

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო

უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი

მიმართულება: ბიოქიმია

გიორგი ბურჯანაძე

“სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი ცირკადული
რიტმის დარღვევის გავლენა თავის ტვინის ფუნქციურ
მდგომარეობაზე”

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

სამეცნიერო ხელმძღვანელი: თსუ პროფესორი,
ბ.მ.დ. ნანა კომორიძე

თბილისი 2015

ანოტაცია

მეოცე საუკუნის შუა წლებიდან სამეცნიერო წრეებში აქტიურად დაიწყო სტრესის, როგორც მნიშვნელოვანი დამაზიანებელი ფაქტორის შესწავლა. მოხდა სხვადასხვა ტიპის სტრესორების იდენტიფიცირება და ინდივიდზე მათი მოქმედების მექანიზმების დახასიათება, რამაც დასაბამი მისცა ანტი-სტრესული საშუალებების შექმნას.

ხანგრძლივი სოციალური იზოლაცია და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევა მიჩნეულია მნიშვნელოვან სტრეს-ფაქტორებად, რომელნიც იწვევენ სხვადასხვა სახის მეტაბოლურ და მენტალურ დარღვევებს. აღსანიშნავია ის ფაქტიც, რომ მოცემული სტრესორების გავლენა სულ უფრო დიდ არეალს იკავებს, შესაბამისად მათი მოქმედების მექანიზმის გარკვევა და დახასიათება თანამედროვე მეცნიერების ერთ-ერთი აქტუალური საკითხია.

გამომდინარე იქიდან, რომ ორგანიზმზე ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის გავლენა ჯერ კიდევ არაა კარგად შესწავლილი, ჩვენი კვლევის ძირითადად წარმოადგენდა უკეთ წარმოგვეჩინა ის ცვლილებები რასაც ადგილი აქვს მათი მოქმედებისას თავის ტვინში.

ამისათვის, მოხდა მოცემული სტრესული პირობების ფონზე თავის ტვინში მიმდინარე ისეთი ძირითადი მეტაბოლური გზების დახასიათება, როგორცაა სასიგნალო სისტემები, ოქსიდაციური პროცესები და ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი.

ექსპერიმენტების შედეგად დადგინდა, რომ ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის ფონზე ადგილი აქვს ფსიქო-ემოციური სტრესის განვითარებას. ამასთან, თავის ტვინის ქსოვილში აღინიშნა რიგი პათოლოგიური ცვლილებები (მაგ. ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის აქტივობის დაქვეითება), რის მიზეზადაც უნდა გვევლინებოდეს განვითარებული ოქსიდაციური სტრესი.

შინაარსი

შესავალი	5
თავი I ლიტერატურული მიმოხილვა	10
I.1 სოციალური იზოლაცია და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევა, როგორც სტრეს-ფაქტორები	10
I.2 სეროტონინი	12
I.3 კორტიკოსტერონი	15
I.4 აზოტის ოქსიდი	17
I.5 ჟანგბადის აქტიური ფორმები და ანტიოქსიდანტური სისტემის ზოგიერთი ფერმენტი	19
I.6 მიტოქონდრიის გარდამავალი განვლადობის ფორა	23
I.7 სტრესის პირობებში უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის თავისებურება	27
თავი II კვლევის ობიექტი და მეთოდოლოგია	34
II.1 კვლევის ობიექტი და საექსპერიმენტო პირობები	34
II.2 კრეატინის ინტრაპერიტონეალური მიწოდება	34
II.3 სუბუჯრედული ფრაქციების მიღება	35
II.4 ჰორმონების რაოდენობრივი ცვლილებების განსაზღვრა	36
II.5 აზოტის ოქსიდის რაოდენობრივი განსაზღვრა	36
II.6 ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროდუქტების რაოდენობრივი განსაზღვრა	36
II.7 სუპეროქსიდდისმუტაზას ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრა	38

II.8	კატალაზას ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრა	39
II.9	აკონიტაზას ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრა	40
II.10	ფუმარაზას ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრა	40
II.11	სუქცინატდეჰიდროგენაზას ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრა	41
II.12	Ca ²⁺ -ატფაზას ფერმენტული აქტივობის და კალციუმის კონცენტრაციის განსაზღვრა	42
II.13	კრეატინკინაზას ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრა	42
II.14	მიტოქონდრიის გარდამავალი განვლადობის ფორის ფუნქციური მდგომარეობის განსაზღვრა	43
II.15	HPLC-MS/MS ანალიზი	43
II.16	კრეატინისა და ატფ-ის რაოდენობრივი განსაზღვრა	44
II.17	ჰექსოკინაზას ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრა	45
II.18	კრეატინის მასინთეზირებელი ფერმენტებისა და მატრანსპორტირებელი ცილის რაოდენობის განსაზღვრა	45
II.19	ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა	46
II.20	სტატისტიკური ანალიზი	46
თავი III	მიღებული შედეგები და მათი ანალიზი	47
	დასკვნა	99
	გამოყენებული ლიტერატურა	100
	გამოქვეყნებული პუბლიკაციები	117
	საკონფერენციო თეზისები	119

შესავალი

თანამედროვე ეპოქამ და ცივილიზაციის რევოლუციური ნაბიჯებით განვითარებამ ახალი გამოწვევების წინაშე დააყენა კაცობრიობა, რომელთა შორის აღსანიშნავია მომატებული სტრესული ფონი.

სტრესს, ანუ გარკვეული გარემო ფაქტორების გავლენას ცოცხალ სისტემაზე, რიგი უარყოფითი შედეგების მოტანა შეუძლია, რომლებიც შესაძლოა ლეტალურადაც კი დამთავრდეს. თუმცა აღსანიშნავია ის ფაქტიც, რომ ორგანიზმზე სტრესული ფაქტორების ხანმოკლე ზემოქმედებას, ზოგიერთ შემთხვევაში, დადებითი ეფექტიც კი შესაძლოა ჰქონდეს, რაც ფართოდ გამოიყენება სამედიცინო პრაქტიკაში.

მეოცე საუკუნის 70-80-იან წლებში, პირველად განისაზღვრა ინდივიდის სოციალური იზოლაციით გამოწვეული სტრესის ეპიდემიოლოგიური ხასიათი და მას შემდეგ ამ კუთხით მრავალი კვლევა ჩატარდა. აღნიშნულმა გამოკვლევებმა წარმოაჩინა ორგანიზმზე პროცესის უარყოფითი ზეგავლენის ხასიათი და მნიშვნელობა.

ცნობილია, რომ ნერვული და ჰუმორული სისტემა წარმოადგენს ძირითად მაკონტროლებელ მექანიზმს, რის საფუძველზედაც ადგილი აქვს ორგანიზმის, როგორც ერთი მთლიანის ფუნქციონირებას, და სწორედ ეს ორი სისტემა წარმოადგენს გარემო ფაქტორების ზემოქმედების უშუალო სამიზნეს.

ამ კუთხით მნიშვნელოვანია თავის ტვინში სინთეზირებული სეროტონინისა და თირკმელზედა ჯირკვლის ჰორმონის, კორტიკოსტერონის რაოდენობრივი ცვლილებები, რომელნიც სტრესული მდგომარეობის ძირითად ბიოქიმიურ მარკერებს წარმოადგენენ.

ორგანიზმში ისეთი ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების, როგორცაა ჰორმონები სეროტონინი, კორტიკოსტერონი და მელატონინი, რაოდენობრივი ცვლილებები უშუალოდ აისახება უჯრედულ მეტაბოლიზმზე. კერძოდ, ისინი, როგორც პირველადი მესენჯერები, უზრუნველყოფენ უჯრედშიდა არემი მეორადი

მესენჯერების სინთეზს, რასაც თან სდევს რთული უჯრედშიდა სასიგნალო კასკადების გააქტივება, რაც თავის მხრივ, გავლენას ახდენს სხვადასხვა უჯრედულ მეტაბოლურ პროცესზე და შესაძლოა რიგი პათოლოგიური ცლილების გამომწვევი მიზეზიც გახდეს (მაგ. ჟანგვითი სტრესის აქტივაცია).

ცნობილია, რომ უჯრედშიდა სასიგნალო კასკადის მიმდინარეობასა და მის ინტესივობაში სხვადასხვა აქტიური მოლეკულებია ჩართული. მათ შორის აღსანიშნავია კალციუმის იონი (Ca^{2+}), რომელიც მრავალ მნიშვნელოვან მეტაბოლურ პროცესშია ჩართული და ამდენად, ორგანიზმის ნორმალურ ცხოველქმედებისათვის გადამწვეტი როლი ენიჭება (ნეიროიმპულსების გადაცემა, კუნთის შეკუმშვა, გულის კუნთის მუშაობა, ფერმენტული რეაქციების მიმდინარეობის რეგულირება, სხვადასხვა ტიპის სასიგნალო ცილოვანი მოლეკულების აქტივაცია–ინაქტივაცია და სხვ.).

კალციუმის იონის მსგავსად, სასიგნალო მოლეკულებიდან აღსანიშნავია აზოტის ოქსიდი, რომლის მიმართ ინტერესი, მისი მოქმედების ხასიათის მრავალფეროვნების გამო, XX საუკუნის 80-იანი წლებიდან არ ცხრება.

აზოტის ოქსიდის (NO) სინთეზი ორგანიზმში სხვადასხვა გზით ხორციელდება, თუმცა ძირითადად მისი წარმოქმნა L-არგინინიდან წარმოებს.

უჯრედში NO-ს სიჭარბე შესაძლოა ოქსიდაციური სტრესის განვითარების მიზეზი გახდეს, რასაც თან სდევს უჯრედის მემბრანული კომპონენტების დაჟანგვის აქტივაცია და შესაბამისად, მემბრანული პროცესების ინაქტივირება.

აღნიშნული სახის გარდაქმებისადმი მნიშვნელოვან მგრძობელობას ავლენს მემბრანული ლიპიდები, რის შედეგადაც ადგილი აქვს ე.წ. ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის (ლზჟ) პროცესის განვითარებას. ამის მიზეზია თავისუფალ-რადიკალური ჟანგვის აქტივაცია, რაც გამოიხატება ჟანგბადისა აქტიური რადიკალების (ROS) და ნიტროზოლირების პროდუქტების პროდუცირებით, რომლებიც ძლიერ დამჟანგავ ფაქტორს წარმოადგენენ შედიან რა ქიმიური რეაქციაში უჯრედისათვის აუცილებელი მნიშვნელოვანი მოლეკულების შემადგენლობაში არსებულ სხვადასხვა აქტიურ ჯგუფებთან.

აღსანიშნავია, რომ უჯრედი, როგორც უაღრესად დინამიური, მოწესრიგებული სტრუქტურა, მუდმივად განიცდის სხვადასხვა ფაქტორებით გამოწვეული ჟანგვითი სტრესის ზემოქმედებას. თუმცა, ამ პროცესის გააქტივების შედეგად წარმოქმნილი თავისუფალი რადიკალების გაუვნებელყოფისათვის უჯრედში ფუნქციონირებს ე.წ. ანტიოქსიდანტური სისტემა. ეს სისტემა წარმოდგენილია ზოგიერთი ენდოგენური ნაერთითა და ე.წ. ანტიოქსიდანტური ფერმენტებით.

უჯრედულ მეტაბოლურ პროცესებს შორის ერთ-ერთი მნიშვნელოვანია ენერგეტიკული ჰომეოსტაზის შენარჩუნება. ფიზიოლოგიურ პირობებში სისტემის მიერ ატფ-ის მოხმარება მუდმივ, დაბალანსებულ წონასწორობაშია მის სინთეზთან, რასაც უზრუნველყოფს სხვადასხვა მეტაბოლური გზები (გლიკოლიზი, კრებსის ციკლი, ჟანგვითი ფოსფორილირება, ცხიმოვანი მჟავების დაჟანგვა და სხვ.). ეს პროცესი საკმაოდ მგრძობელობას ავლენს სხვადასხვა გარეგანი ფაქტორის მიმართ, რომელთა შორისაა ფსიქო-ემოციური სტრესი. ნებისმიერი დარღვევა, რომელიც უჯრედში მიმდინარეობს პირდაპირ ან არაპირდაპირ მოქმედებს უჯრედის ენერგეტიკულ ჰომეოსტაზზე.

როგორც ცნობილია, უჯრედში ენერჯის წარმოქმნის პროცესი იწყება ციტოპლაზმაში და მიტოქონდრიის მატრიქსში მიმდინარე ლიმონმჟავა (კრებსის) ციკლით გრძელდება, რომელიც ერთგვარი დამაკავშირებელ რგოლს წარმოადგენს ციტოზოლში მიმდინარე პროცესებსა და მიტოქონდრიულ სუნთქვის ჯაჭვს შორის, შესაბამისად ამ სისტემის თითოეულ ეტაპზე მიმდინარე ცვლილება ასახავს ჰპოვებს სისტემის ენერგოსტაბილურობაზე.

დადგენილია, რომ ქსოვილებისათვის, რომელნიც მოიხმარენ ჭარბ და ცვალებადი რაოდენობის ენერჯიას (ჩონჩხისა და გულის კუნთი, ნერვული ქსოვილი) კლასიკური გზებით სინთეზირებული ატფ-ის ენერჯია არაა საკმარისი. აღმოჩნდა, რომ ამ ქსოვილებში ენერგეტიკული ბალანსის შესანარჩუნებლად დამატებით ფუნქციონირებს სპეციალიზირებული ბუფერული სისტემა, რომელსაც კრეატინ/ფოსფოკრეატინ/კრეატინკინაზული (Cr/PCr/CK) ციკლი ეწოდება.

აღსანიშნავია, რომ აღნიშნული ციკლი მაღალენერგეტიკული ფოსფატების ბუფერული სისტემის გარდა, მათი მატრასპორტირებელიცაა, კერძოდ მისი

დახმარებით მიმდინარეობს მიტოქონდრიაში წარმოქმნილი მაკროერგების ტრანსპორტირება ციტოპლაზმაში. ნანახია, რომ ამ სისტემისა ფუნქციონირების და მისი შემაღენელი კომპონენტების რაოდენობრივი ცვლილებები სხვადასხვა პათოლოგიური პროცესის განვითარების მიზეზი ხდება.

დადგენილია, რომ ამ სისტემის ფერმენტი კრეატინკინაზა გამოირჩევა ქსოვილ-სპეციფიურობით და იგი უჯრედში სუბუჯრედული იზოფორმების სახით ფუნქციონირებს. ამასთან, მიტოქონდრიაში ის ფუნქციურადაა დაკავშირებული ე.წ. გარდამავალი განვლადობის ფორასთან (MPTP), რომელიც მრავალკომპონენტის ტრანსმემბრანულ არხს წარმოადგენს, თუმცა მისი სტრუქტურა ბოლომდე გაშიფრული არაა. ცნობილია, რომ MPTP მონაწილეს მიტოქონდრიის მემბრანული პოტენციალის შენარჩუნებაში, იგი ასევე აქტიურადაა ჩართული მიტოქონდრიაში კალციუმის იონის რაოდენობრივი შემცველობისა და აპოპტოზური პროცესების რეგულირებაში.

სამუშაოს მიზანი და ამოცანები:

სამუშაოს მიზანს წარმოადგენდა თეთრი, მამრობითი სქესის ვირთაგვას თავის ტვინის ფუნქციური მდგომარეობის შეფასება ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციითა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში.

აქედან გამომდინარე ჩვენს წინაშე დასახული იყო შემდეგი ამოცანები:

1. ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში ზოგიერთი ჰორმონის (კორტიკოსტერონი, სეროტონინი, მელატონინი) რაოდენობრივი ცვლილებების დადგენა;

2. აღნიშნულ პირობებში თავის ტვინში ოქსიდაციური პროცესების მიმდინარეობაზე დაკვირვება ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროდუქტების რაოდენობრივი შემცველობისა და ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტის აქტივობის ცვლილების მაგალითზე;

3. ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში თავის ტვინის უჯრედებში მიმდინარე ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის თავისებურების დადგენა;

4. სტრესულ პირობებში Cr/PCr/CK სისტემის ფუნქციონირებაში მიმდინარე ცვლილებების შესწავლა;

5. სტრესულ პირობებში კრეატინის რაოდენობრივი ცვლილების ხასიათის დადგენა.

ნაშრომის სტრუქტურა: ნაშრომი მოიცავს შესავალს, ლიტერატურულ მიმოხილვას, გამოყენებული მეთოდების აღწერას, მიღებულ შედეგებსა და მათ განხილვას, დასკვნებსა და გამოყენებული ლიტერატურის სიას.

I. ლიტერატურული მიმოხილვა

I.1 სოციალური იზოლაცია და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევა, როგორც სტრეს-ფაქტორები

1936 წელს კანადელმა მეცნიერმა ჰანს სელიემ გამოკვლევებით დაადგინა ორგანიზმზე გარკვეული გარემო ფაქტორების გავლენა და ამ მოვლენას „სტრესი“ უწოდა [1].

მრავალმა კვლევამ დაადასტურა, რომ გარეგანი სტრეს-ფაქტორების ხანმოკლე ზემოქმედება რიგ შემთხვევაში დადებითი ეფექტის მომტანია, თუმცა ამ პირობებში ხანგრძლივი პერიოდით ყოფნამ შესაძლოა მძიმე შედეგებამდე მიიყვანოს სისტემა.

სტრესის განვითარებაში განარჩევენ სამ ძირითად ფაზას, ესენია: განგაშის, რეზისტენტობისა და ადაპტაციის ან/და გამოფიტვის სტადიები. სამივე საფეხური ხასიათდება სპეციფიური ფიზიოლოგიური და ბიოქიმიური მახასიათებლებით [2-4].

XX საუკუნის 80-იან წლებში სტრეს-ფაქტორთა სიას დაემატა ე.წ. სოციალური იზოლაცია. ამ პერიოდში ჩატარებული კვლევებით დადგინდა მსგავსი ზემოქმედების უარყოფითი გავლენა ორგანიზმზე, მის ფუნქციონირებასა და სიკვდილიანობის მაჩვენებელზე [5-7].

აღმოჩნდა, რომ აღნიშნული ზემოქმედება, ორგანიზმისათვის მიყენებული ზიანის თვალსაზრისით, არ ჩამორჩება სიგარეტის წევას, ნარკოტიკებისა და ალკოჰოლის მოხმარებას და ფსიქო-სოციალურ სტრეს-ფაქტორებს [8], თუმცა დღევანდლამდე მაინც არ არის ზუსტად განსაზღვრული, თუ რატომ არის სოციალური იზოლაცია ესეღონ სარისკო სიცოცხლისათვის და ამ კუთხით კვლევა დღესაც აქტიურად მიმდინარეობს.

არსებობს მონაცემები, რომელთა მიხედვითაც სოციუმისგან იზოლაცია წარმოადგენს მნიშვნელოვან სტრეს-ფაქტორს, რომლის გახანგრძლივების შემთხვევაში შესაძლოა განვითარდეს მძიმე პროცესები და ორგანიზმი შესაძლოა ლეტალურ შედეგამდეც კი მივიდეს [9]. მრავალი მეცნიერის აზრით, თანამედროვე

მსოფლიოში კომპიუტერული ტექნოლოგიების, ინტერნეტისა და სოციალური ქსელების განვითარება ხელს უწყობს ადამიანების ურთიერთკავშირს [10], თუმცა მეორეს მხრივ, არსებობს მონაცემები, რომელთა მიხედვით აღნიშნული გარემოებები პირიქით, წარმოადგენს სოციალური არსების, ამ შემთხვევაში ადამიანის, ვირტუალურ სამყაროში გადასვლის საფუძველს და გარკვეულწილად ახდენს პიროვნების იზოლაციას საზოგადოებისგან, რაც უარყოფითად აისახება მასზე [11; 12].

დადგენილია, რომ ინდივიდის იზოლაცია და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევა წარმოადგენს მძლავრ სტრეს-ფაქტორს, რომლის ზემოქმედების შედეგად ორგანიზმში აღინიშნება რიგი ჰორმონალური ცვლილებები, აგრესიისა და შფოთვის მატება, ასევე დეპრესიის განვითარება, რაც ფსიქო-ემოციური სტრესის მიზეზი ხდება [14-18].

თანამედროვე სამეცნიერო კვლევებით დასტურდება ინდივიდთა სოციალური იზოლაციითა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის გავლენა უჯრედში მიმდინარე ბიოქიმიურ პროცესებზე. კერძოდ, დადგენილია, რომ აღნიშნულ პირობებში ვითარდება ოქსიდაციური სტრესი, რასაც მოსდევს მემბრანული ლიპიდების დაზიანება ზეჟანგური ჟანგვის პროცესების აქტივაციის გზით. ასევე, არსებობს მონაცემები ორგანიზმის იმუნურ სისტემაზე ფსიქო-ემოციური სტრესის უარყოფითი გავლენის შესახებ, რაც ხშირად სიცოცხლისათვის საშიში პროცესების გააქტივების მიზეზი ხდება [13].

სულ უფრო მეტი სამეცნიერო მონაცემი მიუთითებს ფსიქო-ემოციური სტრესის შედეგად ნორადრენერგული და სეროტონინერგული სისტემების ჰიპერაქტივაციასა და γ -ამინოერბომჟავაერგული (GABA) სისტემის ინჰიბიციაცაზე [19; 20].

აღმოჩნდა, რომ ფსიქოემოციური სტრესი მძიმე ზეგავლენას ახდენს დასწავლის ხარისხზეც, რაც აისახება სტრესთან დაკავშირებული ნეიროგადამცემების (სეროტონინი) და სტრეს-ჰორმონების (გლუკოკორტიკოიდები) ურთიერთდამოკიდებული რაოდენობრივი ცვლილებით [21]. არსებობს მონაცემები აღნიშნულ პირობებში NMDA რეცეპტორული სისტემის ჩართულობის შესახებაც [22].

ცნობილია, რომ ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესი გავლენას ახდენს უჯრედში NO-სა და გლუტათიონის (GSH) რაოდენობაზე, რაც გამოიხატება ამ უკანასკნელის რაოდენობრივი შემცირებით, ხოლო აზოტის ქანგის მატებით. აღნიშნული კი ოქსიდაციური სტრესის განვითარების პირდაპირპროპორციული მაჩვენებელია [23].

გარდა ბიოქიმიური დარღვევებისა, აღსანიშნავია ფსიქო-ემოციური სტრესით გამოწვეული ფიზიოლოგიური დარღვევებიც, რომლებიც ნათლად მიუთითებს ორგანიზმზე აღნიშნული სტრეს-ფაქტორების უარყოფით ზეგავლენას.

საბოლოოდ, შეიძლება ითქვას, რომ ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესი ნეგატიურ გავლენას ახდენს ცოცხალ სისტემაზე, რაც გამოიხატება ტროფული ფუნქციების დაქვეითებით, სიმსივნური პროცესების გააქტივებით, უჯრედულ დონეზე მეტაბოლური პროცესების იჰიბირებითა და გადაგვარებით, რასაც ლეთალურ შედეგამდე შეუძლია მიიყვანოს ცოცხალი სისტემა.

I.2 სეროტონინი

1935 წელს იტალიელმა მეციერმა ვიტორიო ესპამერმა დაადგინა, რომ ნაწლავების ენტეროქრომაფინური უჯრედებიდან მიღებული ექსტრაქტი იწვევდა ნაწლავების შეკუმშვას და მას ენტერამინი უწოდა [24]. ამასთანავე, არსებობდა მოსაზრება, რომ აღნიშნული ექსტრაქტი წარმოადგენდა ადრენალინს, თუმცა გამოკვლევებით ეს ვერსია არ დადასტურდა. 1948 წელს ამერიკელმა მეცნიერებმა სისხლის შრატში აღმოაჩინეს ნივთიერება, რომელიც გავლენას ახდენდა სისხლძარღვების შეკუმშვაზე და მას სეროტონინი უწოდეს [25].

საბოლოოდ 1952 წელს დადგინდა, რომ მეოცე საუკუნეში, სხვადასხვა დროსა და ადგილას აღმოჩენილი შემკუმშავი აგენტები, რომელთაც ენტერამინი და სეროტონინი უწოდეს, წარმოადგენდნენ ერთ ნივთიერებას და სამეცნიერო ლიტერატურაში დამკვიდრდა 5-ჰიდროქსიტრიპტამინის (5HT) სახელწოდებით [26].

ადამიანში სეროტონინის დაახლოებით 80% გვხვდება ნაწლავის ენტეროქრომაფინურ უჯრედებში, სადაც ის არეგულირებს ნაწლავების

პერისტალტიკას, ხოლო დანარჩენი - ცენტრალური ნერვული სისტემის (ცნს) სეროტონინერგულ ნეირონებსა და სისხლის პლაზმაში. საყურადღებოა, რომ საკუთრივ სეროტონინისათვის ჰემატოენცეფალური ბარიერი განუვლადია, ხოლო მისი სინთეზისათვის საჭირო ნაერთები მარტივად გადალახავენ მას [27; 28].

ცნს-ში სეროტონინი წარმოადგენს ნეირომედიტორს, რომლის სინთეზი L-ტრიპტოფანის ჰიდროქსილირების საშუალებით ხდება. შედეგად წარმოიქმნება 5-ჰიდროქსიტრიპტოფანი (5-HTP). რეაქციას აკატალიზებს ფერმენტი ტრიპტოფანჰიდროქსილაზა (TPH), რომელიც ორგანიზმში ორი იზოფორმის (TPH1 და TPH2) სახით არსებობს. TPH1 ნაწილობრივ სხვადასხვა ქსოვილში, ხოლო TPH2 მხოლოდ თავის ტვინისათვის დამახასიათებელი სუბტიპია. 5-HTP განიცდის ფერმენტულ დეკარბოქსილირებას, რის შედეგადაც წარმოიქმნება 5-ჰიდროქსიტრიფტამინი (5-HT), ანუ სეროტონინი. რეაქციას აკატალიზებს ფერმენტი 5-ჰიდროქსიტრიფტოფანდეკარბოქსილაზა (AADC) [29, 30]. ნაჩვენებია აგრეთვე AADC-ზე პირიდოქსინის გამააქტივებელი ეფექტი [31].

სეროტონინის შემცველი ნეირონული სხეულები წარმოქმნიან გარკვეულ კლასტერებს, რომლებიც განლაგებულია თავის ტვინის ღეროს შუა ნაწილში. ამ ნეირონების აქსონები ახდენს ცნს-ში თითქმის ყველა უბნის ინერვაციას. აღნიშნული გროვები შეესაბამება ე.წ. რაფის ბირთვებს, თუმცა სრულად არ მოიცავს მათ. დაღწრომმა და ფუქსმა აღწერა სეროტონინის შემცველი ნეირონული სხეულების 9 ჯგუფი და ისინი აღნიშნეს, როგორც B₁, B₂ და ა.შ. [32].

ელექტრული იმპულსის საპასუხოდ სეროტონინერგული ნეირონების სხეულები ახდენს ტრიპტოფანიდან 5-HT-ს ჭარბ პროდუცირებას, ხოლო ეს პროცესი მნიშვნელოვნადაა დამოკიდებული ექსტრაცელულარულ Ca²⁺-ზე, რაც გამოიხატება TPH-ის Ca²⁺-დამოკიდებული ფოსფორილებითა და აქტივაციით [33].

სეროტონინის ვეზიკულებში მოთავსება მიმდინარეობს აქტიური ტრანსპორტის მექანიზმით, რომელშიც მონაწილეობს ე.წ. ვეზიკულური ტრანსპორტერები (VMAT₁, VMAT₂). ამასთან, პროცესისათვის აუცილებელია ელექტროქიმიური გრადიენტის არსებობა, რომელსაც ვეზიკულური H⁺-ატფაზა უზრუნველყოფს, წყალბადი პროტონების ვეზიკულაში გადაქაჩვის გზით.

საბოლოოდ, VMAT₁-სა და VMAT₂-ს, რომლებიც წარმოადგენენ ციტპლაზმიდან ტოქსიკური ნივთიერებების ვეზიკულაში გადამტანი სპეციფიური ტრანსპორტერების ჰომოლოგებს, ატიპორტული მექანიზმის საშუალებით გადააქვთ 5-HT [34], ხოლო რაც შეეხება სეროტონინის სინაპსურ ტრანსპორტს, ამ პროცესს უზრუნველყოფს მისი სპეციფიური ტრანსპორტერი (SERT), რომელიც მდებარეობს სეროტონინერგული ნეირონების მემბრანაში და Na⁺-დამოკიდებულ არხს წარმოადგენს, რომელიც აკონტროლებს სინაფსში სეროტონინის რაოდენობას. ის მიეკუთვნება Na⁺- და Cl⁻- დამოკიდებული ტრანსპორტერების ოჯახს [35; 36].

აღმოჩნდა, რომ Ca²⁺-ის უჯრედში შესვლას შეუძლია გაზარდოს 5-HT-ის გამონთავისუფლება. აღწერილია Ca²⁺-ის როლი ვეზიკულური და პლაზმური მემბრანის შრწყმაში. ამასთან, აღსანიშნავია, რომ თავის მხრივ სეროტონინიც მონაწილეობს უჯრედშიდა დეპოებიდან Ca²⁺-ის აქტიურ გამონთავისუფლებაში [37].

5-HT რეცეპტორები ნაწილობრივ, როგორც ცენტრალურ ისე პერიფერიულ ნერვულ სისტემაში და მათ ბუნებრივ ლიგანდს სეროტონინი წარმოადგენს [38, 39].

სეროტონინის რეცეპტორები, გარდა 5-HT₃-ისა, წარმოადგენენ G-ცილებთან ასოცირებულ არხებს, ხოლო 5-HT₃ ლიგანდ-დაჭიმურული იონური არხია.

სეროტონინის რეცეპტორები უზრუნველყოფენ მრავალი ნეირომედიატორის გამოყოფას (დოფამინი, გაემ, გლუტამატი, ეპინეფრინი/ნორეპინეფრინი და სხვ.), ასევე სხვადასხვა ჰორმონის, რომელთა შორისაა ოქსიტოცინი, პროლაქტინი, ვაზოპრესინი, კორტიზოლი, კორტიკოტროპინი და სხვა. შესაბამისად აღნიშნული რეცეპტორების როლი მნიშვნელოვანი სხვადასხვა ფიზიოლოგიურ პროცესებში (გალიზიანებადობა, ძილი, დასწავლა, მეხსიერება, აგრესია და სხვ.) [40].

აღსანიშნავია სეროტონინერგული სისტემის ფუნქცია ე.წ. ცირკადული რიტმის ნორმალურ ფუნქციონირებაში, სადაც ის გვევლინება სინათლეზე დამოკიდებული რეაქციების მაკონტროლებელად [41].

აღმოჩნდა, რომ სეროტონინი მონაწილეობს სტრეს-ჰორმონების (კორტიკოსტერონი, კორტიზოლი) გამოყოფის პროცესშიც. 5-HT-ის სიჭარბე არღვევს აღნიშნული ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთების ნორმალური გამონთავისუფლების პროცესს [42].

ნეირონების, გლიური და სხვა მრავალი სახის უჯრედის მიტოქონდრიის გარე მემბრანაზე წარმოდგენილია ინტეგრალური ფლავოპროტეინი, რომელსაც მონოამინოქსიდაზა (MAO) ეწოდება. ეს უკანასკნელი მონაწილეობს სეროტონინის უჯრედშიდა კატაბოლიზმის პროცესში და მას 5-ჰიდროქსინდოლაცეტალდეჰიდად გარდაქმნის. არსებობს აღნიშნული ფერმენტის ორი იზოფორმა: MAO-A და MAO-B, რომლებიც განსხვავებულ სუბსტრატულ სპეციფიურობას ავლენენ [43; 31].

I.3 კორტიკოსტერონი

თირკმელზედა ჯირკვლის გარე შრის უჯრედები სისხლში გამოყოფენ ერთ-ერთ მნიშვნელოვან სტეროიდულ ჰორმონს - კორტიკოსტერონს (CORT), რომელიც სამეცნიერო ლიტერატურაში „სტრეს-ჰორმონის“ სახელწოდებითაც მოიხსენიება. ის, სტრესული მდგომარეობის ბიოქიმიური იდენტიფიცირების, ერთ-ერთ ძირითად მარკერს წარმოადგენს [44].

ცნობილია, რომ ჰიპოთალამუს-ჰიპოფიზ-თირკმელზედა ჯირკვლის (HPA) ფუნქციური ჯაჭვი მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ნერვული, გულ-სისხლძარღვთა, იმუნური სისტემების ფუნქციონირებასა და სხვადასხვა მეტაბოლური პროცესების ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაში. HPA-ს ძირითადი რეგულატორული ფუნქცია, ცირკადული და სტრესთან დაკავშირებული პროცესების რეგულაციაში ინიცირდება ჰიპოთალამური პარავენტრიკულური უჯრედების (PVC) პარავენტრიკულარულ სუბნაწილში [45].

აღნიშნული უჯრედების უმრავლესობა აწარმოებს კორტიკოტროპინ გამომყოფი ჰორმონისა (CRH) და ვაზოპრესინის (VP) სეკრეციას, რაც იმავდროულად ასტიმულირებს ჰიპოფიზის კორტიკოტროპული უჯრედების მიერ სისხლში ადენოკორტიკოტროპული ჰორმონის (ACTH) სეკრეციას, რომელიც ერთგვარ სტიმულს წარმოადგენს, თირკმელზედა ჯირკვლის მიერ ქოლესტერინიდან CORT-ის სინთეზისათვის, ხოლო ეს უკანასკნელი კი თავის მხრივ აღნიშნული სისტემის მაინჰიბირებელი ფაქტორია [46].

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ CORT მნიშვნელოვან როლს თამაშობს ამინომჟავების გლუკონეოგენეზში ჩართვის პროცესში, რაც აუცილებელია უჯრედშიდა გლიკოგენის ჰომეოსტაზის შენარჩუნებისათვის [47].

ნაჩვენებია სტრესული მდგომარეობის დამოკიდებულება HPA კასკადზე და სიმპატოადრენალურ სისტემაზე, რომლებიც ძირითად ბიოქიმიურ მექანიზმებს წარმოადგენენ სტრესში, როგორც ადამიანში, ისე სხვა ცხოველურ ინდივიდებში [48].

კორტიკოსტერონი, მსგავსად რიგი სტეროიდული ჰორმონებისა, სინთეზირდება თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქოვან შრეში და მის წინამორბედს პრეგნენოლონი წარმოადგენს. ეს უკანასკნელი ციტოქრომ P450-ის ორი იზოფორმის (P450c21 და P450c11) მონაწილეობით მიმდინარე ფერმენტული რეაქციის შედეგად გარდაიქმნება კორტიკოსტერონად [49].

კორტიკოსტერონი წარმოადგენს ძირითად გლუკოკორტიკოიდს, რომელიც ჩართულია იმუნურ რეაქციებსა და სტრესულ პირობებში მიმდინარე პროცესებში [50]. ასევე მნიშვნელოვანია მისი როლი სხვადასხვა დაავადებების ფორმირებაში (კუმინგის სინდრომი, ნელსონის დაავადება და სხვ.) [51].

ნაჩვენებია CORT-ის სინთეზისა და მეტაბოლიზმში სეროტონინერგული სისტემის გავლენა [52] და ჰორმონის მალიმიტირებელი მოქმედება Ca^{2+} -ის, როგორც მეორადი მესენჯერის მოქმედებაზე [53].

ცნს-ში აღწერილია ორი ტიპის კორტიკოსტეროიდული რეცეპტორი, თუმცა სტრეს-ჰორმონის სპეციფიური რეცეპტორები ნანახია ასევე სხვა ქსოვილებშიც.

თავის ტვინში არსებული ორი ტიპის კორტიკოსტეროიდულ რეცეპტორებს (I და II) შორის განსხვავება სუბსტრატების მიმართ (გლუკოკორტიკოიდები, მინერალოკორტიკოიდები) თვისობაზეა დამყარებულია. ამასთან, პირველი ტიპის რეცეპტორი მეტ აფინურობას ავლენს ჰორმონის მიმართ და წარმოდგენილია ჰიპოკამპის ყველა უბანში (CA1, CA2 და CA3), თუმცა CA3-ში, სხვა ჰიპოკამპურ რეგიონებთან შედარებით, გლუკოკორტიკოიდების რაოდენობა საკმაოდ მცირეა [54].

ორივე ტიპის კორტიკოსტეროიდული რეცეპტორი ლიგანდ-აქტივირებადი ტრანსკრიპციული ფაქტორების სუპეროჯახის წარმომადგენელია და ციტოპლაზმაში ასოცირებულია სითბური შოკის ცილების (HSP70 და HSP90) შემცველ

მულტიცილოვან კომპლექსთან. ისინი მონაწილეობენ ტრანსკრიპციული პროცესების რეგულაციაში [55].

კორტიკოსტერონის ზემოქმედების ინჰიბირება წარმოებს ორი ძირითადი გზით. პირველი, როდესაც სხვა სტეროიდული ჰორმონი ახდენს სპეციფიური რეცეპტორის ბლოკირებას, ხოლო მეორე მექანიზმის საშუალებით ხდება CORT-ის ფერმენტული გარდაქმნა ალდოსტერონად. კორტიკოსტერონის რაოდენობრივი ცვლილების ზუსტი მექანიზმი სტრესის პირობებში არაერთგვაროვან ხასიათს ატარებს და ბოლომდე შესწავლილი არ არის [56].

I.4 აზოტის ოქსიდი

1980-იან წლებში ჩატარებულმა კვლევებმა აჩვენა აზოტის მონოოქსიდის (NO), როგორც ენდოთელიუმიდან მიღებული რელაქსაციური ფაქტორის ვაზოდilatაციური მოქმედება.

ლიტერატურაში გაჩნდა მონაცემები, რომ გარდა სისხლძარღვების კედლებზე რელაქსაციური ეფექტისა, ის მრავალ სხვა სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვან პროცესშიც იღებს აქტიურ მონაწილეობას, რისთვისაც 1992 წელს მას „წლის მოლეკულის“ სტატუსი მიენიჭა [57].

უჯრედში NO-ს სინთეზი ამინომჟავა L-არგინინიდან ხდება და რეაქციას ფერმენტი NO-სინთაზა (NOS) აკატალიზებს. რეაქცია მიმდინარეობს NADPH-ისა და O₂-ის თანაობისას, შედეგად კი მიიღება ციტრულინი, NADP⁺ და NO [58].

ცნობილია NOS-ის რამოდენიმე იზოფორმა: ნეირონული NOS (nNOS), ენდოთელური NOS (eNOS) და ინდუციბელური NOS (iNOS). ეს უკანასკნელი ძირითადად ფაგოციტებში გვხვდება, თუმცა სამივე ფერმენტი თითქმის ყველა ქსოვილშია წარმოდგენილი [59].

nNOS და eNOS მუდმივად აწარმოებენ NO-ს სინთეზს სხვადასხვა სიგნალების საპასუხოდ. აღსანიშნავია მათ აქტივობაზე უჯრედშიდა კალციუმის კონცენტრაციის გავლენა, რომელიც პროცესის ეფექტორად გვევლინება. ამასთან, NO-ს სინთეზის გაზრდა შესაძლოა აღნიშნული იონისგან დამოუკიდებლადაც განხორციელდეს [60].

ნაჩვენებია, რომ iNOS-ის აქტივობა ჩვეულებრივ ძალიან მცირეა და ის მხოლოდ კონკრეტული იმუნური პასუხის შემთხვევაში აქტივდება, თუმცა მისი ეფექტი უფრო ხანგრძლივია სხვა NOS-თან შედარებით [61].

დადგენილია, რომ გარეგანი აგენტების მიერ ინიცირებული პროცესის შედეგად სეკრეტირებული აზოტის ოქსიდი წარმოადგენს თავისუფალ რადიკალს და ძლიერ ტოქსიკური ნარტია. აღსანიშნავია, რომ მას შეუძლია გამოიწვიოს დნმ-ის დაზიანება და რკინა-გოგირდოვანი ცენტრების დეგრადაცია [62-67].

საკუთრივ NO-ს სიცოცხლის ხანგრძლივობა მცირეა, თუმცა მას დიდი მნიშვნელობა აქვს მრავალი უჯრედული რეაქციის წარმართვისათვის. ამ რეაქციათა რიგს მიეკუთვნება: რკინა-შემცველი ფერმენტების დაჟანგვა (რიბონუკლეოტიდ-რედუქტაზა და აკონიტაზა), ხსნადი გუანილატციკლაზას აქტივაცია (სისხლძარღვების გლუვი კუნთების მოდუნება), ცილების ADP-რიბოზილირება, მათი გოგირდოვანი ჯგუფების ნიტროზილირება და რკინა-რეგულატორული ფაქტორების აქტივაცია [69].

სხვადასხვა პათოლოგიურ მდგომარეობაში NO მოქმედებს პერიფერიული სისხლის მონონუკლეარულ უჯრედებზე და ახდენს NF-kB-ს აქტივაციას, რომელიც iNOS-ის გენის ექსპრესიის გაძლიერების მოდულატორია [68].

აღსანიშნავია, ის ფაქტიც, რომ აუტონომიური ნერვული სისტემის ზოგიერთი მოტორული ნეირონი NO-ს გამოყოფს, როგორც ნეირომედიატორს [70, 71].

თანამედროვე სამეცნიერო ლიტერატურაში აქტიურად მიმდინარეობს მსჯელობა NO-ს, როგორც აპოპტოზის პროცესში მონაწილე მნიშვნელოვანი მოლეკულის შესაზებ [61].

თუმცა, დღესდღეობით NO-ს ზუსტი როლი ორგანიზმში ჯერ-ჯერობით დაუზუსტებელია, რადგან ის ჩართულია, როგორც დადებით, ისე უარყოფით პროცესებშიც და შესაბამისად, აზოტის ოქსიდი ერთგვარად ორმაგი მოქმედების უჯრედულ მედიატორს წარმოადგენს, რომელსაც გადამწყვეტი როლი ენიჭება მრავალი პროცესის წარმართვაში [72].

I.5 ჟანგბადის აქტიური ფორმები და ანტიოქსიდანტური სისტემის ზოგიერთი ფერმენტი

ა) ჟანგბადის აქტიური ფორმები (ROS)

უჯრედში მიმდინარე ჟანგვა-აღდგენითი რეაქციების შედეგად მუდმივად წარმოიქმნება ე.წ. ჟანგბადის აქტიური ფორმები (ROS), რომელნიც ძლიერ მჟანგავ რადიკალებს წარმოადგენს და მნიშვნელოვანია სხვადასხვა პროცესის ნორმალური ფუნქციონირებისათვის [73].

ამასთან, ნორმალურ პირობებში უჯრედს აქვს უნარი მოახდინოს ROS-ის უარყოფითი ეფექტის აცილება სპეციალური მექანიზმების მეშვეობით (ანტიოქსიდანტური სისტემა). მაგალითად, ფერმენტი სუპეროქსიდდისმუტაზა, რომელიც აკატალიზებს ROS-ის დისმუტაციის რეაქციას, გარდაქმნის მას წყალბადის პეროქსიდად (H_2O_2), ეს უკანასკნელი კი ფერმენტ კატალაზას მოქმედებით იშლება წყლად და თავისუფალ ჟანგბადად [74].

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ გარკვეულ პათოლოგიურ მდგომარეობებში ROS-ის კონცენტრაცია კრიტიკულ ზღვარს აღწევს, რაც წარმოადგენს მრავალი უარყოფითი პროცესის მაპროვოცირებელ ფაქტორს [75].

ROS ტოქსიკური ნაწილაკია და იმუნური სისტემის მიერ გამოიყენება, როგორც ინვაზიური მიკროორგანიზმების გაუვნებელყოფის ერთ-ერთი საშუალება. აღნიშნულ სისტემაში ROS-ის პროდუცირება მიმდინარეობს NADPH-დამოკიდებული ოქსიდაზას მონაწილეობით. ფერმენტის მაკოდირებელ გენში მუტაცია იმუნოდეფიციტის სინდრომს იწვევს, რომელსაც ქრონიკული გრანულომატოზი ეწოდება და ხასიათდება ინფექციების მიმართ მაღალი მგრძობელობით. გარდა ამისა, მიკროორგანიზმებს, რომლებიც გენეტიკურად მოკლებულნი არიან SOD-ს, დაკარგული აქვთ ვირულენტურობა [76].

ROS ძირითადად მიტოქონდრიაში სინთეზირდება, სადაც მათ წარმოქმნას სუნთქვის ჯაჭვის კომპლექსები აწარმოებენ და გამოყოფენ კომპარტმენტის

სხვადასხვა საიტში. მაგალითად, I კომპლექსის მიერ პროდუცირებული ROS მიტოქონდრიის მატრიქსში გამოიყოფა, ხოლო III კომპლექსი მას მემბრანათაშორის სივრცეში გამოიყოფს და რისი შედეგადაც მიტოქონდრიის გარე მემბრანაში არსებული პოტენციალ-დამოკიდებული ანიონური არხის (VDAC) საშუალებით ROS -ს შეუძლია ციტოპლაზმაში გამოსვლა [77].

ცნობილი, რომ ROS-ის სინთეზი შესაძლოა აზოტის ოქსიდის მიერაც იყოს ინიცირებული. ამ პროცესს კარდიოპროტექტორული როლი ენიჭება. ამავე დროს, NO-ს ჭარბი რაოდენობა სხვადასხვა ფერმენტული და მემბრანული კომპლექსების ნიტრიფიცირებას იწვევს, რასაც ROS-ის ტოქსიური კონცენტრაციების გამონთავისუფლებამდე მივყავართ [78].

არსებობს მონაცემები იმის შესახებ, რომ ROS ჩართულია სხვადასხვა პათოლოგიების განვითარებაში (სიმსივნური პროცესები, გულის დაავადებები, ნეიროდეგენერაციული პათოლოგიები და სხვ.). ამასთან, ის პირდაპირ და არაპირდაპირ ზემოქმედებას ახდენს, როგორც მიტოქონდრიულ, ისე ბირთვულ დნმ-ზე, მემბრანულ კომპონენტებსა და სხვადასხვა ფერმენტულ სისტემაზე.

მნიშვნელოვანი მონაცემებია მიღებული ROS-ის, უჯრედის პროგრამირებული სიკვდილის - აპოპტოზის პროცესში მონაწილეობის შესახებ. კერძოდ, ფიქრობენ, რომ ის ჩართულია ე.წ. ლიპიდების ზეჯანგური ჟანგვის პროცესში, რასაც მემბრანული სტრუქტურების რღვევამდე მივყავართ [79]. არსებობს მონაცემები იმის შესახებაც, რომ ROS მნიშვნელოვან როლს ასრულებს აპოპტოზის მიტოქონდრიულ გზასა (მიტოქონდრიის გარდამავალი განვლადობის ფორის აქტივაცია, რასაც მივყავართ აპოპტოსომის ფორმირებამდე) და აუტოფაგიის პროცესში [80].

ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ ჭარბი პროდუცირების გარდა, ROS-ის ტოქსიკური ეფექტი შესაძლოა გამოწვეული იყოს მისი თვისებით მოახდინოს ანტიოქსიდანტური სისტემის ინჰიბირება, რაც თავის მხრივ სხვადასხვა ტოქსიკური ნაერთის დაგროვების მიზეზი შეიძლება გახდეს [81].

არსებობს მონაცემები ROS-ის როლზე დაბერების პროცესშიც და მის მონაწილეობაზე ამ პერიოდში მიმდინარე ჟანგვით სტრესში [76].

ბ) ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტები: სუპეროქსიდდისმუტაზა და კატალაზა

ჟანგვითი პროცესები და სხვადასხვა ტოქსიკური ნართების ჭარბი პროდუცირება მნიშვნელოვან საფრთხეს უქმნის ცოცხალი სისტემის ნორმალურ ფუნქციონირებას და არსებობას. უარყოფითი შედეგების თავიდან ასაცილებლად უჯრედში ფუნქციონირებს ე.წ. ანტიოქსიდანტური სისტემა, რომელიც იცავს უჯრედს ჟანგვა-აღდგენითი პროცესების შედეგად წარმოქმნილი თავისუფალი რადიკალებისაგან [82, 83].

აღნიშნულ სისტემაში გაერთიანებულია მრავალი სტრუქტურა და ფერმენტული სისტემა, რომელთაგანაც აღსანიშნავია - სუპეროქსიდდისმუტაზა (SOD) და კატალაზა.

სუპეროქსიდდისმუტაზების ოჯახს მიეკუთვნება ფერმენტები, რომლებიც აკატალიზებენ ROS-ის დისმუტაციის რეაქციას.

SOD-ის ოჯახის ფერმენტები თავდაპირველად ჩვეულებრივ მეტალოპროტეინად იყო მიჩნეული, რადგან ისინი შეიცავენ სხვადასხვა მეტალურ ჯგუფებს: სპილენძის, თუთიის, მანგანუმის, რკინის, ნიკელისა და სხვა [84].

არსებობს SOD-ის სამი ძირითადი ოჯახი, რომელთა კლასიფიკაცია მეტალურ კოფაქტორებზეა დამყარებული [85-88]:

1. Cu/Zn-სუპეროქსიდდისმუტაზა - ძირითადად გვხვდება ეუკარიოტული უჯრედის ციტოპლაზმაში

2. Fe²⁺ და Mn²⁺-სუპეროქსიდდისმუტაზა - გვხვდება პროკარიოტულ ორგანიზმებში და პროტისტებში, ასევე მიტოქონდრიაში

3. Ni-სუპეროქსიდდისმუტაზა - გვხვდება პროკარიოტულ ორგანიზმებში უახლესი ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია, რომ არსებობს Cu/Zn-SOD-ის კიდევ ერთი იზოფორმა, რომელიც უჯრედგარე სითხეებშია წარმოდგენილი და მას EC-SOD-ს უწოდებენ [89].

დადგენილია, რომ მიტოქონდრიული სუპეროქსიდდისმუტაზა (MnSOD) წარმოადგენს ბიოლოგიურად ყველაზე მნიშვნელოვან იზოფორმას. ნაჩვენებია, რომ

თავგები, რომლებიც მოკლებულნი არიან აღნიშნულ ფერმენტს, დაბადებიდან მცირე დროში იღუპებიან [90]. რაც შეეხება Cu/Zn-SOD-ის არმქონე ინდივიდებს, მათი სიცოცხლისუნარიანობა საგრძნობლად მეტია, თუმცა ვითარდება სხვადასხვა სახის პათოლოგიები [74], ხოლო EC-SOD-ის არარსებობა თითქმის არანაირი უარყოფითი შედეგის მომტანი არ არის [91].

ხერხემლიანთა უმრავლესობაში წარმოადგენილია SOD-ის სამი იზოფორმა:

1. SOD1 (Cu/Zn-SOD) - გვხვდება ციტოპლაზმაში, წარმოადგენს დიმერს;
2. SOD2 (Mn-SOD) - გვხვდება მიტოქონდრიაში, წარმოადგენს ტეტრამერს;
3. SOD3 (EC-SOD) - გვხვდება უჯრედგარე არეში, წარმოადგენს ტეტრამერს.

ვინაიდან ROS-ს აქვს უნარი შევიდეს რეაქციაში სხვადასხვა მემბრანულ კომპონენტებთან, ფერმენტულ სისტემებთან და ასევე აზოტის ოქსიდის რადიკალთან, რის შედეგადაც წარმოიქმნება ტოქსიკური ნაერთი პეროქსინიტრიტი (ONOO⁻), სუპეროქსიდდისმუტაზას მნიშვნელოვანი როლი ეკისრება, რადგან ახდენს სუპეროქსიდის ანიონის გაუვნებელყოფას დისმუტაციის რეაქციის საშუალებით [92]. დარღვევებს ფერმენტის აქტივობაში მივყავართ სხვადასხვა პათოლოგიების განვითარებამდე (ინფექციური, ნეიროდეგენერაციული და სხვა). აქედან გამომდინარე, SOD-ს მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავს უჯრედული მეტაბოლიზმის დაბალანსების პროცესში და ნებისმიერი დარღვევა, რაც მოქმედებს მის აქტივობაზე, პირდაპირ კავშირშია უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობასთან [93-99]. SOD ასევე აქტიურად გამოიყენება კოსმეტიკური მიზნებისათვისაც [100, 101].

1818 წელს ლუის ჯ. სენარდმა ივარაუდა, რომ მის მიერ ცოცხალ სისტემებში აღმოჩენილი წყალბადის პეროქსიდი (H₂O₂) უნდა იშლებოდეს რაღაც ნივთიერების მიერ, მაგრამ მხოლოდ 1900 წელს ოსკარ ლოეუმ დაარქვა აღნიშნულ სუბსტანციას სახელი - კატალაზა და აღმოაჩინა, რომ ის მრავალ მცენარესა და ცხოველში გვხვდება [105]. შემდგომში ფერმენტის კვლევისათვის სხვადასხვა მეთოდი იქნა გამოყენებული რომელთა მეშვეობითაც საბოლოოდ მოხდა მისი დახასიათება [103-106].

ფერმენტი კატალაზა წარმოადგენს ტეტრამერს და ნანახია თითქმის ყველა ცოცხალ ორგანიზმში. ის აკატალიზებს H₂O₂-ის წყლად და მოლეკულურ ჟანგბადად დაშლის რეაქციას [107, 108]. კატალაზა შეიცავს ოთხ პორფირინ-ჰემის (რკინა)

ჯგუფს, რაც საშუალებას აძლევს მას შევიდეს რექციაში წყალბადის პეროქსიდთან. მისი დამოკიდებულება pH-სა და ტემპერატურაზე ვარირებს სახეობათა მიხედვით [109-112].

დადგენილია, რომ ფერმენტი ძირითადად გვხვდება პეროქსისომებში [113] და მის კოფაქტორს რკინის გარდა მანგანუმიც შეიძლება წარმოადგენდეს [114]. კატალაზა აქტიურად გამოიყენება კვებით მრეწველობასა და პარფიუმერიაში [115-117].

დარღვევები, რომლებიც მოქმედებს ფერმენტის აქტივობაზე და მისი მაკოდირებელი გენის ექსპრესიაზე, განაპირობებს ინდივიდთა მგრძობელობის ზრდას სიმსივნური პროცესებისადმი, დნმ-ის ჟანგვით დაზიანებას და სხვა პათოლოგიურ პროცესებს [118, 119].

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, უჯრედის ანტიოქსიდანტური სისტემის სხვადასხვა ინჰიბიტორი, მაგალითად, ჭარბი თავისუფალი რადიკალები (რომელთაც შეუძლიათ გამოიწვიონ ფერმენტების აქტიური ცენტრების დაჟანგვა და შესაბამისად მათი ინაქტივაცია), სხვადასხვა დამაზიანებელი ფაქტორები (რადიაცია, ტემპერატურის მომატება, pH-ის კრიტიკული ცვლილება, გენეტიკური მასალის დაზიანება და სხვა) უარყოფით ზეგავლენას ახდენს უჯრედის და ზოგადად ცოცხალი სისტემის ნორმალურ ფუნქციონირებაზე, რაც შესაძლოა დასრულდეს აპოპტოზური და/ან ნეკროზული მექანიზმების გააქტივებით.

I.6 მიტოქონდრიის გარდამავალი განვლადობის ფორა

1979 წელს ჰანტერმა და ჰავორსმა აღმოაჩინა, რომ Ca^{2+} -ის იონის ჭარბი კონცენტრაცია იწვევდა მიტოქონდრიების გაჯირჯვებას, რისი მიზეზიც იყო მიტოქონდრიის მემბრანაში არსებული ფორის გახსნა, რომელიც საგრძნობლად ზრდიდა მიტოქონდრიის მემბრანის განვლადობას. მას მიტოქონდრიის გარდამავალი განვლადობის ფორა (MPTP) უწოდეს [120].

შემდგომმა კვლევებმა ცხადყო, რომ აღნიშნული მექანიზმით მიტოქონდრიის მემბრანები განვლადი ხდება 1.5 kD-ზე ნაკლები მასის მქონე მოლეკულებისთვის,

რასაც მოსდევს კომპარტმენტის გაჯირჯება და მისი შიდა კომპონენტების ციტოპლაზმაში გადმოსვლა. ყოველივე ეს მნიშვნელოვან როლს თამაშობს სხვადასხვა სახის პათოლოგიებისა და მათ შორის აპოპტოზური პროცესების პროვოცირებაში [121].

დადგენილია, რომ MPTP წარმოადგენს არასპეციფიკურ, მაღალი გამტარებლობის არხს, რომელიც შედგება სხვადასხვა მაკრომოლეკულური კომპონენტებისგან და წარმოიქმნება მიტოქონდრიის გარე და შიდა მემბრანების ურთიერთშეხების ადგილებში [122-124]. ფორის ზუსტი სტრუქტურა ჯერ-ჯერობით დაუდგენელია, თუმცა სავარაუდოა, რომ მის შექმნაში მონაწილეობას იღებს სხვადასხვა ცილოვანი მოლეკულები, რომელთა შორისაა ადენინუკლეოტიდ გადამტანი (ANT), გარე მემბრანის პოტენციალ-დამოკიდებული ანიონური არხი (VDAC) და ციკლოფილინ-D (მატრიქსში) [125].

1969 წელს ნორვეგიაში აღმოჩენილი ციკლოსპორინი-A არის ციკლური, არარიბოსომული პეპტიდი და მის შემადგენლობაში გვხვდება D-სტერეოიზომერული ფორმის ამინომჟავა [126]. ციკლოსპორინი-A აქტიურად გამოიყენება როგორც იმუნოსუპრესორული მედიკამენტი. მას შეუძლია მოახდინოს T-უჯრედებში IL2-ის მაკოდირებელი გენის ექსპრესიის შეჩერება. ამასთან, ის ახდენს MPTP-ის ფორმირების ბლოკირებას მიტოქონდრიის მატრიქსში არსებულ ციკლოფილინ-D-სთან ურთიერთქმედებით და შესაბამისად, ხელს უშლის მის დაკავშირებას შიდა მემბრანაში არსებულ ANT-თან, რის შედეგადაც ფორის აქტივაცია შეუძლებელი ხდება [127-131].

ცნობილია, რომ მრავალ ფაქტორს შეუძლია გამოიწვიოს ფორის გახსნა ანუ აქტივაცია, მაგალითად, მიტოქონდრიის მატრიქსში Ca^{2+} -ის მაღალმა კონცენტრაციამ [132], ზოგიერთი ცხიმოვანი მჟავას არსებობამ [133] და არაორგანული ფოსფორის მაღალმა დონემ [121], თუმცა უკანასკნელი ორი ფაქტორი, მოკლებულია ფორის აქტივაციის უნარს Ca^{2+} -ის იონის არარსებობის შემთხვევაში, მაშინ როცა აღნიშნული კათიონის მაღალი კონცენტრაცია საკმარისია MPTP-ის გასახსნელად [134].

Ca^{2+} -ის გავლენა ფორაზე სავარაუდოდ გამოწვეულია MPTP-ის მატრიქსულ მხარეს არსებულ კალცი-დამაკავშირებელ საიტებთან იონის დაკავშირებით [135, 136].

ფორის აქტივაცია ასევე შესაძლებელია მიტოქონდრიული გარე და შიდა მემბრანების პოტენციალთა სხვაობის გაქრობის შედეგად და/ან თავისუფალი რადიკალების არსებობის გამო, ეს უკანასკნელი კი შიდაუჯრედული Ca^{2+} -ის მაღალი კონცენტრაციის ერთ-ერთი უარყოფითი შედეგია [137-140].

ლიტერატურიდან ირკვევა, რომ MPTP-ის აქტივაცია შეიძლება მოახდინოს ენდოპლაზმურ ბადეში მიმდინარე სტრესულმა პროცესებმაც [141].

რაც შეეხება MPTP-ის ინჰიბიციას, ანუ დახურვას, მასში მონაწილეობას იღებს სხვადასხვა ფაქტორი. კერძოდ, ფორის ბლოკატორებია მისი შემადგენელი კომპონენტების ინჰიბიტორები [142], ასევე ჟანგვითი პროცესები [143] და ადფ-ის, ატფ-ისა და ნადH-ის მაღალი კონცენტრაციები [144, 145].

აღსანიშნავია, რომ ორვალენტიან კათიონებს (მაგალითად, Mg^{2+}) შესწევს უნარი გაუწიოს კონკურენცია Ca^{2+} -ის იონს მატრიქსული მხრიდან არსებულ კალცი-დამაკავშირებელ უბნებთან დაკავშირებაში, რაც იწვევს MPTP-ის ინჰიბირებას [121].

მრავალმა კვლევამ აჩვენა, რომ მიტოქონდრიის გარდამავალი განვლადობის გაზრდა წარმოადგენს სხვადასხვა პათოლოგიის მიზეზს და მას შეუძლია რიგი უარყოფითი შედეგის მქონე პროცესების ინიცირება, რომელთა შორისაა ნეიროდეგენერაციული, გულ-სისხლძარღვთა და სხვა პათოლოგიური გადახრები და აპოპტოზური და ნეკროზული პროცესები [146].

MPTP-ის აქტივაცია, რომელიც ახდენს მიტოქონდრიული მემბრანების განვლადობის მკვეთრ ზრდას, იწვევს კომპარტმენტის დეპოლარიზაციას და მემბრანის პოტენციალთა სხვაობის დაკარგვას, რაც აძლევს შესაძლებლობას პროტონებსა და ზოგიერთ მოლეკულას გადალახოს მემბრანული ბარიერი და კონცენტრაციული გრადიენტის ზემოქმედებით გადმოვიდეს ციტოპლაზმაში, რასაც თან სდევს ატფ-ის სინთეზის ბლოკირება, რაც გამოწვეულია პოტენციალთა სხვაობის დაკარგვით [147, 148].

სხვადასხვა ნეიროდეგენერაციული დაავადებებით ან/და თავის ტრავმით გამოწვეული დაზიანებისას, MPTP-ის გახსნას შეუძლია გამოიწვიოს ატფ-ის პროდუცირების მკვეთრი შემცირება და ატფ-სინთაზას მიერ არა მისი სინთეზის, არამედ ჰიდროლიზური დაშლის პროცესის გააქტივება, რაც იწვევს უჯრედში მწვავე

ენერგოდეფიციტს, მაშინ, როცა სისტემა ყველაზე მეტად საჭიროებს მას ჰომეოსტაზური მდგომარეობის აღსადგენად [149].

ფორის საშუალებით ციტოპლაზმაში Ca^{2+} -ის იონებსაც შეუძლია გადმოსვლა, რაც მეზობელი მიტოქონდრიების დაზიანებისა და სხვადასხვა კალციუმ-დამოკიდებული პროტეაზების (კალპაინი) აქტივაციის მაპროვოცირებელი ფაქტორი შეიძლება გახდეს.

MPTP-ის აქტივაციის შედეგია ასევე ჟანგბადის აქტიური რადიკალების (ROS) წარმოქმნის გაძლიერება, რადგან ფორის საშუალებით მიტოქონდრიაში არსებული გლუტათიონი და სხვა ანტიოქსიდანტური მოლეკულები გადმოდის ციტოპლაზმაში, რაც მნიშვნელოვნად აქვეითებს ROS-ის გაუვნებელყოფის პროცესებს. ამასთან, ელექტრონების გადამტანი ჯაჭვი წარმოქმნის მეტ თავისუფალ რადიკალს, რადგან კარგავს ისეთ კომპონენტს, როგორცაა ციტოქრომ C, რომელსაც თავის მხრივ შეუძლია მოახდინოს აპოპტოზური პროცესების ინიცირება პროაპოპტოზური ფაქტორების აქტივაციით [150; 151].

მიტოქონდრიის მემბრანის განვლადობის ზრდა საშუალებას იძლევა, ერთის მხრივ, მისი შიდა კომპონენტების ციტოპლაზმაში გადმოსვლისათვის, ხოლო მეორეს მხრივ მიტოქონდრიაში წყლის შესვლისათვის, რაც იწვევს მიტოქონდრიის ოსმოსური წნევის მკვეთრ ზრდას, მის გაჯირჯვებას და მემბრანის დამატებით დაზიანებას [152].

არსებობს მონაცემები MPTP-სთან სხვადასხვა ფერმენტული სისტემებისა და ცილოვანი მოლეკულების კავშირის შესახებ. კერძოდ, ცნობილია, რომ Bcl-2 ოჯახის ცილა Bax ე.წ. “ზუფის” ფუნქციას ასრულებს აღნიშნული ფორისათვის და რომ გარკვეულ პირობებში ხდება მისი არხიდან მოცილება. ასევე, სხვადასხვა ფერმენტული სისტემები (ჰექსოკინაზა, კრეატინკინაზა) და სხვა ცილოვანი ჯგუფები მნიშვნელოვან როლს ასრულებენ MPTP-ის მოდიფიკაციაში. თუმცა, ჯერ-ჯერობით ამ კუთხით კვლევები კვლავ აქტიურად მიმდინარეობს და ბოლომდე არ არის სრულად გარკვეული თითოეული მათგანის როლი [135].

I.7. სტრესის პირობებში უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის თავისებურება

ცნობილია, რომ ყველა უჯრედი, წარმოშობისა და ტიპის მიუხედავად, სასიცოცხლო ფუნქციების განსახორციელებლად საჭიროებს ენერგიას, რომლის ძირითად წყაროს ადენოზინტრიფოსფატი (ატფ) წარმოადგენს და მისი შიდაუჯრედული დონის შენარჩუნებას გადაწყვეტი მნიშვნელობა აქვს სხვადასხვა უჯრედული პროცესის მიმდინარეობისთვის. ატფ-ის ჰომეოსტაზის შენარჩუნება განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ისეთი უჯრედებისთვის, რომლებიც გამუდმებით მოიხმარენ ჭარბ და ცვალებადი რაოდენობის ენერგიას, მაგალითად თავის ტვინისა და კუნთოვანი ქსოვილი.

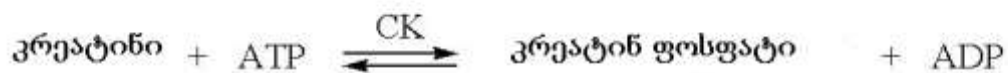
ხშირ შემთხვევაში აერობული, მიტოქონდრიალური მეტაბოლიზმის გზით მიღებული ატფ უჯრედების ენერგეტიკულ მოთხოვნილებას აკმაყოფილებს, მაგრამ ენერგიის განსაკუთრებულად გაზრდილი მოხმარებისას (მაგ. კრუნჩხვების დროს) ან ენერგიის დაქვეითებული წარმოებისას (მაგ. ჟანგვითი სტრესის და ჰიპოქსიისას), უჯრედი ვეღარ ასწრებს დახარჯული ატფ-ს ჩანაცვლებას. ასეთ შემთხვევებში ატფ-ს მარაგი იწურება და თუ მისი დროული აღდგენა არ მოხდა, უჯრედი ილუპება. ატფ-ს მარაგის გამოლევა და უჯრედის ენერგეტიკული დონის დაცემა ხშირად უჯრედის აპოპტოზით ან ნეკროზით მთავრდება.

I.6.1. კრეატინკინაზა

მაღალი მეტაბოლური აქტივობის და ცვალებადი ენერგეტიკული მოთხოვნების მქონე უჯრედებში ატფ-ს ჰომეოსტაზის შენარჩუნებაში მთავარი როლი კრეატინ/კრეატინკინაზა/ფოსფოკრეატინის (Cr/CK/PCr) სისტემას ენიჭება. ეს სისტემა კრეატინკინაზული სისტემის სახელწოდებითაა ცნობილი. Cr სისტემა სწრაფად და დინამიურად აღადგენს დახარჯული ატფ-ს დონეს, პროცესი მიტოქონდრიალური აერობული მეტაბოლიზმის გვერდის ავლით მიმდინარეობს და იგი Cr-ის და PCr-ის

შექცევადი ტრანსფოსფორირების ხარჯზე ხორციელდება [153]. რეაქციას ფერმენტი კრეატინკინაზა აკატალიზებს.

რეაქციაში დახარჯული ატფ-ის ერთი მოლეკულა ერთ მოლეკულა PCr-ის სინთეზს ხმარდება. ეს უკანასკნელი კი მაღალენერგეტიკული ფოსფატის რეზერვუარს წარმოადგენს, რომელიც ენერჯის გაძლიერებული მოხმარების დროს უჯრედს საჭირო ატფ-ს აწვდის CK-ის მიერ უკუფოსფორირების ხარჯზე. ზემოაღნიშნულ რეაქციას ატფ-ის ბუფერული როლის გარდა სხვა ფუნქციებიც გააჩნია. ის უჯრედშიდა ადფ-ის დონესაც არეგულირებს. ეს თვისებები PCr-ს უჯრედში იოლად გადაადგილების საშუალებას აძლევს და შესაბამისად ის არა მარტო ენერგეტიკული ბუფერის, არამედ ენერჯის გადამტანის ფუნქციასაც ასრულებს. ფოსფოკრეატინის ეს ორმაგი როლი ფოსფოკრეატინის წრედის სახელითაა ცნობილი [154].



აღნიშნული მოდელი კრეატინკინაზას ციტოზოლური და მიტოქონდრიული იზოფორმების არსებობას ემყარება და უჯრედული ენერჯის შენახვა-გადატანას შემდეგნაირად ხსნის: მიტოქონდრიული კრეატინკინაზა მიტოქონდრის გარე და შიდა მემბრანათა შორის სივრცეშია მოთავსებული და ჟანგვითი ფოსფორირების პროცესთანაა შეუღლებული. მიტოქონდრიული ჟანგვითი ფოსფორირების შედეგად სინთეზირებულ ატფ-ს მიტოქონდრიული კრეატინკინაზა კრეატინის ფოსფორირებისთვის მოიხმარს. ამ გზით მიღებული ფოსფოკრეატინი გარე მემბრანის გავლით მემბრანათაშორისი სივრციდან ციტოზოლში გადაადგილდება. ციტოზოლში არსებული ფერმენტის ციტოზოლური იზოფორმები ფოსფოკრეატინის უკუფოსფორირებას ახდენენ უჯრედის იმ უბნებში, სადაც ატფ-ს მოთხოვნა გაზრდილია. ერთ-ერთ ასეთ უბანს წარმოადგენს მემბრანული ატფ-აზები, რომლებსაც გამუდმებით ესაჭიროებთ ატფ-ის ენერჯია. ამ პროცესში

გამონთავისუფლებული კრეატინი კვლავ მიტოქონდრიას უბრუნდება, სადაც ფერმენტის მიტოქონდრიული იზოფორმის მონაწილეობით ისევ მიმდინარეობს კრეატინის ფოსფორილირების პროცესი.

დღეისთვის კრეატინკინაზას ხუთი სხვადასხვა იზოფორმაა ცნობილი. ორი მათგანი მიტოქონდრიულია, სამი კი ციტოზოლური [155,156]. ციტოზოლური ფორმები თავის ტვინის, ჩონჩხის კუნთების და გულის კუნთის სპეციფიურ ფორმებად იყოფა. მიტოქონდრიული ფორმებიდან ერთ-ერთი ე.წ. უბიქვიტური, თითქმის ყველა ორგანოშია გავრცელებული კუნთოვანი ქსოვილის გარდა, მეორე იზოფორმა კი ჩონჩხისა და გულის კუნთებში გვხვდება.

მიტოქონდრიული კრეატინკინაზა ახორციელებს კრეატინის გარდაქმნას ფოსფოკრეატინად ატფ-ის ენერჯის ხარჯზე. სხვადასხვა ნეიროდეგენერაციული დაავადებების დროს თავის ტვინის დაზიანებულ რეგიონებში აღინიშნება ციტოზოლური კრეატინკინაზის როგორც რაოდენობის, ასევე აქტივობის შემცირება, რაც სავარაუდოდ დაკავშირებული უნდა იყოს ფერმენტის პოსტრანსლაციურ მოდიფიკაციასთან [157-160]. კერძოდ, ფერმენტის მოლეკულაში კარბონილის ჯგუფის მატება მოწმობს, რომ ამ პროცესში გადამწყვეტი მნიშვნელობა სწორედ მსგავს ცვლილებას გააჩნია, რაც თავის მხრივ გავლენას ახდენს ფერმენტის აქტივობის ცვლილებაზე.

ნაჩვენები იქნა, რომ მიტოქონდრიული კრეატინკინაზა აინჰიბირებს ჟანგბადის რადიკალების გენერაციას და ახდენს ისეთი პროცესების ინდუცირებას, როგორცაა აპოპტოზი, იშემიური და ნეიროდეგენერაციული დაავადებები.

აღსანიშნავია, რომ ზოგადად თავის ტვინი გამოირჩევა მიტოქონდრიული კრეატინკინაზას მაღალი შემცველობით [161].

I.6.2 კრეატინი

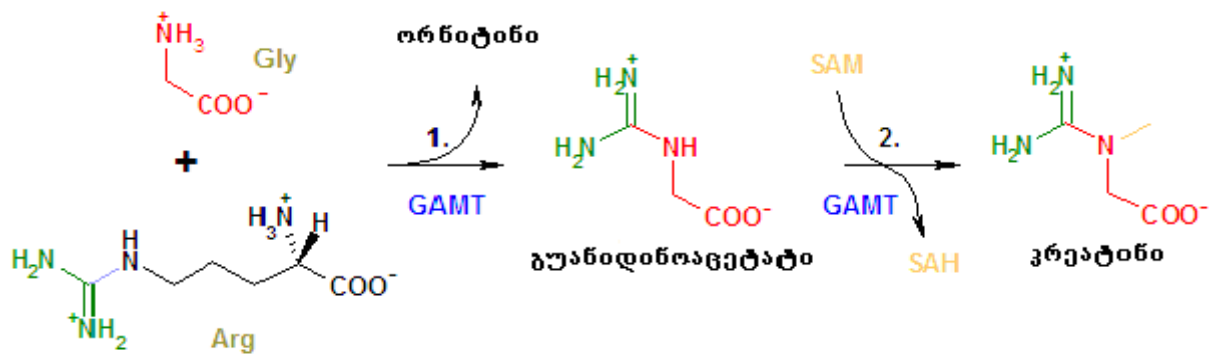
კრეატინი წარმოადგენს ნიტროგენულ ორგანულ მჟავას. იგი ძირითადად ღვიძლში, პანკრეასსა და თირკმელში სინთეზირდება და შემდეგ სისხლის

მიმოქცევის სისტემის მეშვეობით ტვინს, გულს, კუნთს და სხვა ორგანოებს მიეწოდება.

კრეატინის დამატებითი წყაროა ხორციული 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 შელწევა მხოლოდ აქტიური სატრანსპორტო მექანიზმის საშუალებითაა შესაძლებელი. ამ პროცესს აწარმებს სპეციალური სატრანსპორტო ცილა - კრეატინის ტრანსპორტერი (შემოკლებით CrT).

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 ფოსფორილების შედეგად ფოსფოკრეატინად გარდაიქმნება.

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



კრეატინის ნორმალურ მეტაბოლიზმს კრიტიკული მნიშვნელობა გააჩნია თავის ტვინის ფუნქციონირებისთვის. Cr/CK/PCr სისტემისა და კრეატინის მეტაბოლიზმის დარღვევები აღინიშნება შემდეგი ტიპის დაავადებების დროს როგორცაა: კუნთოვანი დისტროფია, ჰიპოქსიურ-იშემიური ენცეფალომიოპათია და სხვ [162].

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. ასევე მწირია მონაცემები იმის თაობაზე, თუ რა გავლენა აქვს კრეატინს ნორმალურ და განვითარებად თავის ტვინზე.

I.6.3. ალდოლაზა

ალდოლაზა არის ფერმენტი ,რომელიც აკატალიზებს ალდოლურ რეაქციებს. მისი სუბსტრატია ფრუქტოზო-1,6-დიფოსფატი, რომელსაც ხლეჩს გლიცერალდეჰიდ-3-ფოსფატად და დიჰიდროქსიაცეტონფოსფატად.

ფერმენტი ალდოლაზა ცოცხალ სისტემაში წარმოადგენილია სამი იზოფერმენტის სახით (A,B,C), რომლებიც კოდირებულია 3 სხვადასხვა გენით. ალდოლაზა A აღმოჩენილია ემბრიონის განვითარების დროს და პროდუცირდება

დიდი რაოდენობით მოზრდილი ადამიანის კუნთებში. ალდოლაზა C კი აღმოჩენილია თავის ტვინში და ნერვულ ქსოვილში.

ALDO-A-ს ნაკლებობამ შესაძლებელია გამოიწვიოს მიოპათია და ჰემოლიტიკური ანემია.

ალდოლაზა B წარმოადგენს იზოფერმენტს, რომელიც გავრცელებულია უმეტეს ქსოვილებში და აწარმოებს მათში ფრუქტოზო-1,6-დიფოსფატის გახლეჩის რეაქციას გლიკოლიზის პროცესში.

I.6.4. სუქცინატდეჰიდროგენაზა, აკონიტაზა , ფუმარაზა

სუქცინატდეჰიდროგენაზა, აკონიტაზა და ფუმარაზა წარმოადგენენ კრებსის ციკლის ფერმენტებს. კრებსის ციკლის რეაქციები მიტოქონდრიების გარეთა მემბრანაზე მიმდინარეობს 8 სტადიად.

იზომერიზაციის რეაქციას წარმართავს ფერმეტი აკონიტაზა, რომლის დროსაც ლიმონის მჟავა (ციტრატი) გარდაიქმნება იზოლიმონის მჟავად (იზოციტრატად). აკონიტაზა შეიცავს რკინა სულფიდურ კლასტერს, მისი ციტოპლაზმური იზოფერმენტი ცნობილია, როგორც რკინა-მგრძნობიარე ცილა და მონაწილეობს რკინის ჰომეოსტაზში.

სუქცინატდეჰიდროგენაზა წარმოადგენს ფერმენტულ კომპლექსს, რომელიც მიტოქონდრიის შიდა მემბრანასთანაა ასოცირებული. იგი ლიმონმჟავას ციკლის ფერმენტია, კერძოდ მისი მეშვეობით ხორციელდება სუქცინატის დეჰიდრირება, რის შედეგადაც წარმოიქმნება ფუმარატი (ფუმარის მჟავა). ფერმენტის პროსთეტულ ჯგუფს წარმოადგენს დაჟანგული FAD^+ , რომელიც რეაქციის მსვლელობისას წყალბადის ორ ატომს იკავშირებს და აღდგება $FADH_2$ -მდე. ფერმენტი აღმოჩენილია ბევრ აერობულ და ანაერობულ ორგანიზმში (მაგ: E.coli). ფერმენტული კომპლექსი ჰეტეროტეტრამერულია და 3 ძირითადი ნაწილითაა წარმოდგენილი, კერძოდ კატალიზური, ელექტრონების გადამტანი და β ტიპის ჰემის შემცველი დომენებით.

სუქცინატდეჰიდროგენაზა აქტიურადაა ჩართული მთელი რიგი პათოლოგიების ჩამოყალიბებაში. მაგალითად ფერმენტის ზოგიერთი მუტაცია ენცეფალომიოპათიისა და პარაგანგლიომას მიზეზია.

სუქცინატის დეჰიდრირებით მიღებულ ფუმარატს ფერმენტი ფუმარაზა ჰიდრატირების გზით გადრეჰმნის მალატად. არსებობს ფერმენტის ორი ფორმა: ციტოზოლური და მიტოქონდრიული. მიტოქონდრიული იზოფორმა მონაწილეობს კრებსის ციკლში, ხოლო ციტოზოლური იზოფორმა კი ამინომჟავების მეტაბოლიზმში.

II. კვლევის ობიექტები და მეთოდები

II.1. კვლევის ობიექტი

ექსპერიმენტები ტარდებოდა მამრობითი სქესის, თეთრ, ლაბორატორიულ ვირთაგვებზე. სოციალური იზოლაციის მიზნით ვირთაგვებს ვათავსებდით ინდივიდუალურ გალიებში, სიბნელის პირობებში (თანაფარდობა სიბნელესა და სინათლეს შორის შეადგენდა 23.5სთ/0.5სთ.). ცხოველები იმყოფებოდნენ სრულ მხედველობით იზოლაციაში. ყნოსვა და სმენა შეზღუდული არ იყო. ცხოველებს საკვები და წყალი ეძლეოდათ შეუზღუდავად. ასეთ პირობებში ვირთაგვები იმყოფებოდნენ 30 დღის განმავლობაში. კონტროლად ვიყენებდით ვირთაგვებს, რომლებიც მოთავსებულნი იყვნენ ერთად, საერთო გალიაში, ჩვეულებრივ პირობებში (თანაფარდობა სიბნელესა და სინათლეს შორის შეადგენდა 10.00/14.00სთ.).

30-დღიანი იზოლაციის შემდეგ ვირთაგვებს ვაძინებდით ქლოროფორმით და ვახდენდით მათ დეკაპიტაციას.

II.2. კრეატინის ინტრაპერიტონეალური მიწოდება

კრეატინის ინტრაპერიტონეალურ მიწოდებას ვახდენდით პერასოსა და სხვათა მოდიფიცირებული მეთოდით [163].

120±5 გრ წონის თეთრ, მამრ ვირთაგვებს უკეთდებოდათ მონიშნული კრეატინის ხსნარის (140 მგ/100მლ 5% DMSO) ინტრაპერიტონეალური ინექცია (14მგ/100გრ წონაზე) დეკაპიტაციამდე 6 საათით ადრე, როგორც ავტორების მიერ იყო შემოთავაზებული კრეატინის ერთჯერადი ინექციის პირობებში.

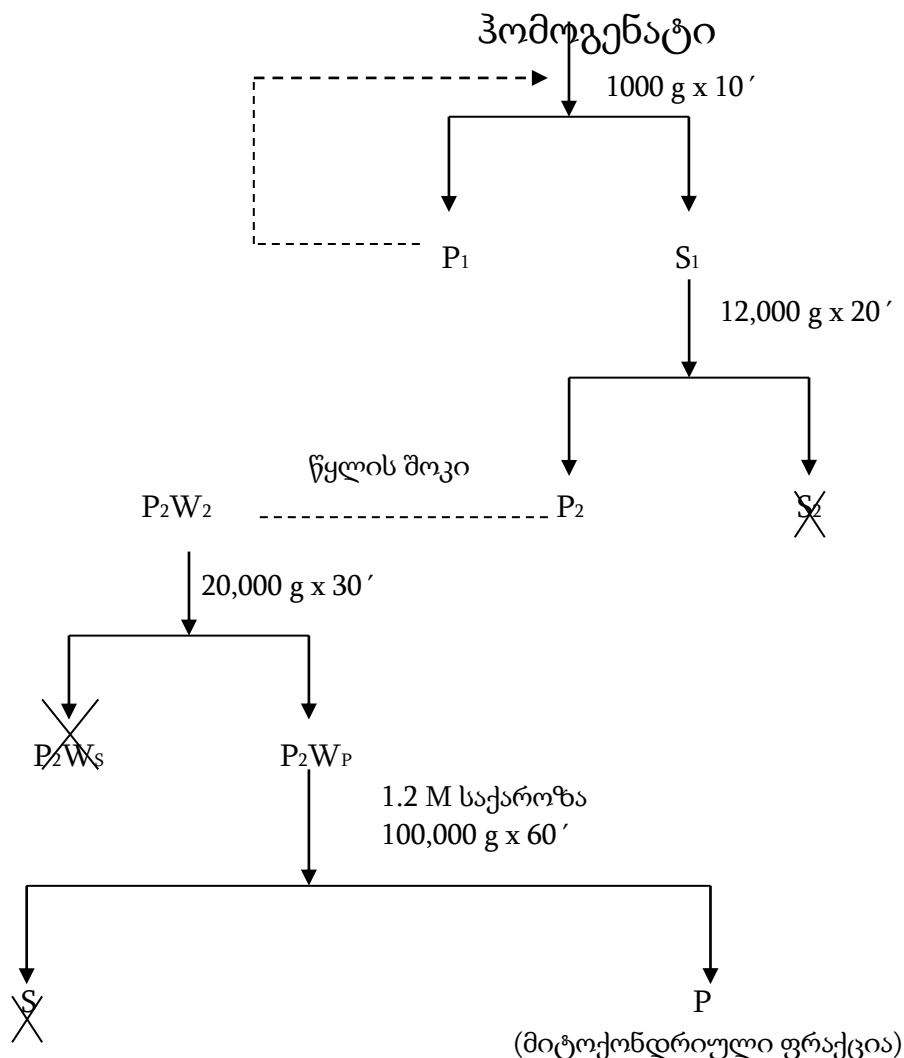
საკონტროლო ჯგუფის შემთხვევაში შეგვყავდა 5% DMSO-ს ხსნარი, რომელიც მიღებულია ორგანიზმისათვის არატოქსიურ კონცენტრაციად [164].

ინექციიდან ექვსი საათის შემდეგ ვახდენდით ცხოველების დეკაპიტაციას და მიღებული თავის ტვინებიდან ვღებულობდით არაცილოვან ექსტრაქტებს შემდგომი ანალიზისათვის.

II.2. სუბუჯრედული ფრაქციების მიღება დე-რობერტისის მიხედვით

თავის ტვინის მიტოქონდრიულ ფრაქციას ვიღებდით დიფერენციალური ცენტრიფუგირებით საქაროზას გრადიენტში [165]:

1. ვიღებდით ლაბორატორიული ვირთაგვების თავის ტვინის სუმა რულ მასალას ჯგუფების მიხედვით: საკონტროლო და საცდელი (სტრესირებული).
2. ვახდენდით მათ ჰომოგენიზაციას საქაროზას გრადიენტში (0.32M).
3. ვიღებდით სუფთა მიტოქონდრიულ ფრაქციებს დიფერენციალური ცენტრიფუგირებით საქაროზას გრადიენტში:



II.3. ჰორმონების რაოდენობების განსაზღვრა

სეროტონინის, კორტიკოსტერონისა და მელატონინის რაოდენობას ვსაზღვრავდით ELISA ტესტ-სისტემების საშუალებით, იმუნოფერმენტული მეთოდით (Serotonin ELISA kit; Corticosterone ELISA kit, Melatonin ELISA kit; IBL International, აშშ).

II.4. აზოტის ოქსიდის რაოდენობის განსაზღვრა

აზოტის ოქსიდის (NO) რაოდენობრივი განსაზღვრისათვის ვიყენებდით პაჰანისა და სხვ. მოდიფიცირებულ მეთოდს [166].

ცდების საწყის ეტაპზე სინჯარაში გადაგვქონდა 2 მლ მიტოქონდრიული სუსპენზია, რის შემდეგაც ვუმატებდით 0.8 მლ დისტილირებულ წყალს და 0.6 მლ NaOH-ს (0.3 M), ვურევდით და ვაყოვნებდით 5 წუთის განმავლობაში და ვუმატებდით 0.6 მლ ZnSO₄-ს (5%).

ნარევს ვაცენტრიფუგირებდით (3000 g x 30') და მიღებულ სუპერნატანტს ვუმატებდით 0.4 მლ გრისის რეაქტივს (20%).

შემდგომში სუსპენზიას ვაინკუბირებდით 15 წუთის განმავლობაში 37°C-ზე და შეფერილობის ინტენსივობას ვზომავდით სპექტროფოტომეტრულად ($\lambda=540$ ნმ).

II.5. ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ზოგიერთი პროდუქტის განსაზღვრა

ა) თბმ (თიობარბიტურის მჟავა) აქტიური პროდუქტების რაოდენობრივი განსაზღვრა

ცდის წინ მიტოქონდრიების სუსპენზიას ვრეცხავდით 0.025M -იანი ტრის-HCl -ის ბუფერით (pH=7.4) საქაროზის მოსაცილებლად, რომელიც ხელს უშლის ფერის წარმოქმნას.

მიტოქონდრიული სუსპენზია (2.0 მლ) გადაგვექონდა ცენტრიფუგის სინჯარებში, ვუმატებდით სამქლორმმარმჟავას (1 მლ) და ვაცენტრიფუგირებდით $4000 \text{ g} \times 10'$ განმავლობაში. მიღებული სუპერნატანტის 2 მლ-ს ემატებოდა 1 მლ 0.8%-იან თიობარბიტურის მჟავას (თბმ). სინჯარებს ვათავსებდით მდულარე წყლის აბაზანაში ($90-100^\circ\text{C}$) და ვახდენდით ნარევის ინკუბაციას 10 წთ-ის განმავლობაში და შემდგომ ვაციებდით ოთახის ტემპერატურამდე ($20-25^\circ\text{C}$).

საკონტროლო სინჯარაში მიტოქონდრიული სუსპენზიის ნაცვლად ემატებოდა 2.0 მლ ბუფერს ხსნარი (0.025M ტრის-HCl; pH=7.4).

თბმ აქტიური პროდუქტების რაოდენობას ვითვლიდით ფორმულით:

$$C = \frac{E_{\text{საშ}}}{\epsilon \times l} \mu\text{M}$$

სადაც:

C - ნივთიერების კონცენტრაციაა;

$E_{\text{საშ}}$ - მიღებული შუქშთანთქმების მაჩვენებლის საშუალო სიდიდე.

მიღებულ ვარდისფერი შეფერილობის ინტენსივობა ისაზღვრებოდა სპექტროფოტომეტრულად $\lambda=532 \text{ ნმ}$ - ის ტალღის სიგრძეზე [167].

ბ) უჯერი ცხიმოვანი მჟავების დიენური კოიუგატების განსაზღვრა

უჯერი ცხიმოვანი მჟავების დიენური კონიუგატების განსაზღვრისათვის ვახდენდით მიღებული მიტოქონდრიების რესუსპენზირებას 0.1 M ფოსფატის ბუფერში (pH=7.6), რის შემდეგაც 1 მლ მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ($\approx 10-15 \text{ მგ}$ ცილა) ემატებოდა 9 მლ სპეციალური ხსნარი (ჰეპტანი:იზოპროპილენი - 1:1) და ჰომოგენიზირდებოდა მინის ჰომოგენიზატორში 15 წუთის განმავლობაში. მიღებული ჰომოგენატი გადაგვექონდა ცენტრიფუგის სინჯარებში, და ვაცენტრიფუგებდით 4000 გ-ზე 10წთ- ის განმავლობაში.

ცენტრიფუგირებით მიღებული სუპერნატანტი გადაგვქონდა გრადუირებულ სინჯარებში და ვუმატებდით დისტილირებულ წყალს (1/10), ვანჯღრევდით და ვაყოვნებდით 5 წთ-ის განმავლობაში. დაშრევების შემდეგ ფრთხილად ვაცილებდით ჰეპტანის ფაზას. სინჯარაში დარჩენილი ხსნარის 0.5 მლ-ს ვუმატებდით ეთილის სპირტს (1:5/1:10) და ვსაზღვრავდით შუქშთანთქმას სპექტროფოტომეტრულად - $\lambda=233$ ნმ ტალღის სიგრძეზე [168].

II.6. სუპეროქსიდდისმუტაზას ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრა

მეთოდის პრინციპი მდგომარეობს ნიტროლურჯი ტეტრაზოლიუმის ალდეგნის რეაქციის შეზღუდვის ხარისხის განსაზღვრაში [169].

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 სპექტროფოტომეტრულად ($\lambda=540$ ნმ), რის შემდეგაც ვუმატებდით 0.1 მლ ნადH-ის ხსნარს (0.8 mM), ვურევდით და ვახდენდით ინკუბაციას 20'-ის განმავლობაში ($t=37^{\circ}\text{C}$).

ინკუბაციის შემდეგ ვსაზღვრავდით ხსნარის შუქშთანთქმას სპექტროფოტომეტრულად ($\lambda=540$ ნმ).

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

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

$$A = \frac{T\%}{100\% - T\%}$$

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

II.7. ფერმენტ კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი დამყარებულია წყალბადის ზეჟანგის (H₂O₂) თვისებაზე, წარმოქმნას მოლიბდატის მარილებთან მყარი ფერადი კომპლექსი [170].

ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე 0.1 მლ საკვლევ მასალას (100 მგ ქსოვილი/1 მლ ტრის-HCl (0.05 M), pH=7.8) ვუმატებდით 2 მლ წყალბადის ზეჟანგს (0.03%), ხოლო ბრმა ცდისთვის განკუთვნილ სინჯარაში საკვლევ 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 ($\lambda=410$ ნმ).

საკონტოლო სინჯარაში წყალბადის ზეჟანგის ნაცვლად შეგვქონდა 2 მლ დისტილირებული წყალი.

ფერმენტის აქტივობას ვითვლიდით ფორმულით:

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

სადაც:

E - ფერმენტის აქტივობა

$A_{\text{ბრმა ცდა}}$ }
 $A_{\text{ცდა}}$ } მიღებული შუქშთანთქმის სიდიდეები

V - შეტანილი ნიმუშის მოცულობა (0.1 მლ)

t - ინკუბაციის დრო (10 წთ)

K - წყალბადის ზეჟანგის მილიმორალური კოეფიციენტი ($22.2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)

1)

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

II.8. ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობის დასადგენად ნატიურ მიტოქონდრიებს ვამუშავებდით ბუფერით, რომელიც შეიცავდა 100 mM ტრის-HCl-ის ბუფერზე (pH=7.4) დამზადებულ 0.1%-იან ტრიტონ X-100-ს და ნატრიუმის ციტრატს. მიღებულ ნალექს ვუმატებდით საინკუბაციო არეს (150 mM ტრის-HCl-ის ბუფერზე დამზადებული: 8.6 mM ცის-აკონიტატი, 60 mM MgCl₂, 0.04 U იზოციტრატ დეჰიდროგენაზა, 125 mM ნადP, 240 mM MTT და 80 mM ფენაზილ მეტოსულფატი (PMS); pH=8.6), ვაყოვნებდით 15 წთ. ოთახის ტემპერატურაზე და ვაცენტრიფუგირებდით (3000 g x 10').

სუპერნატანტში ცის აკონიტის მჟავას გარდაქმნის პროდუქტს ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრულად ($\lambda=240$ ნმ) [171].

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

II.9. ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობას ვსაზღვრავდით ფერმენტის იმ რაოდენობის მიხედვით, რომელიც საჭიროა 1 წუთში 1 M ფუმარის მჟავას (ფუმარატი) დასასინთეზირებლად.

მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ვამუშავებდით ტრის-HCl-ის ბუფერით (pH=8.6), რომელიც შეიცავდა 30 mM კალიუმის ფოსფატს და 0.1 mM L-მალატს.

ნარეკს ვაყოვნებდით 15 წუთი ოთახის ტემპერატურაზე და ვაცენტრიფუგებდით (3000 g x 10').

სუპერნატანტში ფუმარატის რაოდენობას ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრულად ($\lambda=240$ ნმ) [172].

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

II.10. ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრავად ვიყენებდით ახესა და მატსუკის მოდიფიცირებულ მეთოდს [173].

ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე 500 μ ლ მიტოქონდრიულ ფრაქციას ვუმატებდით 1 მლ HBM ბუფერს (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM NaHCO₃, 1.1 mM MgCl₂ x 6H₂O, 1.2 mM Na₂HPO₄, 1.2 mM CaCl₂, 5.5 mM C₆H₁₂O₆ და 20 mM HEPES; pH=7.4) და ვაცენტრიფუგირებდით (16,000 rpm x 10').

შემდეგ ეტაპზე მიღებულ ნალექს ვასუსპენზირებდით 500 μ ლ 3-(4,5-დიმეთილტეტრაზოლ-2)-2,5-დიფენილტეტრაზოლინის ბრომიდი (MTT) (0.5 მგ/მლ) დამზადებული HBM ბუფერზე. მიღებულ სუსპენზიას ვაინკუბირებდით 45 წუთის განმავლობაში 37°C-ზე და ვაცენტრიფუგებდით (16,000 rpm x 10'). მიღებულ ნალექს ვხსნიდით 800 μ ლ დიმეთილსულფოქსიდიში, ვანჯლრევდით საღებავის გადმოსვლამდე და კვლავ ვაცენტრიფუგირებდით (16,000 rpm x 5').

შემდგომ ეტაპზე ვსაზღვრავდით მიღებული სუპერნატანტის შუქშთანთქმის სიდიდეს სპექტროფოტომეტრულად ($\lambda=540$ ნმ).

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

II.11. Ca²⁺-ატგ-აზას აქტივობისა და Ca²⁺-ის კონცენტრაციის განსაზღვრა

Ca²⁺-ატგ-აზას აქტივობას ვსაზღვრავდით რეაქციის შედეგად წარმოქმნილი არაორგანული ფოსფატის (PO₄⁻) რაოდენობის მიხედვით [174].

საკვლევი არე (1 მლ) შეიცავდა 50 mM ტრის-HCl-ის ბუფერს (pH 7.5), 0,4 mM CaCl₂ (MgCl₂), 2mM ატფ და ნიმუში (0,05 მგ ცილა). 15 წთ-იანი ინკუბაციის შემდეგ 37°C-ზე რეაქციას ვაჩერებდით 1,2მლ ცივი ტრიქლორმმარმჟავას დამატებით. ფერმენტის აქტივობას ვითვლიდით განსხვავებით Ca²⁺-ის იონის არსებობა/არარსებობისას მიღებულ შედეგებს შორის.

Ca²⁺-ის იონის რაოდენობას ვითვლიდით Calcium AS FS ტესტის გამოყენებით (DiaSys, გერმანია).

II.12. ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობას ვსაზღვრავდით შუმანისა და სხვათა მოდიფიცირებული მეთოდით [175-177].

ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე ვამზადებდით სამუშაო რეაგენტს, რომელიც შეიცავდა იმიდაზოლის ბუფერზე დამზადებულ პირველ რეაქტივს (20 mM გლუკოზა, 10 mM მაგნიუმის აცეტატი, 2 mM EDTA, 5 mM ამფ, 0.2 mM N-აცეტილცისტეინი, 10 μM დიადენოზინ პენტაფოსფატი, 2 mM ნადფ, >4 U ჰექსოკინაზა, 25 mM SH-სტაბილიზატორი; pH=6.5) და მეორე რეაქტივს (2 mM ადფ, >2.8 U G6P-DH, 30 mM კრეატინფოსფატი), შეფარდებით 4:1. მიტოქონდრიული კრეატინკინაზას აქტივობის გასაზღვრისას მეორე რეაქტივი შეიცავდა ატფ-სა და კრეატინს, pH=7.2.

შემდგომ ეტაპზე 50 μლ მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ვუმატებდით 1 მლ სამუშაო რეაგენტს, ვურევდით და ვახდენდით მის ინკუბაციას 5 წუთის განმავლობაში 37°C-ზე, რის შემდეგაც ვზომავდით ხსნარის შუქშთანთქმის სიდიდეს სპექტროფოტომეტრულად ($\lambda=340$ ნმ) 1, 2, 3 წუთის შემდეგ (A1, A2, A3).

ფერმენტის აქტივობას ვითვლიდით შემდეგი ფორმულით:

$$E = \Delta A \times 6508 \text{ } \mu\text{კატ./ლ}$$

სადაც:

E - ფერმენტის აქტივობაა,

$$\Delta A = \frac{(A1 + A2 + A3)}{3} - \text{მიღებული შუქშთანთქმის სიდიდეთა საშუალო}$$

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

II.13. მიტოქონდრიის გარდამავალი განვლადობის ფორის ხსნადობის შეფასება

2 მლ მიტოქონდრიულ სუსპენზიას (≈ 0.5 მგ ცილა) ვუმატებდით 1 მლ, 25 mM ტრის-HCl-ის ბუფერზე დამზადებულ საინკუბაციო არეს (120 mM KCl, 3 mM KH_2PO_4 , 5 mM Na-სუქცინატი; pH=7.4).

ფორის გახსნის სტიმულაციისათვის ვიყენებდით CaCl_2 -ს (420 μM), ხოლო ბლოკირებისათვის ციკლოსპორინ A-ს (0.42 μM). ორივე ნივთიერება სარეაქციო არეში შეგვქონდა თანაბარი მოცულობით მონაცვლეობით ან ერთად.

ხსნარების შუქშთანთქმის სიდიდეები იზომებოდა სპექტროფოტომეტრულად ($\lambda=520$ ნმ) და ფორის გახსნაზე ვმსჯელობდით მიღებული ექსტინციების ცვლილების საფუძველზე [178; 235].

II.14. HPLC-MS/MS ანალიზი

ნიმუშების ქრომატოგრაფიული ანალიზისათვის გამოვიყენეთ Arias et al. მოდიფიცირებული მეთოდი [179]. ექსპერიმენტები ტარდებოდა Varian ProStar თხევადი ქრომატოგრაფზე (Varian, დანია), რომელიც შეუღლებული იყო Varian 500MS IT Mass Spectrophotometer-თან (Varian, დანია). ESI მიმდინარეობდა დადებითი იონური მეთოდით (იონური ნაკადის ვოლტაჟი 4500V), გამფრქვევი აირის სახით გამოიყენებოდა აზოტი. აირის ნაკადის პარამეტრები ოპტიმიზირებული იყო

(გამფრქვევი 40psi, გამათბობელი 40psi). ტურბო იონური ნაკადის ტემპერატურა შეადგენდა 400 °C.

საწყის ეტაპზე ხდებოდა ნიმუშების მომზადება აპარატული ანალიზისათვის, რისთვისაც ვახდენდით თავის ტვინის ჰომოგენიზაციას 0,5 N HClO₄-ში (300 მგ/10 მლ), რის შემდეგაც წარმოქმნილ ნალექს ვაცილებდით ცენტრიფუგირებით (3000g x 10'). შემდგომ ეტაპზე არაცილოვან სუპერნატანტს ვანიტრალებით შესაბამისი მოცულობის KOH-ით (2 N) და წარმოქმნილ ნალექს (KClO₄) კვლავ ვაცილებდით ცენტრიფუგირებით (3000g x 10'). მიღებულ სუპერნატანტში ვსაზღვრავდით კრეატინისა და ფოსფოკრეატინის კონცენტრაციას, ასევე ვახდენდით ამავე ნიმუშების მასს სპექტრომეტრულ ანალიზს.

გამოყენებულ იქნა კომპანია Waters-ის წარმოების სვეტი SunFire™ C18 (ნაწილაკების ზომა 5µm 4.6x150 mm, Waters, ირლანდია), ნაკადის სიჩქარე იყო 400µლ/წთ ოთახის ტემპერატურაზე. იზოკრატული დაყოფა მიმდინარეობდა გამხსნელი A-ს გამოყენებით (აცეტონიტრილი:ტრიფტორმჟავა:წყალი; 3.0:0,05:96,95). გამოყენებამდე გამხსნელი გავფილტრეთ 0,45µm მემბრანაში და მოვახდინეთ დეგაზაცია ვაკუუმის საშუალებით. თითოეული გაზომვისათვის გამოიყენებოდა 20 µლ სტანდარტი/ნიმუში, რომელიც შეგვყავდა LC-MS-MS სისტემაში.

ანალიზის დრო შეადგენდა 10 წთ-ს, სვეტის ტემპერატურა იყო 30°C. ტალღის სიგრძე იყო 216 ნმ. ინსტრუმენტი აღჭურვილი იყო MS Workstation Version 6.8 პროგრამული უზრუნველყოფის სისტემით.

II.15. კრეატინისა და ატფ-ს რაოდენობრივი განსაზღვრა

კრეატინისა და ატფ-ს რაოდენობას ვსაზღვრავდით Creatine Colorimetric/Fluorimetric Assay Kit-ის და ATP Colorimetric/Fluorimetric Assay Kit გამოყენებით (Biovision Inc, აშშ).

II.16. ფერმენტ ჰექსოკინაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ ჰექსოკინაზას ფერმენტულ აქტივობას ვსაზღვრავდით Hexokinase Colorimetric Assay Kit-ის გამოყენებით (Biovision Inc, აშშ).

II.17. ფოსფოკრეატინის რაოდენობრივი განსაზღვრა

კრეატინის რაოდენობას ვსაზღვრავდით Creatine Colorimetric/Fluorimetric Assay Kit-ის გამოყენებით (Biovision Inc, აშშ).

ფოსფოკრეატინის კონცენტრაციას ნიმუშებში ვსაზღვრავდით Szasz et al მოდიფიცირებული მეთოდით [180].

მეთოდის პრინციპი მდგომარეობს ფოსფოკრეატინის დეფოსფორილირებასა და რიგი ფერმენტული რეაქციების შემდგომ აღდგენილი NADPH წარმოქმნაში.

სარეაქციო არე შეიცავდა 250 mM გლიცილ-გლიცინის ბუფერს (pH 7.4), 20 mM ადგ, 1 mM გლუკოზა, 20 mM NADP⁺, 300 mM MgCl₂, 50 U/ml გლუკოზო-6-ფოსფატდეჰიდროგენაზა და ჰექსოკინაზას, 50 U/ml კრეატინფოსფოკინაზა და ფოსფოკრეატინის სტანდარტული ხსნარი (2მგ/25 მლ).

ნარევეს ვზომავდით $\lambda=340$ ნმ, ვაყოვნებდით 30°C-ზე 5 წთ და შემდეგ ისევ ვზომავდით. ფოსფოკრეატინის კონცენტრაციას ვითვლიდით სპეციალური ფორმულის გამოყენებით:

$$C = [(\Delta A_{\text{ნიმუში}} - \Delta A_{\text{სტანდარტი}}) \times (3.1) \times (25)] / 6.22 \mu\text{M/L}$$

II.18. კრეატინის მასინთეზირებელი ფერმენტებისა და მატრანსპორტირებელი ცილის რაოდენობის განსაზღვრა

კრეატინის მასინთეზირებელია ფერმენტებისა (AGAT, GAMT) და მატრანსპორტირებელი ცილის (SLC6A8) ELISA მეთოდზე დამყარებული იმუნოფერმენტული ტესტ-სისტემების გამოყენებით (MBS Inc, აშშ).

II.19. 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 [181].

ექსპერიმენტის პირველ ეტაპზე 0.4 მლ მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ვუმატებდით 2 მლ C რეაქტივს, რომელიც თავის მხრივ მზადდება A (NaHCO_3 -ის (უწყლო) 2%-იანი ხსნარი დამზადებული 1 N NaOH-ზე) და B (0.5%-იანი $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ დამზადებული 1 %-იან ნატრიუმის ციტრატზე) რეაქტივების ურთიერთშერევით (50:1). ვურევდით და ვაყოვნებდით 10 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე.

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

მიღებულ შეფერილობას ვზომავდით სპექტროფოტომეტრულად ($\lambda=750 \text{ nm}$) და ვითვლიდით ცილის კონცენტრაციას შემდეგი ფორმულით:

$$C = (E_{\lambda a} - b) / a \text{ mg/ml}$$

სადაც:

C - ცილის კონცენტრაცია

$E_{\lambda a}$ - მიღებული შუქშთანთქმების საშუალო

a – y ღერძის გადაკვეთის წერტილი

b - ხაზის დახრილობა

II.20. სტატისტიკური ანალიზი

სტატისტიკური ანალიზისათვის გამოვიყენეთ Student's t-ტესტი არადამოკიდებული მონაცემებისათვის და სარწმუნოდ იქნა მიჩნეული $p < 0.05$ -ზე მაჩვენებელი.

III. მიღებული შედეგები და მათი განხილვა

III.1. ფსიქო-ემოციური სტატუსის განსაზღვრა ხანგრძლივი იზოლირებისა და ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში

გარემოში მიმდინარე ცვლილებები გარკვეულწილად აისახება ორგანიზმზე და რა თქმა უნდა, ეს ყველაზე უკეთ უჯრედულ დონეზე აღიქმება. ცნობილია, რომ ცოცხალი სისტემა ცდილობს შეძლებისდაგვარად შეეწინააღმდეგოს ამ ფაქტორების უარყოფით ზეგავლენას, რაც ვლინდება უჯრედში მიმდინარე მეტაბოლური პროცესების ცვლილებით. აღნიშნული პროცესი შესაძლოა ორი, ერთმანეთისაგან რადიკალურად განსხვავებული გზით წარიმართოს, კერძოდ მოხდეს ახალ გარემო პირობებთან შეგუება - ადაპტაცია, ან პირიქით - დეგრადაცია, რაც ადაპტაციის მსგავსად საფეხურეობრივი პროცესია, მაგრამ ამ უკანასკნელისაგან გასხვავებით, ცოცხალი სისტემა ლეტალურ შედეგამდე მიყავს.

სტრესის გამომწვევი ფაქტორი მრავალია და მათ შორის აქტიურად განიხილება ინდივიდის სოციალური იზოლირება და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევა. სამეცნიერო ლიტერატურიდან კარგადაა ცნობილი ამ ფაქტორების ნეგატიური როლი ცხოველური ორგანიზმების და მათ შორის, ადამიანის სხვადასხვა ორგანოთა სისტემების ფუნქციონირებაზე, რაც საბოლოოდ ვლინდება სხვადასხვა ტიპის პათოლოგიური პროცესისა და დაავადებების ჩამოყალიბებაში [182, 183]. ამ კუთხით მრავალი კვლევაა ჩატარებული, რომლებიც აღნიშნულ პირობებში უჯრედული მეტაბოლიზმის მიმდინარეობის თავისებურებას წარმოაჩენს [184-186].

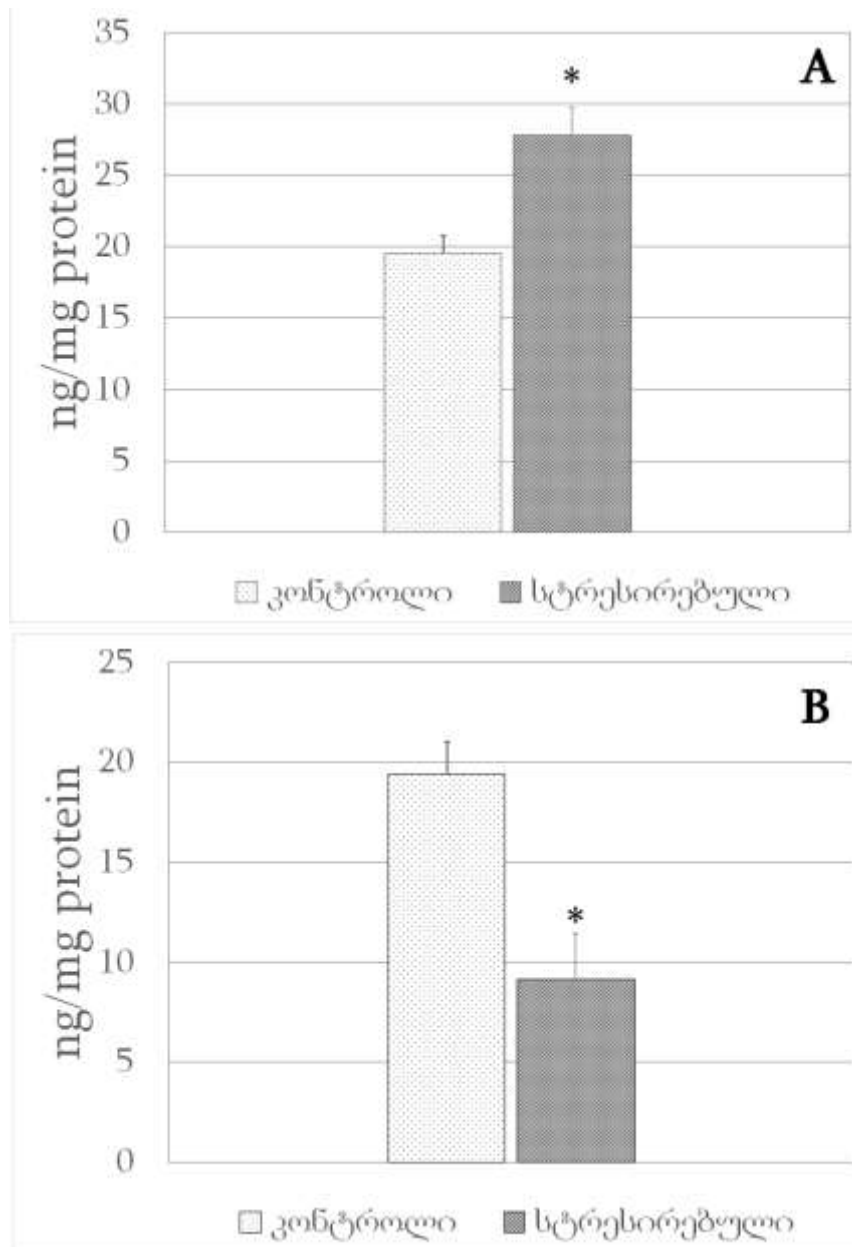
ცნობილია, რომ ნებისმიერი ტიპის ბუნებრივი პირობების ცვლილება, როგორც გარკვეული სტრეს-ფაქტორი, პირველ რიგში მოქმედებს ცნს-ზე, რაც გამოიხატება პერიფერიული ნერვული სისტემის აქტივირებითა და შესაბამისად, სხვადასხვა ჰორმონების სეკრეციით სისხლში. ამის შედეგად, ორგანიზმში იწყება

ბიოქიმიური პროცესების დარღვევა, რასაც მოსდევს არასასურველი ცვლილებები ქსოვილებსა და ორგანოებში და მათი შემდგომი დაზიანებები [187, 188].

თუ გავითვალისწინებთ, რომ სამეცნიერო პრაქტიკაში სტრესული მდგომარეობის შესაფასებელ ძირითად ბიოქიმიურ (სეროლოგიური) მარკერად გამოიყენება საკვლევი ინდივიდის სისხლში სტრესული ჰორმონების რაოდენობრივი ცვლილებები, ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე განისაზღვრა 30-დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში საცდელი ცხოველების სისხლში ისეთი ჰორმონების რაოდენობრივი შემცველობა, როგორცაა კორტიკოსტერონი, სეროტონინი და მელატონინი. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 1 და 2.

სურათიდან ჩანს, რომ ცხოველების იზოლირება და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევა მნიშვნელოვან ზეგავლენას ახდენს ორგანიზმის ჰორმონალურ სტატუსზე, რაც გამოიხატება სეროტონინისა და კორტიკოსტერონის არაერთგვაროვანი რაოდენობრივი ცვლილებით. აღნიშნული ბიოლოგიურად აქტიური ნაერთები მიჩნეულია, როგორც სტრესული მდგომარეობის პირდაპირი მარკერები და ცნობილია, რომ მათი რაოდენობა ამა თუ იმ პირობებში ანტაგონისტურად იცვლება, თუმცა ჯერ-ჯერობით დაუზუსტებელია აღნიშნული ცვლილების ზუსტი ხასიათი, რადგან არსებობს მონაცემები სტრესულ პირობებში, როგორც ერთი, ისე მეორე ჰორმონის რაოდენობრივი სიჭარბისა [21]. მაგალითად, მიჩნეულია, რომ კორტიკოსტერონის რაოდენობრივი მატება დამახასიათებელია ხანმოკლე, მწვავე სტრესისათვის, იმ დროს, როცა ხანგრძლივი სტრესის პირობებში მისი შემცველობა კლებულობს. ამის საპირისპიროდ, სეროტონინის რაოდენობრივი მატება აღინიშნება სწორედ ხანგრძლივი, ქრონიკული სტრესის დროს, ხოლო რაოდენობრივი კლება დამახასიათებელია ხანმოკლე სტრესისათვის [32].

როგორც სურათი 1-დან ჩანს, ცხოველების 30-დღიანი სოციალური იზოლირება და მათი ბუნებრივი რიტმის დარღვევა იწვევს სეროტონინის კონცენტრაციის $\approx 42\%$ -იან ზრდას, მაშინ როცა კორტიკოსტერონის შემცველობა დაახლოებით 72% -ითაა შემცირებული.

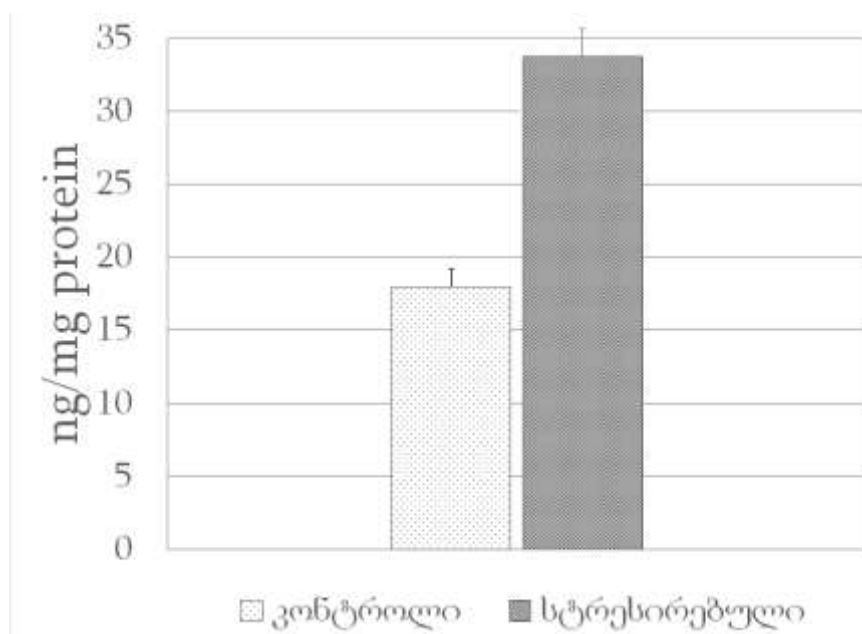


სურათი 1. სეროტონინის (A) და კორტიკოსტერონის (B) რაოდენობრივი ცვლილებები 30 დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში

ორდინატა ღერძზე - ჰორმონის კონცენტრაცია (ng/mg ცილა); * $p < 0.05$

გამომდინარე იქიდან, რომ ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა სოციალური იზოლაციის გავლენა თავის ტვინში მიმდინარე უჯრედულ

მეტაბოლიზმზე ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში, შემდგომ ცდებში ასევე განსაზღვრული იყო მელატონინის რაოდენობრივი შემცველობა 30-დღიანი იზოლაციისა და 23.5 სთ სიბნელეში მყოფი ცხოველების სისხლში. როგორც სურათი 2-დან ჩანს, ხანგრძლივი იზოლირებისა და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის პირობებში მელატონინის შემცველობა ექსპერიმენტული ვირთაგვების თავის ტვინში დაახლოებით 2,5-ჯერაა მომატებული. გასათვალისწინებელია ის ფაქტი, რომ ჰორმონი მელატონინი, რომელიც წარმოადგენს ძლიერ ენდოგენურ ანტიოქსიდანტს, ჭარბი რაოდენობის შემთხვევაში ანტიოქსიდანტური თვისებების მაგივრად, იძენს პროოქსიდანტურ თვისებებს და ხელს უწყობს უჯრედში ჟანგვითი სტრესისა და მისი თანმხვედრი შესაბამისი პროცესების განვითარებას [189].



სურათი 2. მელატონინის რაოდენობრივი ცვლილებები 30 დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში ორდინატა ღერძზე - ჰორმონის კონცენტრაცია (ng/mg ცილა); $p < 0.05$

გარდა ჰორმონების რაოდენობრივი ცვლილებებისა, სტრესის არსებობა შემოწმებული იყო ფიზიოლოგიური ტესტებითაც. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია ცხრილში 1.

ცხოველების ფიზიოლოგიური მახასიათებლები ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ცირკადული რიტმის დაღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში

*p≤0.05, **p≤0.001

	ფიზიოლოგიური მახასიათებლები	საკონტროლო ცხოველები	30-დღიანი სტრესი
შიშის რეაქციები	დეფეკაცია	3.6 ± 0.9	5.6 ± 0.3*
	გრუმინდის ხანგრძლივობა (წმ)	3.7 ± 0.5	17.2 ± 1.4**
	გარინდების რაოდენობა	3.2 ± 0.8	9.8 ± 2.5**
	გარინდების ხანგრძლივობა (წმ)	14.4 ± 2.6	21.4 ± 2.4**
	ვერტიკალური დგომა	11.6 ± 2.4	3.2 ± 0.7**
კვლევის რეაქციები	ცენტრში ყოფნის ხანგრძლივობა (წმ)	4.0 ± 0.7	2.2 ± 1.1*
	ცენტრში ყოფნის რაოდენობა	1.9 ± 0.4	0.8 ± 0.1*
	ცენტრისკენული მოძრაობების რაოდენობა	5.3 ± 1.3	0.6 ± 0.1**
	ჰორიზონტალური მოძრაობების რაოდენობა	4.0 ± 1.5	0

როგორც მიღებული მონაცემებიდან იკვეთება სოციალურ იზოლაციასა და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მოხვედრილი ცხოველების ჰორმონალური სტატუსის გარდა, შეცვლილია ასევე მათი ფიზიოლოგიური მახასიათებლებიც, კერძოდ სარწმუნოდაა გაზრდილი შიშის რეაქციები შემცირებული კვლევითი აქტივობის ფონზე.

ამრიგად, მიღებული მონაცემები მიუთითებენ, რომ აღნიშნულ პირობებში ადგილი აქვს სტრესული ფონის განვითარებას, რაც იძლევა საშუალებას დავასკვნათ, რომ ხანგრძლივი სოციალური იზოლაცია და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევა ფსიქო-ემოციური სტრესის ჩამოყალიბების რეალური ინდიკატორია.

III.2. აზოტის ჟანგისა (NO) და ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის პროდუქტების რაოდენობრივი შემცველობის დადგენა ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში

მიღებული მონაცემებიდან გამომდინარე, შემდგომ ცდებში საინტერესოს წარმოადგენდა შეგვესწავლა ის პროცესები, რომელთა გააქტივება ხდება აღნიშნულ პირობებში და ასევე, დაგვედგინა უჯრედულ მეტაბოლიზმზე მათი ზემოქმედების ხასიათი.

როგორც აღინიშნა, ხანგრძლივი სოციალური იზოლაცია და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევა მნიშვნელოვან გავლენას ახდენს ორგანიზმის ჰორმონალურ სტატუსზე ანუ პირველად მესენჯერულ სისტემაზე. ცნობილია, რომ ორგანიზმში ჰორმონების რაოდენობრივი ცვლილება გავლენას ახდენს უჯრედში მთელი რიგი სასიგნალო მოლეკულების სინთეზსა და მათი მეშვეობით განხორციელებულ სასიგნალო კასკადის ინტენსივობასა და მიმართულებაზე. ერთ-ერთ ასეთ მოლეკულად განიხილება აზოტის ჟანგი (NO).

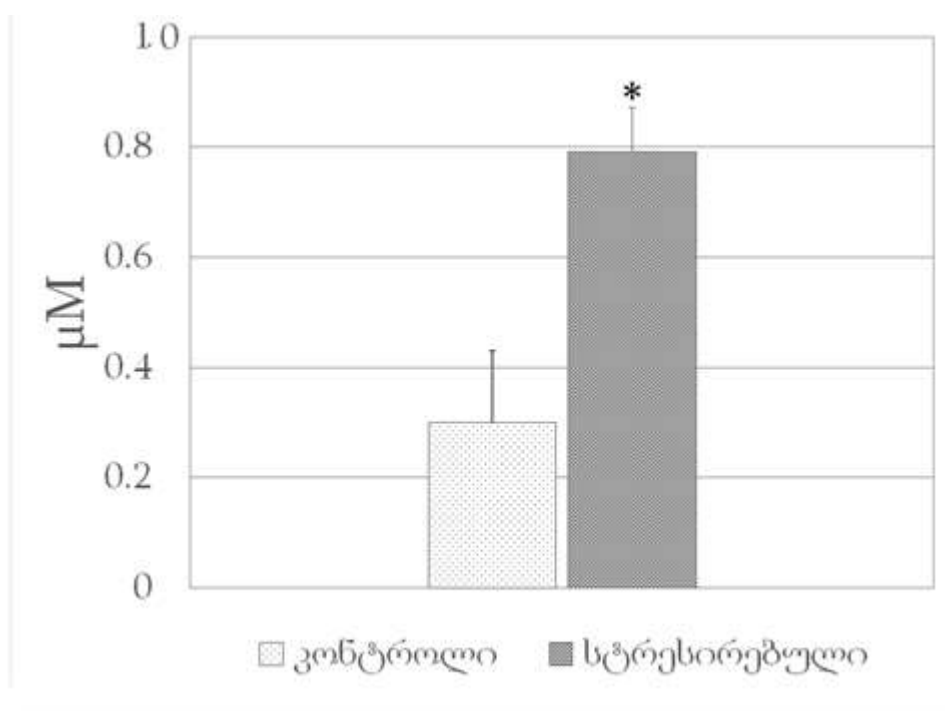
ცნობილია, რომ NO აქტიურადაა ჩართული უჯრედულ მეტაბოლიზმში და მნიშვნელოვან როლს ასრულებს რიგი პროცესების მიმდინარეობაზე. მისი მოქმედებით ადგილი აქვს გლუვი კუნთების მოდუნებას, რითაც ხელს უწყობს არტერიული წნევის დაწევას, ააქტივებს რა ც-გმფ-ის წარმოქმნას. როგორც ნეიროტრანსმიტერი, იგი აქტიურადაა ჩართულია საჭმლის მომნელებელი და გამომყოფი სისტემების მუშაობაში, იმუნური პასუხის შემთხვევაში აზოტის ჟანგი წარმოადგენს ფაგოციტოზის სტიმულატორს და ა.შ. [190].

თანამედროვე სამეცნიერო წრეებში აქტიურად მიმდინარეობს კვლევა NO-ს, როგორც მნიშვნელოვანი სასიგნალო მოლეკულის, როლის გასარკვევად. ცნობილია, რომ მისი სიცოცხლის ხანგრძლივობა მცირეა, თუმცა ის მონაწილეობს მრავალ მეტაბოლურ პროცესში. აღნიშნულ რეაქციათა რიცხვს მიეკუთვნება: მეტალოფერმენტების, კერძოდ რიბონუკლეოტიდ-ტრანსფერაზასა და აკონიტაზას დაჟანგვა, ხსნადი გუანილატციკლაზას აქტივაცია, რასაც თავის მხრივ, მოსდევს სისხლძარღვების მოდუნება, ცილების ADP-რიბოზილირება, ნიტროზილირება და

რკინა-რეგულატორული ფაქტორების აქტივაცია და მრავალი სხვა მნიშვნელოვანი უჯრედული პროცესი [73].

NO-ს ბიოლოგიური როლი უჯრედში პირდაპირ კავშირშია მის რაოდენობრივ შემცველობაზე. მისი ჭარბი, ციტოტოქსიკური რაოდენობა უარყოფითად აისახება უჯრედის ფუნქციონირებაზე, განსაკუთრებით ეს ეხება ნერვული სისტემის უჯრედებს, რასაც ხშირ შემთხვევაში მოსდევს მათი აპოპტოზი [191]. ამდენად, როგორც იკვეთება, NO-ს ფუნქცია უჯრედში მრავალაფეროვანია და ძირითადად განისაზღვრება მისი რაოდენობრივი ცვლილებებით.

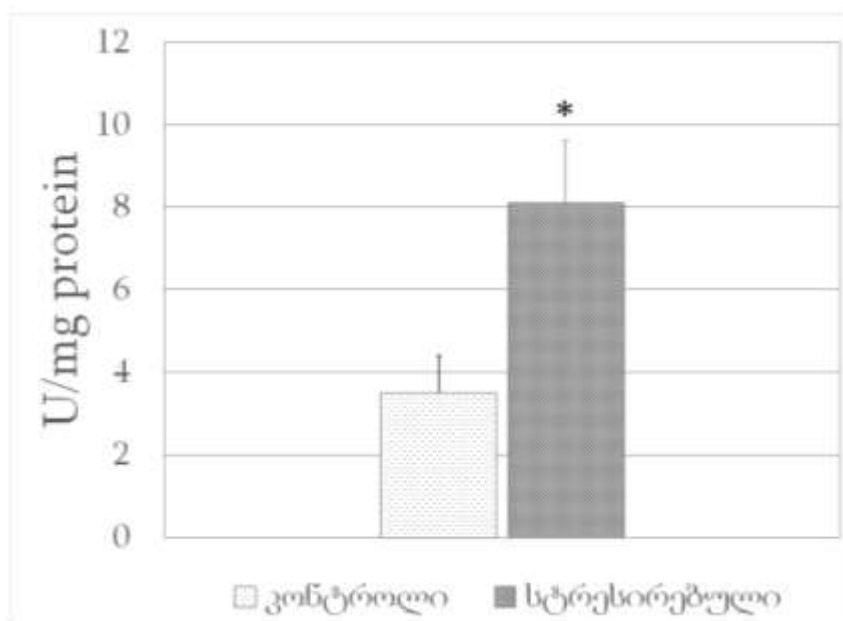
ზემოთქმულის გათვალისწინებით, შემდგომ ცდებში განსაზღვრული იქნა აზოტის ჟანგის რაოდენობრივი შემცველობა როგორც საკონტოლო, ისე სტრესირებული ცხოველების თავის ტვინის სუმატულ ფრაქციაში. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 3.



სურათი 3. აზოტის ჟანგის (NO) რაოდენობრივი ცვლილებები 30- დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში

ორდინატა ლერძზე - NO-ს კონცენტრაცია (µM); $p < 0.05$

სურათიდან ჩანს, რომ ცხოველების ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში NO-ს კონცენტრაცია საცდელი ცხოველების თავის ტვინში, საკონტროლოსთან შედარებით დაახლოებით 62%-ითაა გაზრდილი, რაც სავარაუდოდ მისი მასინთეზირებელი ფერმენტის გააქტივებით შეიძლება აიხსნას.



სურათი 4. NO-სინთაზას ფერმენტული აქტივობის ცვლილება 30- დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში

ორდინატა ღერძზე - NOS-ის ფერმენტული აქტივობა (U/mg protein); $p < 0.05$

ცნობილია, რომ NO-ს სინთეზი ხორციელდება სპეციალური ფერმენტების, კერძოდ NO-სინთაზების (NOS) მონაწილეობით. როგორც ცნობილია, ნანახია ამ ფერმენტის 3 იზოფორმა, კერძოდ ენდოთელიალური, ინდუციბელური და ნეირონალური.

შესაბამისად, საინტერესო იყო გვეჩვენა თუ როგორ იცვლება ნეირონალური NOS-ის ფერმენტული აქტივობა აღნიშნულ პირობებში. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 4, საიდანაც ნათლად ჩანს, რომ ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში nNOS-ის

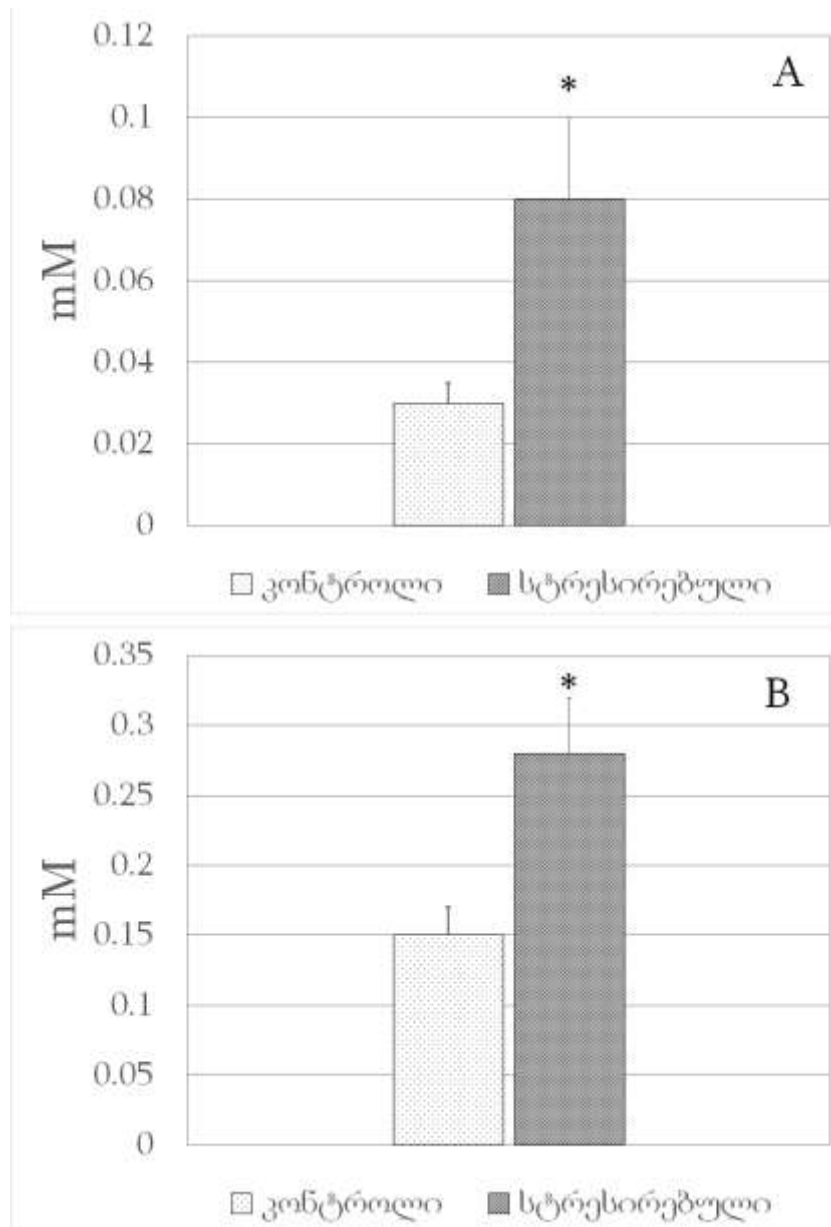
აქტივობა თავის ტვინში დაახლოებით 1,5-ჯერ არის მომატებულია, რაც მიანიშნებს NO-ს სინთეზის გაძლიერებაზე.

ცნობილია, რომ nNOS-ის მთავარ აქტივატორად ითვლება Ca^{2+} -ის იონი [192], რომელიც გვევლინება ორგანიზმის ერთ-ერთ უმნიშვნელოვანეს სასიგნალო იონად და სწორედ მასთანაა დაკავშირებული სხვადასხვა მეტაბოლური, მათ შორის ნერვულ სისტემაში მიმდინარე სასიგნალო გზების ფუნქციონირება [193]. ამასთან, ცნობილია Ca^{2+} -ის, როგორც სხვადასხვა პათოლოგიური პროცესებისა და აპოპტოზური გზების აქტივატორის ფუნქციაც [194].

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, საინტერესო იყო დაგვედგინა Ca^{2+} -ის კონცენტრაციული ცვლილება ვირთაგვათა თავის ტვინის ციტოზოლურ და მიტოქონდრიულ ფრაქციებში, როგორც საცდელ, ისე საკონტროლო ჯგუფის ინდივიდებში.

როგორც სურათიდან 5 ჩანს, როგორც ციტოზოლურ (სურ. 5A), ისე მიტოქონდრიულ (სურ. 5B) ფრაქციაში, Ca^{2+} -ის კონცენტრაცია სტრესირებული ცხოველების თავის ტვინში, საკონტროლოსთან შედარებით სარწმუნოდაა მომატებულია.

როგორც ცნობილია, რომ უჯრედშიდა კალციუმი ეფექტს რამოდენიმე მიმართულებით ახორციელებს. მათ შორის Ca^{2+} -ინდუცირებადი არხების შემადგენელი ცილების ფოსფორილირება და გააქტივა, რასაც თავის მხრივ, მოსდევს უჯრედში დამატებითი იონის შემოდინება და მისი უჯრედშიდა კონცენტრაციის ზრდა [195]. კალციუმის იონის უჯრედშიდა კონცენტრაციის მუდმივობის შენარჩუნება, რომელიც უჯრედისათვის განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია, რამდენიმე ფერმენტული სისტემით ხორციელდება Ca^{2+} -ატფაზა. ცნობილია ამ ფერმენტის რამდენიმე იზოფორმა, კერძოდ პლაზმური მემბრანის, მიტოქონდრიული და ენდოპლაზმური ბადის, რომელთა მოქმედებით მაქსიმალურადაა შენარჩუნებული უჯრედში ამ იონის რაოდენობრივი მუდმივობა [196-197].



სურათი 5. თავის ტვინის უჯრედების ციტოზოლურ (A) და მიტოქონდრიულ (B) ფრაქციებში კალციუმის იონის (Ca^{2+}) რაოდენობრივი ცვლილებები 30- დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში

$n_1=n_2=30$; $df=58$; $t=1.523$

ორდინატა ღერძზე - Ca^{2+} -ს კონცენტრაცია (mM); * $p<0.05$

ამის გათვალისწინებით, ჩვენი კვლევის შედეგომ მიზანს წარმოადგენდა დაგვედგინა თავის ტვინში ამ ფერმენტის სამივე იზოფორმების აქტივობის

ცვლილებები ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში. მიღებული შედეგები წარმოდგენილია სურათზე 6. როგორც მიღებული მონაცემები ცხადყოფს, ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში ადგილი აქვს პლაზმური მემბრანისა და მიტოქონდრიული Ca^{2+} -ატფაზას აქტივობის შემცირებას, რაც განაპირობებს ერთის მხრივ ამ იონის გამოდევნის შეფერხებას უჯრედიდან უჯრედგარე არეში, ასევე მიტოქონდრიუმში მისი შედინებისა და იქ დეპონირების პროცესს. ორივე ეს პროცესი წარმოადგენს უჯრედშიდა, ციტოპლაზმურ სივრცეში ამ იონის რაოდენობრივი გაზრდის მიზეზს [198], რაც უარყოფითად აისახება უჯრედის ფუნქციონირებაზე და უჯრედისათვის ციტოტოქსიკური ეფექტით ხასიათდება. ამავე დროს, გასათვალისწინებელია ის ფაქტი, რომ ჭარბი ენდოგენური კალციუმის ასეთი უარყოფითი ეფექტის მიზეზია მისი ზემოქმედება სხვადასხვა ფერმენტულ სისტემებზე, მათ შორის NO-სინთაზებზე, რაც თავის მხრივ იწვევს ამ ფერმენტის გააქტივებას და შესაბამისად NO-ს რაოდენობრივ მატებას უჯრედში [199, 200].

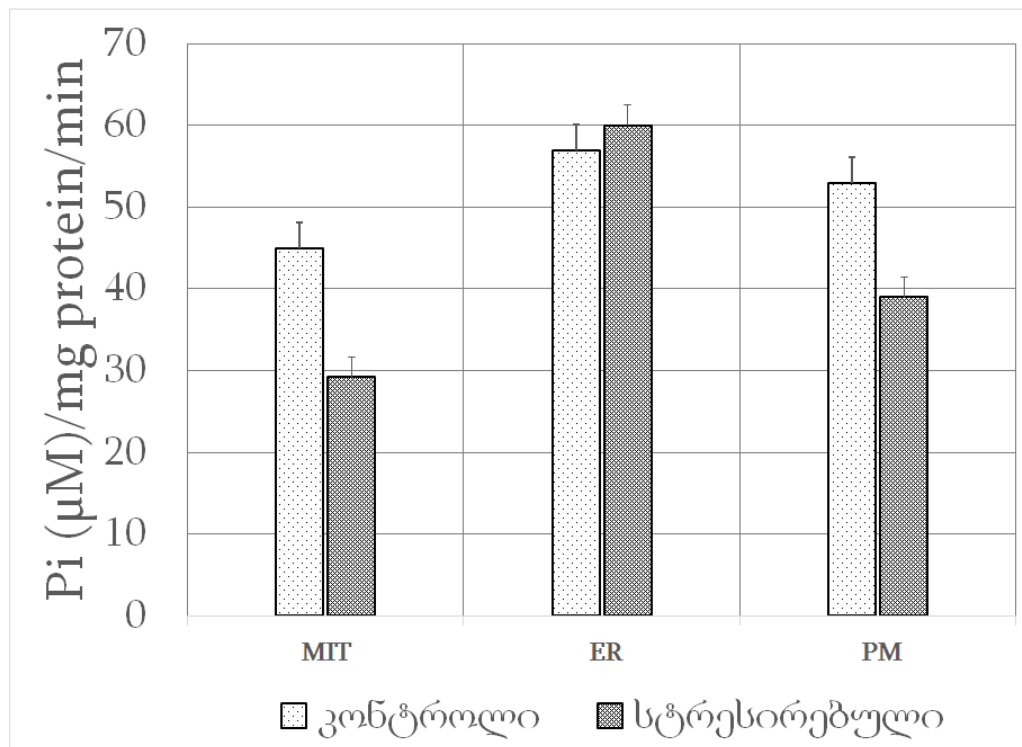
ამდენად, მიღებული მონაცემების გათვალისწინებით, ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის შედეგად, თავის ტვინის უჯრედებში ადგილი აქვს ნერვული უჯრედების პლაზმური მემბრანისა და მიტოქონდრიული Ca^{2+} -ატფაზას აქტივობის შემცირებას, რაც უჯრედებში ამ იონის რაოდენობის მატების მიზეზი ხდება და გამომდინარე იქიდან, რომ NO-სინთაზების კოფაქტორს სწორედ კალციუმის იონი წარმოადგენს [51], თავის მხრივ, უჯრედშიდა NO-ს გაძლიერებული სინთეზის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ინიციატორად გვევლინება. საკუთრივ ჭარბი აზოტის ჟანგი კი ციტოტოქსიკური ეფექტის მქონე მოლეკულაა, რაც გამოიხატება პეროქსინიტრიტის წარმოქმნით, რომელიც სხვადასხვა მემბრანული და უჯრედშიდა კომპონენტების ჟანგვაში აქტიურად მონაწილეობს.

აღსანიშნავია, რომ Ca^{2+} -ის იონი მნიშვნელოვან ფაქტორს წარმოადგენს სეროტონინისა და კორტიკოსტერონის სინთეზის პროცესშიც. კერძოდ, მისი რაოდენობრივი მატების შემთხვევაში აღინიშნება სეროტონინერგული სისტემის მნიშვნელოვანი აქტივაცია და კორტიკოსტერონის სინთეზის ინჰიბირება [201].

სწორედ ამ მიზეზით შეიძლება აიხსნას შესწავლილ პირობებში მოცემული ჰორმონების რაოდენობრივი ცვლილების სპეციფიკა (სურ.1 და 2).

სოციალური იზოლაცია და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევა მნიშვნელოვნად მოქმედებს ორგანიზმის სასიგნალო სისტემებზე და მათ პათოლოგიურ აქტივაციას უწყობს ხელს. კერძოდ, აღნიშნულ პირობებში ნათლად იკვეთება სტრესული პირობების უშუალო მარკერების - სეროტონინისა და კორტიკოსტერონის რაოდენობრივი დისბალანსი, რაც პირდაპირპროპორციულად მიგვანიშნებს განვითარებულ მწვავე სტრესულ ფონზე. ამასთან, Ca^{2+} -ისა და NO-ს რაოდენობრივი ცვლილებებიც იმის მანიშნებელია, რომ შესწავლილი პირობები ნეგატიურ ზეგავლენას ახდენს არამარტო პირველად, არამედ მეორად მესენჯერულ სისტემაზეც, რაც სხვადასხვა პათოლოგიური პროცესის მაპროვოცირებელი შეიძლება გახდეს.

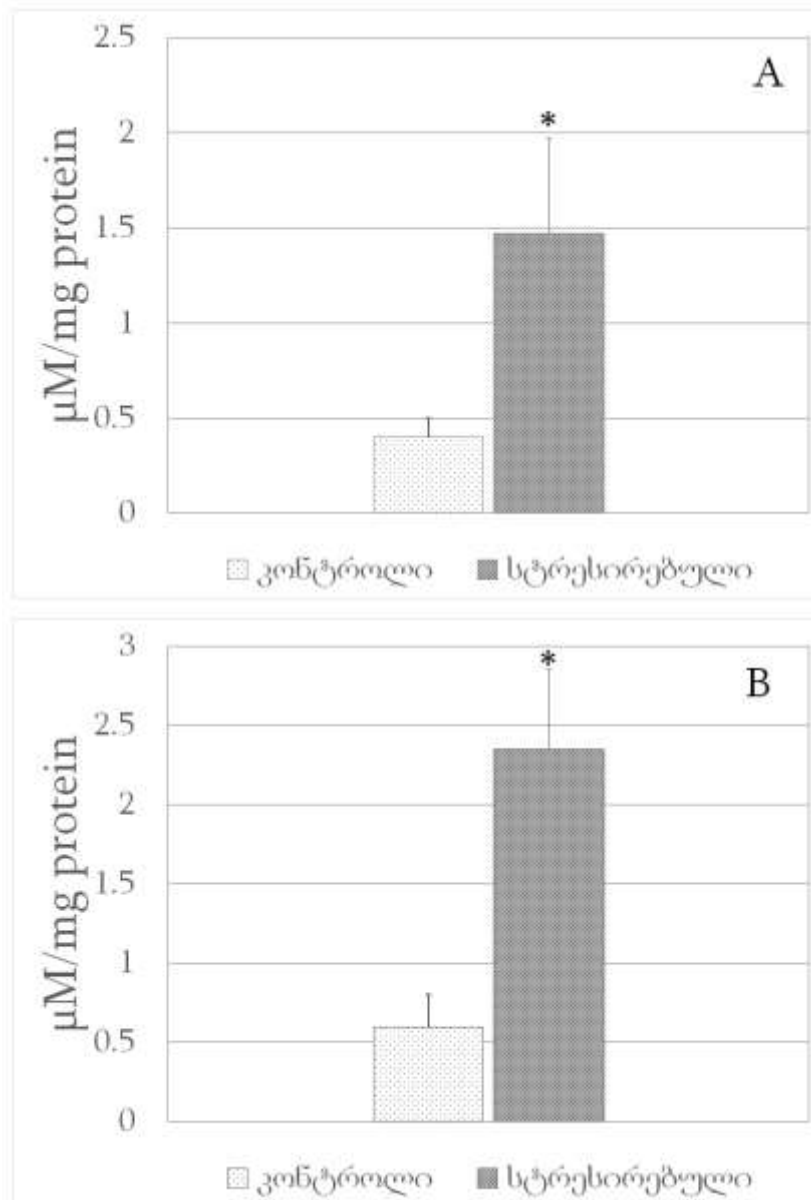
აღნიშნულ პროცესებს შორისაა ასევე აზოტის ჟანგის პათოლოგიური სინთეზის გააქტივებაც, რასაც ე.წ. ნიტრიტ-იონის ($ONOO^-$) ფორმირებამდე მივყავართ, რომლის უშუალო სამიზნეს მემბრანული კომპონენტები (ლიპიდები) და ფერმენტების აქტიური ცენტრები წარმოადგენს. NO-ს გააჩნია უნარი ადვილად შევიდეს რეაქციაში უჯრედში მუდმივად წარმოებულ ჟანგბადის აქტიურ ფორმებთან, რის შედეგადაც წარმოიქმნება პეროქსინიტრიტის რადიკალი, რომელიც თავის მხრივ, საკმაოდ რეაქტიულ ნაერთს წარმოადგენს და მარტივად შეუძლია სხვადასხვა უჯრედული მაკრომოლეკულების დაჟანგვა. ცნობილია, რომ აქტიური რადიკალების ძირითად სამიზნეს, სხვადასხვა ცილოვანი მოლეკულების გარდა, წარმოადგენს უჯერი ცხიმოვანი მჟავების შემცველი მემბრანული ლიპიდები. ლიპიდებზე სხვადასხვა აქტიური რადიკალებისა და მათ შორის, $ONOO^-$ -ის ზემოქმედების შედეგად იწყება ე.წ. ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის (ლზჟ) - პეროქსიდაციის პროცესი, რასაც საბოლოოდ მოსდევს სამიზნე უჯრედში ოქსიდაციური სტრესის განვითარება.



სურათი 6. მიტოქონდრიული, ენდოპლაზმური და პლაზმური მემბრანის Ca^{2+} -ატფაზას აქტივობის ცვლილებები ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში
 ორდინატა ღერძზე - Ca^{2+} -ატფაზას აქტივობა (Pi (µM)/mg protein/min); $p < 0.05$

ლზჟ-ის პროცესისადმი განსაკუთრებულ მგრძობელობას ამჟღავნებენ მემბრანული სტრუქტურები, ვინაიდან მას განსაკუთრებული არყოფითი გავლენა აქვს მემბრანის მთლიანობაზე და შესაბამისად მის ნორმალურ ფუნქციონირებაზე. ამასთან, აღნიშნული პროცესის შედეგად ხდება ჭარბი თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნა, რომლებიც თავის მხრივ სხვადასხვა ჟანგვითი რეაქციები აქტივატორს წარმოადგენენ.

ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე, საინტერესო იყო შეგვეფასებინა, იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის ფონზე მიმდინარე ლზჟ-ის ინტენსივობა, რისთვისაც განისაზღვრა აღნიშნული პროცესის უშუალო მარკერების, თბმ (თიობარბიტურატი) აქტიური პროდუქტებისა და დიენური კონიუგატების რაოდენობრივი შემცველობა, როგორც სტრესირებული, ისე საკონტოლო ინდივიდების თავის ტვინში.



სურათი 7. თბმ-აქტიური პროდუქტების (A) და დიენური კონიუგატების (B) რაოდენობრივი ცვლილებები 30 დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში ორდინატა ღერძზე - ნაერთთა კონცენტრაცია ($\mu\text{M}/\text{მგ ცილა}$); $p < 0.05$

მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 7, საიდანაც ჩანს, რომ თბმ-აქტიური პროდუქტების (სურ. 7A) და დიენური კონიუგატების (სურ. 7B) რაოდენობა სტრესირებული ინდივიდებში მკვეთრადაა მომატებული. კერძოდ, ამ

უკანასკნელის რაოდენობა საკონტროლო მონაცემებთან შედარებით $\approx 77\%$ -ით, ხოლო თბმ-აქტიური პროდუქტებისა კი $\approx 72\%$ -ითაა გაზრდილი

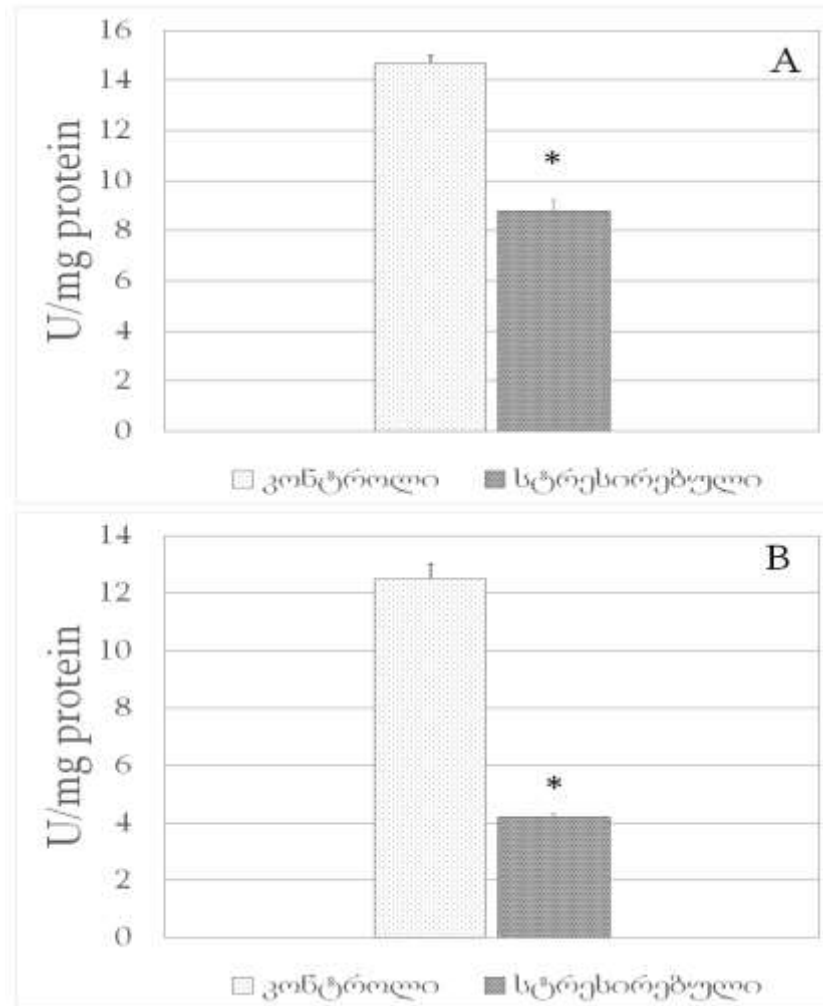
მიღებული მონაცემებიდან გამომდინარე, შესაძლებელია ვივარაუდოთ, რომ ხანგრძლივი იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში ადგილი აქვს ლზჟ-ს აქტივაციას, რისი დადასტურებაცაა ამ პროცესის შედეგად წარმოქმნილი პროდუქტების მკვეთრი რაოდენობრივი მატება, რაც თავის მხრივ, გამოწვეული უნდა იყოს NO-ს ჭარბი პროდუცირებით, ეს უკანასკნელი კი კალციუმის კონცენტრაციული მატების სავარაუდო შედეგია.

ამდენად, ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე, შეგვიძლია გამოვთქვათ მოსაზრება, რომ შესწავლილი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში ცოცხალ სისტემაში ვითარდება ჟანგვითი სტრესი, რაც ნორმალურ უჯრედებში მკვეთრად ცვლის იქ მიმდინარე მეტაბოლიზმს და მთელი რიგი პათოლოგიების მიზეზი შეიძლება გახდეს.

III.3. თავის ტვინის უჯრედებში ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობა ფსიქო-ემოციური სტრესით განპირობებული ოქსიდაციური სტრესის პირობებში

ოქსიდაციური სტრესი უჯრედში მიმდინარე ჟანგვითი პროცესების ერთობლიობაა, რომელიც მუდმივად მიმდინარეობს და ამ პროცესის მთავარი ინიციატორია სხვადასხვა აქტიური რადიკალები, რომლებიც ამა თუ იმ მეტაბოლური რეაქციის შედეგად წარმოიქმნება. ამ პროცესის ნორმალური მიმდინარეობა აუცილებელია უჯრედის ფუნქციონირებისათვის, ვინაიდან მისი დახმარებით ხდება უჯრედის დეგრადირებული მოლეკულების, მათ შორის ცილების, მთელი რიგი ფერმენტების, ნუკლეინის მჟავების, პათოგენური აგენტებისა და სხვათა დაშლა და აცილება, თუმცა მისი გააქტივება დამლუპველად მოქმედებს ცოცხალ სისტემაზე და მთელი რიგი პათოლოგიების მიზეზიც ხდება [202]. უჯრედში მიმდინარე ოქსიდაციური პროცესები კონტროლდება ე.წ ანტიოქსიდანტური სისტემის მოქმედებით. ეს სისტემა მრავალსაფეხურიანია და მოიცავს როგორც

ცალკეულ მოლეკულებს, ასევე ფერმენტულ სისტემებსაც. სწორე ანტიოქსიდანტური სისტემა განსაზღვრავს უჯრედში წარმოებულ პროოქსიდანტური და ოქსიდანტური პროცესების წონასწორობას. თუმცა ზოგიერთ შემთხვევაში მიმდინარეობს ოქსიდაციური პროცესების ინტენსიფიკაცია, რასაც შესაძლებელია უჯრედის და შესაბამისად, მთლიანი ორგანიზმის დაღუპვის მიზეზიც კი გახდეს.



სურათი 8. სუპეროქსიდდისმუტაზასა (A) და კატალაზას (B) ფერმენტული აქტივობის ცვლილებები 30 დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში;

ორდინატა ღერძზე - ფერმენტული აქტივობა (U/მგ ცილა); *p<0.05

ოქსიდაციური პროცესების დამაბალანსებლად უჯრედში გვევლინება ე.წ. ანტიოქსიდანტური სისტემა, რომელიც ახდენს აქტიური რადიკალების

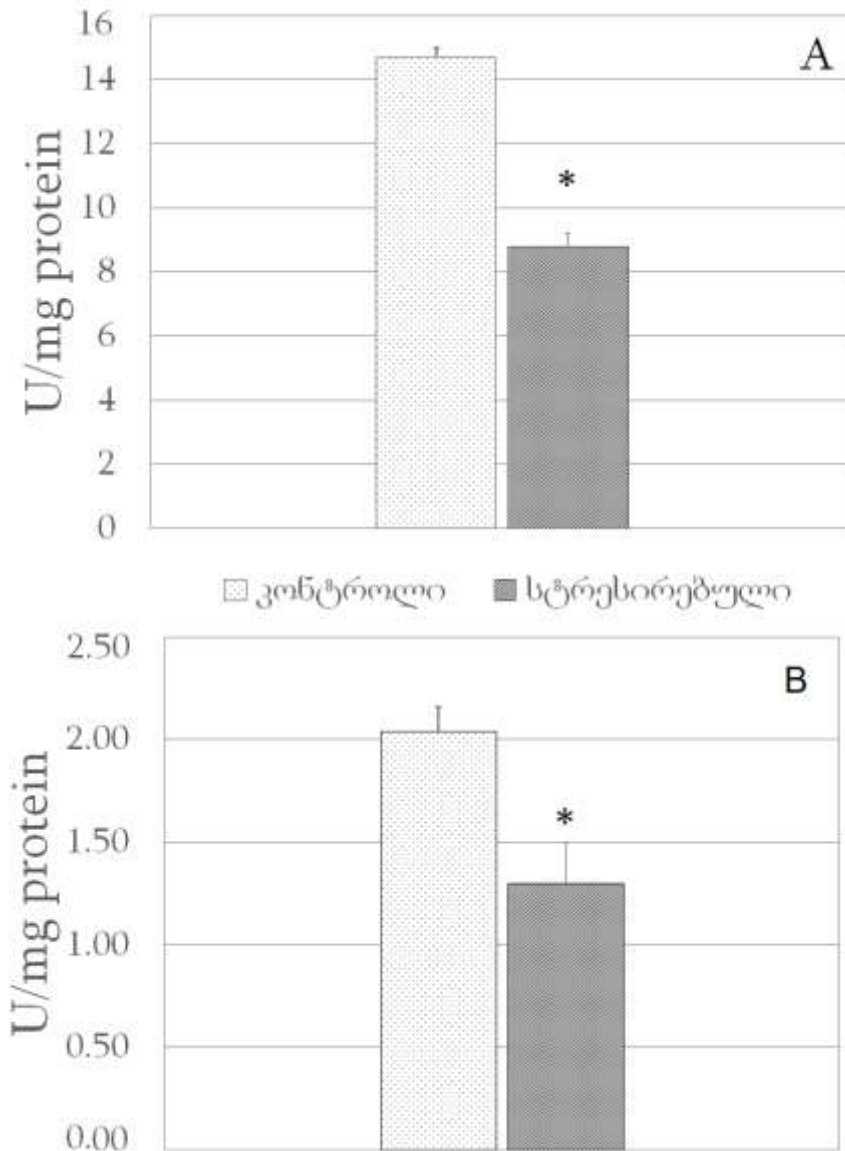
გაუვნებელყოფას სხვადასხვა ნივთიერებებისა და ფერმენტული კომპლექსების საშუალებით.

ანტიოქსიდანტური სისტემის მნიშვნელოვანი წარმომადგენლებია ისეთი ფერმენტები, როგორცაა სუპეროქსიდდისმუტაზა (SOD), კატალაზა, გლუტათიონრედუქტაზა და გლუტათიონპეროქსიდაზა, რომლებიც აკატალიზებენ ჟანგბადის აქტიური რადიკალების ჩართვას წყლისა და გლუტათიონის მოლეკულებში, რითაც ახდენენ ძლიერ მჟანგავი სუპეროქსიდის რადიკალის გაუვნებელყოფას.

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ცდების შემდგომ ეტაპზე, განისაზღვრა SOD-ის, კატალაზას, გლუტათიონრედუქტაზასა და გლუტათიონპეროქსიდაზას ფერმენტული აქტივობის ცვლილება ხანგრძლივი სტრესის პირობებში. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 8 და 9.

მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ საკვლევი ფერმენტების აქტივობა სტრესულ პირობებში შემცირებულია, რაც სავარაუდოდ უნდა იწვევდეს მათი ანტიოქსიდანტური ფუნქციის დაქვეითებასაც. კერძოდ, SOD-ის აქტივობა $\approx 36\%$ -ით კლებულობს (სურ.8A), ხოლო კატალაზას კი $\approx 65\%$ -ით (სურ.8B). ამასთან გლუტათიონრედუქტაზას აქტივობა მცირდება $\approx 37\%$ -ით (სურ.9A), ხოლო გლუტათიონპეროქსიდაზასი $\approx 75\%$ -ით (სურ. 9B).

სავარაუდოა, რომ ანტიოქსიდანტური სისტემის ფუნქციონირებაში მონაწილე ფერმენტების აქტივობის შემცირების მიზეზი შესაძლებელია გამოწვეული იყოს ერთის მხრივ, უშუალოდ ფერმენტების სტრუქტურულ-ფუნქციური ცვლილებებით, ხოლო მეორეს მხრივ, თავისუფალი რადიკალების სიჭარბით, რომელთა გაუვნებელყოფა, მათი წარმოქმნის მაღალი ინტენსივობის გამო, მეტ სირთულესთანაა დაკავშირებული.



სურათი 9. გლუტათიონრედუქტაზასა (A) და გლუტათიონპეროქსიდაზას (B) ფერმენტული აქტივობის ცვლილებები 30- დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში; ორდინატა ღერძზე - ფერმენტული აქტივობა (U/მგ ცილა); $p < 0.05$

მიღებული მონაცემები მიგვანიშნებს, რომ ხანგრძლივი ფსიქოემოციური სტრესის პირობებში ცოცხალ სისტემაში ვითარდება ოქსიდაციური პროცესები, რაც თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის გააქტივებითა და ანტიოქსიდანტური სისტემის მუშაობის ინტენსივობის დაქვეითებით უნდა იყოს გამოწვეული.

III.4. მიტოქონდრიის გარდამავალი განვლადობის ფორის ფუნქციური მდგომარეობა ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში

როგორც აღინიშნა, ოქსიდაციური სტრესის განვითარება უარყოფით გავლენას ახდენს არამარტო უჯრედში მიმდინარე მეტაბოლურ პროცესებსა და ფერმენტული სისტემების მუშაობაზე, არამედ უჯრედის მემბრანის შემადგენელი კომპონენტების მდგომარეობაზეც, კერძოდ, მიტოქონდრიის მემბრანის ფუნქციურ მდგომარეობაზე, რომლის განვლადობის გაზრდა წარმოადგენს აპოპტოზური პროცესების ერთ-ერთ მანიცირებელ ფაქტორს [203].

როდესაც საუბარი Ca^{2+} -ის რაოდენობრივი ცვლილებების ნეგატიურ ეფექტებს შეეხება, ძირითადად იგულისხმება მიტოქონდრიაში მიმდინარე პროცესები და ამ პროცესებზე კალციუმის იონის ჭარბი კონცენტრაციის უარყოფითი გავლენა. როგორც ცნობილია, მიტოქონდრია წარმოადგენს კალციუმის დეპოს, სადაც მისი კონცენტრაცია ციტოზოლურთან შედარებით გაცილებით მეტია. მიტოქონდრია სპეციალური სისტემების საშუალებით ეფექტურად ახორციელებს იონის რაოდენობრივ რეგულირებას. კერძოდ, იგულისხმება მიტოქონდრიული Ca^{2+} -ატფაზა, რომელიც მონაწილეობს ამ იონის ტრანსპორტირებაში ციტოზოლიდან მიტოქონდრიაში და სპეციალური Ca^{2+} -არხები, რომლებიც ჩართული არიან მიტოქონდრიიდან ციტოზოლში მისი გამოდევნის პროცესში. ამ სისტემის ერთი კომპონენტის ფუნქციური მდგომარეობის ცვლილებაც კი უარყოფითად აისახება ნატიური უჯრედის მეტაბოლიზმზე. მაგალითად, Ca^{2+} -ის მკვეთრი მომატება გავლენას ახდენს სხვადასხვა მნიშვნელოვანი ფერმენტების აქტივობაზე და ასევე სხვა პროცესზეც, მათ შორის მიტოქონდრიის გარე და შიდა მემბრანების შეხების საიტებში ფორმირებულ ე.წ. გარდამავალი განვლადობის ფორის (MPTP) ფუნქციონირებაზე.

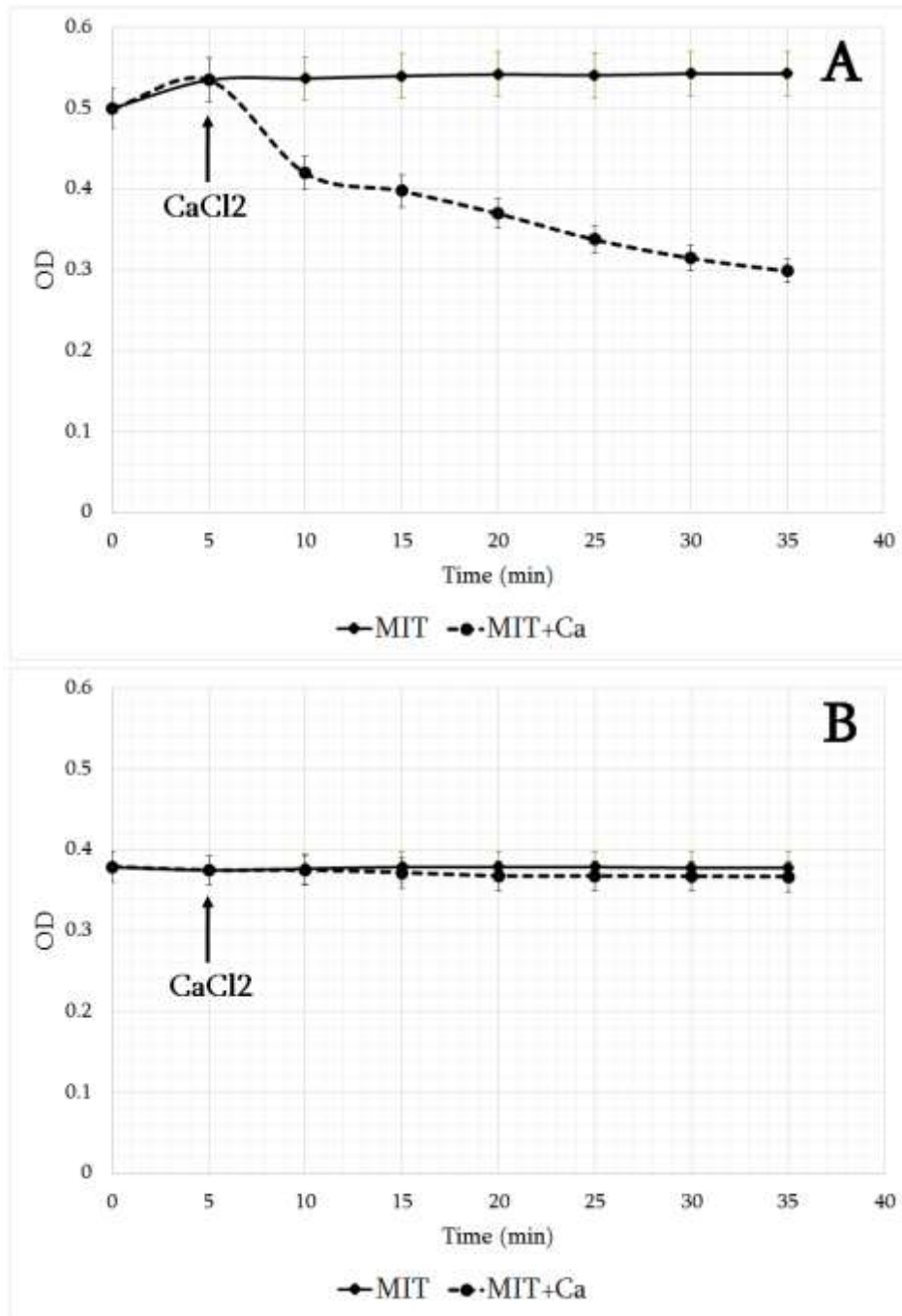
MPTP წარმოადგენს მიტოქონდრიულ არხს, რომელიც არეგულირებს მიტოქონდრიის მატრიქსში Ca^{2+} -ის კონცენტრაციას და ნორმალურ ფიზიოლოგიურ პირობებში იონის რაოდენობრივი შემცველობის შესაბამისად იხსნება (აქტივაცია) ან

იხურება (ინჰიბირება). MPTP-ის გააქტივება Ca^{2+} -დამოკიდებული პროცესია და ამ პროცესის აქტივაცია მიმდინარეობს იონის ჭარბი რაოდენობის შემთხვევაში [204].

MPTP-ის აქტივაცია გულისხმობს მიტოქონდრიდან დაბალმოლეკულური ნაერთების (1,5 kD-ზე ნაკლები), მათ შორის ციტოქრომი C-ს ციტოზოლში გადმოსვლას, ხოლო ამის საპირისპიროდ მიტოქონდიებში წყლის შეღწევას და ამ უკანასკნელის გაჯირჯვებას, რაც იწვევს ატფ-ის მასინთეზირებელი გზების ინჰიბირებას და აპოპტოზის პროცესის მიტოქონდრიული გზის ინიცირებას (ციტოქრომი C-ს მიერ აპოპტოსომის წარმოქმნა) და ამის შედეგად, გარკვეული უჯრედული პათოლოგიების განვითარება [203].

თუ გავითვალისწინებთ, რომ ხანგრძლივი იზოლირებისა და ცირკადული რიტმის დარღვევის შედეგად ექსპერიმენტული ცხოველების თავის ტვინის უჯრედებში აღინიშნა ოქსიდაციური სტრესის თანმხვედრი პროცესები (კალციუმის იონისა და აზოტის ჟანგის რაოდენობრივი მატება, ასევე ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის გააქტიურება და ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობის დაქვეითება), საინტერესო იყო ამ პირობებში შეგვეფასებინა MPTP-ს ფუნქციური მდგომარეობის ცვლილება.

ამისათვის სპექტროფოტომეტრულად განისაზღვრა ნატიური მიტოქონდრიული ფრაქციის შუქშთანთქმის მაჩვენებლის ცვლილება ფორის უნივერსალური აქტივატორის, Ca^{2+} -ის ჭარბი კონცენტრაციისა და ინჰიბიტორის, ციკლოსპორინ A-ს თანაობისას. შესწავლილ იქნა აღნიშნული აგენტების, როგორც ცალ-ცალკე (სურ. 10 და 11), ისე ერთობლივი ზემოქმედების შემთხვევები (სურ. 12).



სურათი 10. საკონტროლო (A) და სტრესირებული (B) ჯგუფის ინდივიდებში MPTP-ის Ca^{2+} -ინდუცირებული აქტივაცია (ხსნადობის მატება) 30- დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში ორდინატა ლერძზე - მიტოქონდრიული სუბსტანციის გაჯირჯვება გამოსახული შუქშთანთქმით (OD) ახსცისათა ლერძზე - ექსპერიმენტის დრო გამოსახული წუთებში

როგორც სურათი 10-დან ჩანს, საკონტროლო ჯგუფის ინდივიდთა თავის ტვინის მიტოქონდრიები, სტრესირებულ ჯგუფთან შედარებით, უფრო სენსიტიურები არიან MPTP-ს ჭარბი Ca^{2+} -ის იონით ინდუცირებული გახსნის მიმართ.

როგორც სურათი 10A-დან ჩანს, მიტოქონდრიულ სისპენზიაში 120 მკმოლი $CaCl_2$ -ის დამატება მნიშვნელოვნად ცვლის მიტოქონდრიების შუქშთანთქმის მაჩვენებელს და იგი მნიშვნელოვნად მცირდება. ამდენად, საკონტროლო ჯგუფის მიტოქონდრიათა გაჯირჯვების ხასიათი შესაბამისობაშია ცნობილ ეფექტთან, რაც კალციუმის იონის ჭარბი რაოდენობის შემთხვევაში MPTP-ის უპირობო აქტივაციას გულისხმობს [125; 130]. თუმცა განსხვავებული სურათი იქნა მიღებული სტრესირებული ცხოველების თავის ტვინიდან გამოყოფილი მიტოქონდრიების შემთხვევაში. კერძოდ, აღმოჩნდა, რომ მიტოქონდრიულ სუსპენზიაზე იგივე კონცენტრაციის კალციუმის დამატება პრაქტიკულად არ ცვლიდა მიტოქონდრიების შუქშთანთქმის სურათს.

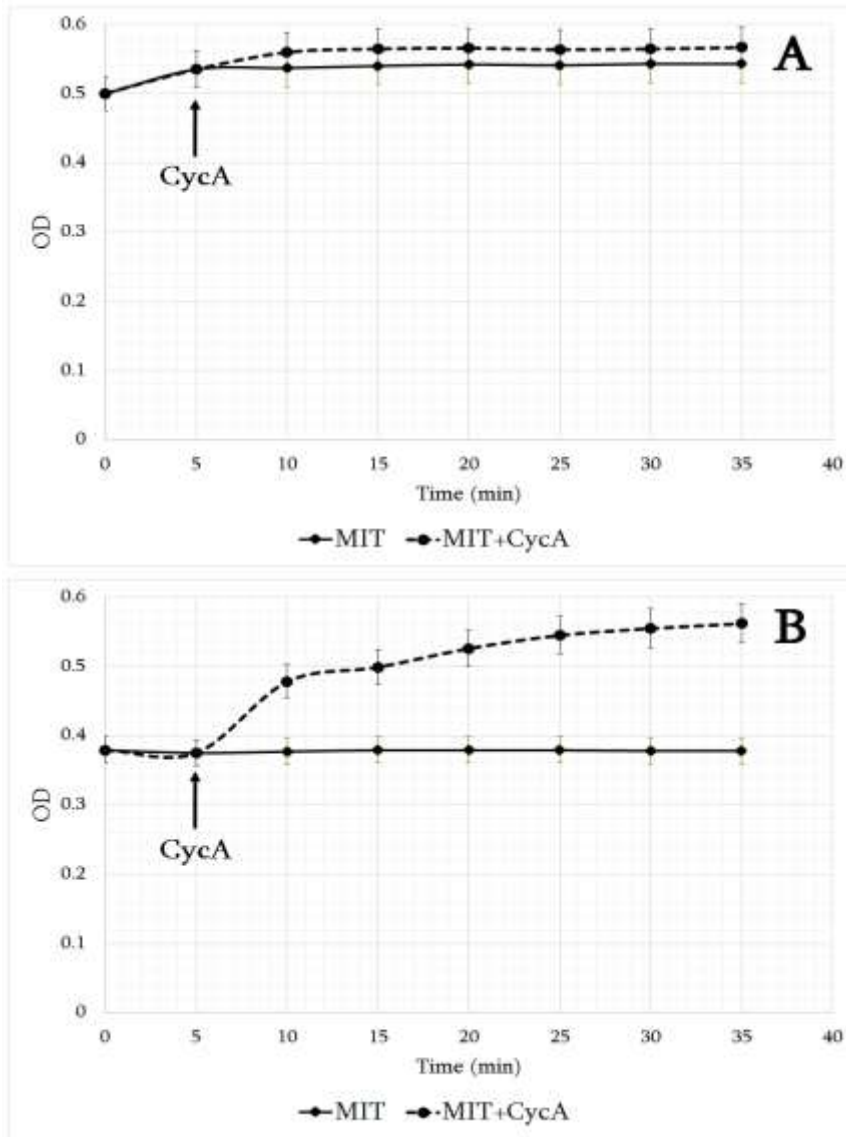
მიღებული ეფექტი გვაფიქრებინებს, რომ იგი შესაძლებელია გამოწვეული იყოს ხანგრძლივი სტრესის ფონზე მიტოქონდრიაში განვითარებული ოქსიდაციური პროცესებითა და ენერგეტიკული დისბალანსით, რაც მემბრანის დაზიანების და შესაბამისად, გარდამავალი განვლადობის მკვეთრი ზრდის მიზეზი შეიძლება გახდეს. თუმცა, მიღებული მონაცემებით იმის მტკიცება, რომ საქმე გვაქვს უშუალოდ MPTP-ის აქტივაციასთან, ბოლომდე მართებულად ვერ ჩაითვლება.

ცნობილია, MPTP-ის ინჰიბიტორად ითვლება მძლავრი იმუნოსუპრესანტი, ციკლური ბუნების არარიბოსომული წარმოშობის პეპტიდი ციკლოსპორინი A. ამდენად, ცდების შემდგომ ეტაპზე შესწავლილი იქნა ამ უკანასკნელის გავლენა ფორის ხსნადობის ხარისხზე კალციუმის იონის არარსებობის პირობებში. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე 11, საიდანაც ჩანს, რომ ციკლოსპორინის თანაობისას ორივე ჯგუფის ცხოველების მიტოქონდრიების შუქშთანთქმის მახასიათებელი არაერთგვაროვნად იცვლება. კერძოდ, შეინიშნება სტრესირებული ინდივიდების თავის ტვინის მიტოქონდრიების გაჯირჯვების მაჩვენებელის მკვეთრი ცვლილება იმ დროს, როცა საკონტროლო მიტოქონდრიების ანალოგიური

სიდიდე პრაქტიკულად რჩება უცვლელი. სურათიდან ჩანს, რომ ციკლოსპორინი A-ს დამატება ზრდის სტრესირებული ვირთაგვის თავის ტვინის მიტოქონდრიული ფრაქციის შუქშთანთქმის სიდიდეს, რაც არ შეინიშნება საკონტროლო ცხოველებში. მიღებული შედეგის მიზეზი, სავარაუდოდ ამ ჯგუფის ცხოველების თავის ტვინის გარკვეული რაოდენობის მიტოქონდრიების MPTP-ის აქტიურ მდგომარეობაში ყოფნაა.

მიღებული შედეგები გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ აღნიშნული ეფექტის მიზეზი შესაძლებელია იყოს ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის ფონზე თავის ტვინში იმ მიტოქონდრიების რაოდენობრივი მატება, რომლებსაც აღნიშნებათ MPTP-ის აქტიური (გახსნილი) მდგომარეობა. ამ მოსაზრების საფუძველს გვაძლევს აქტივატორისა (კალციუმის იონი) და ინჰიბიტორის (ციკლოსპორინი A) მოქმედების ხასიათი მიტოქონდრიული ფრაქციების შუქშთანთქმის სიდიდეზე.

ამასთან, თუ გავითვალისწინებთ, რომ სტრესულ პირობებში შეინიშნება ენდოგენური Ca^{2+} -ის მნიშვნელოვანი მატება (სურ. 5), ადვილი სავარაუდოა, რომ ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში ადვილი ჰქონდეს MPTP-ის აქტივაციის მაჩვენებლისა და შესაბამისად, მიტოქონდრიული მემბრანის განვლადობის ზრდას.



სურათი 11. საკონტროლო (A) და სტრესირებული (B) ჯგუფის ინდივიდებში MPTP-ის ციკლოსპორინ A-ინდუცირებული ინჰიბიცია (ხსნადობის კლება) 30- დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში

ორდინატა ღერძზე - მიტოქონდრიული სუბსტანციის გაჯირჯება გამოსახული შუქშთანთქმით (OD)

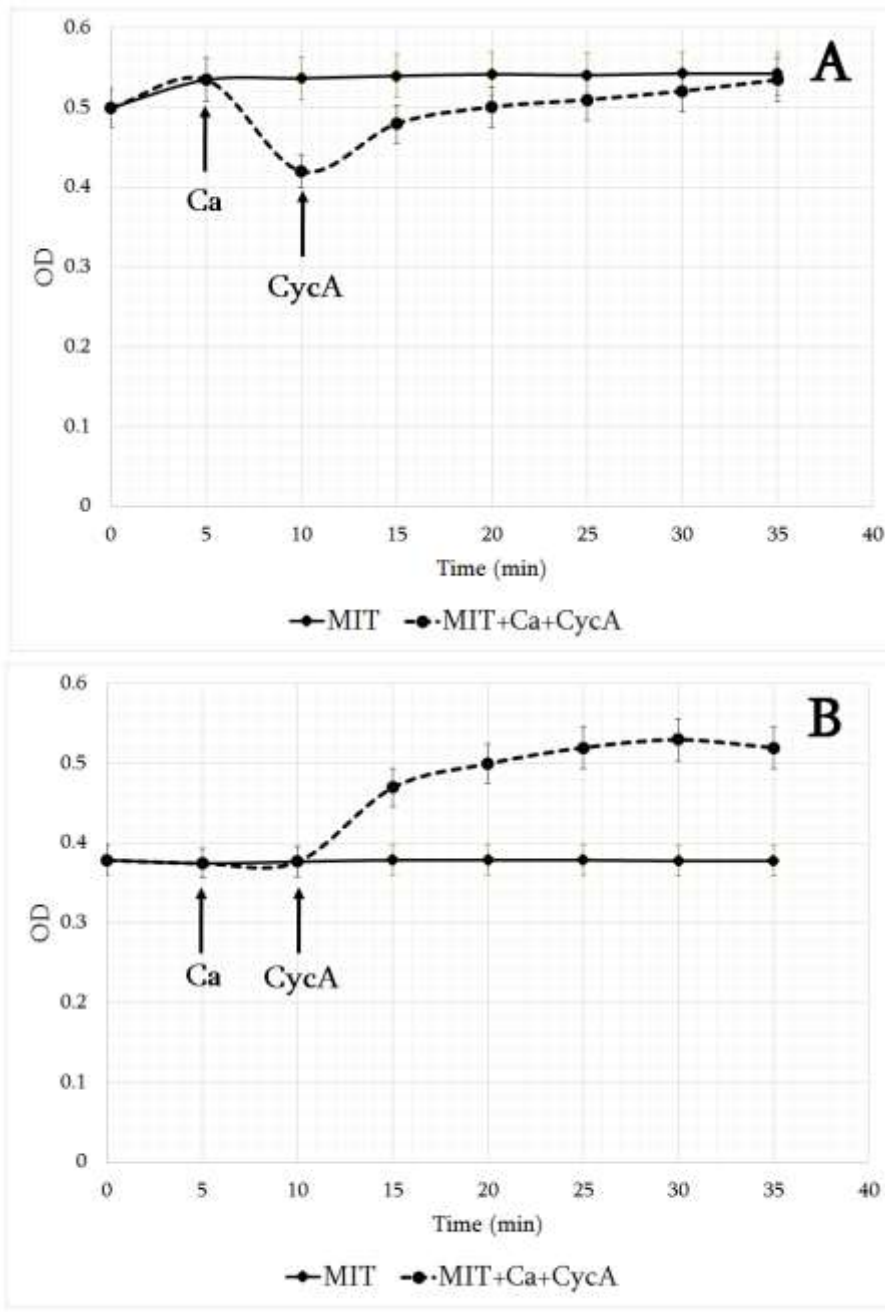
აბსცისათა ღერძზე - ექსპერიმენტის დრო გამოსახული წუთებში

აღნიშნულ მოსაზრებას ადასტურებს ცდები, სადაც შესწავლილი იყო ციკლოსპორინ A-ს გავლენა MPTP-ის Ca²⁺-ინდუცირებულ აქტივაციაზე როგორც

საკონტროლო, ასევე სტრესირებული ვირთაგვების თავის ტვინის მიტოქონდრიებში. მიღებული შედეგები წარმოდგენილია სურათზე 12.

სურათიდან ჩანს, რომ ორივე ჯგუფის ცხოველების მიტოქონდრიებზე კალციუმის იონის დამატება არაერთგვაროვნად მოქმედებს მიტოქონდრიული ფორის ხსნადობის მაჩვენებელზე, კერძოდ როგორც წინა შემთხვევაში (სურ. 10), ისევე აქაც, კალციუმის იონი ახდენს საკონტროლო ჯგუფის ცხოველების თავის ტვინის მიტოქონდრიული სუსპენზიის შუქშთანთქმის მაჩვენებლის შემცირებას და მასზე ციკლოსპორინის დამატება ცვლის ამ მაჩვენებელს, რაც მიუთითებს, რომ კალციუმით გააქტივებული ფორა ციკლოსპორინის ზემოქმედებით ინაქტივირდა (სურ. 12A)

თუმცა სტრესირებულ მიტოქონდრიებზე ეს ეფექტი არ გამოვლინდა (სურ. 12B). კერძოდ, აღინიშნა, რომ CaCl_2 -ის ხსნარით დამუშავების შედეგად არ ფიქსირდება შუქშთანთქმის მაჩვენებლის მნიშვნელოვანი ცვლილება, მაგრამ ციკლოსპორინის დამატება ცვლის სურათს და აღინიშნება შუქშთანთქმის მაჩვენებლის მატება. ეს ეფექტი მიანიშნებს, რომ კალციუმის დამატებამდეც ფორის მდგომარეობა იყო აქტიური, რაც შეიცვალა ინჰიბიტორის (ციკლოსპორინის) შეყვანით სარეაქციო არეში.



სურათი 12. საკონტროლო (A) და სტრესირებული (B) ჯგუფის ინდივიდებში ციკლოსპორინ A-ს გავლენა MPTP-ის Ca^{2+} -ინდუცირებულ აქტივაციაზე ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში

ორდინატა ღერძზე - მიტოქონდრიული სუბსტანციის გაჯირჯვება გამოსახული შუქშთანთქმით (OD)

აბსცისათა ღერძზე - ექსპერიმენტის დრო გამოსახული წუთებში

მიღებული მონაცემი ამყარებს გამოთქმულ მოსაზრებას იმის თაობაზე, რომ შესწავლილ სტრესულ პირობებში განვითარებული ნეგატიური პროცესების გავლენით მომატებულია იმ მიტოქონდრიების წილობრივი მაჩვენებელი, რომლის გარდამავალი განვლადობის ფორა აქტიურ მდგომარეობაშია, რაც სავარაუდოდ, პირველ რიგში კალციუმის იონის სიჭარბით უნდა იყოს გამოწვეული.

III.5. თავის ტვინის ენერგეტიკული მდგომარეობის შეფასება ამ პროცესში მონაწილე ფერმენტების აქტივობის მაგალითზე

როდესაც საუბარი შეეხება მიტოქონდრიას და მასში მიმდინარე სხვადასხვა სახის მეტაბოლურ თუ სტრუქტურულ ცვლილებებს, მკვლევართა ყურადღებას ამ უკანასკნელის, როგორც უჯრედის ენერგომასინთეზირებელი სტრუქტურის, ფუნქციური მდგომარეობა იპყრობს.

ცნობილია, რომ უჯრედის ცხოველქმედების უმნიშვნელოვანესი ფაქტორია ენერგეტიკული ჰომეოსტაზი, ანუ ადენოზინტრიფოსფატის (ატფ) კონცენტრაციული ბალანსის მუდმივობის შენარჩუნება. ცნობილია, რომ უჯრედში ატფ-ის მოხმარება მუდმივ, დაბალანსებულ წონასწორობაში უნდა იყოს მის სინთეზთან. წინააღმდეგ შემთხვევაში იწყება ენერგოდეფიციტი, რომლის ხანგრძლივი დროით შენარჩუნებას როგორც უჯრედისათვის, ასევე მთლიანი ორგანიზმისათვის ლეტალური შედეგი მოაქვს. ეს პროცესი განსაკუთრებით შესამჩნევია მაღალი ენერგომომხმარებელი უჯრედებისათვის, კერძოდ ნერვული და კუნთოვანი უჯრედებისათვის. ატფ-ის მუდმივობის შენარჩუნება საკმაოდ რთული პროცესია და ამისათვის უჯრედში არსებობს კარგად ცნობილი მეტაბოლური გზები, რომლებიც ციტოზოლსა და მიტოქონდრიაში ფუნქციონირებს და ორგანულ ნაერთთა საფეხურეობრივი კატაბოლიზმის შედეგად, ადფ-ის ფოსფორილირების გზით, ატფ-ის სინთეზსა და მის რაოდენობრივ შენარჩუნებას უზრუნველყოფს [205].

ზემოთქმულის გათვალისწინებით, საინტერესო იყო შეგვეფასებინა, სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში, ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მიმდინარე ცვლილებების ხასიათი.

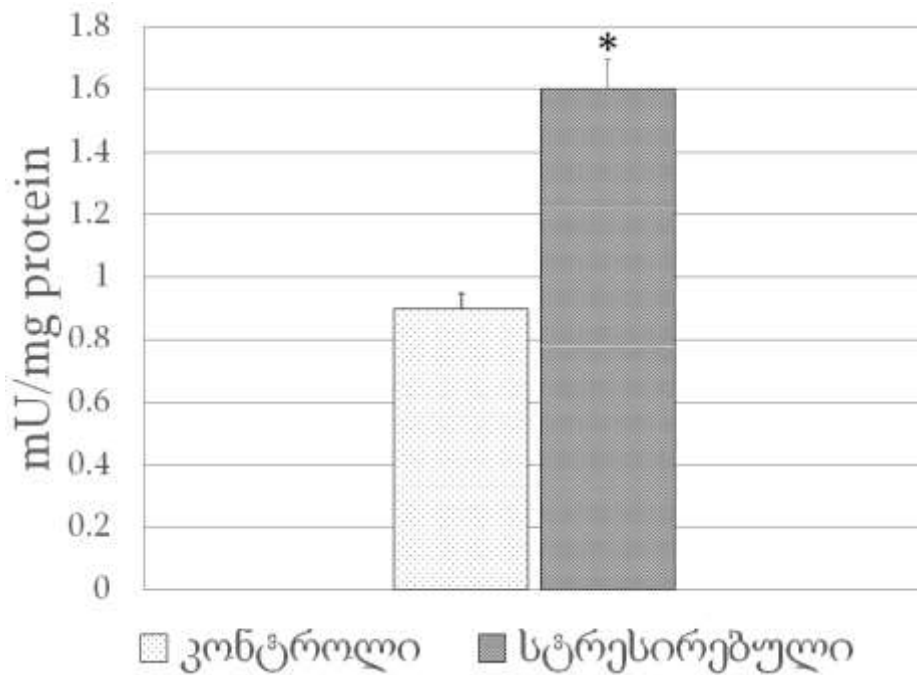
შერჩევის მთავარ კრიტერიუმად გამოყენებულ იქნა ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ციტოზოლური და მიტოქონდრიული ფერმენტების აქტივობის ცვლილება აღნიშნულ პირობებში.

ცნობილია, რომ ნერვული ქსოვილისათვის ატფ-ის ენერჯის წყაროს ნახშირწყლები და კერძოდ, გლუკოზა წარმოადგენს, რომლის დაშლის პროცესი უჯრედის ციტოზოლში იწყება აერობული გლიკოლიზის სახით. ამ პროცესის მაინიცირებელ ფერმენტს წარმოადგენს ციტოზოლური ჰექსოკინაზა. ეს უკანასკნელი ახდენს გლუკოზის ფოსფორილირებას და აქტივაციას და ამით უზრუნველყოფს მის შემდგომ გარდაქმნას მიტოქონდრებში. შესაბამისად, ჰექსოკინაზა გვევლინება აღნიშნული პროცესის ერთ-ერთ მარეგულირებელ ფერმენტად.

ზემოთმულიდან გამომდინარე, ნათლად იკვეთება, რომ როდესაც საუბარია ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის მიმდინარებაზე, ფერმენტ ჰექსოკინაზას აქტივობის ცვლილების შეფასება პირველი და უმნიშვნელოვანესი საფეხურია აღნიშნული პროცესის შესასწავლად.

მიღებული შედეგები წარმოდგენილია სურათზე 13, საიდანაც იკვეთება, რომ ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში საცდელი ცხოველების თავის ტვინში შეინიშნება ფერმენტის აქტივობის მატება ($\approx 76\%$).

მიღებული შედეგიდან იკვეთება, რომ შესწავლილ პირობებში ფერმენტ ჰექსოკინაზას აქტივობა საცდელ ცხოველებში საკონტროლოსთან შედარებით მომატებულია, რაც უნდა მიუთითებდეს ზოგადად გლიკოლიზის პროცესის აქტივაციაზე, თუმცა მხოლოდ აღნიშნულით ამისი მტკიცება საფუძველს მოკლებულია, რადგან გლუკოზის ფოსფორილირება მხოლოდ გლიკოლიზის საწყის ეტაპს არ წარმოადგენს.

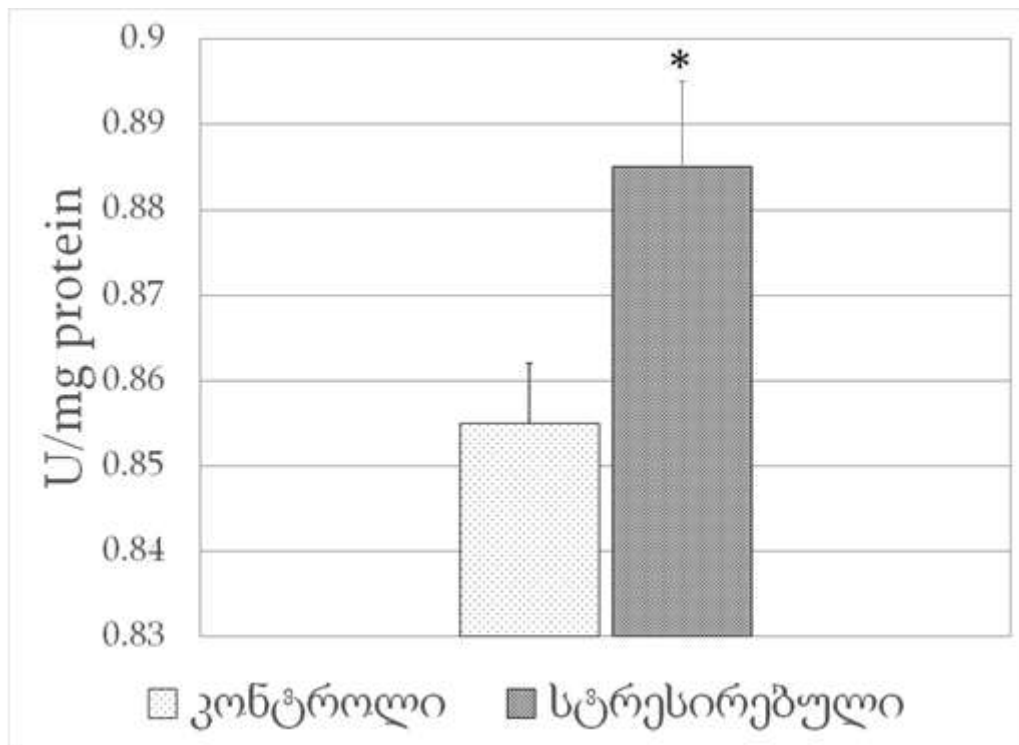


სურათი 13. ჰექსოკინაზას ფერმენტული აქტივობის ცვლილება ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში;

ორდინატა ღერძზე - ჰექსოკინაზას ფერმენტული აქტივობა (mU/მგ. ცილა); *p<0.05

პროცესის უკეთ წარმოსაჩენად ექსპერიმენტების შემდგომ ეტაპზე დამატებით შესწავლილი იქნა გლიკოლიზში მონაწილე კიდევ ერთი ფერმენტის, ალდოლაზას, აქტივობის ცვლილება სტრესულ პირობებში (სურ. 14).

ალდოლაზა, ჰექსოკინაზას მსგავსად წარმოადგენს გლიკოლიზის რეგულატორულ ფერმენტს და მისი მოქმედება ძალზე მნიშვნელოვანია ზოგადად პროცესის სწორად წარსამართავად. ცნობილია, რომ ფერმენტი ელექტროსტატიკური ძალებით დაკავშირებულია მიტოქონდრიის გარე მემბრანასთან, ჟანგბადის აქტიური რადიკალების სიახლოვეს, რაც ზრდის მისი დაჟანგვისა და ინჰიბირების ალბათობას. ამდენად, ალდოლაზას აქტივობის დაქვეითებას შეუძლია გამოიწვიოს გლიკოლიზის მთლიანი პროცესის შეფერხება [206].

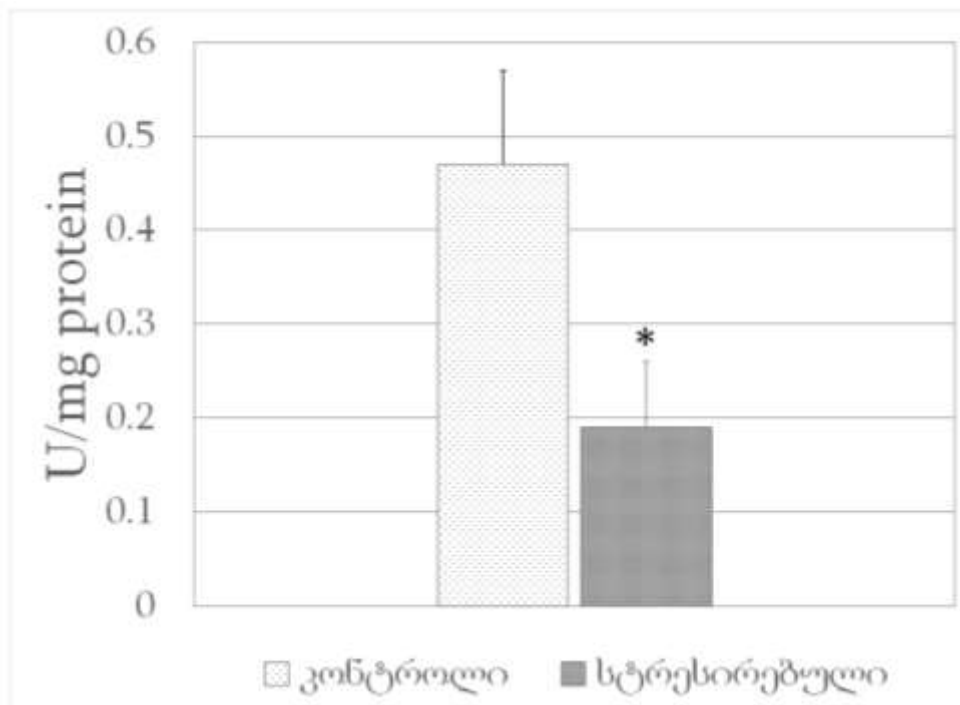


სურათი 14. ალდოლაზას ფერმენტული აქტივობის ცვლილება ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში;

ორდინატა ღერძზე - ალდოლაზას ფერმენტული აქტივობა (U/მგ. ცილა); * $p < 0.05$

ჩვენს მიერ ნანახი იქნა, რომ 30 დღიანი იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში საცდელი ცხოველების თავის ტვინში შეინიშნება შესწავლილი ფერმენტის აქტივობის სარწმუნო მატება, რაც თავის მხრივ, ამყარებს ადრე გამოთქმულ მოსაზრებას იზოლაციით და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში ზოგადად გლიკოლიზის პროცესის გააქტიურებასთან დაკავშირებით.

აღნიშნული ეფექტი განსაკუთრებით საგულისხმოა, რადგან როგორც გამოირკვა მოცემული სტრესული პირობები უარყოფითად მოქმედებს სასიგნალო და ანტიოქსიდანტურ სისტემებზე და იწვევს პეროქსიდაციული პროცესების გააქტივებას, რაც მძიმე შედეგების მომტანი შეიძლება გახდეს სისტემისათვის, თუმცა როგორც მიღებული შედეგებიდან ჩანს უჯრედში აქტივდება ენერჯის მასინთეზირებელი სხვა მეტაბოლური გზები, კერძოდ გლიკოლიზის პროცესი, რაც პროტექტორულ როლს ასრულებს ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მიმდინარე დეფექტების აღმოფხვრაში.



სურათი 15. აკონიტაზას ფერმენტული აქტივობის ცვლილება ხანგრძლივი სოციალურისოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში;

ორდინატა ღერძზე - აკონიტაზას ფერმენტული აქტივობა (U/მგ. ცილა); * $p < 0.05$

მრავალუჯრედიანი ორგანიზმი, რომელიც წარმოადგენს განსხვავებული ფუნქციების შემსრულებელი სისტემების ერთობლიობას, საკუთარი მოთხოვნილებების დასაკმაყოფილებლად მუდმივად საჭიროებს ენერჯის დიდი

რაოდენობის ხარჯვას, რისთვისაც მხოლოდ გლიკოლიზის პროცესის შედეგად წარმოქმნილი ატფ არ არის საკმარისი.

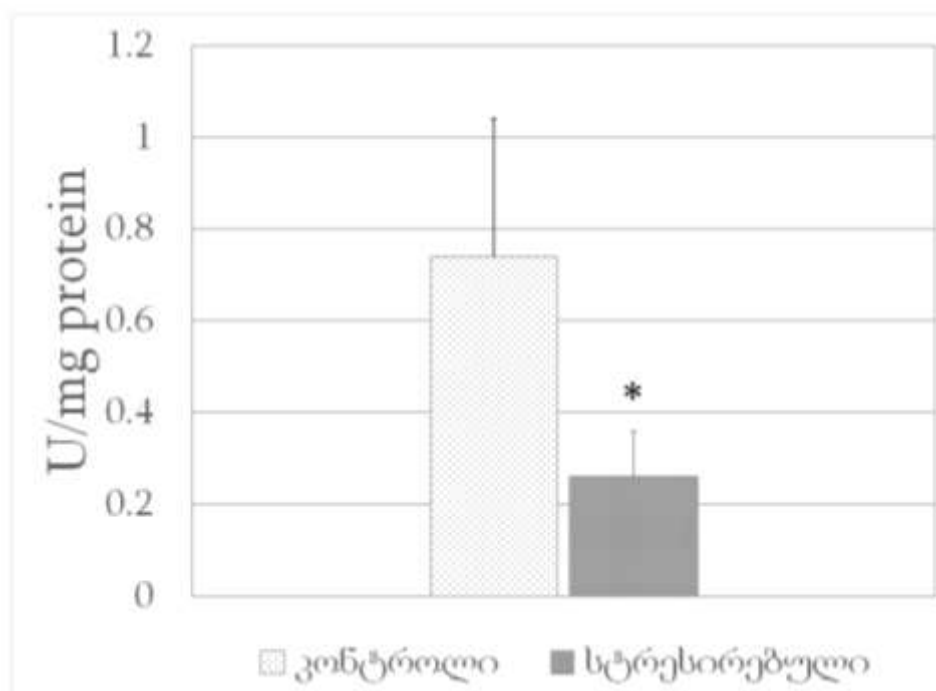
ცნობილია, რომ არსებული ენერგომოთხოვნილებების დასაკმაყოფილებლად გადამწყვეტი როლი მიტოქონდრიასა და მასში მიმდინარე კატაბოლურ პროცესებს უჭირავს, რომლებშიც ძირითადად ლიმონჟავა (კრებსის) ციკლი და მიტოქონდრიული სუნთვის ჯაჭვი მოიაზრება.

ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე, საინტერესო იყო გვენახა, თუ როგორ იცვლება ხანგრძლივ სტრესულ პირობებში მიტოქონდრიაში მიმდინარე ენერგომასინთეზირებელი მეტაბოლური გზები, მაშინ, როცა ციტოპლაზმური პროცესები (გლიკოლიზი) გააქტივებულია.

მოცემული საკითხის გასარკვევად შესწავლილი იქნა სხვადასხვა მიტოქონდრიული ფერმენტების (აკონიტაზა, სუქცინატდეჰიდროგენაზა და ფუმარაზა) აქტივობათა შეფასება, როგორც საკონტროლო ისე საცდელი ჯგუფის ინდივიდთა თავის ტვინის სუმარულ მიტოქონდრიულ ფრაქციაში. ცნობილია, რომ მიტოქონდრიულ ფერმენტები წარმოადგენენ აქტიური რადიკალების პირველად სამიზნეებს და მათ შორის ფერმენტი აკონიტაზა, რომელიც აქტიურ ცენტრში ვხვდებით რკინა-გოგირდოვან ჯგუფებს და ამჟღავნებს რა მაღალმგრძნობელობას ოქსიდაციური პროცესების მიმართ, წარმოადგენს ჟანგვითი სტრესის ერთერთ მნიშვნელოვან მარკერს [207]. როგორც სურათი 15-დან ჩანს, ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობა, რომელიც ლიმონჟავა (კრებსის) ციკლის საწყისი ეტაპის მარეგულირებელ ფერმენტად ითვლება, $\approx 60,5\%$ -ითაა შემცირებული. სავარაუდოა, რომ მისი აქტივობის ამგვარი კლების მიზეზი სწორედ ფერმენტის აქტიურ ცენტრში არსებულ რკინა-გოგირდოვანი კლასტერები იყოს, რომლებიც განსაკუთრებულ მგრძნობელობას ამჟღავნებენ ოქსიდაციური ჟანგვის შედეგად წარმოქმნილი აქტიური რადიკალების მიმართ.

ექსპერიმენტების შემდგომ ეტაპზე, შესწავლილი იყო ამავე ციკლის ისეთი ფერმენტების აქტივობა, როგორცაა სუქცინატდეჰიდროგენაზა და ფუმარაზა (ფუმარატდეჰიდრატაზა) აქტივობა. ცნობილია, რომ პირველი მათგანი გარდა

ტრიკარბონმჟავების ციკლისა, ასევე მონაწილებს მიტოქონდრიულ სუნქვის ჯაჭვის ფუნქციონირებაში და წარმოადგენს ამ სისტემის II კომპლექსს.



სურათი 16. სუქცინატდეჰიდროგენაზას ფერმენტული აქტივობის ცვლილება 30 დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში;

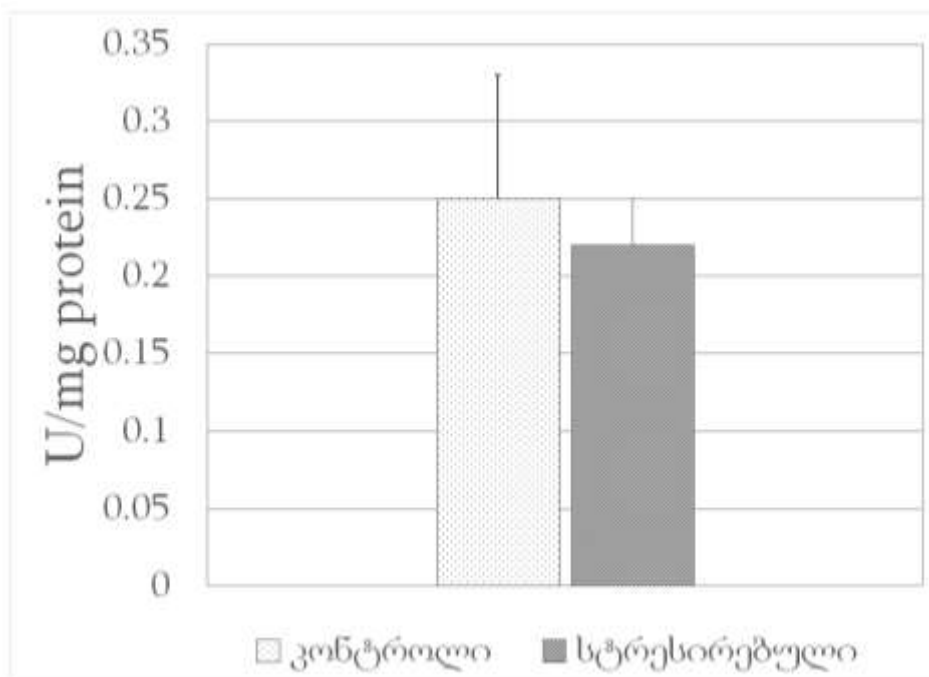
ორდინატთა ღერძზე - სუქცინატდეჰიდროგენაზას ფერმენტული აქტივობა (U/მგ. ცილა);
* $p < 0.05$

ფერმენტული აქტივობის სპექტროფოტომეტრული ანალიზის შედეგად დადგინდა, რომ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობა, აკონიტაზას მსგავსად, მკვეთრად კლებულობს. როგორც სურათიდან 16 ჩანს, 30-დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში შეინიშნება ამ ფერმენტის აქტივობის დაახლოებით 67%-იანი შემცირება.

რაც შეეხება ფუმარაზას, მისი აქტივობის ცვლილება პრაქტიკულად ვერ დაფიქსირდა (სურ.17). აღნიშნული ეფექტი, სავარაუდოდ გამოწვეული უნდა იყოს ფერმენტის სტრუქტურული თავისებურებით, რაც გულისხმობს მის აქტიურ

ცენტრში, აკონიტაზასგან განსხვავებით, მეტალის იონის არარსებობას და შესაბამისად მის მდგრადობას თავისუფალ-რადიკალური ჟანგვისადმი.

ამრიგად, როგორც მიღებული შედეგებიდან ჩანს, ხანგრძლივი იზოლაციითა და ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის შედეგად თავის ტვინის უჯრედებში აღინიშნება აერობული, მიტოქონდრიული პროცესების აქტივობის დაქვეითება (ლიმონმჟავა ციკლის ფერმენტები) ციტოზოლური, ანაერობული პროცესების გააქტივების ფონზე, რისი მანიშნებელიცაა ჰექსოკინაზისა და ალდოლაზის აქტივობის მატება.



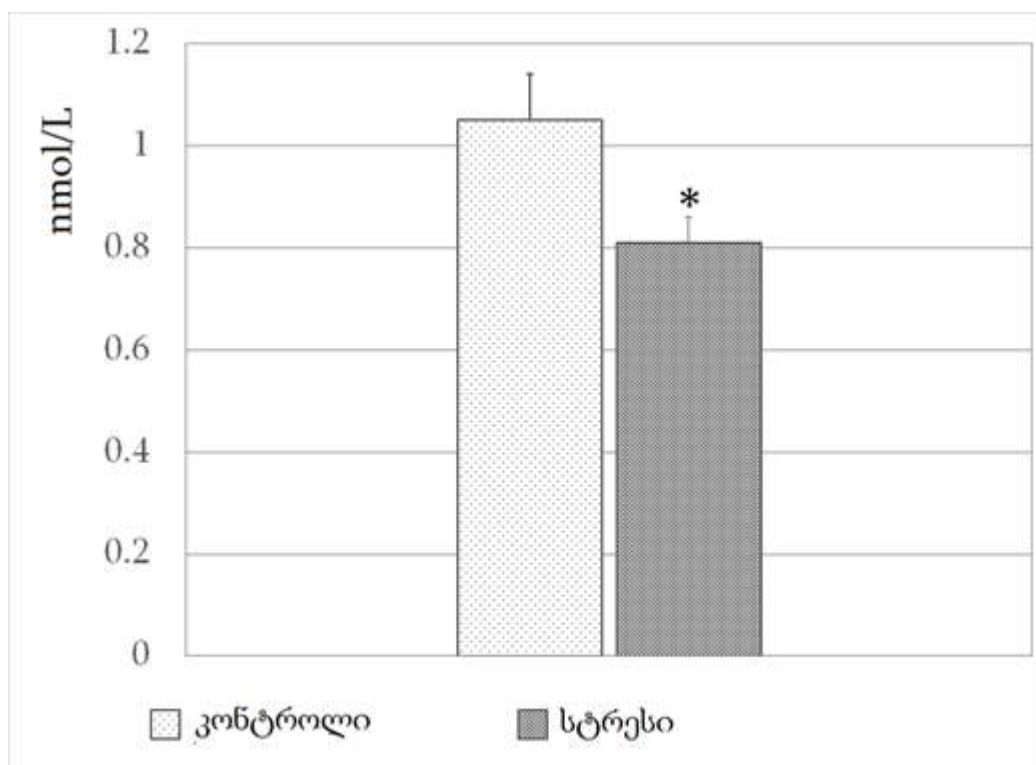
სურათი 17. ფუმარაზას ფერმენტული აქტივობის ცვლილება 30 დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში ორდინატა ღერძზე - ფუმარაზას ფერმენტული აქტივობა (U/მგ. ცილა); * $p < 0.05$

ამის დამადასტურებელია ატფ-ის რაოდენობის ცვლილება საკონტროლო და ექსპერიმენტული ცხოველების თავის ტვინის უჯრედებში. ატფ-ის რაოდენობის განსაზღვრით იქნა ნანახი, საკონტროლო და ექსპერიმენტულ ცხოველებში შეინიშნება სარწმუნო განსხვავება ამ პარამეტრის მიმართ, კერძოდ 30-დღიანი იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში

ექსპერიმენტული ჯგუფის ინდივიდების თავის ტვინის სუმა რულ ფრაქციაში საკონტროლო ცხოველებთან შედარებით, შეინიშნება ატფ-ის კონცენტრაციის კლება ($\approx 22,8\%$) (სურ. 18).

მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, იკვეთება, რომ ხანგრძლივი სტრესული პირობების ზემოქმედების შედეგად თავის ტვინის უჯრედების მიტოქონდრიაში მცირდება აერობული ენერგომასინთეზირებელი მეტაბოლური გზების აქტივობა, ანაერობული პროცესების გააქტივების ფონზე, რაც მიუთითებს სისტემაში განვითარებულ ენერგოდეფიციტზე.

ამასთან, აღნიშნულის დამადასტურებლად გვევლინება ატფ-ის რაოდენობის კლებაც, შესაბამისად ეჭვგარეშეა, შესწავლილი პირობების უარყოფითი ზეგავლენა თავის ტვინში მიმდინარე ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზე.



სურათი 18. ატფ-ის კონცენტრაციული ცვლილება 30-დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში ორდინატა ღერძზე - ატფ-ის კონცენტრაცია (nmol/L); * $p < 0.05$

30-დღიანი იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზე საუბრისას, საინტერესოა გლიკოლიზში

მონაწილე ფერმენტთა აქტივობათა ცვლილებების ხასიათი, რადგან ნანახი იქნა ამ უკანასკნელთა აქტივაცია, მაშინ, როცა მიტოქონდრიაში მიმდინარე მეტაბოლური გზები ინჰიბირებულია და ატფ-ის კონცენტრაცია დაქვეითებულია.

აღსანიშნავია, რომ მსგავსი ეფექტი დამახასიათებელია იშემიური მდგომარეობებისათვის, რადგან მხოლოდ გლიკოლიზური გზების აქტივაცია არაა საკმარისი ნერვული ქსოვილის ენერგეტიკული ჰომეოსტაზის შენარჩუნებისათვის და მისთვის აუცილებელია მიტოქონდრიული ატფ-ის მასინთეზირებელი გზების მაღალი აქტივობა, რათა ცოცხალი სისტემის ცხოველქმედება ნორმალურ დონეზე წარიმართოს [208].

ყოველივე ზემოთქმულიდან გამომდინარე, სავარაუდოა, რომ შესწავლილ სტრესულ პირობებში ნერვულ ქსოვილში ვითარდება იშემიური პროცესები, რაც ენერგეტიკულ დისბალანსთან ერთად სხვა მრავალი პათოლოგიური გამომწვევი შეიძლება გახდეს.

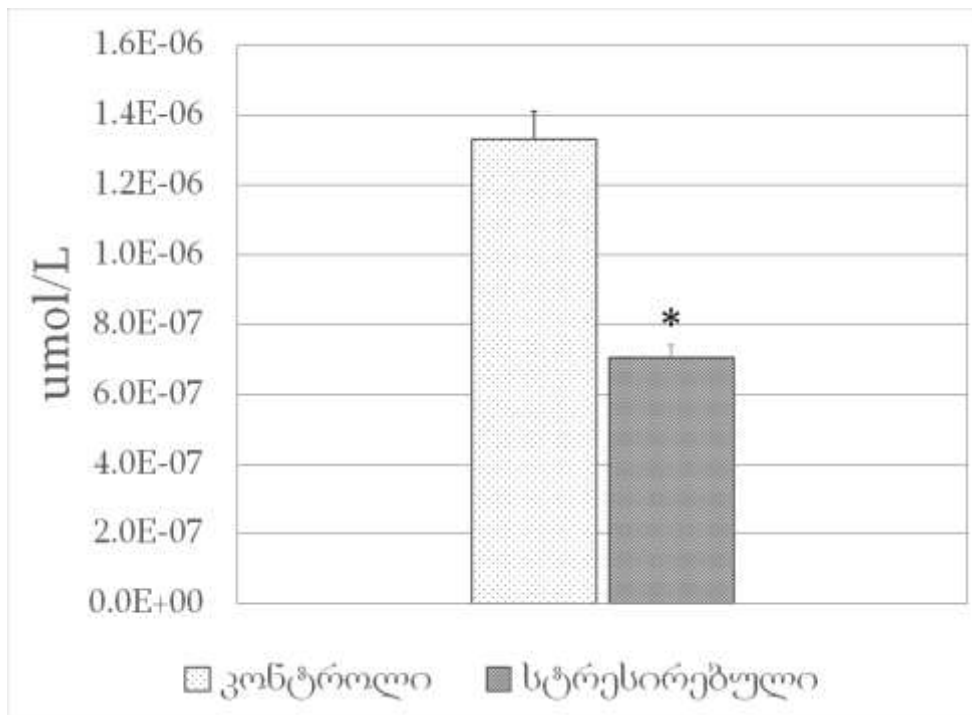
III.6. თავის ტვინში კრეატინი/კრეატინკინაზა/ ფოსფოკრეატინული სისტემის აქტივობა ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში

სამეცნიერო ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ ზემოაღნიშნული მეტაბოლური გზები და მათ მიერ სინთეზირებული ატფ-ის რაოდენობა არ არის საკმარისი ჭარბი და ცვალებადი ენერჯის მომხმარებელი ქსოვილების (ჩონჩხისა და გულის კუნთი, ნერვული სისტემა) ენერგოსტაბილურობისათვის. ცოცხალ უჯრედში მიმდინარე ენერგეტიკული ბალანსის შენარჩუნების პროცესში მნიშვნელოვან როლს კრეატინი(Cr)/ფოსფოკრეატინი(PCr)/ კრეატინკინაზული(CK) სისტემა ასრულებს. ეს პროცესი განსაკუთრებით აქტიურია ისეთი მაღალი ენერგეტიკული მოთხოვნილების უჯრედებისათვის, როგორცაა ნერვული და კუნთოვანი ქსოვილის უჯრედები [209]. ამ სისტემის ფუნქციონირება დამოკიდებული Cr-სა და PCr-ის შემცველობასა და CK-ს აქტივობაზე, რომლის იზოფორმები თითქმის ყველა ტიპის უჯრედში გვხვდება, თუმცა განსაკუთრებით აქტიურია კუნთსა და ტვინში [210].

აღნიშნული ციკლი ერთგვარ ბუფერულ სისტემას წარმოადგენს ენერგეტიკული ჰომეოსტაზის შესანარჩუნებლად. აღნიშნული პროცესის მთავარი ფუნქციაა ატფ-ში აკუმულირებული ენერჯის ფოსფოკრეატინის (PCr) სახით შენახვა, რომელიც მაღალენერგეტიკული ფოსფატების ბუფერულ და მატრასპორტირებელ მოლეკულას წარმოადგენს [211]. 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-ში მიმდინარე სხვა მნიშვნელოვანი პროცესები [212, 213]. ლიტერატურული მონაცემების გათვალისწინებით, კრეატინი ასევე შესაძლებელია განიხილული იქნას როგორც ნეირომოდულატორი, რომელსაც შეუძლია მოახდინოს ზოგიერთი პოსტინაფსური რეცეპტორების მოდულირება. მიღებულია მონაცემები, რომლებიც მიუთითებს Cr-ის მნიშვნელობას ფსიქომოტორული განვითარებისა და შემეცნებითი ფუნქციების რეალიზირების და ემბრიონულ განვითარების პროცესშიც [214]. მისი დეფიციტი ცნს-ში უარყოფითად აისახება ტვინის ფუნქციონირებაზე და ზოგიერთი ნეიროდეგენერაციული დაავადებების თანხვედრ მოვლენას წარმოადგენს [215-217].

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, ექსპერიმენტების შემდგომ ეტაპზე შესწავლილი იქნა PCr-ის რაოდენობრივი ცვლილების ხასიათი იზოლირებითა და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში.

როგორც სურათი 19-დან ჩანს, 30-დღიანი ქრონიკული სტრესის პირობებში, უკვე შესწავლილ ცვლილებებთან ერთად, თავის ტვინში შეინიშნება ასევე PCr-ის რაოდენობრივი შემცირებაც ($\approx 46\%$), რაც მიუთითებს თავის ტვინში ენერგეტიკული ბალანსის დარღვევასა და Cr/PCr/CK ციკლის აქტივობის დაქვეითებაზე.

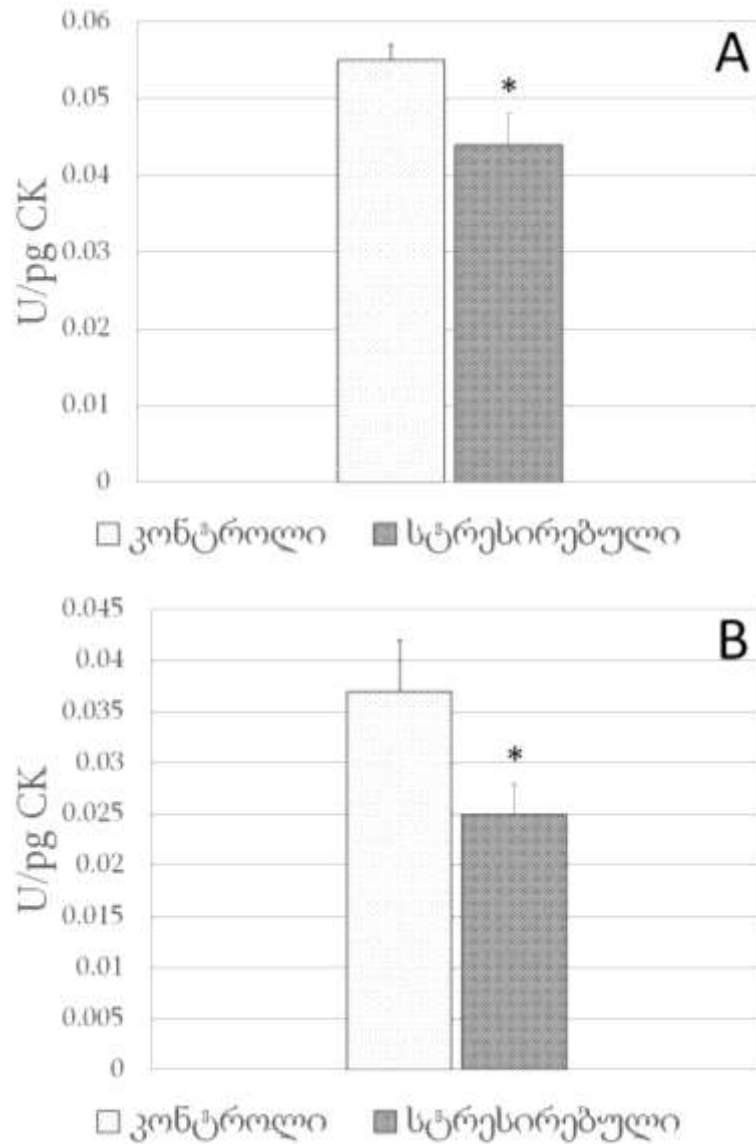


სურათი 19. ფოსფოკრეატინის კონცენტრაციული ცვლილება 30-დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში;

ორდინატა ღერძზე - ფოსფოკრეატინის კონცენტრაცია (uM/L); *p<0.05

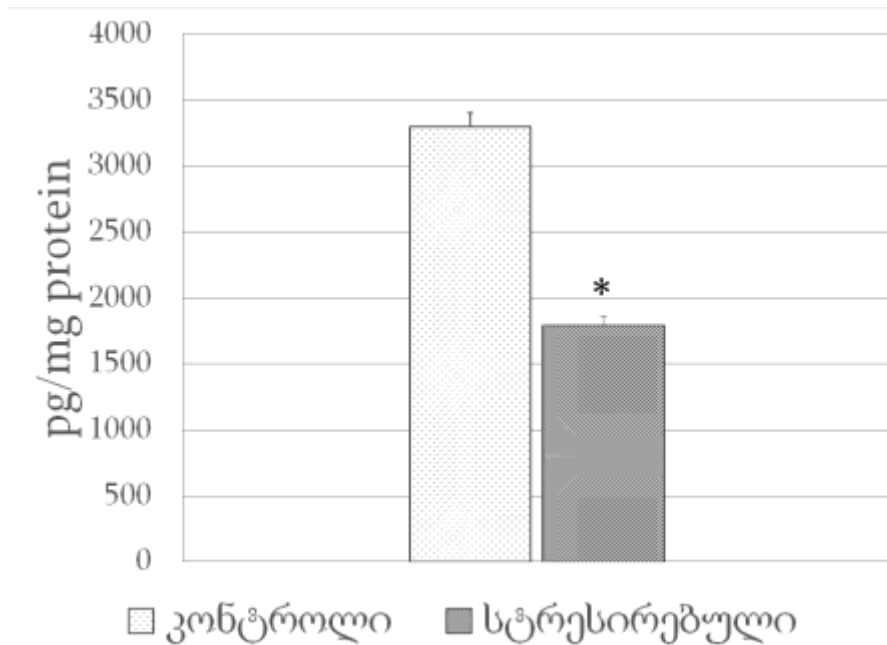
როგორც აღინიშნა, ფოსფოკრეატინი საკუთარ ეფექტს Cr/PCr/CK ციკლის საშუალებით ახორციელებს, რომელსაც ფერმენტი კრეატინკინაზა აკატალიზებს, შესაბამისად, საინტერესო იყო შეგვეფასებინა ამ უკანასკნელის აქტივობის ცვლილება 30-დღიანი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში.

სურათიდან 20 ჩანს, რომ ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში ფერმენტ კრეატინკინაზას, როგორც ციტოზოლური (სურ.20A), ისე მიტოქონდრიული იზოფორმის (სურ.20B) აქტივობა სარწმუნოდაა დაქვეითებული. კერძოდ, ციტოზოლურის დაახლოებით 21%-ით, ხოლო მიტოქონდრიული იზოფორმის 33,3%-ით, რაც მეტყველებს იმაზე, რომ ფსიქო-ემოციურ სტრესის დროს განვითარებულ ენერგეტიკულ დისბალანსს თან ერთვის Cr/PCr/CK ციკლის პროცესის ინტენსივობის დაქვეითებაც.



სურათი 20. კრეატინკინაზას ციტოზოლური (A) და მიტოქონდრიული (B) იზოფორმების ფერმენტული აქტივობების ცვლილება 30-დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში ორდინატა ღერძზე - კრეატინკინაზას ფერმენტული აქტივობა (U/მგ. CK); * $p < 0.05$

ცნობილია, რომ ფერმენტის აქტივობის დაქვეითების მიზეზს წარმოადგენს უშუალოდ ფერმენტის რაოდენობრივი შემცირება და ასევე ფერმენტის მოლეკულაში მიმდინარე სტრუქტურული ცვლილებები.



სურათი 21. კრეატინკინაზას რაოდენობრივი შემცველობა თავის ტვინის სუმარულ ფრაქციაში 30-დღიანი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში

ორდინატა ღერძზე - კრეატინკინაზას კონცენტრაცია (pg/მგ. ცილა); * $p \leq 0.05$

ზემოთქმულის გათვალისწინებით შემდგომ ცდებში მოვახდინეთ კრეატინკინაზას რაოდენობრივი შემცველობის შეფასება, რის შედეგადაც გამოიკვეთა, რომ 30-დღიანი იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში სტრესირებული ინდივიდების თავის ტვინში აღინიშნება ფერმენტის რაოდენობრივი შემცირება (სურ. 21).

ამის პარალელურად, შესწავლილი იქნა კრეატინკინაზას მიტოქონდრიული და ციტოზოლური იზოფორმის კინეტიკური პარამეტრებიც (V_{max} , K_m), რაც მოგვცემდა საშუალებას დაგვედგინა აქტივობის დაქვეითების ძირითადი მიზეზი. იმის გათვალისწინებით, რომ კრეატინკინაზა წარმოადგენს ორსუბსტრატულ ფერმენტს (კრეატინი, ატფ), შესწავლილი იქნა კინეტიკური პარამეტრების მაჩვენებლები ორივე სუბსტრატის, კერძოდ ატფ-სა და კრეატინის მიმართ.

მიღებული შედეგები მოცემულია ცხრილი 2-სა და 3-ში, საიდანაც ნათლად ჩანს, რომ ორივე შემთხვევაში სარწმუნოდაა შემცირებული ფერმენტული რეაქციის მაქსიმალური სიჩქარე (V_{max}), რასაც ვერ ვიტყვით მის თვისობაზე ($1/K_m$) სუბსტრატებისადმი, რომელიც არაერთგვაროვნად იცვლება.

კრეატინკინაზას იზოფორმათა კინეტიკური პარამეტრების ცვლილება ატფ-ის ცვალებადი კონცენტრაციების პირობებში

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$

კინეტიკური პარამეტრები	კრეატინკინაზას მიტოქონდრიული იზოფორმა		კრეატინკინაზას ციტოზოლური იზოფორმა	
	კონტროლი	სტრესი	კონტროლი	სტრესი
V_{max}	19.40 ± 1.4	$9.14 \pm 1.7^{**}$	25.71 ± 1.2	$21.10 \pm 3.30^*$
K_m	2.65 ± 0.1	$1.07 \pm 0.3^*$	3.00 ± 0.3	2.87 ± 0.1

როგორც ზემოთ იყო აღნიშნული, ფერმენტის მაქსიმალური სიჩქარის (V_{max}) ცვლილების ძირითად მიზეზს წარმოადგენს საკუთრივ ფერმენტის მოლეკულაში მიმდინარე სტრუქტურული ცვლილებები, ან მისი რაოდენობრივი კლება. როგორც სურათი 20-დან ჩანს, იზოლირებისა და ცირკადული რიტმის დაღვევა მიმდინარებს კრეატინკინაზას რაოდენობრივი კლების ფონზე, თუმცა არ არის გამორიცხული ასევე ფერმენტის სტრუქტურული ცვლილებებიც იმის გათვალისწინებით, რომ ამ პირობებში განვითარებული ოქსიდაციური სტრესისას კრეატინკინაზასათვის დამახასიათებელია ოქტამერული სტრუქტურის დიმერულ ფორმაში გადასვლა, რაც ასევე ამცირებს ფერმენტის აქტივობას [218]. რაც შეეხება K_m , მისი ცვლილება ძირითადად ეხება ფერმენტის სუბსტრატების რაოდენობის ცვლილებას.

ცხრილი 2-ში მოცემული მონაცემები მიუთითებენ, რომ ფსიქო-ემოციური სტრესის შემთხვევაში როგორც მიტოქონდრიული, ასევე ციტოზოლური იზოფორმების V_{max} ატფ-ის ცვლადი სიდიდის პირობებში მცირდება, რაც ფერმენტის სტრუქტურული ცვლილების მაჩვენებელია. ასევე სარწმუნოდაა შემცირებული მიტოქონდრიული იზოფორმის K_m მაჩვენებელიც, რაც მიანიშნებს ფერმენტის თვისობის გაზრდას მისი ერთ-ერთი სუბსტრატის, კერძოდ ატფ-ისადმი, რაც ატფ-ის სიმცირის პირობებში აძლევს ფერმენტს შესაძლებლობას, რათა მაქსიმალურად გამოავლინოს აქტივობა. თუმცა, ციტოზოლურ იზოფორმაში

მაქსიმალური აქტივობის კლების ფონზე ვერ იქნა ნანახი ფერმენტის K_m მაჩვენებლის სარწმუნო შემცირება.

განსხვავებული მონაცემებია მიღებული ფერმენტის კინეტიკური სიდიდეების კვლევისას მეორე სუბსტრატის, კრეატინის შემთხვევაში (ცხრ.3). კერძოდ, აღინიშნება ორივე იზოფორმის V_{max} -ის დაქვეითება, თუმცა ამ შემთხვევაში გაზრდილია K_m -სიდიდე, რაც მანიშნებელია ფერმენტის თვისობის შემცირებისა მისი მეორე სუბსტრატის, კერძოდ კრეატინის მიმართ.

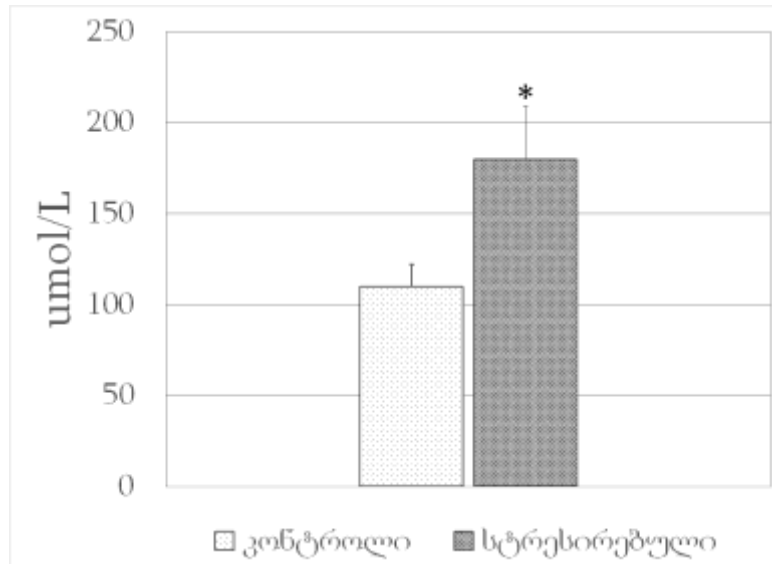
ცხრილი 3

კრეატინკინაზას იზოფორმათა კინეტიკური პარამეტრების ცვლილება კრეატინის ცვალადი კონცენტრაციების პირობებში

* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.001$

კინეტიკური პარამეტრები	კრეატინკინაზას მიტოქონდრიული იზოფორმა		კრეატინკინაზას ციტოზოლური იზოფორმა	
	კონტროლი	სტრესი	კონტოლი	სტრესი
V_{max}	21.30 ± 1.45	$15.05 \pm 0.90^{**}$	19.45 ± 1.97	$12.37 \pm 1.25^{**}$
K_m	2.66 ± 0.56	$4.87 \pm 2.31^{**}$	1.91 ± 0.82	$2.99 \pm 0.41^{**}$

როგორც ცნობილია, რეაქციის მიმდინარეობისას სარეაქციო არეში ამა თუ იმ მიზეზით ფერმენტის სუბსტრატის რაოდენობრივი მატება განაპირობებს ფერმენტული აქტივობის ზოგიერთი მაჩვენებლის ცვლილებას, მათ შორის თვისობის შემცირებას სუბსტრატის მომატებული რაოდენობის მიმართაც [219]. მიღებული მონაცემები მიუთითებენ, რომ კრეატინკინაზას აქტივობისა და თვისობის შემცირება მიმდინარეობს მისი მეორე სუბსტრატის, კერძოდ კრეატინის რაოდენობრივი მატების პირობებში.



სურათი 22. კრეატინის რაოდენობრივი შემცველობა ხანგრძლივი სოციალურ-სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში

ორდინატა ღერძზე - კრეატინის კონცენტრაცია (uM/ლ); *p<0.05

ამის დასადასტურებლად შემდგომ ცდებში დადგენილი იქნა კრეატინის რაოდენობრივი შემცველობა. მიღებული შედეგები წარმოდგენილია სურათზე 22. მონაცემები მიუთითებენ, რომ კრეატინის რაოდენობა სტრესირებული ვირთაგვების თავის ტვინის სუმარულ ფრაქციაში საკონტროლო ცხოველების თავის ტვინის უჯრედებთან შედარებით დაახლოებით 45%-ითაა გაზრდილი.

აღსანიშნავია, რომ მონაცემები კრეატინის რაოდენობრივ შემცველობაზე სხვადასხვა პათოლოგიური მდგომარეობის პირობებში არაერთგვაროვანია. კერძოდ, ნაწილი ავტორებისა თვლის, რომ ოქსიდაციური სტრესის პირობებში ადგილი აქვს კრეატინის რაოდენობრივი შემცველობის კლებას, რაც დამახასიათებელია ზოგიერთი ნეიროდეგენერაციული ცვლილებებისას, მაგალითად ალცჰეიმერისა და პარკინსონის დაავადებების და სხვათა შემთხვევაშიც [220]. თუმცა გამოჩნდა საპირისპირო მონაცემებიც, რომლებიც ადასტურებენ ანალოგიურ პირობებში კრეატინის არა რაოდენობრივ კლებას, არამედ მის მატებას და კრეატინული აგრეგატების

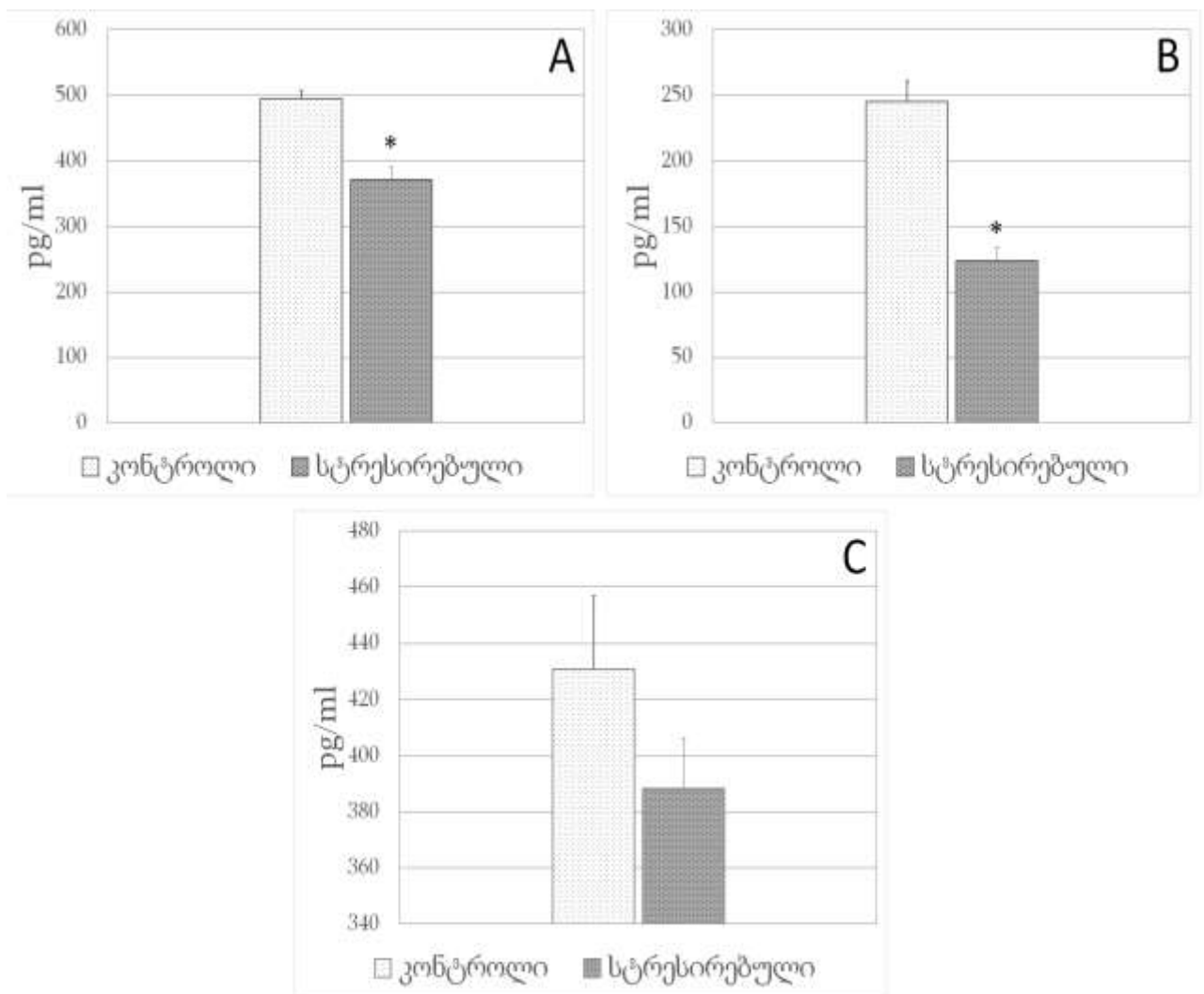
წარმოქმნას თავის ტვინში, როგორც შედეგს ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობის დაქვეითებისა [221].

როგორც ჩვენს მიერ წარმოდგენილი მონაცემებიდან იკვეთება, იზოლირებითა და ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის ფონზე განვითარებული ოქსიდაციური სტრესის პირობებში აღინიშნება თავის ტვინში კრეატინის რაოდენობრივი მატება ფოსფოკრეატინის რაოდენობის შემცირებისა და ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობის დაქვეითების ფონზე.

ცნობილია, რომ ორგანიზმისათვის კრეატინის წყაროს წარმოადგენს, როგორც საკვებით მიღებული და ასევე ენდოგენურად სინთეზირებული კრეატინი. მისი სინთეზი ხორციელდება ორსაფეხურიანი პროცესით L-არგინინიდან, ორი ფერმენტის არგინინ-გლიცინ ამიდინოტრანსფერაზასა (AGAT) და გუანიდინო-აცეტატ მეთილტრანსფერაზას (GAMT) მონაწილეობით ღვიძლსა და თირკმელებში, შემდგომ კი სპეციალური მემბრანული ტრანსპორტერით - SLC6A8 (CrT) საჭიროებისამებრ ნაწილდება მთელ ორგანიზმში [221].

თავდაპირველად ითვლებოდა, რომ თავის ტვინისათვის კრეატინის წყაროს პერიფერიული კრეატინიწარმოადგენდა, თუმცა ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში მისი მასინთეზირებელი და მატრანსპორტირებელი ფერმენტების აღმოჩენამ შეცვალა ესმიდგომა და ამჟამად ითვლება, რომ ნერვული უჯრედებიძირითადადმოიხმარენ ენდოგენურად დასინთეზირებულ კრეატინს [222].

ზემოთქმულიდან გამომდინარე, საინტერესოს წარმოადგენდა შეგვესწავლა კრეატინის სინთეზის პროცესის მიმდინარეობა თავის ტვინში იზოლაციითა და ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ქრონიკული სტრესის პირობებში იმის გათვალისწინებით, რომ ნანახი იქნა მისი რაოდენობრივი მატება. ამისათვის შევისწავლეთ კრეატინის მასინთეზირებელი ფერმენტების AGAT-ისა და GAMT-ის და ასევე მისი მატრანსპორტირებელი ცილის CT1-ის რაოდენობრივი შემცველობა. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურ.23-ზე.



სურათი 23. AGAT-ის (A), GAMT-ის (B) და კრეატინის ტრანსპორტერის (CrT) რაოდენობრივი ცვლილება ხანგრძლივი სოციალისოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში
 ორდინატა ღერძზე - კონცენტრაცია (pg/მლ); * $p < 0.05$

მიღებული მონაცემებიდან ჩანს, რომ ხანგრძლივი სტრესის პირობებში, რომელიც გამოწვეულია სოციალური იზოლირებითა და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით, თავის ტვინის სუბარულ ფრაქციაში სარწმუნოდაა შემცირებული, როგორც AGAT-ის, ასევე GAMT-ის რაოდენობა. ანალოგიური ცვლილებებია მატრანსპორტირებელი ცილის CrT-ის შემთხვევაშიც.

ამდენად, იკვეთება, რომ სტრესულ პირობებში თავის ტვინის უჯრედებში კრეატინის რაოდენობრივი მატება არის დამოკიდებული მისი მასინთეზირებელი

და მატრანსპორტირებელი ცილის რაოდენობრივ მატებაზე და ამ ეფექტის მიზეზი სავარაუდოდ დამოკიდებულია ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობის შემცირებაზე და კრეატინის ფოსფოკრეატინად გარდაქმნის პროცესზე, რასაც მოსდევს მისი დაგროვება უჯრედებზე და შესაბამისად, რაოდენობრივი მატება.

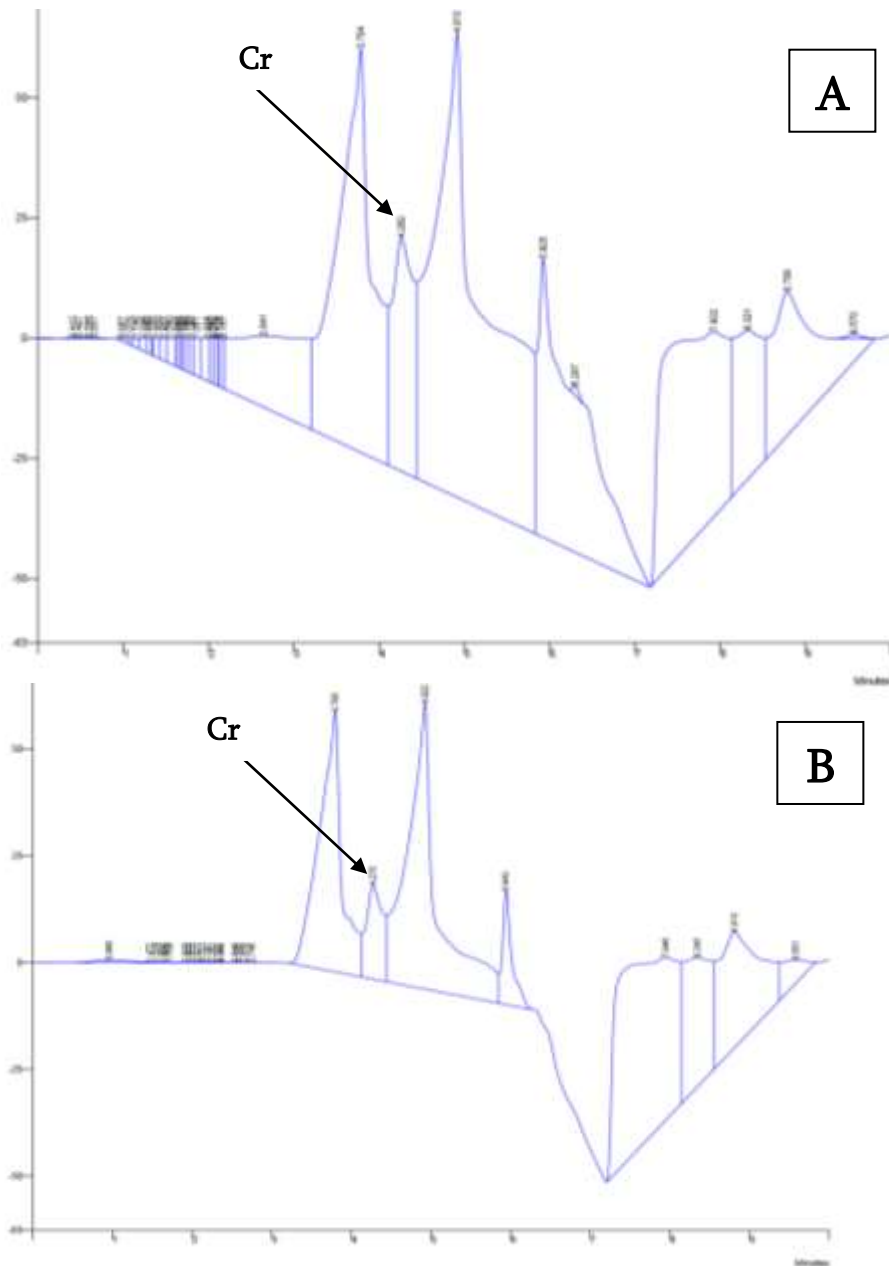
თუმცა ღიად რჩებოდა საკითხი ეგზოგენური, პერიფერიული კრეატინის გაძლიერებული მიწოდებისა, რაც შესაძლებელია გამხდარიყო თავის ტვინის უჯრედებში ამ უკანასკნელის რაოდენობრივი მატების მიზეზი.

ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში, ჩვენს მიერ დაფიქსირებული ცვლილებების გაანალიზების შედეგად და ლიტერატურულ მონაცემებზე დაყრდნობით, ექსპერიმენტების შემდგომ ეტაპზე მოხდა HPLC-MS/MS მეთოდით ეგზოგენურად მიწოდებული მონიშნული კრეატინის (creatine-D3-monohydrate) განსაზღვრა, რათა უკეთ შეგვეფასებინა კრეატინის რაოდენობრივი ცვლილების ხასიათი.

ლიტერატურული მონაცემებიდან ცნობილია, რომ პერიფერიული კრეატინი, რომლის წარმოქმნის ძირითადი საიტებია თირკმელი და ღვიძლი, დიდ გავლენას ვერ ახდენს თავის ტვინში მის შემცველობაზე [223] და კრეატინის მოთხოვნა ძირითადად მის ენდოგენურ სინთეზზეა დამოკიდებული [224]. ამასთან, მიღებულია, რომ ფიზიოლოგიურ მდგომარეობაში, სისხლის ნაკადიდან გადასული კრეატინის მაქსიმალური რაოდენობა თავის ტვინში არსებულის დაახლოებით 1%-ია [225].

მონიშნული კრეატინის ინტრაპერიტონეალური ინექციის (140მგ/კგ) შედეგად თავის ტვინში მაღალი წნევის ქრომატოგრაფული და მასს სპექტროფოტომეტრული მეთოდით კრეატინის განსაზღვრის შედეგები წარმოადგენილია სურათებზე 24 და 25.

როგორც სურათიდან 24 ჩანს, მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიულმა ანალიზმა ვერ მოახდინა თავისუფალი და მონიშნული კრეატინის დიფერენცირება, რადგან მათი გამოსვლის დრო ფაქტობრივად ერთმანეთს ემთხვეოდა. ამასთან საკონტროლო (სურ. 24A) და სტრესირებული (სურ. 24B) ინდივიდების ქრომატოგრამების შედარება არ იძლევა რაიმე მნიშვნელოვანი დასკვნების გამოტანის საფუძველს.



სურათი 24. საკონტროლო (A) და სტრესირებული (B) ჯგუფის ინდივიდების თავის ტვინის სუმა რულ ფრაქციაში მონიშნული კრეატინის (creatine-D3-monohydrate) HPLC ანალიზის დიაგრამა ხანგრძლივი სოციალური სოციალური იზოლაციისა და

ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში

ორდინატა ღერძზე - შუქშთანთქმა

აბსცისათა ღერძზე - დრო (წთ)

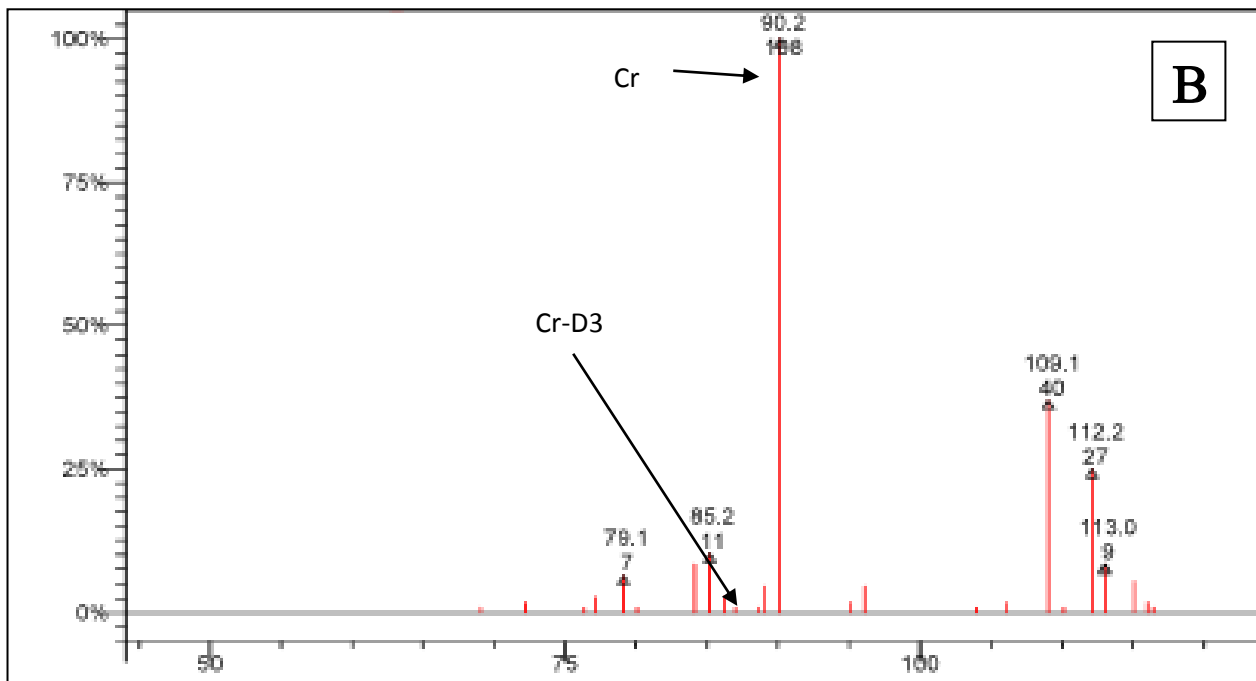
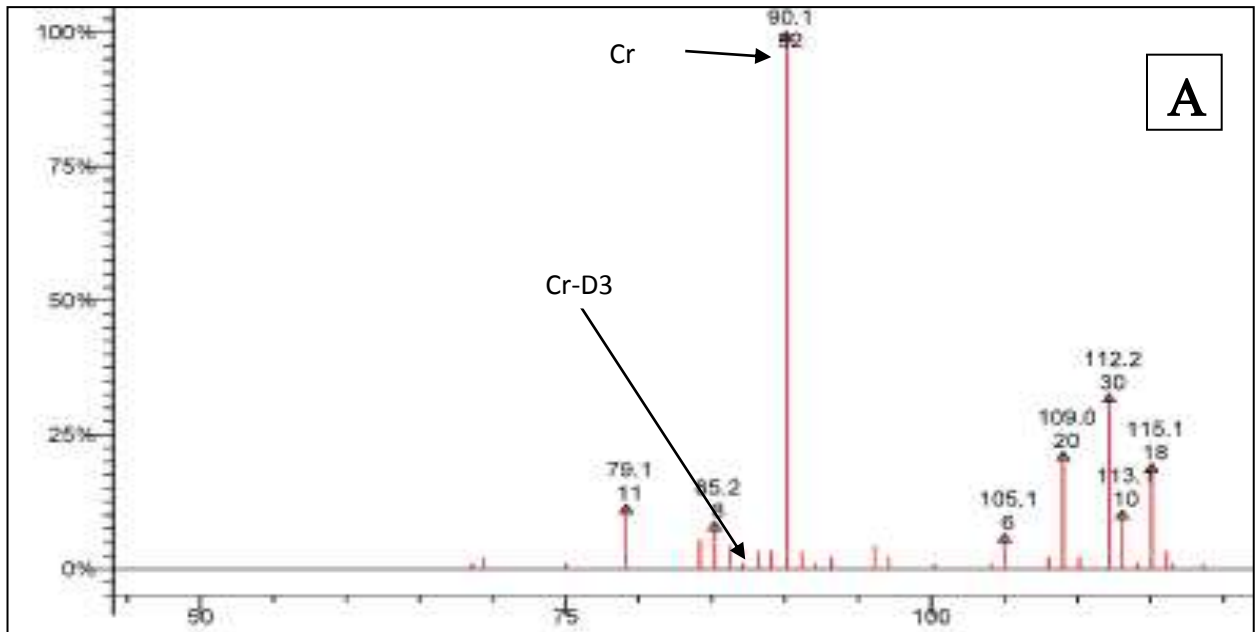
მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიული ანალიზისას მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე, საჭირო გახდა უფრო მგრძობიარე მეთოდის გამოყენება, რომელიც

საკვლევ ფრაქციებში მოახდენდა თავისუფალი და მონიშნული კრეატინის ზუსტი იდენტიფიცირებას და მოგვცემდა მყარი ვარაუდების გამოთქმის საფუძველს. ამისათვის ექსპერიმენტის შემდგომ ეტაპზე მოვახდინეთ მაღალი წნევის ქრომატოგრაფიის საშუალებით მიღებული ფრაქციების იდენტიფიცირება მასს სპექტოფოტომეტრიული ანალიზის გამოყენებით.

ცნობილია, რომ HPLC-MS/MS ანალიზისას კრეატინის აღმომჩენი ძირითადი იონური ფრაგმენტის მასა 90.1-90.2 ატომური მასის ერთეულის ტოლია, შესაბამისად მონიშნული კრეატინის შემთხვევაში აღნიშნული მაჩვენებელი ვარირებს იმის მიხედვით თუ რომელი ფრაგმენტია მონიშნული.

ჩვენს მიერ კრეატინ-D3-ის გამოყენება განაპირობა სწორედ იმ ფაქტმა, რომ ამ შემთხვევაში მონიშნულია ძირითადი ფრაგმენტის მეთილის ჯგუფი და შესაბამისად მისი მასა 93.1-93.2 ატომური მასის ერთეულს შეადგენს.

ექსპერიმენტების შედეგად გამოიკვეთა, რომ ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის ფონზე სტრესირებული ჯგუფის ინდივიდებში ფიქსირდება ჩვეულებრივი, არამონიშნული კრეატინის შესაბამისი ფრაგმენტის ინტენსივობის მატება, კერძოდ საკონტროლო ჯგუფის შემთხვევაში (სურ. 24A) კრეატინის ინტენსივობის მაჩვენებელმა შეადგინა 92, ხოლო სტრესირებულის კი 166 (სურ. 24B), რაც მიუთითებს რომ სტრესის ფონზე თავის ტვინში მომატებულია კრეატინის შემცველობა. აღნიშნული სრულ თანხვედრაშია ჩვენს მიერ ადრე მიღებულ მონაცემთან, რომლებიც ადასტურებენ სტრესის შედეგად თავის ტვინში კრეატინის რაოდენობრივ მატებას (სურ. 22).



სურათი 25. საკონტროლო (A) და სტრესირებული (B) ჯგუფის ინდივიდების თავის ტვინის სუმა რულ ფრაქციაში მონიშნული კრეატინის (creatine-D3-monohydrate) HPLC-MS/MS ანალიზის დიაგრამა ხანგრძლივი სოციალური სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში

ორდინატა ღერძზე - საკვლევი მოლეკულის ფრაგმენტების პროცენტული შემცველობა (100% აღებულია არამონიშნული კრეატინის ფრაგმენტის რაოდენობრივი მაჩვენებელი)

აბსცისათა ღერძზე - ფრაგმენტის მასა/მუხტი (m/z)

ამავე დროს, სურათი 25-დან ნათლად იკვეთება, რომ თავის ტვინის სუმა რულ ფრაქციაში სიმცირის გამო ინტრაპერიტონეალურად შეყვანილი მონიშნული

კრეატინ-D3-ის მაჩვენებელი მინიმალურია და შეადგინამაქსიმალური ინტენსივობის დაახლოებით 1-2%, რაც შეესაბამება სამეცნიერო ლიტერატურაში აღიარებულ მონაცემებს. თუმცა აღსანიშნავია, რომ სტრესირებულ ინდივიდებში მონიშნული კრეატინის შემცველობამ საერთო რაოდენობის მხოლოდ 0,5% შეადგინა, რის მიზეზადაც შესაძლოა კრეატინის ტრანსპორტერის რაოდენობის კლება გამხდარიყო (სურ. 23).

ამდენად, როგორც მიღებული შედეგები მიუთითებს, ექსპერიმენტულ პირობებში კრეატინის რაოდენობრივი მატება არ უნდა იყოს გამოწვეული სტრესის ფონზე განვითარებული ჟანგვითი პროცესების გააქტიურებითა და შესაბამისად, ჰემატოენციფალური ბარიერის განვლადობის გაზრდით და ამ კუთხით, სტრესულ მდგომარეობაში რაიმე მნიშვნელოვან ცვლილებას არ უნდა ქონდეს ადგილი.

მიღებული მონაცემებიდან გამომდინარე სავარაუდოა, რომ კრეატინის რაოდენობრივი მატების მიზეზად გვევლინება 30-დღიანი იზოლაციისა და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის შედეგად ცოცხალ სისტემაში განვითარებული ოქსიდაციური სტრესი და ამის ფონზე ფერმენტ კრეატინკინაზას სტრუქტურაში მიმდინარე ცვლილებები, რაც გამოწვეული უნდა იყოს მიტოქონდრიებში წარმოებული ჭარბი აქტიური რადიკალების გავლენით კრეატინკინაზას სტრუქტურული ცვლილებებით (ოქტამერულიდან დიმერულ კონფორმაციაში გადასვლა), რაც ამ ფერმენტის ინაქტივაციისა და აქტივობის დაქვეითების მიზეზი ხდება და შესაბამისად, განაპირობებს კრეატინის ფოსფოკრეატინადაგარდაქმნის შეფერხებასა და თავისუფალი კრეატინის დაგროვებას.

ამრიგად, მიღებული შედეგებიდან გამომდინარე ვკვებთ, რომ ცვლილებები, რომელთაც ადგილი აქვთ აღნიშნული ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის ფონზე, ძირითადად გამოწვეული უნდა იყოს ცოცხალ სისტემაში განვითარებული ოქსიდაციური პროცესების გაძლიერებით, რის პროვოცირებასაც ახდენს სხვადასხვა სტრესული ფაქტორების ზემოქმედება.

მიღებული მონაცემების შეჯერების შედეგად შესაძლოა გამოიკვეთოს რამდენიმე ძირითადი შედეგი. კერძოდ:

1. ცხოველების 30-დღიანი იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში, ექსპერიმენტულ ცხოველებში შეინიშნება, როგორც სტრეს-ჰორმონების (სეროტონინი და კორტიკოსტერონი), ისე ემოციური მდგომარეობის ცვლილება, რაც საცდელ ინდივიდებში განვითარებული ფსიქო-ემოციური სტრესის მაჩვენებელია.
2. შესწავლილ პირობებში, თავის ტვინში ფიქსირდება ლზჟ-ს პროდუქტთა რაოდენობრივი მატება, რის პარალელურად მიმდინარეობს ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობის შემცირება, რასაც თან ერთვის ისეთი სასიგნალო აგენტების პათოლოგიური რაოდენობრივი ცვლილება, როგორცაა NO და კალციუმის იონი. მიღებული მონაცემები იძლევა საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესი, რომელიც გამოწვეულია 30-დღიანი სოციალური იზოლაციითა და ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით, იწვევს თავისუფალ-რადიკალური ჟანგვის გააქტივებას და ამის შედეგად ოქსიდაციური სტრესის ჩამოყალიბებას.
3. ოქსიდაციური სტრესის განვითარების ფონზე აღინიშნება ცვლილებები ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმშიც. კერძოდ, მიმდინარეობს ანაერობული პროცესების აქტივაცია (გლიკოლიზი), მაშინ, როცა აერობული, მიტოქონდრიული პროცესების (კრებსის ციკლი და მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვი) აქტივობა დაქვეითებულია, რაც აისახა ატფ-ის რაოდენობის შემცირებაში.
4. უშუალოდ ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მიმდინარე ცვლილებების გარდა, აღნიშნულ პირობებში ადგილი აქვს მაკროერგული ფოსფატების მატრანსპორტირებელი სისტემის აქტივობის შემცირებას, რაც გამოიხატება Cr/PCr/CK ციკლის ფუნქციონირებაში მიმდინარე ცვლილებებით. კერძოდ, ფიქსირდება ფერმენტ კრეატინკინაზას, როგორც რაოდენობის, ისე აქტივობის შემცირება, რაც სავარაუდოდ, გამოწვეული უნდა იყოს ჟანგვითი პროცესების გააქტივებით.
5. ფერმენტ კრეატინკინაზას იზოფორმათა აქტივობის კლების პარალელურად აღინიშნება მათი სუბსტრატების - კრეატინისა და ფოსფოკრეატინის

ურთიერსაპირისპირო რაოდენობრივი ცვლილებები. კერძოდ, ხანგრძლივი ფსიქო-ემოციური სტრესის პირობებში კრეატინის რაოდენობა მატულობს (მასინთეზირიბელი ფერმენტების (AGAT და GAMT) და მატრანსპორტირებელი ცილის (CrT) შემცირების ფონზე), მაშინ, როცა ფოსფოკრეატინის კონცენტრაცია შემცირებულია.

6. კრეატინის რაოდენობრივი ცვლილების ხასიათის ანალიზმა ნათლად გამოვლინდა, რომ აღნიშნული ეფექტი არ არის დამოკიდებული ეგზოგენურ, პერიფერიულ კრეატინზე, არამედ იგი მთლიანად განპირობებულია ენდოგენური, თავის ტვინში მიმდინარე პროცესებით, მაგალითისათვის შესაძლებელია მოვიყვანოთ ოქსიდაციური სტრესის გააქტივების ფონზე თავისუფალი კრეატინის რაოდენობრივი მატება, რაც ზოგიერთი ავტორის მონაცემებით, დამახასიათებელია სხვადასხვა პათოგენეზის მქონე ნეიროდეგენერაციული დაავადებებისათვის [210].

დასკვნა

1. ცხოველების ხანგრძლივი სოციალური იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო-ემოციური სტრესის ფონზე თავის ტვინის უჯრედებში ადგილი აქვს ოქსიდაციური სტრესის განვითარებას;
2. გაძლიერებული ოქსიდაციური პროცესები იწვევენ ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ინტენსივობის შემცირებას;
3. ხანგრძლივი იზოლაციისა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში თავის ტვინის უჯრედებში ადგილი აქვს Cr/PCr/CK სისტემის აქტივობის დაქვეითებას;
4. ამის ფონზე თავის ტვინის უჯრედებში კრეატინის რაოდენობრივი მატების მიზეზი გაძლიერებული ოქსიდაციური პროცესების შედეგად ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობის შემცირებაა.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. "Hans Selye". Encyclopædia Britannica (2008 ed.). Encyclopædia Britannica, Inc.
2. House JS, Landis KR, Umberson D. Social relationships and health. *Sciences* 1988; 241:540–5.
3. Berkman LF. "The role of social relations in health promotion", *Psychosomatic Medicine* 1995; 57:245-54.
4. Berkman LF, Glass T. "Social integration, social networks, social support, and health" *Social Epidemiology*. New York: Oxford; 2000.
5. House JS, Landis KR, Umberson D. Social relationships and health. *Science* 1988; 241: 540–5.
6. Berkman LF „The role of social relations in health promotion” *Psychosom Med* 1995; 57: 245–54.
7. Berkman LF, Glass T. Social integration, social networks, social support, and health. In: Berkman LF, Kawachi I, eds. *Social Epidemiology*. New York: Oxford; 2000.
8. "Social Isolation Kills, But How and Why?" *Psychosomatic Medicine* 63:273–274 (2001)
9. Brummett BH, Barefoot JC, Siegler IC, Clapp-Channing NE, Lytle BL, Bosworth HB, Williams RB Jr, Mark DB. Characteristics of socially isolated patients with coronary artery disease who are at elevated risk for mortality. *Psychosom Med* 2001; 63:267–272.
10. Hampton, K., Sessions, L., Her, E.J., and Rainie, L., "Social Isolation and New Technology"
11. N. Nie, D.S. Hillygus and L. Erbring, (2002) "Internet Use, Interpersonal Relations and Sociability: A Time Diary Study",
12. Kraut, R., et al. "Internet Paradox Revisited." *Journal of Social Issues* 58 (2002): 49-74
13. Liu H, Wang Z. "Effects of social isolation stress on immune response and survival time of mouse with liver cancer" *World J Gastroenterol*. 2005 Oct 7;11(37):5902-4.
14. Hatch A. M., Balazs T., Wiberg G. S., Grice H. C., *Science*, 142, 507—508 (1963).
15. Kim J. W., Kirkpatrick B., *Biol. Psychiatry*, 40, 918—922 (1996).
16. Pashko S., DeTurck K. H., Vogel W. H., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 13, 471—473 (1980).
17. Weiss I. C., Pryce C. R., Jongen-Rêlo A. L., Nanz-Bahr N. I., Feldon J., *Behav. Brain Res.*, 152, 279—295 (2004).
18. Valzelli L., "Aggressive Behavior," ed. by Garattini S., Sigg E. B., Ex-1392 Vol. 28, No. 8, *Cerpta Medica*, Amsterdam, 1969, pp. 70—76.
19. Ojima K., Matsumoto K., Tohda M., Watanabe H., *Brain Res.*, 684, 87-94 (1995).

20. Summers CH, Summers TR, Moore MC, Korzan WJ, Woodley SK, Ronan PJ, Ho glund E, Watt MJ, Greenberg N (2003)
21. Matsumoto K., Ojima K., Watanabe H., Brain Res., 708, 1-6 (1996). Temporal patterns of limbic monoamine and plasma corticosterone response during social stress. Neuroscience 116:553–563
22. Dong E., Matsumoto K., Uzunova V., Sugaya I., Takahata H., Nomura H., Watanabe H., Costa E., Guidotti A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 2849-2854 (2001).
23. Nguyen Thi Thu HUONG Yukihiisa MURAKAMI Michihisa TOHDA Hiroshi WATANABE and Kinzo MATSUMOTO, “Social Isolation Stress-Induced Oxidative Damage in Mouse Brain and Its Modulation by Majonoside-R2, a Vietnamese Ginseng Saponin”, Biol. Pharm. Bull. 28(8) 1389-1393 (2005)
24. Negri L (2006). "[Vittorio Erspamer (1909-1999)]" (in Italian). Med Secoli 18 (1): 97–113.
25. Rapport MM, Green AA, Page IH (1948). "Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization". J. Biol. Chem. 176 (3): 1243–51.
26. Feldberg W, Toh CC (1953). "Distribution of 5-hydroxytryptamine (serotonin, enteramine) in the wall of the digestive tract". J. Physiol. (Lond.) 119 (2–3): 352–62.
27. King MW. "Serotonin", The Medical Biochemistry Page, Indiana University School of Medicine. Retrieved 2009-12-01
28. Berger M, Gray JA, Roth BL (2009). "The expanded biology of serotonin" Annu. Rev. Med. 60: 355–66.
29. Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M (2003). "Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform". Science 299 (5603): 76.
30. Eaton M J, Gudehithlu K P, Quach T, Silvia C P, Hadjiconstantinou M, Neff N H. Distribution of aromatic l-amino acid decarboxylase mRNA in mouse brain by in situ hybridization histology. J. Comp. Neurol.1993; 337:640-654.
31. “Serotonin” Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, et al. 6th edition.
32. Molliver M E. Serotonergic neuronal systems: What their anatomic organization tells us about function. J. Clin. Psychopharmacology1987; 7:3s-23s.
33. Boadle-Biber M C. Regulation of serotonin synthesis. Prog. Biophys. Mol. Biol.1993; 60:1–15.
34. Schuldiner S. A molecular glimpse of vesicular monamine transporters, J. Neurochem.1994; 62:2067–2078.
35. Blakely R D, DeFelice L J, Hartzell H C. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. J. Exp. Biol.1994; 196:263–281

36. Borowsky B, Hoffman B J. Neurotransmitter transporters: Molecular biology, function, and regulation. *Int. Rev. Neurobiol.* 1995; 38:139–199.
37. Kusumi I, Koyama T, Yamashita I, “Serotonin-induced platelet intracellular calcium mobilization in depressed patients”, *Psychopharmacology (Berl)*. 1994 Jan; 113(3-4):322-7
38. Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)", *Pharmacol. Rev.* 46 (2): 157–203.
39. Frazer A, Hensler JG (1999). "Chapter 13: Serotonin Receptors", pp. 263–292, ISBN 0-397-51820-X
40. Nichols DE, Nichols CD (May 2008). "Serotonin receptors" *Chem. Rev.* 108 (5): 1614–41
41. Meyer-Bernstein E L, Morin L P. Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *J. Neurosci.* 1996;16:2097–2111.
42. Cases O, Seif I, Grimsby J. et al. “Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAO A ” *Science*1995; 268:1763–1766.
43. Shih JC. Molecular basis of human MAO-A and B. *Neuropsychopharmacology.*1991; 4:1–3.
44. [Http://themedicalbiochemistrypage.org/steroid-hormones.html](http://themedicalbiochemistrypage.org/steroid-hormones.html)
45. CHROUSOS GP, GOLD PW: The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMS* 267:1244-1252, 1992.
46. DALLMAN MF, AKANA SF, CASCIO CS, DARLINGTON DN, JACOBSON L, LEVIN N: Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Prog Horm Res* 43: 113-173, 1987
47. KANT GJ, MOUGEY EH, MEYERHOFF JL: ACTH, prolactin, corticosterone and pituitary cyclic AMP responses to repeated stress. *Pharmacol Biochem Behav* 32: 557-561, 1989
48. VIGA. M, KVĚTNANSKÝ R, JURČOVICOVÁ J, JE.OVÁ D, TATAR P: Comparison of catecholamine and adenopituitary hormone responses to various stress stimuli in man. 1984, pp 865-882.
49. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26/#A461>
50. “The Hormones: Corticoids" Retrieved 2009-04-09.
51. “Hormones”, *Encyclopaedia Britannica, Inc.* 1995;
52. Reul J, deKloet E. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: Microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 117:2505–2511. 1985

53. Arriza J, Simerly R, Swanson L, Evans R. "The neuronal mineralocorticoid receptor as mediator of glucocorticoid response" *Neuron*.1988; 1:887–896.
54. Chao H, Choo P, McEwen B. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptor mRNA expression in rat brain. *Neuroendocrinology* 50:365–371, 1989
55. Funder J. Adrenal steroids: New answers, new questions. *Science* 237:236–237, 1987
56. Herman J, Patel P, Akil H, Watson S. Localization and regulation of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor messenger RNAs in the hippocampal formation of the rat. *Mol. Endocrinol.*1989; 3:1886–1894.
57. Elizabeth Culotta and Daniel E. Koshland Jr (1992) "NO news is good news. (nitric oxide; includes information about other significant advances & discoveries of 1992) (Molecule of the Year)" *Science* 258 (5090): 1862–1864.
58. Stryer, Lubert (1995). *Biochemistry* 4th Edition, W.H. Freeman and Company, p. 732, ISBN 0-7167-2009-4
59. Liu Q, Gross SS (1996) "Binding sites of nitric oxide synthases" *Meth. Enzymol.*268: 311–324.
60. Phil Dash "Nitric Oxide", *Basic Medical Sciences*, St.George's, University of London
61. Gorczynski and Stanely, *Clinical Immunology*. Landes Bioscience; Austin, TX. ISBN 1570596255
62. Wink, DA; et.al. (1991) "DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors" *Science* 254 (5034): 1001–3
63. Nguyen, T; Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR (1992) "DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro". *Proc Natl Acad Sci USA* 89 (7): 3030–4.
64. Li, CQ; Pang B, Kiziltepe T, Trudel LJ, Engelward BP, Dedon PC, Wogan GN (2006). "Threshold Effects of Nitric Oxide-Induced Toxicity and Cellular Responses in Wild-Type and p53-Null Human Lymphoblastoid Cells". *Chem Res Toxicol* 19 (3): 399–406.
65. Hibbs, JB; Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM (1988). "Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule". *Biochem Biophys Res Commun* 157 (1): 87–94.
66. Shami, PJ; Moore, JO; Gockerman, JP; Hathorn, JW; Misukonis, MA; Weinberg, JB (1995). "Nitric oxide modulation of the growth and differentiation of freshly isolated acute non-lymphocytic leukemia cells". *Leukemia research* 19 (8): 527–33.
67. Surks, HK (2007). "cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms". *Circulation research* 101 (11): 1078–80.
68. Kaibori M., Sakitani K., Oda M., Kamiyama Y., Masu Y. and Okumura T. (1999). "Immunosuppressant FK506 inhibits inducible nitric oxide synthase gene expression

- at a step of NF- κ B activation in rat hepatocytes". *J. Hepatol.* 30 (6): 1138–1145.
69. [Http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/N/NO.html](http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/N/NO.html)
 70. Butler A. and Nicholson R.; "Life, death and NO." Cambridge 2003. ISBN 978-0-85404-686-7
 71. Stadtman ER (August 1992) "Protein oxidation and aging" *Science* 257 (5074): 1220–4.
 72. Ho YS, Magnenat JL, Gargano M, Cao J (1 October 1998). "The nature of antioxidant defense mechanisms: a lesson from transgenic studies". *Environ. Health Perspect.* 106 (Suppl 5): 1219–28.
 73. Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T (December 2003) "Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation" *J. Physiol. Pharmacol.* 54 (4): 469–87.
 74. Muller, F. L., Lustgarten, M. S., Jang, Y., Richardson, A. and Van Remmen, H. (2007). "Trends in oxidative aging theories" *Free Radic. Biol. Med.* 43 (4): 477–503.
 75. Patel RP, T Cornwell, Darley-Usmar VM (1999). "The biochemistry of nitric oxide and peroxynitrite: implications for mitochondrial function". In Packer L, Cadenas E. *Understanding the process of aging: the roles of mitochondria, free radicals, and antioxidants.* New York, N.Y: Marcel Dekker. pp. 39–56. ISBN 0-8247-1723-6
 76. Zhelong Xu, Xiang Ji, and Philip G. Boysen "Exogenous nitric oxide generates ROS and induces cardioprotection: involvement of PKG, mitochondrial KATP channels, and ERK", *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286:H1433-H1440, 2004. First published 4 December 2003;
 77. Davies, KJ (1995). "Oxidative stress: The paradox of aerobic life". *Biochemical Society symposium* 61: 1–31.
 78. "Lipid peroxidation in vivo, Evaluation and application of methods for measurement", *Acta Universitatis Upsaliensis.* Södergren E. 2000, pp 78; 949. ISBN 91-554-4791-0
 79. *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants*, vol 1 (1989), p209-221
 80. Sies, Helmut (1997). "Oxidative stress: Oxidants and antioxidants". *Experimental physiology* 82 (2): 291–5. 71.
 81. McCord JM, Fridovich I (1988). "Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988)". *Free Radic. Biol. Med.* 5 (5-6): 363–9.
 82. Tainer JA, Getzoff ED, Richardson JS, Richardson DC (1983). "Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase.". *Nature* 306 (5940): 284–7.
 83. Borgstahl GE, Parge HE, Hickey MJ, Beyer WF Jr, Hallewell RA, Tainer JA (1992). "The structure of human mitochondrial manganese superoxide dismutase reveals a novel tetrameric interface of two 4-helix bundles" *Cell* 71 (1): 107–18.

84. Barondeau DP, Kassmann CJ, Bruns CK, Tainer JA, Getzoff ED (2004) "Nickel superoxide dismutase structure and mechanism" *Biochemistry* 43 (25): 8038–47.
85. Wuerges J, Lee JW, Yim YI, Yim HS, Kang SO, Djinovic Carugo K (2004). "Crystal structure of nickel-containing superoxide dismutase reveals another type of active site" *Proc Natl Acad Sci* 101 (23): 8569–74
86. Nozik-Grayck E, Suliman H, Piantadosi C (2005). "Extracellular superoxide dismutase". *Int J Biochem Cell Biol* 37 (12): 2466–71.
87. 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 manganese superoxide dismutase". *Nat Genet* 18 (2): 159–63.
88. 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 superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury". *Nat Genet* 13 (1): 43–7.
89. <http://www.worthington-biochem.com/SODBE/default.html>
90. Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ (December 1995) "Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase" *Nat. Genet.* 11 (4): 376–81.
91. Muller FL, Song W, Liu Y, Chaudhuri A, Pieke-Dahl S, Strong R, Huang TT, Epstein CJ, Roberts LJ, Csete M, Faulkner JA, Van Remmen H "Absence of Cu/Zn superoxide dismutase leads to elevated oxidative stress and acceleration of age-dependent skeletal muscle atrophy". *Free Radic. Biol. Med.* 40 (11): 1993–2004. June 2006
92. Sentman ML, Granström M, Jakobson H, Reaume A, Basu S, Marklund SL (March 2006) "Phenotypes of mice lacking extracellular superoxide dismutase and copper- and zinc-containing superoxide dismutase". *J. Biol. Chem.* 281 (11): 6904–9.
93. Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, et al. (August 1993) "Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase" *Science* 261 (5124): 1047–51.
94. Conwit RA (December 2006). "Preventing familial ALS: a clinical trial may be feasible but is an efficacy trial warranted?" *J. Neurol. Sci.* 251 (1-2): 1–2.
95. Al-Chalabi A, Leigh PN (August 2000). "Recent advances in amyotrophic lateral sclerosis" *Curr. Opin. Neurol.* 13 (4): 397–405.
96. Groner Y, Elroy-Stein O, Avraham KB, Schickler M, Knobler H, Minc-Golomb D, Bar-Peled O, Yarom R, Rotshenker S (1994) "Cell damage by excess CuZnSOD and Down syndrome" *Biomed. Pharmacother.* 48 (5-6): 231–40.

97. Seguí J, Gironella M, Sans M, Granell S, Gil F, Gimeno M, Coronel P, Piqué JM, Panés J (September 2004). "Superoxide dismutase ameliorates TNBS-induced colitis by reducing oxidative stress, adhesion molecule expression, and leukocyte recruitment into the inflamed intestine". *J. Leukoc. Biol.* 76 (3): 537–44.
98. Campana F, Zervoudis S, Perdereau B, Gez E, Fourquet A, Badiu C, Tsakiris G, Koulaloglou S (2004) "Topical superoxide dismutase reduces post-irradiation breast cancer fibrosis" *J. Cell. Mol. Med.* 8 (1): 109–16.
99. Loew O (May 1900) "A New Enzyme of General Occurrence in Organisms" *Science (journal)* 11 (279): 701–702.
100. Sumner JB, Dounce AL (April 1937) "Crystalline catalase" *Science (journal)* 85 (2206): 366–367.
101. Sumner JB, Gralén N (March 1938) "The molecular weight of crystalline catalase" *Science (journal)* 87 (2256): 284–284.
102. Schroeder WA, Shelton JR, Shelton JB, Robberson B, Apell G (May 1969) "The amino acid sequence of bovine liver catalase: a preliminary report" *Arch. Biochem. Biophys.* 131 (2): 653–655.
103. Murthy MR, Reid TJ, Sicignano A, Tanaka N, Rossmann MG (October 1981) "Structure of beef liver catalase" *J. Mol. Biol.* 152 (2): 465–499.
104. Goodsell DS (2004-09-01) "Catalase" *Molecule of the Month*. RCSB Protein Data Bank.
105. Chelikani P, Fita I, Loewen PC (January 2004) "Diversity of structures and properties among catalases" *Cell. Mol. Life Sci.* 61 (2): 192–208.
106. Maehly A, Chance B (1954) "The assay of catalases and peroxidases" *Methods Biochem Anal. Methods of Biochemical Analysis* 1: 357–424.
107. Aebi H (1984). Aebi, Hugo. ed. "Catalase in vitro" *Meth. Enzymol. Methods in Enzymology* 105: 121–126.
108. "EC 1.11.1.6 - catalase". *BRENDA: The Comprehensive Enzyme Information System*. Department of Bioinformatics and Biochemistry, Technische Universität Braunschweig.
109. Toner K, Sojka G, Ellis R. "A Quantitative Enzyme Study; CATALASE" , 2007-02-11.
110. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) "Peroxisomes" *Molecular Biology of the Cell* (4th ed.). New York: Garland Science. ISBN 0-8153-3218-1.
111. Chelikani P, Fita I, Loewen P (2004) "Diversity of structures and properties among catalases" *Cell Mol Life Sci* 61 (2): 192–208.
112. Zámocký M, Koller F (1999) "Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis" *Prog Biophys Mol Biol* 72

- (1): 19–66.
113. "Catalase". Worthington Enzyme Manual. Worthington Biochemical Corporation. Retrieved 2009-03-01.
 114. Hengge A (1999-03-16). "Re: how is catalase used in industry?" General Biology. MadSci Network. Retrieved 2009-03-01.
 115. Textile industry. Case study 228. International Cleaner Production Information Clearinghouse. Retrieved 2009-03-01.
 116. Wood JM, Decker H, Hartmann H, Chavan B, Rokos H, Spencer JD, Hasse S, Thornton MJ, Shalhaf M, Paus R, Schallreuter KU (February 2009). "Senile hair graying: H₂O₂-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair". *FASEB J.* 23 (7): 2065–2075.
 117. Khan MA, Tania M, Zhang D, Chen H (2010) "Antioxidant enzymes and cancer" *Chin J Cancer Res* 22 (2): 87–92.
 118. Fiskum G. 2000 Mitochondrial participation in ischemic and traumatic neural cell death. *Journal of Neurotrauma*, Volume 17, Issue 10, Pages 843–855
 119. Ichas F and Mazat JP. 1998. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high- conductance state. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 1366, Issues 1–2, Pages 33–50.
 120. Alano CC, Beutner G, Dirksen RT, Gross RA, and Sheu S-S. 2002. Mitochondrial permeability transition and calcium dynamics in striatal neurons upon intense NMDA receptor activation. *Journal of Neurochemistry*, Volume 80, Issue 3, Pages 531-538.
 121. Haworth RA and Hunter DR. 1979. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 195, Issue 2, Pages 460-467.
 122. Crompton M. 1999 "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death" *Biochemical Journal*. Volume 341, Pages 233-249.
 123. Fiskum G. 2001 "Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of acute neuronal cell death" Chapter 16 In *Mitochondria in pathogenesis*. Lemasters JJ and Nieminen AL, eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York. Pages 317–331.
 124. Sullivan PG, Thompson M, and Scheff SW. (2000). Continuous infusion of Cyclosporin A postinjury significantly ameliorates cortical damage following traumatic brain injury. *Experimental Neurology*. Volume 161, Issue 2, Pages 631-637.
 125. Wu AH (January 1989) "Creatine kinase isoforms in ischemic heart disease". *Clin. Chem.* 35 (1): 7–13.

126. Borel JF (2002). "History of the discovery of cyclosporin and of its early pharmacological development". *Wien. Klin. Wochenschr.* 114 (12): 433–7.
127. Pritchard DI (2005) "Sourcing a chemical succession for cyclosporin from parasites and human pathogens". *Drug Discov. Today* 10 (10): 688–91.
128. "Ciclosporin Drug Discovery - A History" John Wiley & Sons. pp. 298–299
129. William F. Ganong. *Review of medical physiology*, 22nd edition, Lange medical books, chapter 27, page 530. ISBN 0-07-144040-2
130. Brustovetsky N, Brustovetsky T, Jemmerson R, and Dubinsky JM. 2002. Calcium induced cytochrome c release from CNS mitochondria is associated with the permeability transition and rupture of the outer membrane. *Journal of Neurochemistry*, Volume 80, Issue 2, Pages 207-218.
131. Garcia-Ruiz C, Colell A, Paris R, and Fernandez-Checa JC. 2000. Direct interaction of GD3 ganglioside with mitochondria generates reactive oxygen species followed by mitochondrial permeability transition, cytochrome c release, and caspase activation. *FASEB Journal*, Volume 14, Issue 7, Pages 847-858.
132. Nicholls DG and Brand MD. 1980. The nature of the calcium ion efflux induced in rat liver mitochondria by the oxidation of endogenous nicotinamide nucleotides. *Biochemical Journal*, Volume 188, Issue 1, 113-118
133. Gunter TE, Gunter KK, Sheu SS, and Gavin CE. 1994. [Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance.] *American journal of Physiology*, Volume 267, Issue 2, Pages C313-C339. PMID
134. Ichas F and Mazat JP. 1998. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high- conductance state. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 1366, Issues 1-2, Pages 33-50
135. Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, and Montal M. 1996. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *Journal of Neuroscience*, Volume 16, Issue 19, Pages 6125-6133.
136. <http://www.jbc.org/content/286/8/6345.long>
137. Fiskum G. 2001 "Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of acute neuronal cell death" Chapter 16 In *Mitochondria in pathogenesis*. Lemasters JJ and Nieminen AL, eds. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Pages 317–331
138. Sullivan PG, Thompson M, and Scheff SW. (2000). Continuous infusion of Cyclosporin A postinjury significantly ameliorates cortical damage following traumatic brain injury. *Experimental Neurology*. Volume 161, Issue 2, Pages 631-637.
139. Deniaud A, Sharaf El Dein O, Maillier E, Poncet D, Kroemer G, Lemaire C, Brenner

- C. 2007. Endoplasmic reticulum stress induces calcium-dependent permeability transition, mitochondrial outer membrane permeabilization and apoptosis. *Oncogene*, August 13, 2007, published online ahead of print.
140. Chinopoulos C, Starkov AA, Fiskum G. Cyclosporin A-insensitive permeability transition in brain mitochondria: Inhibition by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *J Biol Chem*. 2003 Jul 25; 278(30):27382-9.
 141. Friberg H and Wieloch T. 2002. Mitochondrial permeability transition in acute neurodegeneration. *Biochimie*, Volume 84, Issues 2-3, Pages 241-250.
 142. Brustovetsky N, Brustovetsky T, Purl KJ, Capano M, Crompton M, and Dubinsky JM. 2003 "Increased susceptibility of striatal mitochondria to calcium-induced permeability transition" *The Journal of Neuroscience*. Volume 23 Issue 12, Pages 4858-4867.
 143. Hunter DR and Haworth RA 1979 "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondrial transitional Ca²⁺-release" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 195, Issue 2, Pages 468-477.
 144. Beutner G, Rück A, Riede B, Brdiczka D. 1998 „Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases" *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 1368, Issue 1, Pages 7-18.
 145. Hunter DR and Haworth RA 1979 "The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria I. The protective mechanisms" *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Volume 195, Issue 2, Pages 453-459.
 146. Mitochondrial Permeability Transition (PT) from www.Celldeath.de
 147. Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, and Montal M. 1996 "Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity" *Journal of Neuroscience*, Volume 16, Issue 19, Pages 6125-6133.
 148. White RJ and Reynolds IJ. 1996. Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: An early signal specific to excitotoxin exposure. *Journal of Neuroscience*, Volume 16, Number 18, Pages 5688-5697.
 149. <http://www.jbc.org/content/286/8/6345.long>
 150. Stavrovskaya IG and Kristal BS 2005 "The powerhouse takes control of the cell: Is the mitochondrial permeability transition a viable therapeutic target against neuronal dysfunction and death?" *Free Radical Biology and Medicine*. Volume 38, Issue 6, Pages 687-697
 151. Büki A, Okonkwo DO, Wang KKW, and Povlishock JT. 2000 "Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury" *Journal of Neuroscience*. Volume

- 20, Issue 8, Pages 2825-2834
152. Luetjens CM, Bui NT, Sengpiel B, Münstermann G, Poppe M, Krohn AJ, Bauerbach E, Krieglstein J, and Prehn JHM. 2000. Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: Cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *The Journal of Neuroscience*, Volume 20, Issue 15, Pages 5715-5723.
 153. Kekelidze T., Khait I., Togliatti A., Benzecry J.M., Weiringa B., Holtzman D. Altered brain phosphocreatine and ATP regulation when mitochondrial creatine kinase is absent. *J. Neurosci. Res.* 2001; 66: 866-872.
 154. Theo Walliamann: Multiple functions of creatine kinase for cellular energetics a scientific rationale for creatine supplementation.
 155. Burdzhnanadze GM, Dachanidze NT, Karapetian MS, Menabde KO, Koshoridze NI. Energy exchange in the rat's brain during chronic stress *Georgian Med News.* 2009 Feb; (167):84-9.
 156. Upham B. I. Wanger J.G. Toxicant-induced Oxidative Stress in Cancer. *Toxicological Sciences* 2001,64 1-3
 157. Aksenov M.Y., Aksenova M.V., Butterfield D.A., Geddes J.W., Markesbery W.R. Protein oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *Neuroscience.* 2001; 103: 373-383
 158. Burklen T.S., Hirschy A., Willimann T. Brain-type creatine kinase BB-CK interacts with the Golgi Matrix Protein GM130 in early prophase. *Mol Cell Biochem.* 2007; 297: 53-64.
 159. Burklen T.S., Schlattner U., Homayouni R., Gough K., Rak M., Szeghalmi A., Willimann T. The Creatine Kinase/ Creatine connection to Alzheimer's Disease : CK-inactivation, APP-CK Complexes and Focal Creatine Deposits. *J Biomed Biotechnol.* 2006; 3:35936-35945
 160. Meyer L.E., Machado L.B., Santiago A.P., Da-Silva W.S., et.al. Mitochondrial creatine kinase activity prevents reactive oxygen species generation: antioxidant role of mitochondrial kinase-dependent ADP re-cycling activity. *J Biol Chem.* 2006; 281: 37361-37371
 161. Brustovetsky N, LaFrance R, Purl KJ, Brustovetsky T. et al. Age-dependent changes in the calcium sensitivity of striatal mitochondria in mouse models of Huntington's Disease. *J. Neurochem.* 2005; 93: 1361-1370
 162. Borja García-Bueno, José L. M. Madrigal, Beatriz G. Pérez-Nievas and Juan Carlos Leza. Stress mediators regulate brain prostaglandin synthesis and peroxisome proliferator-activated receptor-Activation after stress in rats
 163. Perasso L1, Cupello A, Lunardi GL, Principato C, Gandolfo C, Balestrino M. Kinetics of creatine in blood and brain after intraperitoneal injection in the rat.

- Brain Res. 2003 Jun 6;974(1-2):37-42
164. Xing, L and Remick, D.G. Mechanisms of Dimethyl Sulfoxide Augmentation of IL-1 β Production. *The Journal of Immunology*, 2005, 174:6195-6202
 165. De Robertis E. Structural components of the synaptic region.// *Handbook of Neurochemistry*, 1969-2- pp.365-372
 166. Pahan K., Liu X., McKinney M.J., Wood C., Sheikh F.G., Raymond J.R. Induction of nitric oxide synthase and activation of nuclear factor-kB in primary astrocytes. *J.Neurochem.* 2000.-v.74 -p. 2288-2295
 167. Uchiyama M, Michara M (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Biochem* 86; 271-384
 168. Skernyakov VI, Kozhemyakin LA, Smirnov VV (1988) Lipid Peroxidation Products in cerebrospinal fluid in patients with craniocerebral traumas. *Lab. Delo* 8; 14-16
 169. 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
 170. Koroliuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG, Tokarev VE (1988) Method for detection of catalase activity. *Lab Delo* 1; 16-9
 171. Kaptain S. Downey W.E. Tang C. Philpott C. Haile D, Orloff D. A regulated RNA binding protein also possesses aconitase activity. *Proc Natl. Acad Sci, USA* 1991, 88.
 172. Patel M1, Day BJ, Crapo JD, Fridovich I, McNamara JO. Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron.* 1996 Feb; 16(2):345-55.
 173. Abe K., Matsuki A. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) reduction activity and LDH release using MTT. // *J.Neurosci. Res.* -1974.-v.38.-p. 325-329.
 174. Shalev O, Lavi V, Hebbel RP, Eaton JW. Erythrocyte (Ca²⁺ + Mg²⁺)-ATPase activity: increased sensitivity to oxidative stress in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Am J Hematol.* 1985 Jun; 19(2):131-6.
 175. Bartels, H. et.al. *Clin.Chim. Acta* 32, 81 (1971)
 176. Popper, H. et.al. *Biochem.Zeitschr.* 291, 354 (1937)
 177. Schumann, G. et.al. *Clin Chem Acta*, 327, 69-79 (2003)
 178. Klauke, R. et. al.*Eur.J.Clin.Chem.Clin.Biochem.* 15, 901-909 (1993)
 179. Arias A1, Ormazabal A, Moreno J, González B, Vilaseca MA, García-Villoria J, Pàmpol T, Briones P, Artuch R, Ribes A. Methods for the diagnosis of creatine deficiency syndromes: a comparative study. *J Neurosci Methods.* 2006 Sep 30;156(1-2):305-9.
 180. Szasz, G. Gruber, W. and Bernt, E. 1976 *Clinical Chemistry* 22, 650-656

181. Tietz, N. W. (ed.), *Clinical Guide to Laboratory test*; 3rd edition, WB Saunders Co, (1995)
182. Brookes P.S., Darley-Usmar V.M. "Role of Calcium and Superoxide Dismutase in Sensitizing mitochondria to Peroxynitrite-induced Permeability Transition" *Am. J. Physiol Hearty Circ. Physiol.* - 2004 - 286, #1 - P.H39-H46
183. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., (1951) Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent *J. Biol. Chem.*, 193 ,265-275.
184. Brennan, M., Vega, M., Garcia, I., Abad, A., & Friedman, M.B. (2005). Meeting the mental health needs of elderly Latinos affected by depression: implications for outreach and service provision. *Care Management Journals*, 6(2), 98-106.
185. Anisimov VN, Vinogradova IA, Panchenko AV, Popovich IG, Zabezhinski MA. Light-at-night-induced circadian disruption, cancer and aging. *Curr Aging Sci.* 2012 Dec;5(3):170-7.
186. Eckel-Mahan K, Sassone-Corsi P; Metabolism and the circadian clock converge, *Physiol Rev.* 2013 Jan;93(1):107-35.
187. Sinner C, Kaehler ST, Philippu A, Singewald N. 2001. Role of nitric oxide in the stress-induced release of serotonin in the locus coeruleus. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 364:105–109.
188. Malkesman O, Maayan R, Weizman A, Weller A. 2006. Aggressive behavior and HPA axis hormones after social isolation in adult rats of two different genetic animal models for depression. *Behav Brain Res.* 175:408–414.
189. Volden PA, Wonder EL, Skor MN, Carmean CM, Patel FN, Ye H, Kocherginsky M, McClintock MK, Brady MJ, Conzen SD; Chronic social isolation is associated with metabolic gene expression changes specific to mammary adipose tissue. *Cancer Prev Res (Phila).* 2013 Jul;6(7):634-45.
190. Djordjevic J, Djordjevic A, Adzic M, Radojcic MB; Effects of chronic social, isolation on Wistar rat behavior and brain plasticity marker; *Neuropsychobiology.* 2012;66(2):112-9.
191. Carmen Rodriguez, Vanesa Martín, Federico Herrera, Guillermo García-Santos, Jezabel Rodriguez-Blanco, Sara Casado-Zapico, Ana María Sánchez-Sánchez, Santos Suárez, Noelia Puente-Moncada, María José Anítua and Isaac Antolín; Mechanisms Involved in the Pro-Apoptotic Effect of Melatonin in Cancer Cells; *Int. J. Mol. Sci.* 2013, 14, 6597-6613
192. Cemil Tümera, Hakkı Murat Bilginb, Basra Deniz Obayb, Hüda Dikenb, Mukadder Atmacab, Mustafa Kelleb; Effect of nitric oxide on phagocytic activity of lipopolysaccharide-induced macrophages: Possible role of exogenous l-arginine; *Cell Biology International*, Volume 31, Issue 6, June 2007, Pages 565–569

193. Taotao Weia, Chang Chena, Jingwu Houa, Wenjuan Xina, Akitane Morib; Nitric oxide induces oxidative stress and apoptosis in neuronal cells; *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Volume 1498, Issue 1, 20 October 2000, Pages 72–79
194. Nukala, Vidya Nag, "ROLE OF CALCIUM AND NITRIC OXIDE SYNTHASE (NOS) IN BRAIN MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION" (2007). Theses and Dissertations--Anatomy and Neurobiology. Paper 8.
195. Brennan SC, Conigrave AD. Regulation of cellular signal transduction pathways by the extracellular calcium-sensing receptor; *Curr Pharm Biotechnol*. 2009 Apr;10(3):270-81.
196. Rasola A, Bernardi P.; Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis; *Cell Calcium*. 2011 Sep;50(3):222-33
197. William A. Catterall, *Voltage-Gated Calcium Channels*, Cold Spring Harb Perspect Biol 2011
198. Delivoria-Papadopoulos M, Ashraf QM, Mishra OP. 2008. Effect of hypoxia on expression of apoptotic proteins in nuclear, mitochondrial and cytosolic fractions of the cerebral cortex of newborn piglets: the role of nuclear Ca²⁺-influx. *Neurochem Res*. 33:1196–1204.;
199. Huang H, Nagaraja RY, Garside ML, Akemann W, Knöpfel T, Empson RM. 2010. Contribution of plasma membrane Ca²⁺ ATPase to cerebellar synapse function. *World J Biol Chem*. 5: 95–102.
200. Marisa Brini and Ernesto Carafoli; The Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium; *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011 Feb;
201. Congwu Du, Mei Yu, Nora D. Volkow, Alan P. Koretsky, Joanna S. Fowler and Helene Benveniste; Cocaine Increases the Intracellular Calcium Concentration in Brain Independently of Its Cerebrovascular Effects, *The Journal of Neuroscience*, 8 November 2006, 26(45): 11522-11531;
202. RON KOHEN1 AND ABRAHAM NYSKA Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification *TOXICOLOGIC PATHOLOGY*, vol 30, no 6, pp 620–650, 2002
203. Uli Miller and Gerd Bicker, Calcium-activated Release of Nitric Oxide and Cellular Distribution of Nitric Oxide-Synthesizing Neurons in the Nervous System of the Locust *The Journal of Neuroscience*, December 1994, 74(12): 7521-7528.
204. [Http://www.spingerlink.com/content/wh03133240567463](http://www.spingerlink.com/content/wh03133240567463)
205. Martin LJ, Adams NA, Pan Y, Price A, Wong M.; The mitochondrial permeability

- transition pore regulates nitric oxide-mediated apoptosis of neurons induced by target deprivation; *J Neurosci.* 2011 Jan 5;31(1):359-70.
206. Rasola A, Bernardi P; The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 2007, 12:815-833
 207. Mullauer FB, Kessler JH, Medema JP. Betulinic acid induces cytochrome c release and apoptosis in a Bax/Bak-independent, permeability transition pore dependent fashion. *Apoptosis.* 2009 Feb;14(2):191-202.
 208. Dzaja PP, Terzic A; Phosphotransfer networks and cellular energetics; *J Exp Biol* 2003, 206:2039-2047
 209. Brosnan JT, Brosnan ME. Creatine: endogenous metabolite, dietary, and therapeutic supplement. *Annu Rev Nutr.* 2007; 27:241-61.
 210. T Wallimann, M Wyss, D Brdiczka, K Nicolay, H M Eppenberger (1992) Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 281
 211. Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, et al.; Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* 2002;959:199–213.
 212. Bothwell, J.H., Rae, C., Dixon, R.M., Styles, P., and Bhakoo, K.K., 2001, Hypo-osmotic swelling activated release of organic osmolytes in brain slices: implications for brain oedema in vivo. *J. Neurochem.* 77: 1632-1640
 213. Galbraith, R.A., Furukawa, M., and Li, M., 2006, Possible role of creatine concentrations in the brain in regulating appetite and weight. *Brain Res.* 1101: 85-91.
 214. Béard E, Braissant O. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. *J Neurochem.* 2010 Oct;115(2):297-313.
 215. Cagnon L, Braissant O. Hyperammonemia-induced toxicity for the developing central nervous system. *Brain Res Rev.* 2007 Nov;56(1):183-97.
 216. Donnan, G.A., M. Fisher, M. Macleod and S.M. Davis, 2008. Stroke. *Lancet*, 371: 1612-1623.
 217. Beal MF. Energetics in the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *TINS.* 2000;23:298–304
 218. Tanja S. Bürklen, Uwe Schlattner, Ramin Homayouni, Kathleen Gough, Margaret Rak, Adriana Szeghalmi, Theo Wallimann The Creatine Kinase/Creatine Connection to Alzheimer's Disease: CK Inactivation, APP-CK Complexes, and Focal Creatine Deposits *J Biomed Biotechnol.* 2006; 2006:35936.
 219. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики 1979
 220. Peter J. Adhietty and M. Flint Beal Creatine and Its Potential Therapeutic Value

- for Targeting Cellular Energy Impairment in Neurodegenerative Diseases
Neuromolecular Med. 2008; 10(4): 275–290.
221. Nulton-Persson AC, Szveda LI. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 2001;276:23357–61.
 222. Schurr A. Lactate, glucose and energy metabolism in the ischemic brain (Review); *Int J Mol Med.* 2002 Aug; 10(2):131-6.
 223. Braissant O, Henry H, Loup M, Eilers B, Bachmann C Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study *Brain Res Mol Brain Res.* 2001 Jan 31; 86(1-2):193-201
 224. Olivier Braissant, Claude Bachmann, Hugues Henry Expression and function of AGAT, GAMT and CT1 in the mammalian brain. *Subcell Biochem* 2007 ;46:67-81
 225. Sumio Ohtsuki, Masanori Tachikawa, Hitomi Takanaga, Hidemi Shimizu, Masahiko Watanabe, Ken-ichi Hosoya, and Tetsuya Terasaki The Blood–Brain Barrier Creatine Transporter Is a Major Pathway for Supplying Creatine to the Brain *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 22:1327–1335 © 2002
 226. Christie DL; Functional insights into the creatine transporter. *Subcell Biochem.* 2007;46:99-118.
 227. O. Moe and R. Cornelius, *Enzyme Kinetics*, *J. Chem. Educ.* 65, 137 (1988)
 228. Urdal P, Stromme JH; Effects of Ca, Mg and EGTA on creatine activity in cerebrospinal fluid. *Clin Chem* 1979;25:147-150
 229. Peter J. Adhietty and M. Flint Beal; Creatine and Its Potential Therapeutic Value for Targeting Cellular Energy Impairment in Neurodegenerative Diseases *Neuromolecular Med.* 2008 ; 10(4): 275–290.
 230. Patricia J. Allen, Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value? *Neurosci Biobehav Rev.* 2012 May; 36(5): 1442–1462.
 231. Braissant O, Henry H, Béard E, Uldry J.; Creatine deficiency syndromes and the importance of creatine synthesis in the brain. *Amino Acids.* 2011 May;40(5):1315-24.
 232. Longo N, Ardon O, Vanzo R, Schwartz E, Pasquali M.; Disorders of creatine transport and metabolism. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2011 Feb 15;157C(1):72-8.
 233. Braissant O, Henry H, Loup M, Eilers B, Bachmann C; Endogenous synthesis and transport of creatine in the rat brain: an in situ hybridization study; *Brain Research. Molecular Brain Research* 2001, 86(1-2):193-201
 234. Gregory J. Brewer and Theo W. Wallimann; Protective Effect of the Energy Precursor Creatine Against Toxicity of Glutamate and b-Amyloid in Rat

Hippocampal Neurons Journal of Neurochemistry Lippincott Williams & Wilkins, Inc., Philadelphia 2000 International Society for Neurochemistry

235. Dolder M., Walzel B., Speer O. et.al “Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates” J. Biol. Chem. 2003; 278:17760-17766

გამოქვეყნებული პუბლიკაციები:

1. Changes in activity of hippocampus creatine kinase under circadian rhythm disorders; GM Burjanadze, ZT Kuchukashvili, MV Chachua, KO Menabde, *Biological Rhythm Research* 45 (5), 685-697; 2014
2. "Functioning of the Antioxidant System under Psycho-Emotional Stress" Natalia Dachanidze, George Burjanadze, Zurab Kuchukashvili, Ketevan Menabde, Nana Koshoridze; *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, Vol. 9 No. 4 2013, pp. 122-131
3. „Lipid Peroxidation and Antioxidant System Activity Changes of Rat Blood and Cardiac Muscle Cells Under Chronic Stress" Natalia Dachanidze, George Burjanadze, Zurab Kuchukashvili, Ketevan Menabde, Nana Koshoridze; 2013, *International Journal of Biochemistry and Biophysics* 1(1): 16-21
4. "Long-lasting stress, quantitative changes in nitric oxide concentration and functional state of brain mitochondria"; Kuchukashvili Z, Burjanadze G, Menabde K, Chachua M, Dachanidze N, Mikadze M, Koshoridze N., *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2012; 72(1):40-50
5. "Brain mitochondria and long-lasting psycho-emotional stress" Z Kuchukashvili, N Koshoridze, K Menabde, G Burjanadze, M Chachua, *FEBS JOURNAL*, 2012; Volume 279, pp 198-198
6. "Tissue specificity of lipid peroxidation under emotional stress in rats"; Menabde KO, Burdzhnanadze GM, Chachua MV, Kuchukashvili ZT, Koshoridze NI., *Ukr Biokhim Zh.* 2011; 83(3):85-90.
7. "Functional state of rat cardiomyocytes and blood antioxidant system under psycho-emotional stress"; Kuchukashvili Z, Menabde K, Chachua M, Burjanadze G, Chipashvili M, Koshoridze N., *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2011; 43(6):480-6.
8. "Functional Status of Mitochondrial Pore in the Brain of Laboratory Rats Subjected to Prolonged Emotional Stress" G Burjanadze, K Menabde, M Gavashelidze, Z

Kuchukasvili, N Koshoridze, 2009, Journal of Stress Physiology & Biochemistry, 7(4): 88-96.

9. "P-149 Energetic Changes in Heart Cells of White Rats in Conditions Stress Induced by Violated Durinal Cycle" Tengiz Samkharadze, Nana Koshoridze, Manana Chipashvili, Margarita Karapetiani, George Burjanadze, Natalia Dachanashvili, CVD Prevention and Control, Elsevier, volume 4, p. S94, 2009

10. "Energy exchange in the rat's brain during chronic stress" GM Burdzhanadze, NT Dachanidze, MS Karapetian, KO Menabde, NI Koshoridze, 2009, Georgian Med News.2(167):84-9

სამეცნიერო კონფერენციები:

1. "Impact of psycho-emotional stress on activity of brain antioxidant system and energy metabolism in naturally aggressive (killer) animals"; 9th forum of Neuroscience, FENS; Milan, Italy 2014
2. "Psycho-emotional stress and antioxidant system in brain mitochondria"; Cell Symposia Mitochondria: from Signaling to Disease; Lisbon, Portugal, 2013
3. "Changes in Activity of Creatine kinase and Functional State of Mitochondria under Stress Conditions"; Tbilisi International Conference. Merging neuroscience and medicine: Implications for brain disorders, Tbilisi, Georgia, 2013
4. "Functional Status of Brain Mitochondria under Psycho-Emotional Stress", 8th IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy, 2011
5. "Functional State of Rat Cardiomyocytes and Blood Antioxidant System under Psycho-Emotional Stress", International Medical Student Congress, OMU, Samsun, Turkey, 2011
6. "Pro- and Antioxidant System in Cardiac Histiocytes and Blood under Stress Caused by Isolation and Violation of Diurnal Cycle", XXVI National Congress of Cardiology Boards, Turkish Society of Cardiology, Istanbul, Turkey, 2010
7. "The Changes of Some Kinetic Parameters of Creatinephosphokinase (CPK) During Isolative Stress and Diurnal Cycle Disorders", 14th Annual Symposium for Biology Students in Europe – SymBioSE'10, Eskisehir, Turkey; 2010
8. "Rat Brain H-Ras protein levels, CK and Succinate Dehydrogenase Activity Changes Caused by Isolative Stress", 12th Annual Symposium for Biology Students in Europe – SymBioSE'08, Coimbra-Aveiro, Portugal, 2008