუნქციონირებაზე. ცნობილია, რომ თავის ტვინში ქრონიკული სტრესით განპირობებული ოქსიდაციური პროცესების მიმართ განსაკუთრებულ მგრძნობელობას ავლენს NMDA-რეცეპტორი, კერძოდ მისი N1სუბერთეული[14; 66].ოქსიდაციური პროცესები ზრდის რა ჰემატოენცეფალური ბარიერის გავლადობას, იწვევს ასევე NMDA-რეცეპტორის აქტივაციას N1 სუბერთეულის ფოსფორილირებით და შესაბამისად, უჯრედშიდა Ca^{2+}-ის რაოდენობის მატებას [14; 64; 75]. სტრესის პირობებში NMDA-რეცეპტორის აქტივაციის მიზეზიზოგიერთი ჰორმონის, მათ შორის სეროტონინისა და კორტიკოსტერონის რაოდენობრივი ცვლილებებია [78; 3]. ჩვენმა წინა კვლევებმა ხანგრძლივი ბუნებრივი ცირკადული ციკლის დარღვევით გამოწვეული სტრესის დროს აჩვენა ამ ჰორმონების რაოდენობრივი ცვლილებები [13; 48]. ამდენად, სავარაუდოა, რომ დღე-ღამური ციკლის დარღვევისა და სოციალური იზოლაციის დროს ჰიპოკამპის უჯრედებში Ca^{2+}-ის რაოდენობის მატების მიზეზი შესაძლებელია იყოს ჰორმონების ზემოქმედებით ინდუცირებული NMDA-რეცეპტორის აქტივაცია და უჯრედგარე Ca^{2+}-ის უჯრედში შედინების ზრდა, რასაც მოსდევს NO-ს სინთეზას და ოქსიდაციური პროცესების გააქტიურება და ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობის დაქვეითება.

ამ მოსაზრებას ადასტურებს ექსპერიმენტი, სადაც ნაჩვენებია საკვლევ ჯგუფებში Na^{+},K^{+}-ATPase-ს აქტივობის ცვლილება. როგორც ცნობილია, NMDA-რეცეპტორსა და Na,K-ATPase-ს შორის არსებობს როგორც ფუნქციური, ასევე სტრუქტურული ურთიერთკავშირი [1; 16]. მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ G2 ჯგუფის ვირთაგვების უჯრედებში Na,K-ATPase-ს ინჰიბიტორის Ca^{2+}-ის რაოდენობის ზრდის პარალელურად, შეინიშნება ამ ფერმენტის აქტივობის სარწმუნო შემცირება, რაც შესაბამისობაშა ლიტერატურულ მონაცემებთან [77] და კრეატინის ხანგრძლივი პერიოდით შეყვანა ზრდის სტრესის პირობებში მის აქტივობას (G3 ჯგუფი) (სურ 4D). ლიტერატურული მონაცემების გათვალისწინებით, სავარაუდოდ კრეატინის მასტიმულირებელი ეფექტის მიზეზი უნდა იყოს კრეატინის უშუალო ზემოქმედებით NMDA-

რეცეპტორის აქტივობის მოდულირება, პოტენციალ-მგრძნობიარე Na-არხების ჩაკეტვა და კალცინეირინული სასიგნალო გზის აქტივაცია, რასაც მოსდევს Na,K-ATPase გააქტიურება [9].

კრეატინის მოდულატორული თვისება, მოახდინოს უჯრედშიდა Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი კორექცია NMDA-რეცეპტორზე უშუალო ზემოქმედებით, ჩანს ასევე ექსპერიმენტში, სადაც შესწავლილია მისი გავლენა Mg^{2+}-ATPase-ზე (სურ.4E). ცნობილია, რომ Na,K-ATPase-გან განსხვავებით, Mg-ATPase-ს აქტივობა არ არის დამოკიდებული NMDA-რეცეპტორზე და შესაბამისად, უჯრედშიდა Ca^{2+}-ზე [45]. ჩვენმა შედეგებმა აჩვენა, რომ კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა არ ცვლის ამ ფერმენტის აქტივობას (სურ.4.E).

ამრიგად, მიღებული შედეგები აჩვენებენ, რომ ეგზოგენური გზით ორგანიზმში მოხვედრილი კრეატინი ენერგეტიკულ პროცესებში აქტიური მონაწილეობის გარდა, ასრულებს ასევე პროტექტორულ ფუნქციასაც. კერძოდ, აძლიერებს რა სტრესის შედეგად დაქვეითებულ ენერგეტიკულ პოტენციალსთავის ტვინის უჯრედებში, ზრდის ცილოვანი მოლეკულების, მათ შორის ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების რაოდენობას მათი სინთეზის გაძლიერების ხარჯზე. ამავე დროს, ურთიერთქმედებს რა NMDA-რეცეპტორზე და შესაბამისად, უჯრედში Ca^{2+}-ის ჰომეოსტაზე, ახდენს ამ რეცეპტორის ფუნქციონირების მოდულირებას, რაც ამცირებს სტრესის შედეგად ჰიპოკამპის უჯრედში გაზრდილი Ca^{2+}-ის შემცველობას და მისი სიჭარბით გამოწვეულ ციტოტოქსიკურ ეფექტს.რა თქმა უნდა, გამოთქმული მოსაზრებამოითხოვს უფრო დეტალურ შესწავლას, რათა გაფართოვდეს წარმოდგენა კრეატინის ნაკლებად ცნობილ ანტიოქსიდანტურ როლზე ცნს-ში.

დასკვნა

1. ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევისა და ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციით გამოწვეული სტრესის პირობებში ინტრაპერიტონიალურად შეყვანილი ეგზოგენური კრეატინი ააქტივებს ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების სოდ-ისა და კატალაზას აქტივობას. კრეატინის ეს ეფექტი მიიღწევა არსებული ფერმენტების სტრუქტურული ცვლილებებითა და ასევე მათი სინთეზის ინტენსივობის გაზრდით;

2. გარდა ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილეობისა, ასევე იკვეთება კრეატინის ნეიროპროტექტორული როლიც, რაც მდგომარეობს მის შესაძლებლობაში NMDA-რეცეპტორთან ურთიერთქმედებით თავიდან აიცილოს ფსიქო–ემოციური სტრესის შედეგად გაზრდილი უჯრედშიდა კალციუმის იონის ციტოტოქსიკური ეფექტი.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Akkuratov, E. E., Lopacheva, O. M., Kruusmägi, M., Lopachev, A. V., Shah, Z. A., Boldyrev, A. A., & Liu, L. (2015). Functional Interaction Between Na/K-ATPase and NMDA Receptor in Cerebellar Neurons. *Molecular Neurobiology*, *52*(3), 1726–1734. https://doi.org/10.1007/s12035-014-8975-3

2. Ando, T., Mimura, K., Johansson, C. C., Hanson, M. G., Mougiakakos, D., Larsson, C., … Kiessling, R. (2008). Transduction with the Antioxidant Enzyme Catalase Protects Human T Cells against Oxidative Stress. Journal of Immunology, *181*(12), 8382–8390. https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.12.8382

3. Andres, A. L., Regev, L., Phi, L., Seese, R. R., Chen, Y., Gall, C. M., & Baram, T. Z. (2013). NMDA receptor activation and calpain contribute to disruption of dendritic spines by the stress neuropeptide CRH. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *33*(43), 16945–60. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1445-13.2013

4. Anderson R. Lukey P.T,Theron A.J, Dippenaar U. Ascorbate and cystein –mediated selectiveneutralisaton of extracellular oxidants during Nformyl peptide activation of human phagocytes //Agents and Actons. 1987-20(1/2)-p.77

5. Appleton, Nancy, Phd, Lick the Sugar Habit. P 138-144. NY: Avery Penguin Putnam, 1996.

6. Araújo, M. B., Moura, L. P., Junior, R. C. V., Junior, M. C., Dalia, R. A., Sponton, A. C., … Mello, M. A. R. (2013). Creatine supplementation and oxidative stress in rat liver. *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, *10*(1), 54. https://doi.org/10.1186/1550-2783-10-54

7. Bassit, R. A., Pinheiro, C. H. D. J., Vitzel, K. F., Sproesser, A. J., Silveira, L. R., & Curi, R. (2010). Effect of short-term creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. *European Journal of Applied Physiology*, *108*(5), 945–955. https://doi.org/10.1007/s00421-009-1305-1

8. Berkman LF, Glass T. Social integration, social networks, social support, and health.In: Berkman LF, Kawachi I, eds. Social Epidemiology. New York: Oxford; 2000

9. Bertuccio, C.A., Cheng, S.X., Arrizurieta, E.E., Martin, R.S., Ibarra, F.R., 2003. Mech-anisms of Na+-K+-ATPase phosphorylation by PKC in the medullary thick ascending limb of Henle in the rat. Pflugers Archiv 447, 87–96;

10. Betzen, C., White, R., Zehendner, C. M., Pietrowski, E., Bender, B., Luhmann, H. J., & Kuhlmann, C. R. W. (2009). Oxidative stress upregulates the NMDA receptor on cerebrovascular endothelium. *Free Radical Biology and Medicine*, *47*(8), 1212–1220. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.034

11. Bhabak KP, Mugesh G. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. Accounts of chemical research. 2010 Aug 6;43(11):1408-19;

12. Brethauer, S., & Wyman, C. E. (2010). Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, *101*(13), 4862–4874. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.009

13. Burjanadze, G. M., Kuchukashvili, Z. T., Chachua, M. V., Menabde, K. O., Dachanidze, N. T., & Koshoridze, N. I. (2014). Changes in activity of hippocampus creatine kinase under circadian rhythm disorders. *Biological Rhythm Research*, *1016*(February 2016), 1–13. https://doi.org/10.1080/09291016.2014.888172

14. Calabrese, F., Guidotti, G., Molteni, R., Racagni, G., Mancini, M., & Riva, M. A. (2012). Stress-induced changes of hippocampal NMDA receptors: Modulation by duloxetine treatment. *PLoS ONE*, *7*(5). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037916

15. Camacho, M. E., Carrion, M. D., Lopez-Cara, L. C., Entrena, A., Gallo, M. A., Espinosa, A., Acuna-Castroviejo, D. (2012). Melatonin synthetic analogs as nitric oxide synthase inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, *12*(7), 600–17.

16. Carvalho, F. B., Mello, C. F., Marisco, P. C., Tonello, R., Girardi, B. A., Ferreira, J., … Rubin, M. A. (2012). Spermidine decreases Na +,K +-ATPase activity through NMDA receptor and protein kinase G activation in the hippocampus of rats. *European Journal of Pharmacology*, *684*(1–3), 79–86. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.03.046

17. Chakrabarti, S., Jahandideh, F., & Wu, J. (2014). Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Research International*, 1–12. https://doi.org/10.1155/2014/608979

18. Datson, N. a, van den Oever, J. M. E., Korobko, O. B., Magarinos, A. M., de Kloet, E. R., & McEwen, B. (2013). Prior history of chronic stress changes the transcriptional response to glucocorticoid

challenge in the dentate gyrus region of the male rat hippocampus. *Endocrinology*, (C), 1–12. https://doi.org/10.1210/en.2012-2233

19. Deminice, R., Rosa, F. T., Franco, G. S., Jordao, A. A., & de Freitas, E. C. (2013). Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans. *Nutrition*, *29*(9), 1127–1132. https://doi.org/10.1016/j.nut.2013.03.003

20. Dronjak S. and Gavrilovic L. Effects of stress on catecholamine stores in central and peripheral tissues of long-term socially isolated rats**,** Brazilian Journal of medical and biological research (2006) 39 : 785-790

21. Eckel-Mahan, K., & Sassone-Corsi, P. (2013). Metabolism and the Circadian Clock Converge. *American Physiological Society*, *93*(1), 107–135. https://doi.org/10.1152/physrev.00016.2012

22. Gao, Z. Y., Collins, H. W., Matschinsky, F. M., Lee, V. M. Y., & Wolf, B. A. (1998). Cytotoxic effect of β-amyloid on a human differentiated neuron is not mediated by cytoplasmic Ca^{2+} accumulation. *Journal of Neurochemistry*, *70*(4), 1394–1400.

23. Giuseppe Potrick, Stefani Ramiro, Barcos Nunes, Claudia Ramos Rhoden; CREATINE SUPPLEMENTATION: A Novel Role in Antioxidant System in Exercise and In Chronic Diseases CONTEXTO & SAÚDE IJUÍ EDITORA UNIJUÍ v. 14 n. 27 JUL./DEZ. 2014 p. 32-43

24. Goleman, Daniel, Richard Boyatzis, and Annie Mckee. Primal Leadership.p 13-14 Boston: Harvard Business School Press, 2002

25. Griffiths, C., Yamini, B., Hall, C., & Garthwaite, J. (2002). Nitric oxide inactivation in brain by a novel O2-dependent mechanism resulting in the formation of nitrate ions. *The Biochemical Journal*, *362*(Pt 2), 459–64. https://doi.org/10.1042/0264-6021:3620459

26. Guimarães-Ferreira, L., Pinheiro, C. H. J., Gerlinger-Romero, F., Vitzel, K. F., Nachbar, R. T., Curi, R., & Nunes, M. T. (2012). Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle. *European Journal of Applied Physiology*, 1–7. https://doi.org/10.1007/s00421-012-2378-9

27. Hamidreza Famitafreshi, Morteza Karimian, Hamed Fanaei, Fatemeh Attari, Sulail Fatima, Social isolation is associated with reduced neurogenesis, impaired spatial working memory performance, and altered anxiety levels in male rats; Open Access Animal Physiology, 16 June 2015 pages 87-95.

28. House JS, Landis KR, Umberson D. Social relationships and health. Science 1988; 241: 540–5.

29. Huang, C.-C., Lai, C.-J., Tsai, M.-H., Wu, Y.-C., Chen, K.-T., Jou, M.-J., … Wei, I.-H. (2015). Effects of melatonin on the nitric oxide system and protein nitration in the hypobaric hypoxic rat hippocampus. *BMC Neuroscience*, *16*, 61.

30. https://doi.org/10.1186/s12868-015-0199-6

31. https://tsu.ge/science/?leng=ge&cat=jurnal&jnomeri=4&tid=8

32. http://www.worthington-biochem.com/SODBE/default.html

33. http://www.modernpublishing.ge/view_post.php?id=10&pub=7&ye.

34. http://www1.naec.ge/images/doc/SXVA/naec.ge-n10-10.pdf

35. http://dictionary.css.ge/content/circadian-rhythm

36. http://logdoctor.ge/?p=90.

37. http://www.braintools.ru/article/9548

38. http://www.mkurnali.ge/fsiqonevrologia/nevrologia/2106-2010-09-02-10-10-19.html

39. http://intermedia.ge/სტატია/63931-სტრესი-ჰანს-სელიეს-მიხედვით/89

40. Ingwall JS. ATP and the Heart. Springer Science & Business Media; 2002 Jun 30.

41. John M. Lawler,1 William S. Barnes, Gaoyao Wu, Wook Song, and Scott Demaree;Direct Antioxidant Properties of Creatine-Biochemical and Biophysical Research Communications 290, 47-52, February 2002

42. Ji, L. L., Gomez-Cabrera, M. C., & Vina, J. (2006). Exercise and hormesis: Activation of cellular antioxidant signaling pathway. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1067, pp. 425–435). https://doi.org/10.1196/annals.1354.061

43. Juravleva, E., Barbakadze, T., Mikeladze, D., & Kekelidze, T. (2005). Creatine enhances survival of glutamate-treated neuronal/glial cells, modulates Ras/NF-??B signaling, and increases the generation of reactive oxygen species. In *Journal of Neuroscience Research* (Vol. 79, pp. 224–230). https://doi.org/10.1002/jnr.20291

44. Kingsley, M., Cunningham, D., Mason, L., Kilduff, L. P., & McEneny, J. (2009). Role of creatine supplementation on exercise-induced cardiovascular function and oxidative stress. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2*(4), 247–254. https://doi.org/10.4161/oxim.2.4.9415

45. Kinoshita, P. F., Leite, J. A., Orellana, A. M. M., Vasconcelos, A. R., Quintas, L. E. M., Kawamoto, E. M., & Scavone, C. (2016). The influence of Na+, K+-ATPase on glutamate signaling in neurodegenerative diseases and senescence. *Frontiers in Physiology*. https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00195

46. Koroliuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG, Tokarev VE (1988) Method for detection of catalase activity. Lab Delo 1; 16-9.

47. Koshoridze, N. I., Menabde, K. O., Chachua, M. V, Kuchukashvili, Z. T., Chipashvili, M. D., Кошоридзе, Н. И., … Чипашвили, М. Д. (2009). Enzymes of Energy Metabolism in Brain and Chronic Stress, *5*(1), 32–37.

48. Koshoridze, N., Kuchukashvili, Z., Menabde, K., Lekiashvili, S., & Koshoridze, M. (2016). ALTERATIONS IN BRAIN CREATINE CONCENTRATIONS UNDER LONG-TERM SOCIAL ISOLATION (EXPERIMENTAL STUDY). *Georgian Medical News*, *251*(2), 70–77.

49. Kranner I Britic S. A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance. Interagtive and Comparative Biol. 2005, 45,734-740

50. Krishnan, N., Davis, A. J., & Giebultowicz, J. M. (2008). Circadian regulation of response to oxidative stress in Drosophila melanogaster. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *374*(2), 299–303. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.011

51. Kuchukashvili, Z., Burjanadze, G., Menabde, K., Chachua, M., Dachanidze, N., Mikadze, M., & Koshoridze, N. (2012). Long-lasting stress, quantitative changes in nitric oxide concentration and functional state of brain mitochondria. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, *72*(1), 40–50

52. Lawler, J. M., Barnes, W. S., Wu, G., Song, W., & Demaree, S. (2002). Direct antioxidant properties of creatine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *290*(1), 47–52. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.6164

53. Leonardo Magno Rambo, Leandro Rodrigo Ribeiro, Vanessa Grigoletto Schramm, Andriely Moreira Berch, Daniel Neis Stamm, Iuri Domingues Della-Pace, Luiz Fernando Almeida Silva , Ana Flávia Furian, Mauro Schneider Oliveira, Michele Rechia Fighera, Luiz Fernando Freire Royes ;Creatine

increases hippocampal Na+,K+-ATPase activity via NMDA–calcineurin pathway-Brain Research Bulletin 88 (2012) 553– 559.

54. Maigaard, K., Hageman, I., Jørgensen, A., Jørgensen, M. B., & Wörtwein, G. (2012). Electroconvulsive stimulations prevent chronic stress-induced increases in L-type calcium channel mRNAs in the hippocampus and basolateral amygdala. *Neuroscience Letters*, *516*(1), 24–28. https://doi.org/10.1016/j.neulet.2012.03.043

55. Matthew A. Cooper1,*, Catherine T. Clinard1, and Kathleen E. Morrison; Neurobiological Mechanisms Supporting Experience-Dependent Resistance to Social Stress, *Neuroscience*. 2015 April 16; 291: 1–14. doi:10.1016

56. Melov S, Schneider J, Day B, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra S, Crapo J, Wallace D(1998). "A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganesesuperoxide dismutase". Nat Genet 18 (2): 159–63.

57. Musiek, E. S. (2015). Circadian clock disruption in neurodegenerative diseases: Cause and effect? *Frontiers in Pharmacology*, *6*(FEB). https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00029

58. Opie LH, editor. Heart physiology: from cell to circulation. Lippincott Williams & Wilkins; 2004.

59. Ojima K., Matsumoto K., Tohda M., Watanabe H., Hyperactivity of central noradrenergic and CRF systems is involved in social isolation-induced decrease in pentobarbital sleep. Brain Res., 684, 87-94 (1995).

60. Pahan K., Liu X., McKinney M.J., Wood C., Sheikh F.G., Raymond J.R. Induction of nitric oxide synthaze and activation of nuclear factor-kB in primary astrocytes. J.Neurochem. 2000.-v.74 –p. 2288-2295

61. Perry, J. J. P., Shin, D. S., Getzoff, E. D., & Tainer, J. A. (2010). The structural biochemistry of the superoxide dismutases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.11.004

62. Pulido, S. M., Passaquin, A. C., Leijendekker, W. J., Challet, C., Wallimann, T., & Rüegg, U. T. (1998). Creatine supplementation improves intracellular Ca2+ handling and survival in mdx skeletal muscle cells. *FEBS Letters*, *439*(3), 357–362. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01399-4

63. Rafael Deminice Ph.D, Fl_avia Troncon Rosa Ph.D. , Gabriel Silveira Franco B.S. , Alceu Afonso Jordao Ph.D, Ellen Cristini de Freitas Ph.D.Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans-Nutrition 29 (2013) 1127–1132

64. Rambo, L. M., Ribeiro, L. R., Schramm, V. G., Berch, A. M., Stamm, D. N., Della-Pace, I. D., … Royes, L. F. F. (2012). Creatine increases hippocampal Na+,K+-ATPase activity via NMDA-calcineurin pathway. *Brain Research Bulletin*, *88*(6), 553–559. https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2012.06.007

65. Reaume A, Elliott J, Hoffman E, Kowall N, Ferrante R, Siwek D, Wilcox H, Flood D,Beal M, Brown R, Scott R, Snider W (1996). "Motor neurons in Cu/Zn superoxidedismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death afteraxonal injury". Nat Genet 13 (1): 43–7.

66. Reyes, R. C., Brennan, A. M., Shen, Y., Baldwin, Y., & Swanson, R. A. (2012). Activation of neuronal NMDA receptors induces superoxide-mediated oxidative stress in neighboring neurons and astrocytes. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(37), 12973–8. https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1597-12.2012

67. Scibior, D., & Czeczot, H. (2006). [Catalase: structure, properties, functions]. *Postępy Higieny I Medycyny Doświadczalnej (Online)*, *60*, 170–80. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16618987

68. Serafini, M., & Testa, M. F. (2009). Redox ingredients for oxidative stress prevention: the unexplored potentiality of coffee. *Clinics in Dermatology*, *27*(2), 225–229. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.04.007

69. Sukhia L.A. Sami Al'Saidi (2009) the importance of Research Enzymes Neutralize Free Radical Oxygen Specie in the Lens in Patient with age cataract. Lab delo 13; 144-149

70. Summers CH, Summers TR, Moore MC, Korzan WJ, Woodley SK, Ronan PJ, Hoglund E, Watt MJ, Greenberg N (2003), Temporal patterns of limbic monoamine and plasma corticosterone Response during social stress, Neuroscience, 116: 553-563.

71. Shim IS, Momose Y, Yamamoto A, Kim DW, Usui K. Inhibition of catalase activity by oxidative stress and its relationship to salicylic acid accumulation in plants. Plant Growth Regulation. 2003 Mar 1;39(3):285-92.

72. Shohami, E., & Biegon, A. (2014). Novel Approach to the Role of NMDA Receptors in Traumatic Brain Injury. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, *13*(4), 567–573. https://doi.org/10.2174/18715273113126660196

73. Soman, S., Korah, P. K., Jayanarayanan, S., Mathew, J., & Paulose, C. S. (2012). Oxidative stress induced NMDA receptor alteration leads to spatial memory deficits in temporal lobe epilepsy: Ameliorative effects of Withania somnifera and Withanolide A. *Neurochemical Research*, *37*(9), 1915–1927. https://doi.org/10.1007/s11064-012-0810-5

74. Steptoe, A. (1997). Stress management. In A. Baum, S. Newman, J. Weinman, R. West, & C. McManus (Eds.), Cambridge Handbook of Psychology, Health and Medicine (pp. 262-264). Cambridge: Cambridge University Press.

75. Taniguchi, S., Nakazawa, T., Tanimura, A., Kiyama, Y., Tezuka, T., Watabe, A. M., … Yamamoto, T. (2009). Involvement of NMDAR2A tyrosine phosphorylation in depression-related behaviour. *The EMBO Journal*, *28*(23), 3717–29. https://doi.org/10.1038/emboj.2009.300

76. Tietz, N. W. (ed.), Clinical Guide to Laboratory test; 3rd edition, WB Saunders Co, (1995)

77. Tian, J., & Xie, Z. (2008). The Na-K-ATPase and calcium-signaling microdomains. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *23*, 205–11. https://doi.org/10.1152/physiol.00008.2008

78. Tse, Y. C., Bagot, R. C., Hutter, J. A., Wong, A. S., & Wong, T. P. (2011). Modulation of synaptic plasticity by stress hormone associates with plastic alteration of synaptic NMDA receptor in the adult hippocampus. *PLoS ONE*, *6*(11). https://doi.org/10.1371/journal.pone.0027215

79. Weaver, J., Porasuphatana, S., Tsai, P., Cao, G.-L., Budzichowski, T. a, Roman, L. J., & Rosen, G. M. (2002). The activation of neuronal nitric-oxide synthase by various divalent cations. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *302*(2), 781–786. https://doi.org/10.1124/jpet.102.035337

80. Zaidi, A. (2010). Plasma membrane Ca-ATPases: Targets of oxidative stress in brain aging and neurodegeneration. World Journal of Biological Chemistry, *1*(9), 271–280. https://doi.org/10.4331/wjbc.v1.i9.271

81. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // соросовский образовательный журнал . 2000. Т6, №12-С.13-19;

82. Кольман Я, Рем К.Г. Наглядная биохимия. Пер. С нем – М. Мир. 200.-469с

83. Маянский Д.Н. Цырендоржиев Д.Д Активация макрофагов.// Успехи современной биологии.1990-Т.109 сю352-369.

84. Фурдуе Ф. Стресс. 1986