ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტის სამაგისტრო პროგრამის ბიოლოგიის მაგისტრანტის

ნინო პაპელიშვილის

სამაგისტრო ნაშრომი

ქრონიკული სტრესის პირობებში თავის ტვინის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზე კრეატინის პროტექტორული ეფექტის მოლეკულური მექანიზმის შესწავლა

ხელმძღვანელი - პროფ. ნანა კოშორიძე

თანახელმძღვანელი - ასისტ. პროფესორი გიორგი ბურჯანაძე

თბილისი - 2019

სარჩევი

ანოტაცია 3
Annotation 4
შესავალი 5
I.1 სტრესი და მისი გამომწვევი ფაქტორები 8
I.1.1. სტრესის ფორმები 9
I.1.2.ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესი 13
I.2. კრეატინი 15
I.2.1. კრეატინის სინთეზი 16
I.2.2. კრეატინის ტრანსპორტი ცნს-ში 17
I.2.3. კრეატინის ფუნქცია 18
I.3. უჯრედის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ფერმენტის დახასიათება 19
I.3.1. კრეატინფოსფოკინაზა 19
I.3.2. ალდოლაზა 20
I.3.3. კრებსის ციკლის ზოგიერთი ფერმენტი 21
I.4 PI3K/Akt/mTOR სასიგნალო გზის კომპონენტები 22
I.4.1 ფოსფატიდილ ინოზიტოლ-3 კინაზა (PI3K) 23
I.4.2 პროტეინ კინაზა B- ცილა Akt 24
I.4.4 ეუკარიოტული ტრანსლაციის ინიციაციის ფაქტორის E4-ის დამაკავშირებელი ცილა 27
4E-BP1 27
I.4.5 რიბოსომული ცილის კინაზა S6K1 28
II თავი. კვლევის ობიექტი და გამოყენებული მეთოდები 31
II.1 კვლევის ობიექტი 31
II.2 ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობის განსაზღვრა 32
II.3. ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობის განსაზღვრა 32
II.4 ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა 32
II.5. ფერმენტ ალდოლაზას აქტივობის განსაზღვრა 33
II.6. ფერმენტ კრეატინკინაზას (CrK) აქტივობის განსაზღვრა 33
II.7 ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდის აღწერა 34
II.8. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ლოურის მეთოდით 35

II.9.მიღებულ მონაცემთა სტატისტიკური ანალიზი 36

III თავი. მიღებული შედეგები.....37

III.1. ჰიპოკამპის უჯრედებში ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ფერმენტის აქტივობის ცვლილებები ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის დროს 37

III.2. კრეატინკინაზას კინეტიკური პარამეტრების (Vmax, Km) ცვლილება ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში.....39

III.3. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა PI3K / Akt / mTOR სასიგნალო გზაზე.....40

Vთავი. მიღებული შედეგები 49

დასკვნა.....50

გამოყენებული ლიტერატურა 51

ანოტაცია

ცნობილია, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის რღვევა განაპირობებს უჯრედული მეტაბოლიზმის ცვლილებას და ქრონიკული სტრესის ჩამოყალიბებას, რაც გულისხმობს როგორც უჯრედის ენერგეტიკულ სტატუსის, ასევე სინთეზური რექციების ინტენსივობის შემცირებას. ამის გათვალისწინებით, ისეთი ნაერთების მოძიება, რომლებსაც შეუძლიათ სტრესული მდგომარეობის პრევენცია, განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია. ამის გათვალისწინებით ჩვენი ყურადღება მიიპყრო კრეატინმა. წარმოადგენს რა ძუძუმწოვრებში ენდოგენურ ნაერთს, იგი ასევე გამოიყენება, როგორც საკვები დანამატი და მნიშვნელოვან როლს ასრულებს როგორც მის ცხოველქმედებაში, ასევე გამოიყენება ზოგიერთი ნეიროდეგენერაციული დაავადების თერაპევტიულ საშუალებად.

ჩატარებულმა კვლევებმა აჩვენა, რომ ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევის პირობებში კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა ხელს უწყობს ენერგეტიკულ პროცესებში ჩართული მიტოქონდრიული ფერმენტების აქტივაციას ჰიპოკამპის უჯრედებში და ამის ძირითად მიზეზს წარმოადგენს ამ პირობებში სინთეზური პროცესების გაძლიერება. იმის გათვალისწინებით, რომ ენერგეტიული პროცესების რეგულირების ცენტრალურ სასიგნალო მოლეკულას წარმოადგენს mTOR, ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა მისი რაოდენობრივი ცვლილებები ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში და კრეატინის ეფექტი ამ ცვლილებებზე. ნანახი იქნა, რომ კრატინის ეგზოგენური დამატება ზრდის ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში შემცირებული როგორც ფოსფორილირებული mTOR-ის, ასევე მისი აქტივატორის AKT-ს რაოდენობას. ამ ვარაუდს ადასტურებს ასევე ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემებიც, სადაც ნანახია სტრესის პირობებში AKT-ს უარყოფითი რეგულატორის ცილა PTEN-ის აქტივაცია. როგორც წარმოდგენილი, ასევე ჩვენი წინა კვლევების შედეგებზე დაყრდნობით, გამოთქმულია მოსაზრება, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში PTEN-ის გააქტიურებისა და შესაბამისად, AKT-სა და mTOR-ის აქტივობის შემცირების მიზეზი შესაძლებელია იყოს ჰიპოკამპის უჯრედებში NMDA-რეცეპტორის ჰიპერაქტივაცია და ამის შედეგად Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი მატება. ამდენად, სავარუდოა, რომ კრეატინის დადებითი როლი ამ პროცესებზე გამოწვეული იყოს მისი მოდულატორული ეფექტით NMDA-რეცეპტორზე, რაც ამცირებს Ca^{2+}-ის იონების რაოდენობასა და აქვეითებს PTEN-ის აქტივაციის ხარისხს, რაც თავის მხრივ, ზრდის როგორც აქტივირებული AKT-ს, ასევე აქტივირებული mTOR-ის შემცველობასაც.

Annotation

It is well known that disruption of natural Circadian Rhythm lead to changes in the cellular metabolism and development of chronic stress, which involves reduction in the energetic status of individual cells, as well as, intensity of synthetic reactions. Considering the above mentioned, it is crucial to discover substances that can prevent the development of these processes during stressful conditions. Our attention was drawn to Creatine. It is an endogenous substance in the mammals, used as a supplement during strenuous physical exertion and also used as a therapeutic means for certain neurodegenerative diseases.

The conducted experiments showed that intraperitoneal injections of Creatine during prolonged disruption of Circadian Rhythm, assist in activation of Mitochondrial enzymes involved in energy metabolism in Hippocampal cells. Since, central regulatory substance in processes of energy metabolism is signaling molecule, mTOR, we studied its quantitative changes during prolonged disruption of Circadian Rhythm and influence of exogenous Creatine. The results revealed that exogenous supplementation of Creatine increases the amount of phosphorylated mTOR, as well as its activator – AKT, which were originally decreased as a result of stress conditions and express weakened energy metabolism processes. This assumption is also confirmed by our data, which show the activation of negative regulator of AKT, PTEN. Thus, we hypothesize based on this, as well as, our past results that activation of PTEN and consequently, reduction in the activities of AKT and mTOR in Hippocampal cells during stress conditions caused by disruption of Circadian Rhythm, are the result of hyperactivation of NMDA receptors, which led to increased concentration of Ca^{2+}. Consequently, it can be assumed that the positive role of Creatine on these processes is exerted via its modulatory effects on NMDA receptors that causes lowering of Ca^{2+} concentration and thus, lowering of PTEN activation, which increases quantity of activated AKT, as well as, activated mTOR.

შესავალი

სტრესი ანუ „ორგანიზმის არასპეციფიური პასუხი გარეგან ცვლილებაზე“ და მისი მოქმედების ბიოქიმიური და ფიზიოლოგიური მექანიზმების შესწავლა თანამედროვე მეცნიერების ერთ-ერთ აქტუალურ საკითხს წარმოადგენს. მიუხედავად იმისა, რომ მსგავსი ზემოქმედება ხშირ შემთხვევაში აუცილებელი ფაქტორია გარემოში ადაპტაციისთვის, ხანგრძლივად მიმდინარე სტრესი არღვევს ორგანიზმის სხვადასხვა სისტემის ნორმალურ მოქმედებას და უარყოფითად აისახება მათ ფუნქციონირებაზე. სტრესის უარყოფითი ეფექტის მიზეზი ორგანიზმზე გამოიხატება ფერმენტული სისტემების აქტივობის, ორგანიზმის ჰორმონალური სტატუსისა და ბიოლოგიურად აქტიური მოლეკულების რაოდენობრივ ცვლილებაში, ასევე უჯრედული მეტაბოლიზმის დარღვევაში, გენეტიკური აპარატის გააქტიურებასა და სხვა მნიშვნელოვან პროცესებში. აღსანიშნავია, რომ სტრესს-ფაქტორების ხანმოკლე ზემოქმედებას მოსდევს უჯრედის ფუნქციური გააქტიურება, თუმცა სტრესის გახანგრძლივების შედეგად განვითარებული მეტაბოლური ცვლილებები ხშირ შემთხვევაში სხვადასხვა პათოლოგიების გამომწვევი ფაქტორად გვევლინება.

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

ორგანიზმზე სტრესის ზემოქმედების ძირითადად მიზეზად ითვლება ამ პირობებში სხვადასხვა ბიოლოგიურად აქტიური მოლეკულებისა და იონების, განსაკუთრებით კი კალციუმის-Ca^{+2} იონის ჭარბი რაოდენობით დაგროვება, რაც უარყოფით გავლენას ახდენს როგორც ზოგადად უჯრედის, აგრეთვე ნერვული სისტემის უჯრედების ფუნქციონირებაზე. უჯრედზე სტრესის ზემოქმედების საბოლოო ეტაპად, მიიჩნევა იქ მიმდინარე ჟანგვითი პროცესების გაძლიერება და ოქსიდაციური სტრესის ჩამოყალიბება, რაც თავის მხრივ ცილოვანი მოლეკულების, მათ შორის ფერმენტების სტრუქტურულ-ფუნქციურ ცვლილებებსა და ასევე ლიპიდების შემადგენლობაში არსებული ცხიმოვანი მჟავების (განსაკუთრებით უჯერი ცხიმოვანი მჟავების) გაძლიერებულ ჟანგვასა და ე.წ. ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის აქტივაციას იწვევს.

ზემოთაღნიშნული ეფექტების გამომწვევი სტრეს-ფაქტორები საკმაოდ მრავალფეროვანია და მათ შორის აღსანიშნავია ხანგრძლივი პერიოდით ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის (ე.წ. ცირკადული რიტმი) დარღვევა. დადასტურებულია, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქო - სოციალურ სტრესი ორგანიზმში მიმდინარეობს სხვადასხვა ნეიროტრანსმიტერებისა და გლუკოკორტიკოიდული ჰორმონების რაოდენობრივი ცვლილებების ფონზე, რაც თავის მხრივ, გავლენას ახდენს მეხსიერებისა და დასწავლის პროცესზე და ასევე ინდივიდთა ემოციურ მდგომარეობაზე და ხშირ შემთხვევაში, ნეიროტოქსიკური ეფექტით ხასიათდება.

ფიზიოლოგიური პროცესების დროში ორგანიზირება წარმოადგენს ბიოლოგიური სისტემის ფუნდამენტურ თვისებას, რომელიც დამახასიათებელია ყველა დონის ცოცხალი მატერიისათვის. ბიოლოგიური დროის სისტემების ჩამოყალიბება მიმდინარეობს განსაზღვრული გენეტიკური პროგრამით, რომლის დარღვევა ორგანიზმისათვის დამახასიათებელი უჯრედული ჰომეოსტაზის შეცვლას იწვევს. იმ ფაქტორებს შორის, რომლებიც განსაზღვრავენ ორგანიზმში მიმდინარე პროცესების რიტმულობას, განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია სინათლისა და სიბნელის კანონზომიერი ცვლილება - ე.წ. *ცირკადული რიტმი,* რომლის დარღვევა ხშირ შემთხვევაში აისახება უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის ცვლილებით, სტრესული პროცესების განვითარებისა და მისი შედეგების მიზეზი ხდება.

მიუხედავად იმისა, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში მიმდინარე ბიოქიმიურ ცვლილებებთან დაკავშირებით მრავალი კვლევაა ჩატარებული, ჯერ კიდევ არ არის ბოლომდე გარკვეული ამ პირობებში თავის ტვინში მიმდინარე ცვლილებების მოლეკულური მექანიზმები. კერძოდ, არ არის ბოლომდე გარკვეული ამ პირობებში ენერგეტიკული ცვლილებების მოლეკულური მექანიზმები, რაც თავის მხრივ, მრავალი ნეიროდეგენერაციული პათოლოგიების მიზეზი ხდება. ცნობილია, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის განხორციელებას განაპირობებს სპეციფიკური გენები, რომელთა მიერ კოდირებული ცილები, (რომლებიც წარმოადგენენ ტრანსკრიფციულ ფაქტორებს) დიდწილად განსაზღვრავენ უჯრედული მეტაბოლიზმისათვის, მათ შორის ენერგეტიკულის მეტაბოლიზმისათვის დამახასიათებელ ცირკადულ პროცესებს. ამ ცილების მოქმედების მექანიზმი დამყარებულია უჯრედისათვის დამახასითებელი სასიგნალო რეგულაციურ გზებზე ზემოქმედებით.

ყოველივე ზემოთთქმულის გათვალისწინებით,განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია ისეთი ნივთიერებების მოძიება, რომლებსაც შესწევთ უნარი მოახდინონ სტრესული მდგომარეობის

პრევენცია. დღესდღეობით ცნობილია მთელი რიგი ნაერთებისა, რომლებიც ამ მიზნით აქტიურად გამოიყენება პრაქტიკაში. მათ შორის განიხილება კრეატინი (α-N-მეთილგუანიდინო აცეტილის მჟავა).

კრეატინი (Cr - N-[aminoiminomethyl]-N-methyl glycine) წარმოადგენს ორგანულ ნაერთს, რომელიც ფოსფოკრეატინთან (PCr) ერთად მნიშვნელოვან როლს ასრულებს უჯრედში მიმდინარე ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში. რეაქცია კრეატინსა და ფოსფოკრეატინს შორის კატალიზირდება ფერმენტ კრეატინკინაზით (CK), რომლის იზოფორმები თითქმის ყველა ტიპის უჯრედებში გვხვდება, თუმცა მისი განსაკუთრებული აქტიურობით ხასიათდება მაღალი ენერგეტიკული მოთხოვნილების მქონე ქსოვილები, როგორიცაა კუნთი და ტვინი. ენერგეტიკული ფუნქციის გარდა, Cr ორგანიზმში სავარაუდოდ სხვა პროცესებშიაცაა ჩართული. მაგალითად, ნერვული იმპულსის გადაცემა, მემბრანული პოტენციალისა და იონური გრადიენტის შენარჩუნება, უჯრედული ჰომეოსტაზი, უჯრედშიდა სასიგნალო გზების გააქტიურება, აქსონალური და დენდრიტული ტრანსპორტი და სხვა მნიშვნელოვანი პროცესები. ლიტერატურული მონაცემების გათვალისწინებით, Cr ასევე განიხილება როგორც ნეირომოდულატორი, რომელსაც შეუძლია მოახდინოს ზოგიერთი პოსტსინაფსური რეცეპტორების აქტივობის მოდულირებაც. ნევროლოგიური დაავადებების მრავალფეროვნება, რომლებიც შეინიშნება კრეატინის დეფიციტის შემთხვევაში, მიუთითებს მის მნიშვნელობაზე ფსიქომოტორული განვითარებისა და შემეცნებითი ფუნქციების რეალიზირების პროცესშიც.

ექსპერიმენტის მიზანი : ზემოთმულიდან გამომდინარე, ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა შეგვეწავლა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მიმდინარე სტრესის პირობებში ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედებში ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის თავისებურება და მისი პრევენცია ეგზოგენურად შეყვანილი Cr-ის მონაწილეობით. ასევე დაგვედგინა ამ პროცესის მიმდინარეობის ზოგიერთი თავისებურება.

I თავი.ლიტერატურული მიმოხილვა

I.1 სტრესი და მისი გამომწვევი ფაქტორები

სტრესი წარმოადგენს ორგანიზმის საპასუხო რეაქციას გარემოს ცვლილებებზე. სტრესის ფიზიოლოგიური და ფსიქოლოგიური ასპექტები პირველად კანადელმა ფიზიოლოგმა და ენდოკრინოლოგმა ჰანს სელიემ შეისწავლა. 1936 წელს ჟურნალ "Nature-ში" მან გამოაქვეყნა მოკლე ინფორმაცია "ადაპტაციური სინდრომის" შესახებ. სწორედ ეს პუბლიკაცია მიიჩნევა სტრესის შესწავლის პირველ მცდელობად. სელიეს განმარტებით, სტრესი წარმოადგენს ორგანიზმის ისეთ მდგომარეობას რომელსაც მისი დასუსტება და ორგანოთა სისტემების ფუნქციათა დარღვევა ახასიათებს. ტერმინი "სტრესი" მოგვიანებით გაჩნდა, რაც ინგლისური სიტყვაა და დაძაბულობას ნიშნავს.

სტრესი წარმოადგენს ორგანიზმის არასპეციფიური რეაქციების ერთობლიობას, რომელიც წარმოიქმნება ცოცხალი ორგანიზმის გარე სამყაროში მიმდინარე ცვლილებებისადმი ადაპტაციას შედეგად და აღძვრება ამ რეაქციების ძლიერი ზემოქმედებით, რომელთა საბოლოო მიზანს წარმოადგენს ორგანიზმის სარეზერვო ძალების მობილიზება. სელიეს კონცეფციის გათვალისწინებით, სტრესული მდგომარეობა ვლინდება იმ პირობებში, როცესაც ინდივიდისადმი წაყენებული მოთხოვნები აღემატება იმ პერსონალურ და სოციალურ რესურსებს, რომლის მობილიზაციის უნარიც მას შესწევს.

ფიზიოლოგიური და ფსიქოლოგიური ცვლილებების გარდა, სტრესის პირობებში ორგანიზმში აქტიურად მიმდინარეობს ბიოქიმიური ცვლილებებიც. მაგალითად, სტრესულ პირობებში სისხლში იწყება ადრენალინის დიდი რაოდენობით გამოყოფა, რასაც მოსდევს სარეზერვო ძალების მობილიზაცია და გარკვეული ხნის განმავლობაში ფიზიკური და გონებრივი შესაძლებლობების მკვეთრი ზრდა, რაც თავდაპირველად დადებითად მოქმედებს ორგანიზმზე. ეს ზემოქმედება განსაზღვრულ დროის მონაკვეთს მოიცავს. ხანმოკლე სტრესი ადამიანისთვის უვნებელია, მეტიც - მოვალეობების უკეთ შესრულებასაც კი უწყობს ხელს, მაშინ როცა სტრესის გახანგრძლივებას, რომელიც კვირობით, თვეობით და წლობით გრძელდება, შეუძლია მნიშვნელოვანი ბიოქიმიური

ცვლილებების გამოწვევა, რაც მთელი რიგი პათოლოგიების განვითარებისა და შესაბამისად, მძიმე დაავადებების გამოწვევი მიზეზი ხდება.

I.1.1. სტრესის ფორმები

გამოყოფენ სტრესის ორ ფორმას: ეუსტრესსა და დისტრესს. ეუსტრესი დადებითი ემოციებით გამოწვეული სტრესია. სტრესის ეს ფორმა არც თუ ისე ძლიერია და განსაკუთრებულ შემთხვევებში იწვევს ორგანიზმის მიერ სასიცოცხლოდ აუცილებელი გარკვეული ძალების მობილიზაციასაც კი. ამის საპირისპიროდ, დისტრესი წარმოადგენს უარყოფითი ემოციებით გამოწვეულ სტრესს, რომელთანაც გამკლავება ორგანიზმის ძალებს აღემატება. მას შეუძლია მძიმე ფსიქო-სომატური დაავადებების გამოწვევა (Bridges 1982).

იმის მიხედვით თუ რა პერიოდის განმავლობაში მიმდინარეობს ორგანიზმზე სტესის გამოწვევი ფაქტორების - სტრესორების ზემოქმედება, გამოყოფენ სტრესის ხანმოკლე და ხანგრძლივ, სხვაგვარად - მწვავე და ქრონიკულ ფორმებს. მწვავე სტრესისთვის დამახასიათებელია სწრაფი ზემოქმედება. მისი რადიკალური გამოვლინებაა შოკი, რომლის შედეგადაც ადამიანი კარგავს წონასწორობას და გამოდის მდგომარეობიდან. მწვავე სტრესი ძალიან ხშირად გადადის ქრონიკულში, რომლის დროსაც ხდება მწვავე სტრესის გახანგრძლივება. შოკური მდგომარეობის გადალახვის შემდეგ ადამიანი თითქოსდა გამოდის მძიმე მდგომარეობიდან, მაგრამ გადატანილთან დაკავშირებული მოგონებები ხელახლა აბრუნებს მას განცდილთან. ხანგრძლივი სტრესი ყოველთვის არ წარმოადგენს მწვავე სტრესის შედეგს. მას დამოუკიდებლად აღმოცენებაც შეუძლია ერთი შეხედვით იმ უმნიშვნელო ფაქტორთა გავლენით, რომლებიც ორგანიზმზე პერმანენტულად მოქმედებს. ქრონიკული სტრესის გამომწვევ ფაქტორებად შეიძლება ჩაითვალოს სამსახურის ხანგრძლივი ძებნა, მუდმივი წარუმატებლობა, ახლობლებთან მუდმივი უთანხმოება და სხვა(Church et al., 2012).

სტრესის განვითარებასა და ჩამოყალიბებაში განარჩევენ სამ ძირითად ფაზას:

1. *საბრძოლო განგაშის ფაზა-* ამ დროს ორგანიზმი ახდენს ენერგეტიკული რესურსების მობილიზებას და იწყება მზადება საპასუხო რეაქციის განხორციელებისთვის, რაც გამოიხატება ადრენალინის, ადრენოკორტიკოტროპული ჰორმონისა და გლუკოკორტიკოიდების გაძლიერებული

სეკრეციით, რის პასუხადაც ხდება ნერვული სისტემისა და გარკვეული ორგანოების მუშაობის გაძლიერება. თუკი ასეთი მდგომარეობა პერმანეტულ ხასიათს იძენს, ხდება პათოლოგიური პროცესების განვითარება უკლებლივ ყველა ორგანოთა სისტემაში. ამ დარღვევების ხარისხი შესაძლოა სიცოცხლესთან შეუთავსებელიც კი იყოს. იმ შემთხვევაში, თუ ორგანიზმმა დაძლია ყოველივე ეს, ვითარდება რეზისტენტობის ფაზა;

2.*რეზისტენტობის (აქტივაციის) ფაზა* - დგება მაშინ, როდესაც ორგანიზმი გადალახავს საბრძოლო განგაშის სტადიას და ხდება რეზისტენტული სტრესორების მიმართ;

3.ადაპტაციის ან გამოფიტვის (დისტრესის) ფაზა - ამ ფაზისათვის დამახასიათბელია ორგანიზმის მდგომარეობის გაუარესება და დამძიმება. იგი ვითარდება რეზისტენტობის ფაზის შემდეგ, იმ პირობებში, როდესაც ორგანიზმი უკვე შეგუებულია თირკმელზედა ჯირკვლის ჰორმონების ჭარბ რაოდენობას. სტრესის განვითარების ეს ეტაპი მთლიანად დამოკიდებული იმაზე, თუ ადაპტაციური ენერგიის რა მარაგი გააჩნია ორგანიზმს.

სტრესის გამომწვევი უამრავი ფაქტორი შეიძლება იყოს. ამის გათვალისწინებით, განსხვავებულია ასევე ამ ფაქტორების მიერ გამოწვეული სტრესის ტიპებიც (Sies, 1986).

- *ფიზიოლოგიური სტრესი* ვითარდება ორგანიზმზე ნეგატიური ფაქტორების პირდაპირი ზემოქმედებით. ასეთი ფაქტორებია ტკივილი, შიმშილი, სიცივე, ძლიერი არომატები, არასაკმარისი განათება სამუშაო ადგილას ან საცხოვრებელში, ზედმეტი ხმაური.
- *ფსიქოლოგიურ სტრესს* იწვევს ორგანიზმზე მოქმედი სასიგნალო ფაქტორები: მოსალოდნელი საშიშროება, ინფორმაციული გადატვირთვა, შეურაცხყოფა, დიდი მოცულობის სამუშაოს შესრულება, დიდი პასუხისმგებლობის დაკისრება.
- *ემოციური სტრესი,* ფსიქოლოგიური სტრესის ერთ-ერთი სახეა რომელიც ვითარდება იმ პირობებში მაშინ, როდესაც ინდივიდის სოციალურ სტატუსს საფრთხე ემუქრება. მაგალითად ომის ანდა მძიმე დაავადების დროს. ასეთი სახის სტრესი ემოციურ რეაქციებთან არის დაკავშირებული.
- *ინფორმაციული სტრესი* ინფორმაციული გადატვირთვის (დიდი ინფორმაციული ნაკადის დამუშავებისას საკუთარი თავისადმი ჭარბი მომთხოვნელობის) ან ინფორმაციული ვაკუუმის შედეგია.

გამოყოფენ ასევე:

- *შიდაპიროვნულ სტრესს,*
- *სამსახურებრივ სტრესს,*
- *ეკოლოგიური სტრესს.*

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

სტრესულ სიტუაციებზე პასუხისმგებელია თავის ტვინის სამი უბანი: ნუშურა ჯირკვალი, ჰიპოკამპი და პრეფრონტალური ქერქი. სამივე უბანში განლაგებულია კორტიკოსტეროიდული რეცეპტორები, რომელიც თავის მხრივ 2 ტიპისაა: მინერალოკორტიკოიდული და გლუკოკორტიკოიდული რეცეპტორები. მინერალოკორტიკოიდულ რეცეპტორებს (MR) გააჩნიათ მაღალი აფინობა კორტიზოლის მიმართ. ჩვეულებრივ პირობებში, ისინი ნაწილობრივ აქტიურები არიან. მუდმივად აქტიურდებიან მაშინ , როცა ირღვევა ორგანიზმის ჰომეოსტაზი. მეორე ტიპის-გლუკოკორტიკოიდულ რეცეპტორებს (GR) გააჩნიათ დაბალი აფინობა კორტიზოლის მიმართ და აქტივდებიან მხოლოდ მაშინ, როცა სტრესის ინტენსივობა პიკს აღწევს .ეს საშუალებას აძლევს ტვინს სწრაფად წარმოქმნას საპასუხო რეაქცია გამღიზიანებელზე, ამიტომ ვუმკლავდებით ადვილად სტრესულ სიტუაციებს. პირველ ეტაპზე, როდესაც სტრესორის მოქმედება ორგანიზმზე ქრონიკულ ხასიათს იღებს, ნერვულ სისტემაში უჯრედულ დონეზე იწყება მეტაბოლური ცვლილებები, რასაც მოსდევს ჯანმრთელობისთვის საშიში მდგომარობა. მაგალითად, სტრესის შედეგად მკვეთრად მცირდება ჰემატოენცეფალური ბარიერის უნარი შეზღუდოს სხვადასხვა ქიმიური ნივთიერებების გადასვლა თავის ტვინში სისხლის მიმოქცევის სისტემიდან.

სტრესის საპასუხო პროცესები მიმდინარეობს პერიფერიულ ნერვულ სისტემაშიც. კერძოდ ავტონომიური ნერვული სისიტემის აქტივაცია განაპირობებს მთელი რიგი ქიმიური რეაქციების დაწყებას. პრეგანგლიური ნერვული უჯრედებიდან ხდება აცეტილქოლინის გამოთავისუფლება. აღნიშნული ნეიროტრანსმიტერი ასტიმულირებს პოსტგანგლიური ნეირონებიდან ნორადრენალინის გამოყოფას, რომელიც უშუალოდ სისხლის მიმოქცევის სისტემაში ხვდება და განაპირობებს ნერვული და ენდოკრინული სისტემიების აქტივაციას.(Church et al., 2012).

ნორადრენალინი ააქტივებს ჰიპოთალამუს-ჰიპოფიზ-თირკმელზედა ჯირკვლის ღერძს (HPA), რომელიც თავის მხრივ, ამუშავებს ინფორმაციას ჰიპოთალამუსში სტრესორის შესახებ. სიგნალი ჰიპოთალამუსიდან სწრაფად გადაეცემა ჰიპოფიზში და საბოლოოდ ხვდება თირკმელზედა ჯირკვლის ქერქში, რომლის საპასუხოდ იწყება კორტიკოსტეროიდების, კერძოდ : კორტიზოლისა და კორტიკოსტერონის სეკრეცია(Varghese et al., 2001). გარდა ბიოქიმიური ცვლილებებისა, სტრესულ სიტუაციებს ორგანიზმი პასუხობს ფიზიოლოგიური ცვლილებებითაც. საბოლოოდ ქრონიკული სტრესი უარყოფით გავლენას ახდენს ორგანიზმზე და შესაძლოა მისი დაღუპვა გამოიწვიოს.

XX საუკუნის 80-იან წლებში სტრეს-ფაქტორთა სიას ე.წ. სოციალური იზოლაციაც დაემატა. ამ პერიოდში ჩატარებულმა კვლევებმა დაადგინა, რომ სოციალური იზოლაციის უარყოფითი გავლენა ორგანიზმზე, მიყენებული ზიანის თვალსაზრისით, არ ჩამორჩება ნარკოტიკებისა და ალკოჰოლის მოხმარებას და სხვა ფსიქო-სოციალურ სტრეს-ფაქტორებს (Zhuravliova et al., 2009; Koike et. al., 2009), თუმცა დღესდღეობით ჯერ არ არის ზუსტად განსაზღვრული, თუ რატომ არის სოციალური იზოლაცია ამდენად სარისკო სიცოცხლისათვის და ამ კუთხით კვლევა დღესაც აქტიურად მიმდინარეობს. არსებული მონაცემების მიხედვით სოციუმისგან იზოლაცია წარმოადგენს მნიშვნელოვან სტრეს-ფაქტორს, რომლის გახანგრძლივების შემთხვევაში შესაძლოა განვითარდეს მძიმე პათოლოგიები და ორგანიზმი შესაძლოა ლეტალურ შედეგამდეც კი მივიდეს (Pinna et al., 2006). მეცნიერთა აზრით,დღეს მსოფლიოში კომპიუტერული ტექნოლოგიების, ინტერნეტისა და სოციალური ქსელების განვითარება ხელს უწყობს სოციალურ ურთიერთობებს (Berkman, 1995), თუმცა მეორე მხრივს, არსებობს მონაცემები, რომელთა მიხედვით აღნიშნული გარემოებები პირიქით, წარმოადგენს ადამიანის ვირტუალურ სამყაროში გადასვლის საფუძველს და გარკვეულწილად იწვევს პიროვნების იზოლაციას საზოგადოებისგან, რაც უარყოფითად აისახება მასზე. 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(Pshennikova et al., 2002;Masood et al., 2006; Maekawa et al., 2010). თანამედროვე სამეცნიერო კვლევებით დასტურდება რომ, ინდივიდთა სოციალური იზოლაციითა და ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევით გამოწვეული ფსიქოემოციური სტრესის პირობებში ვითარდება ოქსიდაციური სტრესი, რაც იწვევს მემბრანული ლიპიდების დაზიანებას 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.

I.1.2.ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესი

ცირკადული რიტმი წარმოადგენს მენტალური, ქცევითი და ფიზიკური ცვლილებების ერთობლიობას რომელიც დღე-ღამური რიტმის მონაცვლეობას სდევს თან. მას ძილ-ღვიძილის ციკლსაც უწოდებენ. ეს ცვლილებები ვითარდება სინათლისა და სიბნელის ფაზების მონაცვლეობის გავლენით ორგანიზმში(Koch et al., 2016; Kiehn et al., 2017; Helfrich-Förster, 2017).

ცოცხალი ორგანიზმები არ არიან დაცულნი გარემოს ცვლილებებისგან, ისევე როგორც არაპროგნოზირებადი სტრესორებისგან. ეს ორივე ფაქტორი საჭიროებს ადეკვატურ ფსიქოლოგირ პასუხს, რასაც უზრუნველყოფს ცირკადული რიტმი.მოსალოდნელი ყოველდღიური გარემოს ცვლილებებისადმი ორგანიზმებს ჩამოუყალიბდათ შინაგანი ბიოლოგიური საათები რომელიც მათ აძლევს საშუალებას გაარკვიონ დღის მიახლოებითი პერიოდი.ეს შინაგანი საათის მექანიზმები თავისუფლად მუშაობენ 24 საათიანი დღე-ღამური ციკლის მანძილზე, ამიტომ მათ ცირკადული საათებიც ეწოდებათ. ცირკადული რიტმი ორგანიზმის ყველა უჯრედსა და ქსოვილს გააჩნია და მისი მოქმედების კოორდინაცია ხდება თავის ტვინიდან. ბიოლოგიური საათი ორგანიზმის შინაგანი დროის მარეგულირებელი აპარატია.ის წარმოადგენილია სპეციფიური ცილოვანი მოლეკულებით რომლებიც ზეგავლენას ახდენენ ორგანიზმის უჯრედებზე.ეს ცილოვანი მოლეკულები სინთეზირდება ე.წ. საათის გენებით. მთავარი ფაქტორი რომელიც ზეგავლენას ახდენს ცირკადულ რიტმზე არის სინათლე. სინათლისა და სიბნელის ფაზების მონაცვლეობა იწვევს საათის გენების აქტივობის მოდულაციას. სინათლისა და სიბნელის ფაზების მონაცვლეობას შეუძლია ააჩქაროს ან შეანელოს ბიოლოგიური საათი, ისევე როგორც ცირკადული რიტმი.ჩვენი სხეულის მთვარი ბიოლოგიური საათი წარმოდგენილია თავის ტვინში არსებული ენდოკრინული ჯირკვლით-ეპიფიზით. ეპიფიზი ე.წ. ჯალღუზისებრი სხეული(epiphysis cerebri) ვითარდება შუა ტვინის (მეზენცეფალონის) დორსალური ნაწილის გამონაზარდის სახით.ეპიფიზის სპეციფიურ უჯდებში - პინეალოციტებში N-აცეტილსეროტონინისგან ხდება ჰორმონ მელატონინის წარმოქმნა.თავის ტვინის ეს უბანი იმპულსებს იღებს ოპტიკური ნერვიდან. როდესაც გარემო არ არის განათებული, ხდება ამ ინფორმაციას მიწოდება ეპიფიზისთვის და ის იწყებს ჰორმონ მელატონინის სეკრეციას.

მელატონინის ზეგავლენით ხდება ორგანიზმის მოდუნება და ძილის ფაზის დადგომა(Cajochen et a., 2003; Amaral, Cipolla-Neto, 2018;)მაშინ როდესაც მელატონინის გამოყოფა დღის განმავლობაში შეზღუდულია. მელატონინს ეპიფიზი ღამის განმავლობაში გამოიმუშავებს, ხოლო დღის მანძილზე მისგან ნეირომედიატორი სეროტონინი მზადდება. მელატონინის სინთეზი მიმდინარეობს 4 სტადიად. პირველ და მეორე ეტაპზე ამინომჟავა L-ტრიფტოფანი ფერმენტ ტრიფტოფან-5-ჰიდროქსილაზას მეშვეობით გარდაიქმნება 5-ჰიდროქსი-L-ტრიფტოფანად (5-HTP). შემდგომ ეტაპზე 5-HTP დეკარბოქსილირდება 5-ჰიდროქსიტრიფტოფან დეკარბოქსილაზას მეშვეობით და მიიღება სეროტონინი. სიბნელის პირობებში აქტივდება საკვანძო ფერმენტი არალკილამინ-Nაცეტილტრანსფერაზა (AANAT) იგივე, სეროტონინ-N-აცეტილტრანსფერაზა (SNAT) და ახდენს სეროტონინის გარდაქმნას N-აცეტილსეროტონინად, რომელსაც საბოლოოდ გარდაიქმნება მელატონინად ფერმენტი აცეტილსეროტონინ-O-მეთილტრანსფერაზას მიერ. ცნობილია, რომ AANAT გენი აქტივდება მხოლოდ ფოტოპერიოდის გავლენით და ადამიანებში იგი ლოკალიზებულია მე-7 ქორმოსომაში(Kovacic ,Somanathan, 2014). მეცნიერები დღესდღეობით სწავლობენ როგორი გავლენა აქვს მობილური ტელეფონების ეკრანის განათებას ღამის განმავლობაში მელატონინის სეკრეციაზე. ამასთანავე მელატონინს გააჩნია ანტიოქსიდანტური თვისებები, ის უკავშირდება თავისუფალს რადიკალებს როგორიცაა O_2^-, NO^-, OH^-. მელატონინი მოქმედებს სხვა ანტიოქსიდანტებთან ერთად და უზრუნველყოფს მათ 2-ჯერ უფრო ეფექტურ მუშაობას.

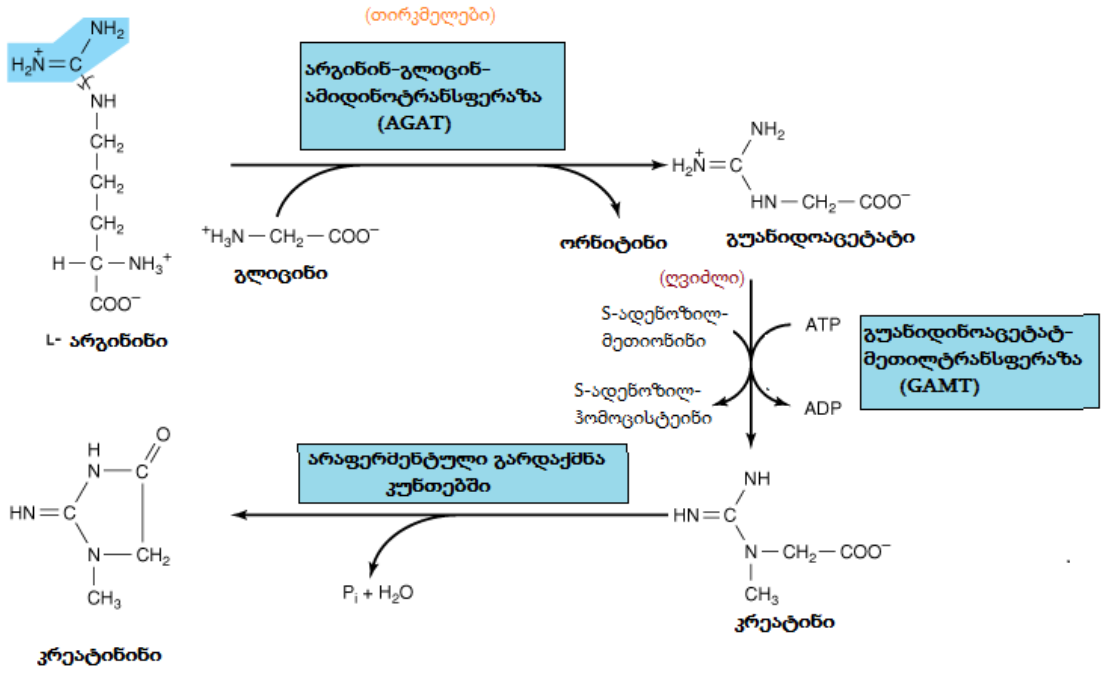
როგორც ზემოთ იყო აღნიშნული სტრესის დროს ხდება თირკმელზედა ჯირკვლის სტიმულირება და შედეგად კორტიკოსტეროიდების გამოყოფა. სისხლში კორტიკოსტეროიდების მაღალი კონცენტრაციის დროს ადგილი აქვს თავის ტვინში კორტიკოიდული რეცეპტორების ჰიპერაქტივაციას. რასაც მოსდევს ნერვულ სისტემაში ისეთი მეტაბოლური ცვლილება როგორიცაა L-ტიპის კალციუმის იონურ არხებზე ზემოქმედება. კერძოდ კორტიკოიდები იწვევს ამ არხების განვლადობის ზრდას და შესაბამისად ნეირონებში Ca^{+2}-ის იონის რაოდენობრივ მატებას. Ca^{+2} ის გაზრდილ რაოდენობას კი უჯრედში ციტოტოქსიური ეფექტები ახასიათებს. ამასთანავე ბიოქიმიის კათედრაზე ჩატარებული წინა კვლევების შედეგებიდან გამომდინარე ვვარაუდობთ, რომ სტრესის დროს შემცირებული ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობის დაქვეითების ერთ-ერთი მთავარი განმაპირობებელი ფაქტორი სწორედ Ca^{+2} ის იონის გაზრდილი რაოდენობაა(Wilking et al., 2013;).

I.2. კრეატინი

კრეატინი (Cr- N-[aminoiminomethyl]-N-methyl glycine) წარმოადგენს აზოტშემცველ ორგანულ მჟავას, რომელიც გვხვდება ძუძუმწოვართა თითქმის ყველა ორგანოში, თუმცა, მისი დიდი შემცველობით გამოირჩევა თავის ტვინი და კუნთოვანი ქსოვილი. მონაწილეობს რა Cr/PCr/CK სისტემის ფუნქციონირებაში იგი აქტიურადაა ჩართული უჯრედში მიმდინარე ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში, და მისი დეფიციტი ასოცირდება მთელი რიგი ფიზიკური და შემეცნებითი ფუნქციების დაქვეითებასთან(Almeida et al. 2006; Allen 2012). ითვლება, რომ Cr -ის მოქმედების ძირითად მექანიზმს წარმოადგენს მისი მონაწილეობა ენერგიის აკუმულირების პროცესში. თუმცა სხვადასხვა ექსპერიმენტებმა დაადასტურეს ასევე მისი ნეირომოდულატორული და ნეიროპროტექტორული თვისებებიც(Bassit et al., 2010; Beard E, Braissant, 2010). სინთეზირდება რა ნერვულ უჯრედებში იგი ასრულებს სასიგნალო მოლეკულის ფუნქციასაც. კერძოდ, შეუძლია გააქტიურს ზოგიერთი სასიგნალო გზა და ამ გზით დაარეგულიროს ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი და მოახდინოს გავლენა უჯრედების ზრდასა პროლიფერაციასა და სიცოცხლისუნარიანობაზე(Allen 2012; Bassit et al., 2010).

მისი სინთეზი ორ სტადიად მიმდინარეობს. პირველ სტადიაზე, რომელიც თირკმელებში მიმდინარეობს, არგინინიდან და გლიცინიდან წარმოიქნება შუალედური ნაერთი გუანიდინაცეტატი. რეაქციის კატალიზატორია ფერმენტი არგინინ-გლიცინამიდინოტრანსფერაზა (AGAT) (სურ.I .1).

კრეატინის სინთეზი საბოლოოდ ღვიძლში სრულდება. სინთეზის შემდეგ კრეატინი ხვდება სისხლში და ამ გზით ისეთ ორგანოებს მიეწოდება რომელთაც მაღალი ენერგეტიკული მოთხოვნილება გააჩნიათ.ასეთ ორგანოებს წარმოადგენს ძირითადად კუნთები და ნერვული ქსოვილი.



სურათი I.1. ცხოველურ ორგანიზმში კრეატინის სინთეზის მიმდინარეობა

კრეატინი დიდი რაოდენობით შედის ისეთ საკვებ პროდუქტებში როგორიცაა რძის პროდუქტები, ხორცი და თევზეული. თუმცა ის აუცილებელი საკვები დანამატი არ არის, რადგან მისი სინთეზი ენდოგენურადაც ხდება ისეთ ორგანოებში როგორცაა ღვიძლი,პანკრეასი და თირკმლები. ბოლოდროინდელი კვლევების შედეგად მიღებული მონაცემებით კი მიიჩნევა, რომ კრეატინის ენდოგენური სინთეზი ხდება თავის ტვინშიც, ვინაიდან ნერვულ ქსოვილში აღმოჩენილია კრეატინის მასინთეზირებელი ფერმენტები-არგინინ-გლიცინ ამინოტრანსფერაზა (AGAT) და გუანიდინოაცეტატ მეთილტრასფერაზა(GAMT).

I.2.1. კრეატინის სინთეზი

კრეატინის სინთეზი ორგანიზმში იწყება ამინომჟავებიდან-არგინინიდან, გლიცინიდან და მეთიონინიდან. კრეატინის ენდოგენური სინთზი ორგანიზმში ორ ეტაპად მიმდინარეობს, პირველი ეტაპი მიმდინარეობს თირკმლებში,პროცესი იწყება ამინომჟავა L-არგინინიდან,რომელზეც მოქმედებს ფერმენტი არგინინ გლიცინ ამინოტრანსფერაზა(AGAT), რომელიც აკატალიზებს არგინინის და გლიცინის კონვერსიას გუანიდინოაცეტატად(GAA) და ორნიტინად. კვლევები გვიჩვენებს, რომ ხდება გუანიდინოაცეტატის(GAA) გამოიყოფა თირკმლებიდან რომელიც შემდეგ

ხვდება ღვიძლში,სადაც იწყება უკვე მეორე ეტაპი-ფერმენტი გუანიდინოაცეტატ N-მეთილ ტრანსფერაზა(GAMT) აკატალიზებს გუანიდინოაცეტატიდან კრეატინის სინთეზს. ეს ფერმენტი მეთილის ჯგუფის დონორად იყენებს S-ადენოზილ მეთიონინს(SAMe). რეაქციის შედეგად მიიღება მაღალენერგეტიკული ნაერთი კრეატინი(Cr) და S-ადენოზილ ჰომოცისტეინი(SAH).

ვარაუდობენ, რომ კრეატინის ენდოგენური სინთეზი ასევე ხდება თავის ტვინში, ვინაიდან კრეატინის მასინთეზირებელი ფერმენტების AGAT და GAMT-ის ექსპრესია ნანახია თავის ტვინის უჯრედებში, როგორც ნეირონებში ასევე ასტროციბსა და ოლიგოდენდროციტებში.თუმცა კვლევებმა აჩვენა, რომ ვირთაგვას ტვინის ქერქის უჯრედების მხოლოდ 12% ში ხდება არგინინ გლიცინ ამინოტრანსფერაზასა (AGAT) და გუანიდინოაცეტატ მეთილტრანსფერაზას (GAMT) ექსპრესია, მაშინ როდესაც უჯრედების 30% არ ექსპრესირებს არცერთ ფერმენტს.შესაბამისად მეცნიერთა ერთ ნაწილს მიაჩნია რომ, კრეატინის სინთეზი ხდება თავის ტვინში სწორედ ამ ფერმენტების ნერვულ ქსოვილში ექსპრესიის გამო.თუმცა მეცნიერთა მეორე ნაწილს მიაჩნია, რომ თავის ტვინში ადგილი აქვს პერიფერიული კრეატინის ტრანსპორტირებას ჰემატოენცეფალური ბარიერის გავლით სპეციფიური ცილა ტრანსპორტერების საშუალებით, რომლებიც ლოკალიზებულნი არიან სწორედ ჰემატოენცეფალურ ბარიერში(BBB).

I.2.2. კრეატინის ტრანსპორტი ცნს-ში

ცილას, რომელიც აწარმოებს ენდოგენური კრეატინის ტრანსპორტირებას სისხლიდან ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში ე.წ-CRT ცილა(ასევე ე.წ CRT1; CT1; და SLC6A8)ეწოდება.ის ახდენს კრეატინს ტრანსპოტირებას სისხლიდან თავის ტვინში ჰემატო-ენცეფალური ბარიერის გავლით კონცენტრაციული გრადიენტის მიმართულებით, ასევე მის საწინააღმდეგოდაც. კრეატინის ტრანსპორტი დამოკიდებულია Na^+ და Cl^- ის იონებზე და ინჰიბირდება CRT-ის ინჰიბიტორებით, როგორციაა მაგ. გუანიდინოაცეტატი.

ნორზერნ ბლოტინგის და იმუნობლოტინგის ანალიზებით ნაჩვენები იქნა რომ CRT-ის ექსპრესიას ადგილი აქვს ვირთაგვების ჰემატოენცეფალური ბარიერის ენდოთელიალურ უჯრედებში.ასევე ნანახი იქნა CRT-ის მაღალი ექსპრესია ვირთაგვების ტვინის კაპილარებში კონფოკალური იმუნოფლუორესცენტული მიკროსკოპით შესწავლის შედეგად. ეს შედეგები ადასტურებს მოსაზრებას, რომ ტვინში ხდება როგორც კრეატინის ტრანსპორტირება სპეციფიური

ტრანსპორტერების საშუალებით, ასევე კრეატინის ადგილობრივი სინთეზი, რაზეც მიგვითითებს თავის ტვინში კრეატინის მასინთეზირებელი ფერმენტების-AGAT-ისა და GAMT-ის მაღალი ექსპრესია(Allen, 2012; Deminice et al., 2013).

მართლაც კვლევებით ნანახია, რომ თაგვები, რომლებსაც აქვთ კრეატინის ტრანსპორტიორი ცილის CRT-ს მასინთეზირებელი გენის მუტაცია,რის გამოც დარღვეული აქვთ ჰემატო-ენცეფალური ბარიერის გავლით კრეატინის ტრანსპორტი, განიცდიან კრეატინის დეფიციტს ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში, რაც იწვევს რიგ მეტაბოლურ და კოგნიტურ დარღვევებს მიუხედავად ტვინში AGAT-ისა GAMT-ის ნორმალური ექსპრესიისა.

I.2.3. კრეატინის ფუნქცია

კრეატინი (Cr) წარმოადგენს მაღალ ენერგეტიკულ ნაერთს რომელსაც შეუძლია ფოსფატის ჯგუფის დაკავშირებით გარდაიქმნას ფოსფოკრეატინად (PCr). ამ რეაქციას ფერმენტი კრეატინკინაზა (CK) ახორციელებს. უჯრედში ენერგეტიკულ ჰომეოსტაზს სწორედ ეს სისტემა არეგულირებს რომელიც ცნობილია როგორც კრეატინ/ფოსფოკრეატინ/კრეატინკინაზული სისტემის სახელწოდებით (Cr/PCr/CK). უჯრედში არსებობს ფერმენტ კრეატინკინაზას ორი იზოფორმა, ერთი მათგანი არის მიტოქონდრიული კრეატინკინაზა(MtCK), რომელიც აკატალიზებს მიტოქონდრიაში სინთეზირებული ატფ-ის დაკავშირებას კრეატინზე(Cr), რეაქციის შედეგად წარმოიქმნება მაღალენერგეტიკული ნაერთი ფოსფოკრეატინი(PCr), რომლის მიმართაც მიტოქონდრიის მემბრანა განვლადია და ხდება მისი გამოტანა ციტოპლაზმაში. სადაც მასზე უკვე მოქმედებს კრეატინკინაზას ციტოპლაზმური იზოფორმა და ახდენს ფოსფოკრეატინის დაშლას კრეატინად და ატფ-ად. შესაბამისად ამ გზით ხდება მიტოქონდრიიდან ციტოპლაზმაში ატფ-ის გადმოსვლა. ხოლო რაც შეეხება კრეატინს, ის უკან ბრუნდება მიტოქონდრიაში.

Cr/PCr/CK-სისტემის ძირითადი როლს წარმოადგენს ცენტრალურ ნერვულ სისტემაში ენერგეტიკული ბალანსის შენარჩუნება. ATP-ის გარკვეული რაოდენობა აუცილებელია ნეირონებში მემბრანული პოტენციალისა და იონური გრადიენტის შენარჩუნებისთვის,Ca^{+2} ის შიდაუჯრეუდული რაოდენობის რეგულაციისთვის, ნეიროტრანსმისიისა და შიდაუჯრედული სასიგნალო გზების აქტივაციისთვის, ასევე აქსონალური და დენდრიტული ტრანსპოტისთვის. ტვინი შეადგენს სხეულის მასის მხოლოდ 2%-ს თუმცა მას შეუძლია მოიხმაროს სხეულის მთელი სარეზერვო ენერგიის 20% მდე.

კრეატინ/ფოსფოკრეატინ/კრეატინკინაზული(Cr/PCr/CK) ჰომეოსტაზის სისტემა ასრულებს ძირითად როლს ცენტრალური ნერვული სისტემის განვითარებაში.სხვადასხვა კვლევებმა აჩვენა რომ ფერმენტ კრეატინკინაზას (CK) იზოფორმები მაღალი კონცენტრაციითაა ნანახი ნათხემსა და ჰიპოკამპში. ჰიპოკამპი წარმოადგენს მნიშვნელოვან უბანს დასწავლასა და მეხსიერების პროცესებში. ჰიპოკამპი მნიშვნელოვნად ზიანდება ალცჰაიმერით დაავადების დროს (Mak et al. 2009; Baroncelli et al., 2014).

I.3. უჯრედის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ფერმენტის დახასიათება

სტრესული სიტუაციების შედეგად სხვადასხვა პათოლოგიების განვითარება დაკავშირებულია უჯრედში მიმდინარე მეტაბოლური პროცესების დარღვევასთან. ცნობილია, რომ მეტაბოლური პროცესების ნორმალიზირებისათვის აუცილებელია უჯრედში ატფ-ის ოპტიმალური რაოდენობის არსებობა. ნორმალურ პირობებში ატფ-ის 95% სინთეზირდება მიტოქონდრიაში ჟანგვითი ფოსფორილირების გზით. დარჩენილი 5% წარმოიქმნება გლიკოლიზის შედეგად. წარმოქმნილი ენერგიის 60-70% იხარჯება კონკრეტული ორგანოს ფუნქციონირებისათვის, ხოლო 30-40% კი ენერგოდამოკიდებული იონური არხების მუშაობისათვის, განსაკუთრებით Ca^{+2}-ატფ-აზა-ს ფუნქციონირებისათვის სარკოპლაზმურ რეტიკულუმში. უჯრედების მეტაბოლიზმში ასევე დიდ როლს ასრულებს Cr/CK/PCr სისტემა, რომელიც სწრაფად და დინამიურად აღადგენს დახარჯული ატფ-ს დონეს უჯრედებში. სტრესული სიტუაციებისას ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი ირღვევა, რაც გამოიხატება პროცესში მონაწილე ფერმენტების აქტივობის ცვლილებით, რისი მიზეზიც შესაძლოა იყოს სუბსტრატის რაოდენობრივი ცვლილებები ან თვით ფერმენტის მოდიფიკაც. ასეთ სიტუაციებში უჯრედის უზრუნველყოფა ვეღარ ხდება საჭირო რაოდენობის ატფ-ით, ენერგეტიკული დონის დაცემა კი ხშირად უჯრედის აპოპტოზით ან ნეკროზით მთავრდება.

I.3.1. კრეატინფოსფოკინაზა

ცნობილია ფერმენტ კრეატინკინაზას რამდენიმე იზოფორმა. ფერმენტის მიტოქონდრიული იზოფორმა ლიკალიზირებულია მიტოქონდრიის მემბრანათაშორის სივრცეში და ახდენს მიტოქონდრიაში სინთეზირებული ატფ-იდან ფოსფოკრეატინის წარმოქმნას ჟანგვითი ფოსფორილირების გზით. მიღებული ფოსფოკრეატინი გარე მემბრანის გავლით მემბრანათშორისი

სივრციდან ციტოზოლში გადაადგილდება. ციტოპლაზმაში განთავსებული ფერმენტის ციტოზოლური იზოფორმები ფოსფოკრეატინის უკუ-ფოსფორილირებას აწარმოებს უჯრედის იმ უბნებში, სადაც ატფ-ზე მოთხოვნილება გაზრდილია. ერთ-ერთ ასეთ უბანს წარმოადგენს მემბრანული ატფ-აზები, რომლებსაც გამუდმებით ესაჭიროებთ ატფ-ის ენერგია. ამ პროცესში გამონთავისუფლებული კრეატინი კვლავ მიტოქონდრიას უბრუნდება, სადაც ფერმენტის მიტოქონდრიული იზოფორმის მონაწილეობით ისევ მიმდინარეობს კრეატინის ფოსფორილირების პროცესი (Zhao et al., 2011). ცნობილია კრეატინკინაზას 3 იზოფორმა: CK-MM რომელიც უმეტესად კუნთებში გვხვდება, CK-BB თავის ტვინში და CK-MB გულის კუნთის უჯრედებში. სხვადასხვა დაავადებისას ფერმენტის რაოდენობრივ მომატებას სისხლში სადიაგნოსტიკო-კლინიკური მნიშვნლობა გააჩნია. კერძოდ, CK-MB-ს მატება მიანიშნებს უჯრედების დაზიანებაზე. თუმცა უნდა აღინიშნოს,რომ ენდოკრინული დარღვევებისას, ავთვისებიანი ჰიპერთერმიისა და ნეიროლეფსიური სინდრომისასაც შესაძლოა გაზრდილი იყოს ფერმენტის რაოდენობა.

I.3.2. ალდოლაზა

ალდოლაზა გლიკოლიზის პროცესში ჩართული ერთ-ერთი მნიშვნელოვანი ფერმენტია, რომელიც ფრუქტოზო-1,6-დიფოსფატს გარდაქმნის გლიცერალდეჰიდ-3-ფოსფატად და ჰიდროქსიაცეტონდიფოსფატად. ცნობილია ფერმენტის სამი იზოფორმა (A,B,C). ალდოლაზა A-ნანახია ემბრიონსა და მოზრდილი ადამიანის კუნთებში, ასევე ღვიძლში, თირკმელსა და ნაწლავებში. იგი ლოკალიზებულია ციტოპლაზმაში, მაგრამ უჯრედული ციკლის S ფაზაში, დნმ-ის სინთეზისას, მას შეუძლია ბირთვშიც გადაინაცვლოს. ბირთვში მისი ლოკალიზაცია რეგულირდება პროტეინკინაზა B (PKB) და p38-ის მიერ. ალდოლაზა A შესაძლოა ლოკალიზებული იყოს მიტოქონდრიაშიც(Wyss et al. 2011). ფერმენტის აქტივობა რეგულირდება მეტაბოლიზმში მონაწილე სხვადასხვა სუბსტრატებით, მაგალითად გლუკოზით, ლაქტატითა და გლუტამინით. ალდოლაზა A-ს მაკოდირებელი გენი განსაკუთრებული ინტენსივობით ექსპრესირდება სხვადასხვა სახის სიმსივნის დროს (მაგ. ფილტვის ბრტყელუჯრედოვანი კარცინომა), რაც იწვევს გლიკოლიზის პროცესის გააქტიურებას და შესაბამისად, სიმსივნური უჯრედების ზომაში სწრაფ ზრდას. მისი გააქტიურება მიანიშნებს მეტასტაზების გავრცელებაზე, ხოლო დაქვეითება ამცირებს სიმსივნური უჯრედების გადაადგილებას. ასე რომ, ალდოლაზა A მიიჩნევა ფილტვის ბრტყელუჯრედიანი კარცინომის ერთგვარ მარკერადაც.

ალდოლაზა B უმეტესად ღვიძლში ლოკალიზრდება და მისი დეფიციტი მკვეთრად აფერხებს გლიკოლიზისა და გლუკონეოგენეზის მიმდინარეობას. ასევე, მისმა დეფიციტმა შესაძლოა გამოიწვიოს ფრუქტოზის აუტანლობა, რომელიც მემკვიდრეობით ხასიათს ატარებს. ალდოლაზა C-ს ლოკალიზაციის ადგილს წარმოადგენს თავის ტვინი. ფერმენტი განსაკუთრებით აქტივდება შიზოფრენიის დროს, თავის ტვინის სიმსივნეებისა და ასევე ალცჰაიმერის დაავადებისას. ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ სტრესის პირობებში მან შეიძლება განიცადოს სტრუქტურული მოდიფიკაცია, რის გამოც მისი აქტივობა მნიშვნელოვნად კლებულობს.

I.3.3. კრებსის ციკლის ზოგიერთი ფერმენტი

კრებსის ციკლი წარმოადგენს რთული ქიმიური რეაქციების ჯაჭვს, რომელიც მიმდინარეობს 8 სტადიად მიტოქონდრიულ მატრიქსში .

ციკლის ერთერთ პირველ ფერმენტს აკონიტაზა წარმოადგნს, რომელსაც ენერგიის წარმოქმნაში მნიშნელოვანი როლი აკისრია, იგი წარმართავს იზომერიზაციის რეაქციას, რომლის შედეგად ციტრატიდან მიიღება იზოციტრატი. ფერმენტს სპეციფიური აგებულება გააჩნია, აქტიური ცენტრი წარმოდგენილია რკინა-გოგირდოვანი კლასტერით (Fe-S-ჯგუფი), რის გამოც იგი მგრძნობიარეა ჟანგბადის აქტიური რადიკალების მიმართ. ROS-ის მაღალი კონცენტრაციით არსებობისას ხდება ფერმენტის აქტიური ცენტრის ინაქტივაცია, რასაც ფერმენტის ინჰიბირება და შესაბამისად, მეტაბოლიზმის პროცესის შეფერხება მოსდევს. გარდა აღნიშნულისა, აკონიტაზას ციტოზოლურ ფორმა ფუნქციონირებს, როგორც რკინა-დამაკავშირებელი ცილა (IRP) და მონაწილეობს რკინის ჰომეოსტაზში (Shi et al., 2011).

სუქცინატდეჰიდროგენაზა, ან სუქცინატ კოენზიმ Q რედუქტაზა წარმოადგენს სუნთქვის ჯაჭვისა და კრებისის ციკლის ფერმენტს, მოთავსებულია მიტოქონდრიის შიდა მემბრანაზე. 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 FADH2–მდე. ფერმენტული კომპლექსი წარმოდგენილია შემდეგი სუბერთეულებით: SdhA, SdhB, SdhC და SdhD. ლიტერატურიდან ცნობილია, რომ B, C და D სუბერთეულების მუტაცია განაპირობებს ოქსიდაციური სტრესის ინიცირებას(Brierea et al., 2005). სუქცინატდეჰიდროგენაზას მიერ წარმოქმნილი ფუმარატი

ფერმენტ ფუმარაზას მეშვეობით გარდაიქმნება მალატად. არსებობს ფერმენტის ორი იზოფორმა: ციტოზოლური და მიტოქონდრიული. მიტოქონდრიული იზოფორმა ჩართულია კრებსის ციკლში, ხოლო ციტოზოლური იზოფორმა ამინომჟავებისა და ფუმარატის მეტაბოლიზმში მონაწილეობს. ფუმარაზას მაკოდირებელი გენის მუტაციამ შესაძლოა გამოიწვიოს თირკმლის კარცინომა და კანის ლეიომიომა. ფერმენტის დეფიციტი განაპირობებს ენცეფალოპათიის განვითარებას, რისი მიზეზი ორგანიზმში დიდი რაოდენობით ფუმარის მჟავის დაგროვებაა.

I.4 PI3K/Akt/mTOR სასიგნალო გზის კომპონენტები

PI3K/Akt/mTOR-შიდაუჯრედული სასიგნალო გზა ერთ-ერთი ყველაზე მნიშვნელოვანი კასკადია უჯრედული ციკლის რეგულაციაში. ამ სასიგნალო სისტემასთანაა დაკავშირებული უჯრედის პროლიფერაცია, სიმსივური ზრდა, სასიცოცხლო ხანგრძლივობა და მეტაბოლიზმის რეგულაცია. ცილა PI3K-ს აქტივაცია(ფოსფოინოზიტოლ-3 კინაზა) იწვევს პლაზმურ მემბრანაში ლოკალიზებული ცილა Akt-ს ფოსფორილირებას, რითიც ხდება მისი აქტივაცია. ცილა Akt- აგრეთვე ცნობილია როგორც პროტეინ კინაზა-B (PKB). პროტეინ კინაზა- B წარმოადგენს სერინ-თრეონინ სპეციფიურ კინაზას, რომელსაც ძირითადი როლი აკისრია უჯრედში მიმდინარე უამრავ პროცესებში. ფოსფორილირებული ცილა Akt(PKB) იწვევს ცილა mTOR ის აქტივაციას, რომელიც თავის მხრივ ასტიმულირებს ისეთ პროცესებს უჯრედში როგორიც არის გლუკოზის მეტაბოლიზმი, აპოპტოზი, უჯრედების პროლიფერაცია და მიგრაცია. ფოსფორილირებული ცილა mTOR - ასევე იწვევს უჯრედული ტრანსკრიფციის ფაქტორების აქტივაციას, რაც შესაბამისად ასტიმულირებს გარკვეული ცილების სინთეზის ინტენსიფიკაციას. დღეისათვის საკმაოდ ბევრი ნივთირებაა ცნობილი რომლებიც იწვევენ PI3K/AKT/mTOR სასიგნალო გზის გააქტიურებას, ასეთებია მაგალითად ინსულინი, ინსულინის მსგავსი ზრდის ფაქტორი (IGF-1), ზოგიერთი ამინომჟავა და მათ შორისაა კრეატინიც როგორც ბიოგენური ამინი. ზოგიერთი ტიპის სიმსივნეების დროს ნანახია PI3K/AKT/mTOR სასიგნალო გზის კომპონენტების რაოდენობრივი მატება, ვინაიდან როგორც უკვე იყო აღნიშნული ეს სასიგნალო გზა ხელს უშლის აპოპტოზს და ასტიმულირებს უჯრედების პროლიფერაციას (Sarbassov et al., 2005; Russell et al., 2011).

I.4.1 ფოსფატიდილ ინოზიტოლ-3 კინაზა (PI3K)

ფოსფატიდილ ინოზიტოლ-3 კინაზა იგივე ფოსფოინოზიტიდილ-3 კინაზა მიეკუთვნება PI3K ცილების ოჯახს, რომელიც მოიცავს პროტეინკინაზების 4 განსხვავებულ კლასს. როგორც ლიტერატურიდან ცნობილია პროტეინკინაზების დანიშნულებაა სხვადასხვა ბიოლოგიურად აქტიური მოლეკულების ფოსფორილირება მათზე ფოსფატის ჯგუფის გადატანით. PI3K ოჯახის ცილების I კლასის პროტეინკინაზები უზრუნველყოფენ ფოსფატიდილინოზიტოლ- 4,5-დიფოსფატის(PIP2) გარდაქმნას ფოსფატიდილინოზიტოლ-3,4,5- ტრიფოსფატად(PIP3). ფოსფატიდილ ინოზიტოლ-4.5-დიფოსფატი(PIP2) პლაზმური მემბრანის ფოსფოლიპიდური კომპონენტია, ფოსფატიდილინოზიტოლ-3 კინაზების (PI3K) აქტივაცია ხდება G-ცილასთან შეუღლებული რეცეპტორების და ასევე თიროზინ კინაზული რეცეპტორების ფოსფორილირების გზით. ფოსფორილირებული ფოსფატიდილინოზიტოლ-3,4,5- ტრიფოსფატი(PIP3) იწვევს პროტეინ კინაზა B-ს, იგივე Akt-ს აქტივაციას ეს კი იწვევს ცილა mTOR-ის აქტივაციას (Schieke et al., 2006).

I.4.2 PTEN ცილა, როგორც Akt-ს ინჰიბიტორი მოლეკულა

PI3K-ს საპირისპირო მოქმედება გააჩნია PTEN-ცილას(ფოსფატაზა და ტენსინის ჰომოლოგი-phospatase and tensin homolog) ამის გამო ეს ცილა სიმსივნის სუპრესორი ცილების ჯგუფს მიერკუთვნება,ნანახია რა PI3K/Akt/mTOR სასიგნალო გზის ჰიპერაქტივაცია სიმსივნეების დროს(Chalhoub, Baker, 2009). PI3K -გან განსხვავებით, PTEN ცილა ფერმენტ Akt-ს უარყოფით რეგულატორს წარმოადგენს, რომლის გააქტიურებაც იწვევს AKT-ს დეფოსფორილირებას და შესაბამისად,მისი აქტივობის შემცირებას. ზოგადად, ცილა PTEN-ის გააქტიურება სხვადასხვა გზით მიმდინარეობს. მაგალითად, უჯრედში Ca^{+2} -ის რაოდენობის მატების შემთხვევაში, რისი მიზეზიც NMDA-რეცეპტორის ჰიპერაქტივაცია. ცილა PTEN-ის ეფექტი გამოიხატება იმაში, რომ ის ახდენს ფოსფატიდილინოზიტოლ-3,4,5-ტრიფოსფატის(PIP3)-ის დეფოსფორილირებას, რის შედეგადაც ის გარდაიქმნება ფოსფატიდილინოზიტოლ-4,5-დიფოსფატად(PIP2) ,შესაბამისად ხდება PIP3-ის რაოდენობის შემცირება და ვეღარ ხდება ცილა Akt-ს ფოსფორილირება. ამიტომაც PTEN წარმოადგენს PI3K/Akt/mTOR სასიგნალო კასკადის ინჰიბიტორს და განიხილება როგორც სიმსივნის სუპრესორი მოლეკულა. ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემებით დასტურდება, რომ ბუნებრივი

ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევის პირობებში ხდება სწორედ ცილა PTEN-ის აქტივაცია (Brito et al., 2015). PTEN ცილის მაკოდირებელი გენი მიიჩნევა ერთ-ერთ ყველაზე გავრცელებულ სიმსივნის სუპრესორ გენად, აღმოჩნდა, რომ პროსტატის სიმსივნის მქონე მამაკაცთა 70%-ს ცილა PTEN-ის მაკოდირებელი გენის მუტაცია გააჩნია. PTEN-ის მაკოდირებელი გენის დარღვევას ასევე შეუძლია გამოიწვიოს ისეთი სიმსივნეები როგორიცაა მკერდის კიბო, ფილტვის სიმსივნე, გლიობლასტომები და საშვილოსნოს ენდომეტრიუმის სიმსივნეები (Hopkins et al., 2018).

I.4.2 პროტეინ კინაზა B- ცილა Akt

პროტეინ კინაზა B (PKB) ასევე ცნობილი როგორც ცილა Akt წარმოადგენს სერინ/თრეონინ სპეციფიურ პროტეინ კინაზას. ძუძუმწოვრებში დღესდღეობით აღმოჩენილია ამ ცილის 3 იზოფორმა, რომლებიც ძალიან მცირედით განსხვავდებიან ერთმანეთისგან, ესენია ე.წ Akt1, Akt2 და Akt3 (PKBα, PKBβ და PKBγ). ეს ცილა შეიცავს სამ ფუნქციურ დომენს, ესენია N-ტერმინალური პლექსტრინის ჰომოლოგიური დომენი, ცენტრალური კინაზური დომენი და C-ტერმინალური რეგულატორული დომენი. Akt-ს იზოფორმებს შორის განსხვავებას განაპირობებს მათ რეგულატორულ საიტებს შორის არსებული სხვაობა. ყველაზე ფართოდ გავრცელებულ იზოფორმას წარმოადგენს Akt1. ის ძირითადად გვხვდება ძუძუმწოვრების ქსოვილების უმრავლესობაში. ცილა Akt1-ის აქტივაციისთვის საჭიროა მისი რეგულატორული საიტის შემადგენლობაში მყოფი სერინის 474-ე და თრეონინინს 308-ე ნაშთების ფოსფორილირება(Manning, Toker, 2017). ცილა Akt ლოკალიზებულია პლაზმურ მემმრანაში, მისი ფოსფორილირება იწვევს ისეთ პროცესებს როგორიცაა ტრანსკრიფციის ფაქტორი ცილის CREB-ის (C-AMP responce element-binding protein) აქტივაცია, ის უკავშირდება დნმ-ის კონკრეტულ უბანს-ე.წ CRE (C-AMP responce element) ციკლიური ამფ-ის საპასუხო ელემეტს, და მასთან დაკავშირებით იწვევს კონკრეტული გენების ტრანსკრიფციის აქტივაციას ან პირიქით. რაც იწვევს გარკვეული ცილების სინთეზის ინტენსივობის გაზრდას, მათ შორისაა ისეთი ცილები როგორიცაა სომატოსტატინი, და საათის გენების ცილები-PER1 და PER2. Akt-ს ფოსფორილირება ასევე იწვევს ცილა p27-ის ინჰიბირებას რომელიც როგორც ცნობილია წარმოადგენს ციკლინ დამოკიდებული კინაზების ციკლინ E-CDK2-ს და ციკლინ D-CDK4-ის ინჰიბიტორს. აღნიშნული ციკლინები უზრუნველყოფენ უჯრედული ციკლის გადასვლას G1 ფაზაში. შესაბამისად p27-ის ინჰიბირება გამოიწვევს უჯრედული ციკლის აქტივაციას. ამასთანავე Akt-ს ერთ-ერთ ეფექტს წარმადგენს ფერმენტ გლიკოგენსინთაზკინაზა-3-ის(GSK-3) ინაქტივაცია. GSK-3 წარმოადგენს

პროტეინკინაზას რომელიც უზრუნველყოფს ფერმენტ გლიკოგენსინთაზას ფოსფორილირებას, ამ ფერმენტის სერინისა და თრეონინის ნაშთებზე ფოსტატის ჯგუფის გადატანით. ფერმენტი გლიკოგენ სინთაზა კი აქტიურია არაფოსფორილირებულ მდგომარეობაში. ამ ფერმენტის ფუნქციას წარმოადგენს გლოუკოზის ნაშთებიდან გლიკოგენის წარმოქმნა. GSK-3 ის მიერ გლიკოგენ სინთაზას ფოსფორილირება კი გამოიწვევს გლიკოგენეზის ინჰიბირებას. და ვინაიდან Akt-ს აქტივაცია იწვევს GSK3-ის ინაქტივაციას, შესაბამისად აღარ ხდება გლიკოგენეზის პროცესის ინჰიბირება და ამის საპირისპიროდ ადგილი აქვს გლუკოზიდან გლიკოგენის სინთეზის გააქტიურებას(Varghese et al., 2001;Polter et al., 2011).

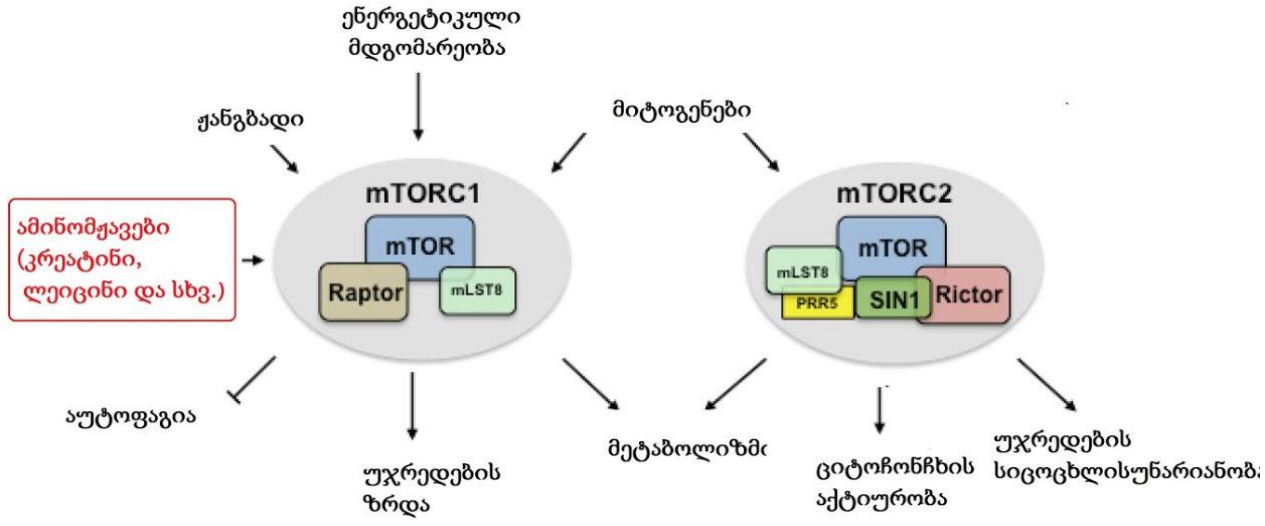
I.4.3 ძუძუმწოვრების რაფამიცინის სამიზნე ცილა- mTOR(mammalian target of rapamycin)

mTOR არის 289 KDA-იანი ცილა, რომელიც წარმოადგენს სერინ-თრეონინ პროტეინკინაზას. მისი აქტივაცია ხდება ფოსფორილირებით, ზრდის ფაქტორებისა და სტრესის საპასუხოდ. mTOR ნანახია როგორც საფუარ სოკოებში, ასევე ყველა სახის ეუკარიოტულ ორგანიზმებში მათ შორის მცენარეებში, მწრებსა და ძუძუმწოვრებში. მას გააჩნია არსებითი ფუნქცია ცილის სინთეზში, ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში, ლიპიდების მეტაბოლიზმში, უჯრდის აუტოფაგიაში ლიზოსომების ბიოგენეზში და მრავალ სხვა პროცესში. ასევე თავის ტვინში ის მონაწილეობს აქსონალურ ზრდაში, აქსონალურ რეგენერაციაში და მიელინიზაციაში, იონური არხების ექსპრესიაში, ასტროციტების მიგრაციასა და პროლიფერაციაში(Lee et al., 2017). mTOR -ის აღმოჩენამ და შესწავლამ ფუნდამენტურად შეცვალა მეცნიერების შეხედულება უჯრედის პროლიფერაციაზე. ცილა mTOR-ის აქტივაცია არის არა სპონტანური არამედ ეს არის მაღალორგანიზებული პროცესი რომელიც რეგულირდება მასთან დაკავშირებული გარე და შიდაუჯრედული სასიგნალო მოლეკულებით.

mTOR ორი კომპლექსის სახით არსებობს, ესაა ე.წ. mTORC1 კომპლექსი1 და mTORC2 კომპლექსი2. mTORC1-ის ძირითადი დანიშნულებაა ცილის სინთეზის კონტროლი, უჯრედების ზრდა და პროლიფერაცია.კომპლექსი სტიმულირდება ზრდის ფაქტორებითა და ზოგიერთი ამინომჟავით, აგრეთვე მისი აქტივობა იზრდება ოქსიდაციური სტრესის ზრდისა და ანთებითი პროცესების საპასუხოდ. mTORC1 კომპლექსი1-ის შემადგენლობაში გარდა mTOR-სა შედის ცილა MLST8, რომელიც ადამიანებში კოდირდება MLST8 გენით. ის შედის mTOR ის ორივე კომპლექსის mTORC1და mTORC2-ის შემადგენლობაში. ნანახია ცილა MLST8-ის რაოდენობის ზრდა მსხვილი

ნაწლავის და პროსტატის სიმსივნეების დროს. ასევე პირველი კომპლექსის შემადგენლობაში შედის ცილა Pras40, Raptor და Deptor.ცილა Raptor-ს (Regulatory associated protein of mTOR) იგივე KIAA1303 ადაპტორი ცილაა რომელიც კოდირდება RPTOR გენით. გენი ლოკალიზებულია მე-17 ქრომოსომაში. გენის პროდუქტია ორი მ-რნმ რომლებიც ტრანსლირებენ Raptor-ის ორი იზოფორმის სინთეზს. Raptor1 იზოფორმა შეიცავს 1335 ამინომჟავას, ხოლო Raptor-ის მეორე იზოფორმა 1177 ამინომჟავას შეიცავს(Sciarretta et al., 2015). ცილა Deptor-ც ასევე შედის mTOR-ის ორივე კომპლექსის შემადგენლობაში. მას ასევე უწოდებენ DEP დომენის შემცველ ცილას-DEPDC6, ის შედგება 409 ამინომჟავისგან. Deptor ცნობილია როგორც mTOR-ის ინჰიბიტორი მოლეკულა. ის ჩართულია ისეთ მოლეკულურ მექანიზმებში, როგორებიცაა უჯრედული ზრდა და აპოპტოზი, აუტოფაგია და სტრესის საპასუხო რეაქციები.Deptor-ურთიერთქმედებს mTOR-თან და აინჰიბირებს მის კინაზურ აქტივობას, ხოლო Deptor-ის რაოდენობის შემცირება თავდაპირველად იწვევს mTOR-ის აქტივობის ზრდას, რაც შემდგომში იწვევს ცილა Deptor-ის ექსპრესიის შემცირებას (Inoki et al., 2003).

რაც შეეხება mTORC2 კომპლექს 2-ს მის შესახებ შედარებით ნაკლები ინფორმაციაა ცნობილი, თუმცა დღესდღეობით დადგენილია რომ ის აკონტროლებს უჯრედულ მეტაბოლიზმს და ასევე უჯრედის ციტოჩონჩხის რეორგანიზაციაზე ახდენს ზეგავლენას. mTORC2 კომპლექსი 2-ის შემადგენლობაში გარდა ცილებისა: mTOR; Deptor და mLST8, რომლებიც შედიან ასევე mTORC1-ის შემადგენლობაში დამატებით შედის ცილები: Rictor, mSin1;protor1 და protor2-ს(Garami, 2003).



სურათიI.2 mTORC1-სა და mTORC2 კომპლექსების შემადგენლობაში შემავალი ცილები

mTOR-ის ფუნქციაზე ზეგავლენას ახდენს ისეთი რეცეპტორების აქტივაცია როგორებიცაა NMDA, AMPA, ტროპომიოზინის რეცეპტორის კინაზა B (TrkB), დოფამინერგული და მეტაბოტროპული გლუტამატური რეცეპტორები (mGLuRs). ჩვენი წინა კვლევებით ნანახია რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის შედეგად გამოწვეული სტრესის დროს ხდება შიდაუჯრედული კალციუმის იონის რაოდენობრივი ზრდა, უჯრედებზე კორტიზოლის ჭარბი რაოდენობით ზემოქმედების გამო, და კალციუმის რაოდენობრივი მატებაც უჯრედში ასტიმულირებს mTORC1-ის აქტივაციას, ვინაიდან ამ დროს ხდება IP3K-სა და Akt-ს ფოსფორილირება. თუმცა როდესაც საქმე ქრონიკულ სტრესს ეხება დროთა განმავლობაში ხდება mTOR-ის ექსპრესიის შემცირება, რაც ჩვენს მიერ მიღებულ შედეგებშიც იქნა ნანახი. ამასთანავე საგულისხმოა ის ფაქტიც, რომ NMDA რეცეპტორის ანტაგონისტი ნივთიერების კეტამინის ზემოქმედება იწვევს ჰიპოკამპის უჯრედებში ფერმენტ გლიკოგენსინთაზკინაზა3-ის (GSK-3)-ის ინჰიბირებას, რის შედეგადაც ვეღარ ხდება GSK3-ით IP3K/Akt/mTOR-სასიგნალო კასკადის ინაქტივაცია. ამიტომ კეტამინი და სხვა ანტიდეპრესანტი საშუალებებიც გვევლინება როგორც mTOR-ის სასიგნალო გზის გამააქტივებებლი მოლეკულები (Sancak et al., 2010).

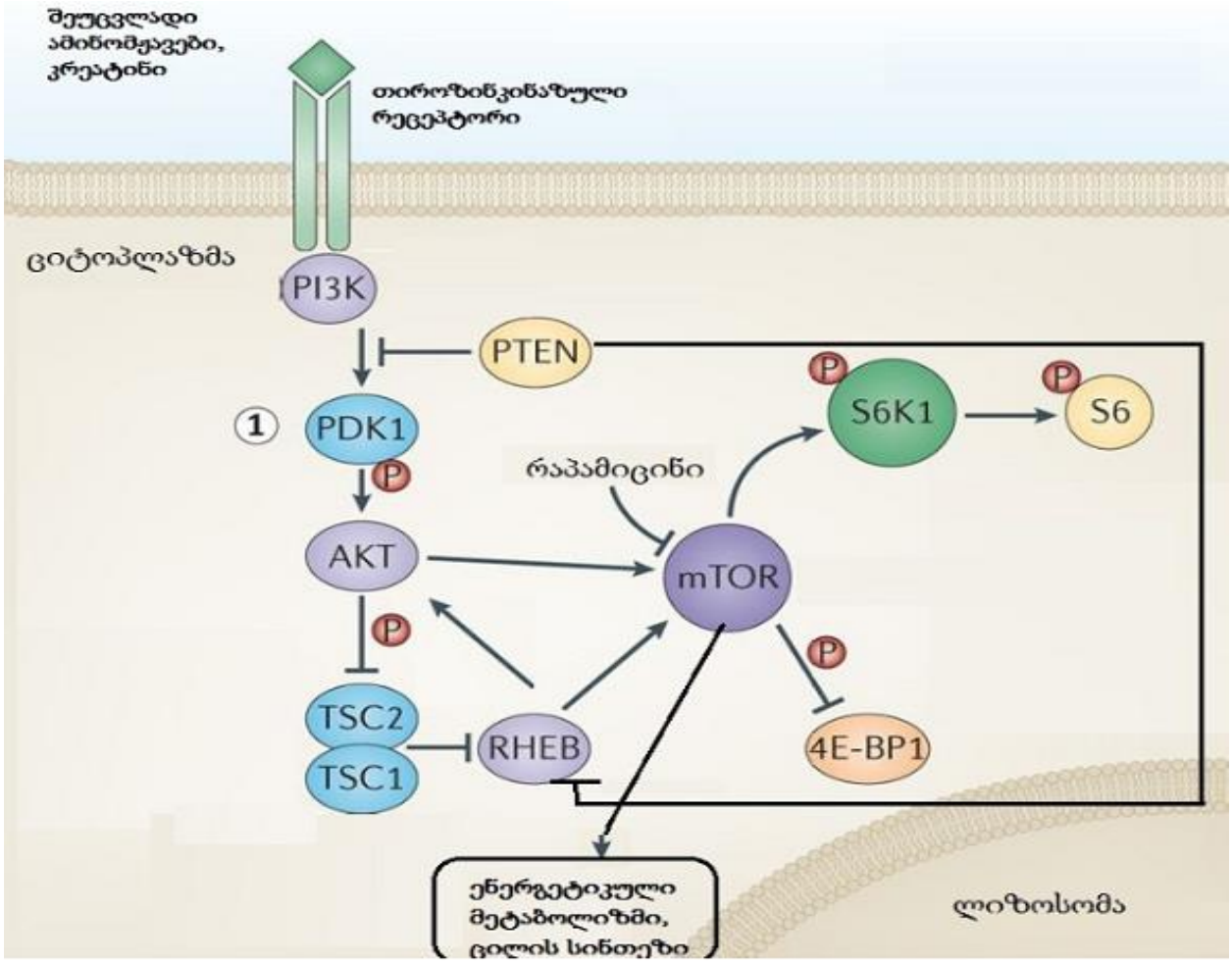
I.4.4 ეუკარიოტული ტრანსლაციის ინიციაციის ფაქტორის E4-ის დამაკავშირებელი ცილა 4E-BP1

გააქტივებული mTOR უზრუნველყოფს ანაბოლური პროცესების აქტივაციას ვინაიდან იწვევს ეუკარიოტული ტრანსლაციის ინიციაციის ფაქტორის დამაკავშირებელი ცილის 4E-BP1(Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1) ფოსფორილირებას, რითიც ამცირებს მის აფინობას ეუკატიოტული ტრანსლაციის ინიციაციის ფაქტორთან eIF4E(Eukaryotic translation initiation factor 4E). ეს პროცესი ხელს უშლის eIF4E ტრანსლაციის ფაქტორთან მისი ინჰიბიტორი ცილის 4E-BP1-ის დაკავშირებას, და შედეგად ხდება ტრანსლაციის ინიციაციის გაადვილება. დღესდღეობით დადგენილია რომ mTORC1 კომპლექსი1-ის შემადგენლობაშ შემავალი ცილებიდან სწორედ მისი კატალიზური ფუნქციის მქონე ცილა Raptor უზრუნველყოფს 4E-PB1-თან დაკავშრებას და შედეგად

მის ფოსოფორილირებას, რაც ინიციაციის ფაქტორის დამაკავშირებელი ცილის ინჰიბირებას იწვევს(Garami, 2003).

I.4.5 რიბოსომული ცილის კინაზა S6K1

რიბოსომული ცილის კინაზას S6K1 (70KDa) სამიზნე ცილას წარმოადგენს რობოსომული S6 ცილა. S6K1-კინაზა ახდენს S6-რიბოსომული ცილის ფოსფორილირებას რის შედეგადაც ხდება ცილის სინთეზის ინდუქცია რიბოსომის მიერ. რიბოსომული ცილა წარმოადგენს რიბოსომის სტრუქტურულ კომპონენტს, რომელიც უკავშირდება რ-რნმ-ს და ქმნის სუბერთეულებს. ეს ცილები პირველად შეისწავლეს Escherichia coli-ს მაგალითზე. E.coli-ს რიბოსომების შესწავლისას დადგინდა რომ პროკარიოტული და ეუკაროტული რიბოსომები განსხვავდება ერთმანეთისგან მათი სედიმენტაციის კონსტანტით. ვინაიდან განსხვავებულია მათი სუბერთეულების სედიმეტაციის კონსტანტა, პროკარიოტული რიბოსომის მცირე სუბერთეულის სედიმენტაციის კონტანტა არის 30S ხოლო დიდი სუბერთეულის-50S. ხოლო რაც შეეხებათ ეუკარიოტულ რიბოსომებს, მათი მცირე სუბრეთეულის სედიმენტაციის კონსტანტა არის 40S, დიდი სუბერთეულის-60S. რიბოსომული კინაზა- S6K1 უზრუნველყოფს ეუკარიოტული რიბოსომის მცირე სუბერთეულის შემადგენლობაში მყოფი S6 ცილის ფოსფორილირებას, რაც აუცილებელია რიბოსომის მიერ მესენჯერული რნმ-ის ტრანსლაციისთვის. S6K ცილა იყო ერთ-ერთი პირველი კინაზა რომელიც იდენტიფიცირებულ იქნა როგორც mTOR-ის სამიზნე მოლეკულა(Kim, Guan, 2011). ძუძუმწოვრებში არსებობს S6K-ს ორი ჰომოლოგი: S6K1 და S6K2 რომელთა შორისაც განსხვავებას განაპირობებს რეგულატორული უბნის N და C-ტერმინალური უბნების ამინომჟავური შედგენილობა. რიბოსომული ცილის S6K-ს სრული აქტივაციისთვის საჭიროა 389-ე პოზიციაზე მყოფი თრეონინის ნაშთის ფოსფორილირება, რაც ხდება ცილა mTOR ის საშუალებით.



სურათი I.3 ფოსფორილირებული mTOR-ის მიერ ჩართული უჯრედშიდა პროცესები

mTORC1-ის შემადგენლობაში შემავალი ცილები მგრძნობიარეა მაკროლიდების ჯგუფში შემავალი ანტიბიოტიკის-რაფამიცინის მიმართ. ამ ანტიბიოტიკს წარმოქმნის ბაქტერია *Streptomyces hygroscopics.* რაფამიცინი თავდაპირველად აღმოჩენილი იყო როგორც სოკოს საწინააღმდეგო პრეპარატი, ამასთანავე მალევე დადგინდა, რომ ის იწვევს ინტერლეიკინ2(IL-2)-ის ინჰიბირებას რის შედეგადაც ხდება იმუნური სისტემის სუპრესია. ამასთანავე რაფამიცინის ზემოქმედებით ინჰიბირდება უჯრედების ზომაში ზრდა და პროლიფერაცია. დღესდღეობით რაფამიცინი გამოიყენება მედიცინაში როგორ ძლიერი იმუნოსუპრესანტი და ასევე ანტისიმსივნური პრეპარატი. ხოლო რაც შეეხება mTORC2- რაფამიცინისადმი შედარებით ნაკლებ მგრძნობელობას ავლენს, სწორედ ამის გამო mTORC2 კომპლექსის აქტივობის ინჰიბირებისთვის საჭიროა რაფამიცინის უფრო

ხანგრძლივი ზემოქმედება.რაფამიცინი აინჰიბირებს რიბოსომული პროტეინ S6 კინაზა 1-ის (p70S8K) და ეუკარიოტული ინიციაციის ფაქტორის დამაკავშირებელი ცილის ფოსფორილირებას. შესაბამისად ამცირებს ტრანსკრიფციის და ტრანსლაციის ინტენსივობას(Xie et al., 2018).

mTOR-ს ასევე მნიშვნელოვანი როლი აკისრია თავის ტვინის განვითარებაში. ის უზრუნველყოფს დასწავლისა და მეხსიერების ფორმირებას ჰიპოკამპში და ახალი სინაფსური კავშირების ჩამოყალიბებას თავის ტვინის პრეფრონტალურ ქერქში. დასწავლისა და მეხსიერების ფორმირების პროცები mTOR ის დახმარებით ხორციელდება სინაფსებში ცილის სინთეზის გაძლიერებით. mTOR-ის როლს მეხსიერების ჩამოყალიბებაში მიანიშნებს ის ფაქტიც რომ ნანახი იქნა PI3K/Akt/mTOR სასიგნალო გზის ჰიპერაქტივაცია ალცაიმერით დაავადებულ ადამიანებში(Oddo,2012).

II თავი. კვლევის ობიექტი და გამოყენებული მეთოდები

II.1 კვლევის ობიექტი

კვლევის ობიექტს წარმოადგენდა 45 მამრობითი სქესის,თეთრი ფერის ლაბორატორიული ვირთაგვა, რომლებიც დაყოფილნი იყვნენ სამ ჯგუფად, თითოეულ ჯგუფში-15 ვირთაგვა. I ჯგუფი G1 წარმოდგენილი იყო კონტროლის სახით, ეს ვირთაგვები იმყოფებოდნენ ნორმალურ პირობებში, მათ არ ჰქონდათ დარღვეული დღეღამური ციკლი, თანაფარდობა სინათლისა და სიბნელის ფაზებს შორის შეადგენდა 10/14 საათს, ამასთანავე ისინი მოქცეულნი იყვნენ ერთად საერთო გალიაში. II ჯგუფის ვირთაგვები-G2 იმყოფებოდნენ სოციალური იზოლაციის ქვეშ, ისინი ცალ-ცალკე იყვნენ მოთავსებულნი გალიებში და ამასთანავე დარღვეული ჰქონდათ ნორმალური ცირკადული რიტმიც ვინაიდან მთელი ექსპერიმენტის მანძილზე იმყოფებოდნენ სრულ სიბნელეში (სინათლესა და სიბნელეს შორის თანაფარდობა - 23,5/0,5 სთ). მესამე ჯგუფის-G3 ინდივიდები ასევე იმყოფებოდნენ სოციალური იზოლაციისა და ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში, და სტრესის პარალელურად მკურნალობის მიზნით, ყოველდღიურად უკეთდებოდათ კრეატინის ინექცია ინტრაპერიტონეალურად 140მგ/კგ-ზე. არცერთი ჯგუფის ვირთაგვებისთვის ყნოსვითი და სმენითი შეგრძნებები არ იყო შეზღუდული. ამასთანავე მათთვის საკვებისა და წყლის მიწოდებაც ხდებოდა შეუზღუდავად. საცდელი ობიექტები ასეთ პირობებში იმყოფებოდნენ 30 დღის განმავლობაში. შემდგეგ ხდებოდა სამივე ჯგუფის ცხოველების დაძინება ქლოროფორმით და დეკაპიტაცია.

დეკაპიტაციის შემდგომ თავის ტვინიდან ვიღებდით ჰიპოკამპს და ვხმარობდით საჭიროებისამებრს. ტვინიდან იზოლირებული ჰიპოკამპი ინახებოდა მაცივარში 30 დღის განმავლობაში -40^0-50^{0}C-ზე.

II.2 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 ვაცენტრიფურირებდით (3000 g x 10´). სუპერნატანტში ცის აკონიტის მჟავას გარდაქმნის პროდუქტს ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრულად (λ=240 ნმ). ფერმენტ აკონიტაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა) (Zhuravliova et al. 2009).

II.3. 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. ნარევს ვაყოვნებდით 15 წუთით ოთახის ტემპერატურაზე და ვაცენტრიფუგებდით (3000 g x10´). სუპერნატანტში ფუმარატის რაოდენობას ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრულად (λ=240 ნმ). ფერმენტ ფუმარაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა) (Zhuravliova et al. 2009).

II.4 ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობის განსასაზღვრავად ვიყენებდით აბესა და მატსუკის მოდიფიცირებულ მეთოდს.

ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე 500 µl 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 µl 3-(4,5- დიმეთილტეტრაზოლ-2)-2,5 დიფენილტეტრაზოლინის ბრომიდზე(MTT) (0.5 მგ/მლ)დამზადებულ HBM ბუფერზე. მიღებულ სუსპენზიას ვაინკუბირებდით 45 წუთის განმავლობაში 37°C-ზე და ვაცენტრიფუგებით (16,000 rpm x 10´). მიღებულ ნალექს ვხსნიდით 800 µლ დიმეთილსულფოქსიდში, ვანჯღრევდით საღებავის გადმოსვლამდე და კვლავ ვაცენტრიფუგირებდით (16,000 rpm x 5´). შემდგომ ეტაპზე ვსაზღვრავდით მიღებული სუპერნატანტის შუქშთანთქმის სიდიდეს სპექტროფოტომეტრულად (λ=540 ნმ). ფერმენტ სუქცინატდეჰიდროგენაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე (U/მგ ცილა) გადაანგარიშებით.

II.5. ფერმენტ ალდოლაზას აქტივობის განსაზღვრა

ადოლაზას აქტივობის განსასაზღვრავად ვიყენებდით ჩაპელისა და ჰოლმსის მოდიფიცირებულ მეთოდს. ალდოლაზური აქტივობა ისაზღვრებოდა ტრიფოსფატებში არსებული ლაბილური ფოსფორის რაოდენობის მიხედვთ. საინკუბაციო ხსნარი შეიცავს 1 მლ გლიცინის ბუფერს (0.1 M, pH 9.0), 0.25 მლ ფრუქტოზო–1,6–დიფოსფატის (2 mM) ხსნარს და 0.25 მლ ჰიდრაზინის ხსნარს (0.1 M). რეაქცია ჩერდება 2 M NaOH–ის დამატებით. ფერმენტის აქტივობა ისაზღვრება სპექტროფოტომეტრულად 340 ნმ ტალღის სიგრძეზე. ფერმენტ ალდოლაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა).

II.6. ფერმენტ კრეატინკინაზას (CrK) აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობას ვსაზღვრავდით შუმანისა და სხვათა მოდიფიცირებული მეთოდით(Santos et al., 2009).

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 SHსტაბილიზატორი; pH=6.5) და მეორე რეაქტივს (2 mM ადფ, >2.8 U G6P-DH, 30 mM კრეატინფოსფატი), შეფარდებით 4:1. მიტოქონდრიული კრეატინკინაზას

აქტივობის განსაზღვრისას მეორე რეაქტივი შეიცავდა ატფ-სა და კრეატინს, pH=7.2. შემდგომ ეტაპზე 50 µl 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 (λ=340 ნმ) 1, 2, 3 წუთის შემდეგ (A1, A2, A3). ფერმენტის აქტივობას ვითვლიდით შემდეგი ფორმულით:

E = ΔA x 6508 მკატ./ლ 55

სადაც:

E - ფერმენტის აქტივობაა,

ΔA=(A1 + A2 + A3) / 3

- მიღებული სამი შუქშთანთქმის სიდიდეთა საშუალო. ფერმენტ კრეატინკინაზას აქტივობას ვითვლიდით 1 მგ ცილაზე გადაანგარიშებით (U/მგ ცილა) .

II.7 ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდის აღწერა

ვესტერნ ბლოტინგი ხშირად გამოიყენებადი ტექნიოლოგიაა უჯრედულ და მოლეკულურ ბიოლოგიაში. კვლევის ეს მეთოდი იძლევა შესაძლებლობას მოვახდინოთ ნიმუშში სპეციფიური ცილების აღმოჩენა და ამასთანავე გავაკეთოთ მათი რაოდენობრივი ანალიზი. ვესტერნ ბლოტინგის ტექნიკა მოიცავს ორ ძირითად ეტაპს, ესენია:

1. 1.SDS პოლიაკრილამიდ გელ-ელექტროფორეზი
2. 2.მიღებული ცილოვანი ფრაქციების ტრანსფერი ნიტროცელულოზის მემბრანაზე და ანტისხეულებით მონიშვნა

ნიმუშებიდან გამოყოფილი ცილების ფრაქციების ანალიზს ვახდენდით ელექტროფორეზის ხელსაწყოს საშუალებით. სინჯებში ცილის რაოდენობა წინასწარ იყო განსაზღვრული ლოურის ცილის რაოდენობის განსაზღვრის მეთოდით და თითოეულ მათგანში იყო წარმოდგენილი თანაბარი კონცენტრაციით (70 მკგ/30მლ-ში).

მიღებული ცილების ფრაქციების ანალიზი ხდებოდა ელექტროფორეზის ხელსაწყოს საშუალებით. სინჯებს ვუმატებდით იმავე მოცულობის ელექტროფორეზის სინჯის ბუფერს(20%-გლიცეროლი, 10%-მერკაპტოეთანოლი, 6%-ნატრიუმის დეოდეცილსულფატი(SDS), 0,02-0,04% ბრომფენოლის ლურჯი 250Mm Tris-HCl, Ph-6,7) და ვადურებდით 5 წუთის განმავლობაში. ელექტროფორეზის გაშვება ხდებოდა 7,5-12%-იან აკრილამიდ-ბისაკრილამიდის გელზე 110 ვოლტის სიმძლავრით ცილების სრულ დაყოფამდე.

შემდგომი ეტაპს წარმადგენდა მიღებული ცილების ტრანსფერი ნიტროცელულოზის მემბრანაზე, რომლის დაბლოკვასაც ვახდენდით 5%-იანი ალბუმინის ხსნარით, და შემდეგ უკვე ვახდენდით მემბრანაზე არსებული ცილების ანტისხეულებით მონიშვნას. მეორეულ ანტისხეულებზე მიმაგრებული ფლუორესცენტული ნივთიერება საშუალებას გვაძლევდა გადაგვეტანა მემბრანაზე ასახული ცილოვანი ფრაქციების ნათება რენდგენის ფირებზე.

ფირზე ასახული შედეგი საშუალებას გვაძლევდა დაგვედგინა როგორც კინკრეტული ცილის არსებობა ნიმუშში, ამასთანავე მისი რაოდენობაც.

II.8. 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.

ექსპერიმენტის პირველ ეტაპზე 0.4 მლ მიტოქონდრიულ სუსპენზიას ვუმატებდით 2 მლ C რეაქტივს, რომელიც თავის მხრივ მზადდება A (NaHCO3-ის (უწყლო) 2%-იანი ხსნარი დამზადებული 1 N NaOH-ზე) და B (0.5%-იანი CuSO4 x 5H2O 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 ტემერატურაზე. მიღებულ შეფერილობას ვზომავდით სპექტროფოტომეტრულად (λ=750 ნმ) და ვითვლიდით ცილის კონცენტრაციას შემდეგი ფორმულით:

$$C = (E_{საშ}-b)/a \text{ mg/ml}$$

სადაც:

C - ცილის კონცენტრაცია,

$E_{საშ}$ - მიღებული შუქშთანთქმების საშუალო,

a-y ღერძის გადაკვეთის წერტილი,

b-გრაფიკის დახრილობა.

II.9.მიღებულ მონაცემთა სტატისტიკური ანალიზი

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

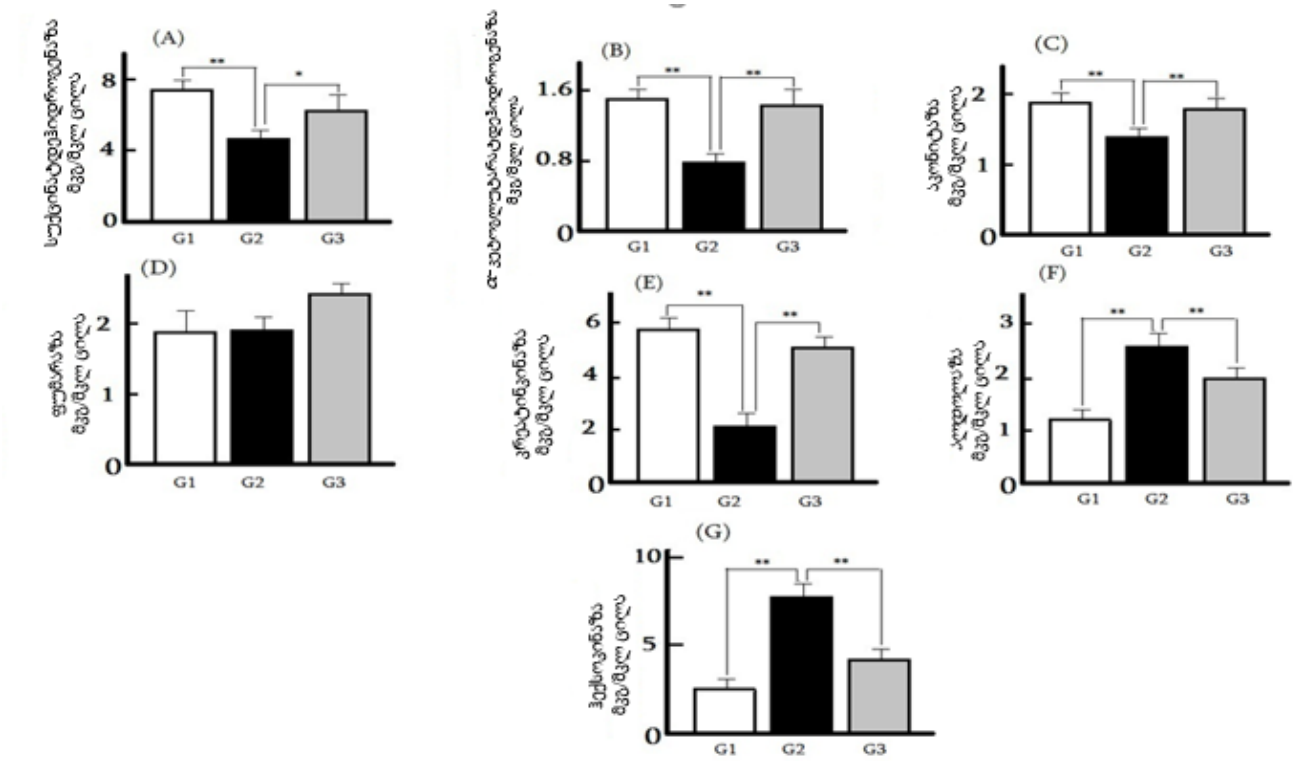
III თავი. მიღებული შედეგები

III.1. ჰიპოკამპის უჯრედებში ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ფერმენტის აქტივობის ცვლილებები ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის დროს

ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემები აჩვენებენ, რომ ხანგრძლივი 30 დღიანი ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით სტრესირებულ ვირთაგვებში (G2) ადგილი აქვს ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ზოგიერთი ფერმენტის აქტივობის შემცირებას საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით(G1). კერძოდ ეს ფერმენტებია: სუქცინატდეჰიდროგენაზა, α - კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზა, აკონიტაზა, კრეატინკინაზა. თუმცა სტრესის პარალელურად კრეატინის ეგზოგენურად მიწოდება სარწმუნოდ ზრდის მათ აქტივობას(G3). განსხვავებით ამ ფერმენტებისგან არ არის შეცვლილი ენზიმ ფუმარაზას აქტივობა სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპში (G2), თუმცა მისი აქტივობა გაზრდილია იმ ვირთაგვების ჰიპოკამპში რომელთაც სტრესის პარალელურად მიეწოდებოდათ კრეატინი (G3).

განსხვავებული შედეგები იქნა მიღებული გლიკოლიზის პროცესში მონაწილე ფერმენტების შემთხვევაში. ჩვენს მიერ შესწავლილი იქნა ამ პროცესის ორი ფერმენტი ალდოლაზა (სურ.III.1F) და ჰექსოკინაზა (სურ.III.1G). ცნობილია, რომ ალდოლაზა უშუალო სიახლოვესაა მიტოქონდრიებთან და იქ წარმოქმნილ აქტიური ჟანგბადის ფორმებთან-ROS-თან.

ამის გათვალისწინებით, ჩვენ ვივარაუდეთ, რომ ადგილი უნდა ჰქონოდა ამ ფერმენტის აქტივობის დაქვეითებას. თუმცა, მიღებულმა მონაცემებმა გვიჩვენა საპირისპირო ეფექტი, კერძოდ, ალდოლაზას აქტივობა იმატებს ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში (*F, p*) Cr-ის დამატება კი არ ცვლის მის აქტივობას (*F, p*). ალდოლაზასგან განსხვავებული მონაცემები იქნა მიღებული ჰექსოკინაზას აქტივობის შემთხვევაში (სურ.III.1G). ცდის შედეგად დადგინდა რომ, ჰექსოკინაზას აქტივობა, ალდოლაზას ანალოგიურად მატულობს სტრესირებული ვირთაგვების (G2)-ის ჰიპოკამპში (*F, p*) და Cr-ის ეგზოგენური დამატება(G3) ამ ფერმენტის აქტივობას აახლოვებს საკონტროლო მაჩვენებლებს (G1). იმის გათვალისწინებით, რომ ჰექსოკინაზა წარმოადგენს გლიკოლიზის მალიმიტირებელ ფერმენტს, უზრუნველყოფს რა გლიკოლიზის აქტივაციას, სავარაუდოა, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევა აძლიერებს თავის ტვინში გლუკოზის ანაერობულ მეტაბოლიზმს, როგორც კომპენსატორულ მექანიზმს სტრესის დროს.

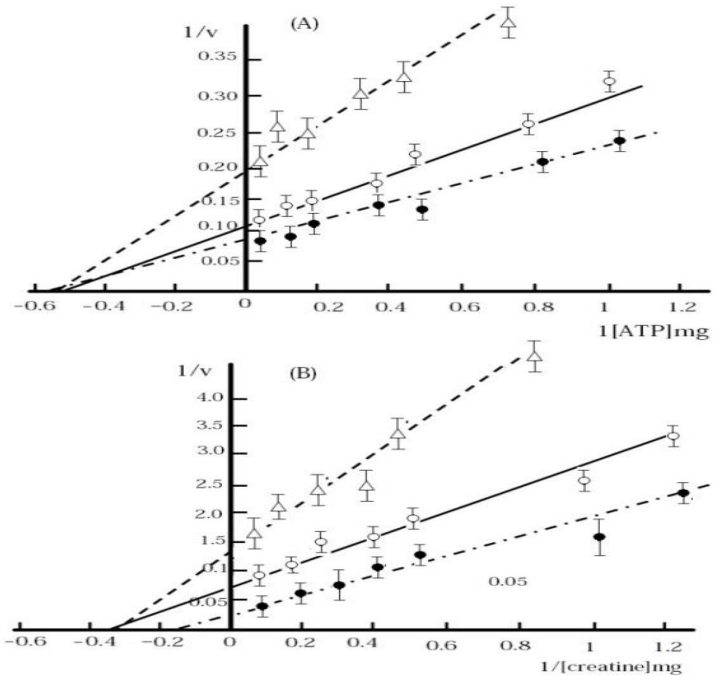


სურათი III.1 ჰიპოკამპის უჯრედებში სუქცინატდეჰიდროგენაზას (A), α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას (B), აკონიტაზასა (C), ფუმარაზას (D), კრეატინკინაზას (E), ალდოლაზასა (F) და ჰექსოკინაზას (G) აქტივობა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში და მათი ცვლილება ეგზოგენური კრეატინის მიწოდებისას

მიღებული შედეგები მიუთითებს, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მიმდინარე ოქსიდაციური სტრესის დროს, მიტოქონდრიული ჟანგვითი ფოსფორილირების შემცირების პარალელურად, ადგილი აქვს გლიკოლიზური პროცესების გაძლიერებას.

III.2. კრეატინკინაზას კინეტიკური პარამეტრების (Vmax, Km) ცვლილება ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში

ამასთანავე ჩვენ დავინტერესდით თუ რატომ იცვლება ფერმენტ კრეატინკინაზას (CK) აქტივობა სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპში (G2). ამიტომაც გადავწვყვიტეთ განგვესაზღვრა ფერმენტ კრეატინკინაზას ძირითადი კინეტიკური პარამეტრები- V_{max} და K_m. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე (სურათი III.2).



სურათიIII.2.○-კონტროლი(G1); Δ-სტრესირებული (G2); ● სტრესი+კრეატინი (G3)

აბსცისაზე (x ღერძზე) დატანილია ფერმენტული რეაქციის შებრუნებული სიდიდე- 1/V, ხოლო ორდინატაზე (y ღერძზე) სუბსტრატის კონცენტრაცია- $1/K_m$

იმის გათვალისწინებით, რომ კრეატინკინაზა ორ სუბსტრატიანი ფერმენტია- ის იკავშირებს როგორც ატფ-ს ისე კრეატინს, სწორედ ამის გამო ფერმენტის კინეტიკური პარამეტრები განვსაზღვრეთ ორივე სუბსტრატთან მიმართებაში. ექსპერიმენტის დროს ხდებოდა სუბსტრატის კონცენტრაციების თანდათანობითი გაზრდა.

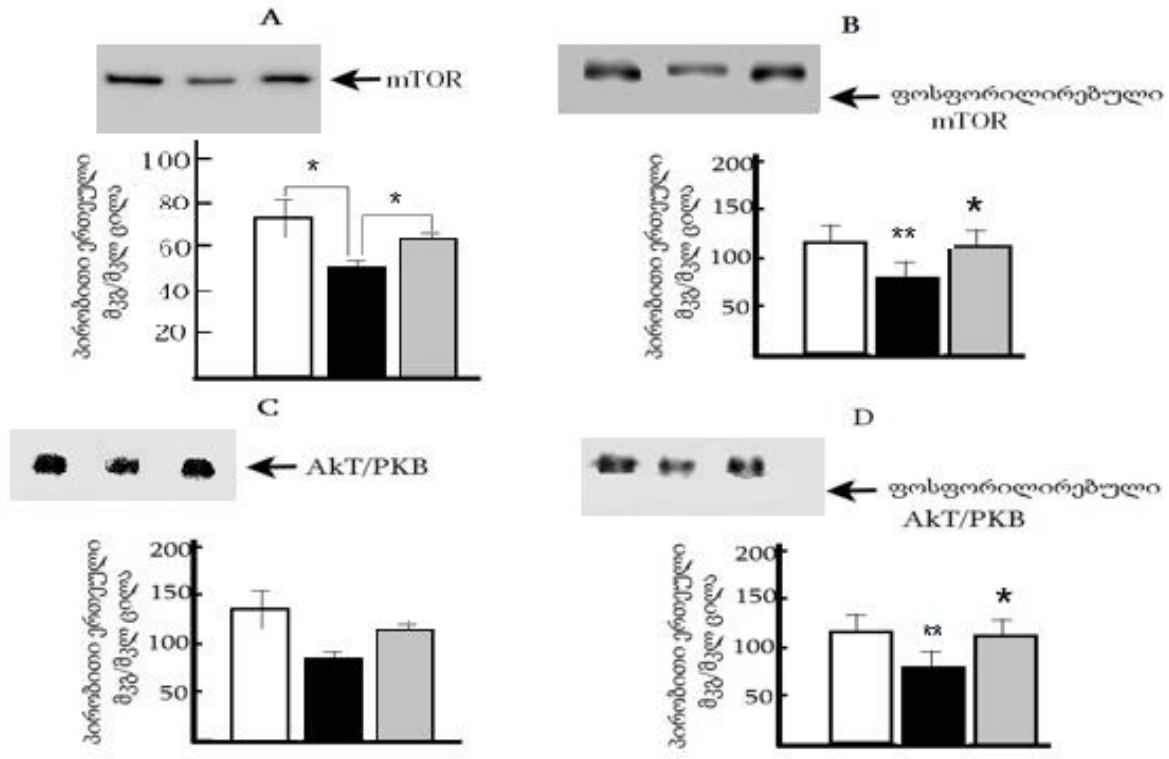
მიღებულმა მონაცემებმა გვიჩვენა რომ, ხანგრძლივი დღე-ღამური ციკლის დარღვევის პირობებში ადგილი აქვს V_{max}-ის შემცირებას. მიღებული მონაცემები საშუალებას იძლევა ვივარაუდოთ, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში კრეატინკინაზას აქტივობის შემცირების ძირითადი მიზეზი არის სწორედ სტრესის პირობებში CrK-ს რაოდენობის შემცირება. რაც სავარუდოდ გამოწვეულია უჯრედში სინთეზური რეაქციების ინტენსივობის დაქვეითებით. წარმოდგენილი სურათიდან ასევე ჩანს, რომ Cr-ის ეგზოგენური მიწოდების პირობებში გაზრდილია ფერმენტის V_{max} , რისი მიზეზიც, მისი რაოდენობის მატება უნდა იყოს.

III.3. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა PI3K / Akt / mTOR სასიგნალო გზაზე

ჩვენს მომდევნო ცდებში გვინდოდა დაგვედგინა თუ როგორ იცვლება უჯრედული მეტაბოლიზმის მარეგულირებელი ერთ-ერთი მთავარი სასიგნალო გზის აქტივობა, ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მყოფი ვირთაგვების ჰიპოკამპში(G2), საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით (G1) და აგრეთვე ისეთი ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედებშიც, რომელთაც სტრესის შედეგად განვითარებული დარღვევების პრევენიის მიზნით ვუკეთებდით კრეატინის ინექციას(G3). ამისთვის ვესტერნ-ბლოტინგის მეთოდით განვსაზღვრეთ საკონტროლო (G1); სტრესირებულ (G2); და კრეატინით ნამკურნალები (G3) ვირთაგვების პიპოკამპის უჯრედებიდან გამოყოფილი სასიგნალო მოლეკულების mTOR-სა და Akt-ს რაოდენობები.

ნანახი იქნა რომ mTOR-ის როგორც ფოსფორილირებული ისე არაფოსფორილირებული ფორმის რაოდენობები საკონტროლო ჯგუფთან (G1) შედარებით სტრესირებულ ჯგუფში (G2) სარწმუნოდაა შემცირებული, ხოლო კრეატინით ნამკურნალები სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპში (G3) კი ადგილი აქვს mTOR-ის ფოსფორილირებული და არაფოსფორილირებული ფორმების სარწმუნო რაოდენობრივ მატებას სტრესირებულ (G2) ჯგუფთან შედარებით. იხ. სურათი III.3.

რაც შეეხება პროტეინკინაზა B-ს, ასევე ე.წ Akt ცილას, ამ ცილის რაოდენობაც სარწმუნოდაა შემცირებული სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპში(G2) საკონტროლო ჯგუფთან(G1) შედარებით. ხოლო კრეატინით ნამკურნალები ვირთაგვების თავის ტვინში(G3) ნანახი იქნა Akt-ს სარწმუნო რაოდენობრივი ზრდა სტრესირებულ (G2) ჯგუფთან შედარებით და იგი საკონტროლო მაჩვენებელს (G1) უახლოვდება. იხ. სურათი III.3.



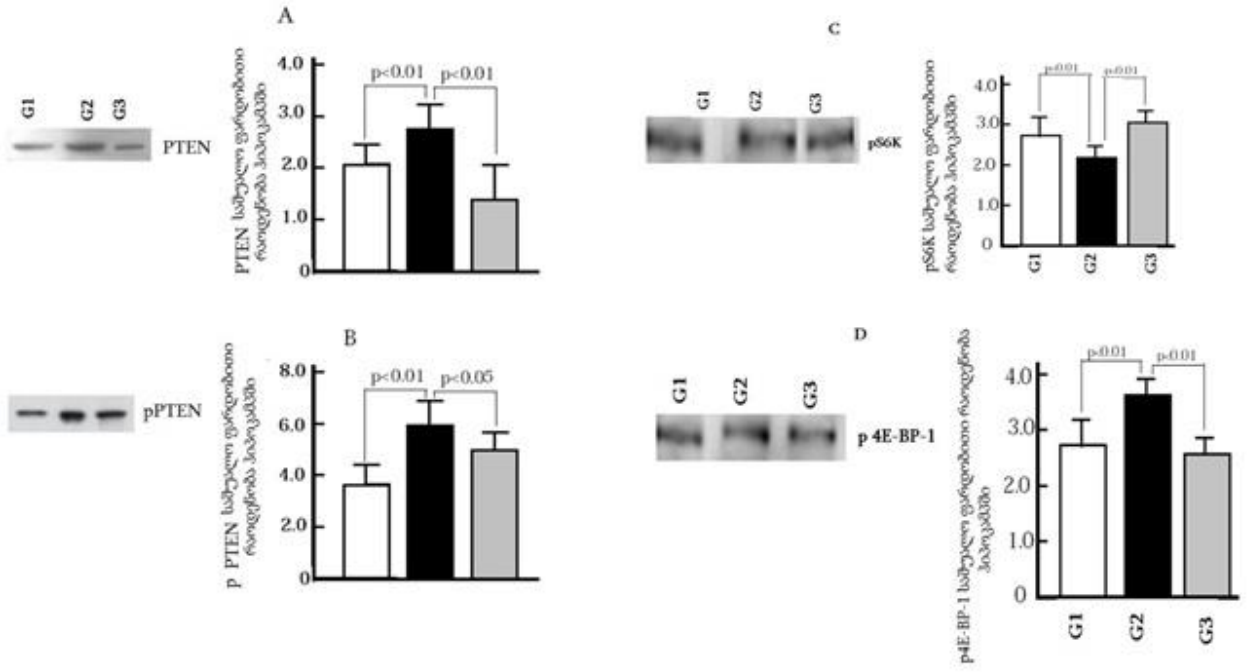
სურათიIII.3 ფოსფორილირებული და არაფოსფორილირებული mTOR-სა და Akt-ს რაოდენობრივი ცვლებები საკონტროლო(G1); სტრესირებულ(G2) და კრეატინით ნამკურნალები(G3) ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედებში.

mTOR - A; ფოსფორილირებული mTOR - B; Akt- C; ფოსფორილირებული Akt – D.

□ საკონტროლო (G1) ■ სტრესირებული (G2) ▒ სტრესირებული+კრეატინი

((*$p<0.05$, **$p<0.001$)

შემდგომ ექსპერმენტში განსაზღვრული იქნა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში PTEN ცილის აქტიური ფორმის რაოდენობრივი ცვლილებები. მიღებული მონაცემები წარმოდგენილია სურათზე III.4A და III.4B, სადაც ჩანს, რომ ამ პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში გაზრდილია ამ ფერმენტის აქტივირებული ფორმის შემცველობა, რაც შესაბამისად აისახება AKT/PKB აქტივობის შემცირებაში. როგორც ამავე სურათებიდან ჩანს, Cr -ის ეგზოგენური გზით ხანგრძლივი შეყვანა ამცირებს PTEN -ის აქტიური ფორმის რაოდენობას, რასაც შესაბამისად, მოსდევს აქტივირებული AKT/PKB-ის რაოდენობრივი მატებაც.



სურათი III.4 არაფოსფორილირებული და ფოსფორილირებული PTEN-ს, pS6K-სა და p4E-BP-1-ს რაოდენობრივი შემცველობა ჰიპოკამპის უჯრედებში ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი ცვლილების დროს და მათი ცვლილებები კრეატინის ეგზოგენურად შეყვანის პირობებში

A - PTEN; B - აქტივირებული (ფოსფორილირებული) PTEN; C - PS6K; D – p4E-BP1

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

ზემოთმოყვანილი მონაცემების გათვალისწინებით, იმის დასადგენად, თუ რამდენადაა შეცვლილი ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში ცილების სინთეზის ინტენსივობა და ასევე იმის გამოსარკვევად, ახდენს თუ არა ამ პროცესზე ეგზოგენური Cr დადებით ეფექტს, შესწავლილი იქნა რიბოსომული კინაზა S6-ს (p70S6K) და ეუკარიტული ინიციაციის 4E ფაქტორის შემბოჭველი ცილის (eukaryotic initiation factor 4E-1 (elF4E)-binding protein 1, 4E-BP-1) აქტიური ფორმების რაოდენობრივი ცვლილებები (სურ.III.4 C,D).

როგორც წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, ბუნებრივი დღე-ღამური ციკლის ცვლილების პირობებში (G2) შემცირებულია აქტივირებული p70S6K-ს რაოდენობა, რომელიც იზრდება G3-ის ჰიპოკამპის უჯრედებში. საპირისპირო მონაცემებია 4E-BP-1-ს შემთვევაში. სურათიდან ჩანს, რომ G2-ის უჯრედები ხასიათდებიან აქტივირებული 4E-BP-1-ს მაღალი შემცველობით, რაც შესაბამისად აფერხებს ცილის სინთეზის პროცესების მიმდინარეობას. G3 -ის ჰიპოკამპში აღინიშნება ამ ფაქტორის აქტივაცირებული

ფორმის რაოდენობის შემცირება, რაც მიუთითებს ეგზოგენური Cr-ის შეყვანისას ცილის სინთეზის პროცესის გააქტიურებას.

IV თავი. მიღებული მონაცემების განხილვა

ჩვენს წინა ექსპერიმენტებში შესწავლილი იქნა ეგზოგენური Cr-ის პროტექტორული გავლენა ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევით გამოწვეულ ცვლილებებზე ჰიპოკამპის უჯრედებში. კერძოდ, ნანახი იქნა, რომ ლაბორატორიული ვირთაგვას ორგანიზმში 140მგ/კგ კრეატინის 30-დღიანი ყოველდღიური შეყვანა ცირკადული რიტმის დარღვევის პარალელურად, ზრდის უჯრედებში განვითარებული ოქსიდაციური სტრესის ფონზე დაქვეითებული ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობას. გამოთქვა ვარაუდი, რომ ამის მიზეზი შესაძლებელია იყოს ეგზოგენური Cr -ის გავლენით ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების სინთეზის გაძლიერებაა. ასევე ნაჩვენები იქნა, რომ Cr-ის მიწოდება აუმჯობესებს უჯრედებში არა მარტო ანტიოქსიდანტური სისტემის მუშაობას, არამედ ატფ-ის შემცველობასაც, რაც ასევე დადებითად აისახება მათ ფუნქციონირებაზე (Aksenov et al., 1997; ; Drory, Gross, 2002; Wyss, Schulze, 2002; Baroncelli et al., 2014). ამის გათვალისწინებით, კვლევის მიზანს წარმოდგენდა იმ სავარაუდო მექანიზმის დადგენა, რომლის გზითაც ეგზოგენური Cr-ის მიწოდება დადებით გავლენას ახდენს ჰიპოკამპის უჯრედების ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზე ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში.

ცნობილია, რომ გაძლიერებული ოქსიდაციური პროცესების შედეგად, რომელიც დამახასიათებელია სხვადასხვა ტიპის სტრესული ფაქტორების და მათ შორის ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევისას, იზრდება რა ROS-ების რაოდენობა, მათ პირველად სამიზნეს წარმოადგენს მიტოქონდრიული ფერმენტები, რაც ამ ენზიმების მოლეკულებში არსებული სპეციფიკური სტრუქტურებითაა განპირობებული. მაგალითად, აკონიტაზასა და სუქცინატდეჰიდროგენაზას მოლეკულში გვხვდება Fe-S ცენტრები, რომლებიც გამოირჩევიან ოქსიდაციური პროცესებისადმი სენსიტიურობით და გამოიყენებიან როგორც ამ პროცესების მგრძნობიარე მარკერები (Brierea et al., 2005). მიღებული მონაცემებიდან ჩანს, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ჰიპოკამპის უჯრედებში საკონტროლო ჯგუფთან (G1) შედარებით სარწმუნოდაა შემცირებული როგორც სუქცინატდეჰიდროგენაზას, ასევე აკონიტაზას აქტივობა (სურ.III.1 A,C). შეინიშნება α-კეტოგლუტარატდეჰიდროგენაზას აქტივობის დაქვეითებაც, რომელიც ასევე ამჟღავნებს მგრძნობელობას ოქსიდაციური სტრესისადმი (სურ.III.1B) (Shi et al., 2011). ანალოგიური ცვლილებებით ხასიათდება კრეატინკინაზაც, რომლის მოლეკულში არსებული SH-ჯგუფების დაჟანგვა ასევე ამცირებს მის აქტივობას (სურ.III.1 E). ამის საპირისპიროდ, ფუმარაზას მოლეკულაში არ გვხვდება ამ ტიპის სტრუქტურები, რის გამოც იგი გამოირჩევა არასენსიტიურობით ამ პროცესებისადმი(Estévezet al., 2002).

სურათი III.1D-ზე წარმოდგენილი მონაცემები მიუთითებს, რომ არ შეინიშნება ფუმარაზას აქტივობის ცვლილება. მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ Cr-ის ეგზოგენური მიწოდება სარწმუნოდ ზრდის მათ აქტივობას.

ამ ფერენტების აქტივობის შემცირების პარალელურად შეინიშნება გლიკოლიზის პროცესის გაძლიერება. ცნობილია, რომ გლიკოლიზური პროცესების გაძლიერებას უჯრედში თან სდევს ლაქტატის რაოდენობის მატებაც, რაც თავის მხრივ, უჯრედის შემჟავიანების მიზეზი ხდება და ხელს უწყობს ოქსიდაციური სტრესის შედეგად დაქვეითებული ფერმენტების აქტივობის დაქვეითების ხარისხის ზრდას(Hashimoto et al. 2008). ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში გლიკოლიზის გააქტიურების მაჩვენებელია ალდოლაზასა და ჰექსოკინაზას აქტივობის ზრდა (სურ.III.1 F,G). ცნობილია, რომ ჰექსოკინაზა, რომელიც გლიკოლიზის მალიმიტირებელ ფერმენტს წარმოადგენს, უჯრედში მიტოქონდირული და სოლუბილიზირებული ფორმითაა წარმოდგენილი. მიტოქონდრიული ჰექსოკინაზას მაღალი აქტივობით გამოირჩევა ნერვული უჯრედები. ისეთ პირობებში, როცა უჯრედში ატფ-ის რაოდენობა შემცირებულია, ფერმენტი უკავშირდება რა Mg^{2+}-ს, ასოცირდება მიტოქონდრიის გარე მემბრანასთან, რასაც თან ახლავს მისი გამოთავისუფლება გლუკოზო-6-ფოსფატის მაინჰიბირებელი ეფექტიდან და შესაბამისად, სუბსტრატურილი ფოსფორილირების, ანუ გლიკოლიზური პროცესების გააქტივება. ეს პროცესი განსაკუთრებით ინტენსიურად მიმდინარეობს ატფ-ის და შესაბამისად ATP/ADP დაბალი მაჩვენებლის პირობებში, მაგალითად, ქრონიკული სტრესის შემთვევაში. სავარაუდოა, რომ იმ პირობებში, როცა ჰიპოკამპის უჯრედებში კრეატინის ეგზოგენური მიწოდებისას გაზრდილია ATP-ის და ასევე ATP/ADP მაჩვენებელი, იზრდება ჰექსოკინაზას სოლუბილიზაციის ხარისხი, რასაც თან სდევს გლუკოზის ფოსფორილირების დაქვეითება და შესაბამისად, გლიკოლიზის პროცესის შეფერხებაც(Heneberg, 2018). ამრიგად, ჩვენი კვლევის შედეგებმა აჩვენა, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევისას ადგილი აქვს ტრიკარბომჟავების ციკლის შენელებას, რაც განაპირობებს ჰექსოკინაზური აქტივობისა და გლიკოლიზის კომპენსატორულ გაძლიერებას ჰიპოკამპის უჯრედებში.

ცნობილია, რომ ზოგადად, ფერმენტის აქტივობის ცვლილების მიზეზი შესაძლებელია იყოს როგორც მათი სტრუტურული, ასევე რაოდენობრივი ცვლილებები. ამის გათვალისწინებით, საინტერესოს წარმოადგენდა გაგვერკვია კრეატინის ინტრაპერიტონიალურად მიწოდების პირობებში ფერმენტების აქტივობის ცვლილების ხასიათი. ეს საკითხი შესწავლილი იქნა კრეატინკინაზას კინეტიკური მახასიათებლების (V_{max}, K_m) ცვლილების მაგალითზე. სურათიIII.2-ზე წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებს, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში განვითარებული ოქსიდაციური სტრესის პირობებში მცირდება რეაქციის V_{max}. რაც ფერმენტის რაოდენობრივი

შემცირების მაჩვენებელია. თუმცა ასევე ჩანს, რომ სტრესის პირობებში Cr-ის ეგზოგენური შეყვანა ზრდის ფერმენტის აქტივობას V_{max}-ის გაზრდის ხარჯზე, რისი მიზეზიც, სავარაუდოდ Cr-ის შეყვანის შემთხვევაში სინთეზური რეაქციების ინტენსივობის ზრდით, უმეტესად კი კრეატინკინაზას სინთეზის ინტენსიფიკაციით უნდა იყოს გამოწვეული.

ანალოგიური შედეგებია ნანახი სხვა კვლევებშიც, სადაც გამოთქმულია მოსაზრება, რომ Cr-ის ეფექტი ფერმენტების აქტივობაზე უკავშირდება მის მონაწილეობას Cr/CK/PCr სისტემის ფუნქციონირებაში, რაც იწვევს უჯრედის ენერგეტიკული პოტენციალისა და შესაბამისად, ანაბოლური პროცესების გააქტიურებას და ხელს უწყობს სხვადასხვა ცილების, მათ შორის ფერმენტების რაოდენობივ მატებასაც (Kingsley et al., 2009; Bassit et al., 2010). თუმცა არსებობს განსხვავებული მოსაზრებაც, რომ ამის მიზეზია Cr-ის თვისება, მოახდინოს რეაქტიური რადიკალების შებოჭვა და განეიტრალება და ამ გზით მოახდინოს ზემოქმედება ფერმენტების აქტივობაზე(Guimaraes-Ferreira et al., 2012).

ჩვენს მიერ ჩატარებული mTOR-ის რაოდენობრივი ანალიზის კვლევის შედეგად მიღებული მონაცემებიდან ჩანს, რომ ჰიპოკამპის უჯრედებში ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში შეინიშნება როგორც საერთო, ასევე აქტივირებული mTOR-ის რაოდენობის შემცირება (სურ.III.3A). აღსანიშნავია, რომ mTOR-ის აქტივობა განსაკუთრებით მნიშვნელოვანია მიტოქონდრიული სუნთქვის ჯაჭვის ფუნქციონირებისათვის(Floyd et al., 2007). გამოთქმულია მოსაზრება, რომ mTOR-ის ინჰიბირებას მოსდევს მოტოქონდრიული პროცესების დაქვეითება და ამის საპირისპიროდ, გლიკოლიზური პროცესების გაძლიერება(Curtis et al., 2007), რაც კარგად გამოჩნდა ჩვენს ექსპერიმენტშიც (სურ. III.1). სურათზე წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებს, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში შეინიშნება მიტოქონდრიული ფერმენტების აქტივობის დაქვეითება, რაც შესაბამისად იწვევს ჟანგვითი ფოსფორილირების პროცესის შეფერხებას და შესაბამისად, ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დაქვეითებას. ამ პირობებში გლიკოლიზური პროცესების გააქტივებას შესაძლებელია კომპენსატორულ ფუნქცია ენიჭებოდეს.

ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემებით ასევე დასტურდება, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში, როდესაც ადგილი აქვს ჟანგვითი ფოსფორილირებისა და შესაბამისად ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა დაქვეითებას, აღინიშნება ფოსფორილირებული AKT-ს რაოდენობის შემცირება (სურ.III.3C,D). AKT-ს აქტივობის რეგულირებაში, PI3K-ს გარდა, მონაწილეობს ასევე ცილა PTEN, რომელიც PI3K -გან განსხვავებით, ამ ფერმენტის უარყოფით რეგულატორს წარმოადგენს. ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემებით ნანახი იქნა ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევის პირობებში სწორედ ცილა PTEN-ის რაოდენობრივი მატება(სურათიIII.4). ცილა PTEN-ის გააქტიურება

სხვადასხვა გზითაა შესაძლებელი. მაგალითად, უჯრედში Ca^{2+}-ის რაოდენობის მატების შემთხვევაში, რომლის მიზეზი NMDA-რეცეპტორის აქტივაციაა(Brito et al., 2015).

აღსანიშნავია, რომ ჩვენს წინა კვლევებში ნანახი იქნა ჰიპოკამპის უჯრედების პოსტსინაფსურ მემბრანებზე NMDA-რეცეპტორების ჰიპერაქტივაცია ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში, რაც მნიშვნელოვნად ცვლის ჰიპოკამპში უჯრედული პროცესების მიმდინარეობას, კერძოდ კი იწვევს Ca^{2+}-ის , აზოტის ჟანგის და H_2O_2 რაოდენობრივ ცვლილებებს. რის ფონზეც აღინიშნება ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების რაოდენობრივი შემცირება და შესაბამისად, ამ სისტემის აქტივობის დაქვეითება. ამ სისტემის ფერმენტების კინეტიკური პარამეტრების შესწავლამ აჩვენა, რომ ამ ფაქტის მიზეზი შესაძლებელია ყოფილიყო ანტიოქსიდანტური ფერმენტების რაოდენობრივი შემცირება, რაც სავარაუდოდ, სწორედ სინთეზური პროცესების ინტენსივობის დაქვეითების შედეგად ვითარდება. ხოლო კრეატინით ნამკურნალები სტრესირებული ვირთაგვების თავის ტვინში(G3) ნანახი იქნა PTEN-ის რაოდენობრივი შემცირება. როგორც წარმოდგენილი, ასევე წინა კვლევების შედეგად მიღებული მონაცემების გათვალისწინებით, ამ ეფექტის მიზეზს წარმოადგენს Cr-ის მოდულატორული ეფექტი NMDA-რეცეპტორზე, რასაც მოსდევს ჰიპოკამპის უჯრედებში როგორც Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი შემცირება, ასევე ცილა PTEN-ის აქტივაციის ხარისხის ცვლილება, რაც თავის მხრივ AKT-სა და mTOR-ის გააქტიურებისა და შესაბამისად, ჰიპოკამპის უჯრედებში ცილის სინთეზის (მათ შორის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების) ინტენსივობისა და ფერმენტების აქტივობის მატების მიზეზი ხდება.

ამ მოსაზრებას ადასტურებს ცდები, სადაც შესწავლილია აქტივირებული რიბოსომული S6K-ს რაოდენობის მაგალითზე ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ცილის სინთეზის მიმდინარეობის ინტენსივობა და მისი ცვლილება Cr-ის ეგზოგენურად მიწოდების პირობებში. ცნობილია, რომ ამ ფერმენტის აქტივობა პირდაპირაა დამოკიდებული mTOR-ით ფოსფორილირებაზე და იცვლება როგორც მწვავე, ასევე ქრონიკული სტრესის პირობებში. ჩვენს მიერ მიღებული მონაცემებიდან იკვეთება, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევისას ჰიპოკამპის უჯრედებში (G2), სადაც აღინიშნება აქტივირებული mTOR-ის რაოდენეობის შემცირება, დაქვეითებულია ასევე ფოსფორილირებული რიბოსომული S6K-ს რაოდენობაც, რაც გაზრდილია იმ ჯგუფის ჰიპოკამპის უჯრედებში, რომლებიც სტრესის პარალელურად ეგზოგენურად იღებდნენ Cr-ს (G3) (სურ.III.4C), რაც ცილის სინთეზის ინტენსივობის გაზრდის მაჩვენებელია.

ამ მოსაზრებას ადასტურებს ასევე ექსპერიმენტი, სადაც შესწავლილია აქტივირებული ტრანსლაციური რეპრესორის 4E-BP-1-ს რაოდენობრივი ცვლილებები საკვლევ ჯგუფებში (სურ.III.4D).

ცნობილია, რომ mTOR-ის ფოსფორილირება იწვევს არა მარტო S6K-ს აქტივაციას, არამედ ეუკარიოტული ტრანსლაციის ინჰიბიტორის 4E-BP1-ს ინჰიბიციასაც, რომელიც წარმოადგენს ცილის სინთეზის პროცესის შემაფერხებელ ფაქტორს და მისი აქტივობის ზრდა უკავშირდება ცილის სინთეზის ინტენსივობის შემცირებას(Kumar et al.,2002; Lang et al., 2003). როგორც წარმოადგენილი სურათიდან ჩანს, კრეატინის ეგზოგენური მიწოდების შემთხვევაში შეინიშნება ამ ფაქტორის აქტივირებული ფორმის რაოდნეობრივი შემცირება სტრესირებული ჯგუფის უჯრედებთან შედარებით, რაც ცილების სინთეზის ინტენსივობის გაზრდის მაჩვენებელია.

Vთავი. მიღებული შედეგები

1. ჩატარებულმა ექსპერიმენტებმა აჩვენა, რომ ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში ჩართული ფერმენტების დაქვეითებული აქტივობა, რაც დამახასიათებელია ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევის შედეგად განვითარებული ოქსიდაციური სტრესისათვის, მატულობს ორგანიზმში ეგზოგენურად შეყვანილი კრეატინის გავლენით;

2. ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში ფერმენტების აქტივობის კინეტიკური პარამეტრების შესწავლად აჩვენა ამ ფერმენტების რაოდენობრივი შემცირება. კრეატინის ეგზოგენურად მიწოდების პირობებში ფერმენტების აქტივობის მატების მიზეზი ხდება სინთეზური პროცესების გააქტივება, რაც ხელს უწყობს ამ ფერმენტების რაოდენობისა და შესაბამისად, მათი აქტივობის ზრდას;

3. კრეატინის ამ ეფექტის ახსნის მიზნით თავის ტვინის უჯრედებში PI3K / Akt / mTOR- სასიგნალო გზის კომპონენტების შესწავლამ აჩვენა, რომ კრეატინს, როგორც ამინომჟავური ბუნების ნაერთს, შესწევს უნარი მოახდინოს სტრესის შედეგად დაქვეითებული Akt -სა და mTOR გააქტივება, რაც ზოგადად, ხელს უწყობს ანაბოლური რეაქციების გააქტიურებას;

4. კრეატინის ეგზოგენურად მიწოდების პირობებში სინთეზური რეაქციების აქტივაციის მანიშნებელია ასევე ისეთი ფაქტორების აქტივობის ცვლილება, როგორიცაა S6K (რიბოსომული პროტეინკინაზა S6 ბეტა-1) და ეუკარიოტების ტრანსლაციის ინიციაციის რეპრესორი 4E-BP1.

დასკვნა

- ორგანიზმში ეგზოგენურად შეყვანილი კრეატინი ააქტივებს ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევის პირობებში დაქვეითებული ანაბოლური პროცესების ინტენსივობას PI3K / Akt / mTOR სასიგნალო გზის კომპონენტების აქტივაციის ხარჯზე.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Aksenov MY, Aksenova MV, Payne RM, et al. (1997) The expression of creatine kinase isoenzymes in neocortex of patients with neurodegenerative disorders: Alzheimer's and Pick's disease. Exp Neurol 146:458-465.
2. Allen PJ. 2012. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 36:1442–1462.
3. Almeida LS, Salomons GS, Hogenboom F, Jakobs C, Schoffelmeer ANM. 2006. Exocytotic release of creatine in rat brain. Synapse. 60:118–123.
4. Amaral FGD, Cipolla-Neto J.2018. A brief review about melatonin, a pineal hormone. Arch Endocrinol Metab. 62(4):472-479.
   and pharmacological response in social isolation-reared mice. Behav Brain Res 202(1):114–121.
   and selectively increase brain neurosteroid content at doses that are inactive
5. Baroncelli L, Alessandrì MG, Tola J, Putignano E, Migliore M, Amendola E, Gross C, Leuzzi V, Cioni G, and Pizzorusso T (2014) A novel mouse model of creatine transporter deficiency. F1000 Research 228:1-14.
6. Bassit RA, Pinheiro CH, Vitzel KF, Sproesser AJ, Silveira LR, Curi R. 2010. Effect of short-term creatine supplementation on markers of skeletal muscle damage after strenuous contractile activity. Eur J Appl Physiol.108:945–955.
7. Beard E, Braissant O. 2010. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. J Neurochem. 115:297-313.
8. Berkman LF. 1995. The role of social relations in health promotion. Psychosom Med
9. Bridges PK. 1982. The physiology and biochemistry of stress: some practical aspects. Practitioner. 226(1371), 575-1579.
10. Brierea JJ, Favierb J, El Ghouzzia V, Djouadic F, Benita P, and Gimenezc AP (2005) Succinate dehydrogenase deficiency in human. Mol Life Sci 62:2317–2328.
11. Brito M, Goulielmaki E, Papakonstanti EA. 2015 Focus on PTEN Regulation. Front Oncol. 205 27; 5:166.
12. Cajochen , K. Kra¨uchi, Wirz-Justice A.2003. Role of Melatonin in the Regulation of Human Circadian Rhythms and Sleep. J Neuroendocrinology. 15, 432–437.
13. Chalhoub N. Baker SJ. PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. 2009. Annu Rev Pathol. 4: 127–150.
14. Church D, Yount G, Brooks AJ. 2012. The effect of emotional freedom techniques on stress biochemistry: a randomized controlled trial. J Nerv Ment Dis. 200(10), 891-896.
15. Curtis C, Landis GN, Folk D, et al. (2007) Transcriptional profiling of MnSOD-mediated lifespan extension in *Drosophila* reveals a species-general network of aging and metabolic genes. Genome Biol 8:R262.

16. Floyd S, Favre C, Lasorsa F M, et al. (2007) The insulin-like growth factor-I-mTOR signaling pathway induces the mitochondrial pyrimidine nucleotide carrier to promote cell growth. Mol Biol Cell 18:3545-3555.
17. Garami, A. 2003. Insulin activation of Rheb, a mediator of mTOR/S6K/4E-BP signaling, is inhibited by TSC1 and 2. Mol. Cell11, 1457–1466 (2003).
18. Guimaraes-Ferreira L, Pinheiro CHJ, Gerlinger-Romero F, et al. (2012) Short-term creatine supplementation decreases reactive oxygen species content with no changes in expression and activity of antioxidant enzymes in skeletal muscle. Eur J Appl Physiol 112:3905-3911.
19. Deminice R, Rosa FT, Franco GS, Jordao AA, de Freitas EC. 2013. Effects of creatine supplementation on oxidative stress and inflammatory markers after repeated-sprint exercise in humans. Nutrition. 29:1127–1132.
20. Drory VE, Gross D (2002) No effect of creatine on respiratory distress in amyotrophic lateral sclerosis. Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord 3:43-46.
21. Estévez M, Skarda J, Spencer J, et al. (2002) X-ray crystallographic and kinetic correlation of a clinically observed human fumarase mutation. *Protein Sci 11:1552-1557.*
22. Hashimoto T, Hussien R, Cho HS, et al. (2008) Evidence for the mitochondrial lactate oxidation complex in rat neurons: demonstration of an essential component of brain lactate shuttles. PLoS ONE 3:e2915.
23. Helfrich-Förster C[1]. 2017. Interactions between psychosocial stress and the circadian endogenous clock. Psych J. 6(4):277-289.
24. Heneberg P (2018) Redox Regulation of Hexokinases. Antioxid Redox Signal 30:415-442.
25. Hopkins BD, Hodakoski C, Barrows D, Mense SM, Parsons RE. 2014. PTEN function: the long and the short of it. Trends Biochem Sci. ; 39(4):183-190.
26. Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K. L. 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115, 577–590.
27. Kiehn JT, Tsang AH, Heyde I, Leinweber B, Kolbe I, Leliavski A, Oster H. (2017). Circadian Rhythms in Adipose Tissue Physiology. Compr Physiol. 7(2):383-427.
28. Kim, J. & Guan, K. L. 2011. Amino acid signaling in TOR activation. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 1001–1032.
29. Kingsley M, Cunningham D, Mason L, et al. (2009) Role of creatine supplementation on exercise-induced cardiovascular function and oxidative stress. Oxid Med Cell Longevity 2:247-254.
30. Koch CE, Leinweber B, Drengberg BC, Blaum C, Oster H. (2016). Interaction between circadian rhythms and stress. Neurobiol Stress. 6:57-67.
31. Koike H, Ibi D, Mizoguchi H, Nagai T, Nitta A, Takuma K. 2009. Behavioral abnormality
32. Kovacic P., Somanathan R. 2014. Melatonin and Circadian Rhythm: Aging, Cancer, and Mechanism. Open Journal of Preventive Medicine.4, 7. DOI:10.4236/ojpm.2014.47065.
33. Kumar V, Frost RA, and Lang CH (2002) Alcohol impairs insulin and IGF- I stimulation of S6K1 but not 4E-BP1 in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 283:917-928.
34. Lang CH, Frost RA, and Deshpande N (2003) Alcohol impairs leucinemediated phosphorylation of 4E-BP1, S6K1, eIF4G, and mTOR in skeletal muscle. Am J Physiol Endocrinol Metab 285:1205-1215.

35. Lee G, Zheng Y, . 2017. Post-transcriptional Regulation of De Novo Lipogenesis by mTORC1-S6K1-SRPK2 Signaling. Cell. 171(7):1545-1558.
36. Maekawa T, Kim S, Nakai D, Makino Ch, Takagi T, Ogura H, Yamada K (2010) Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. The EMBO J 29: 196 – 208.
37. Mak CS, Waldvogel HJ, Dodd JR, Dodd J.R., Gilbert R.T., Lowe M.T.J. , Birch N.P., Faull R.L.M. Christie D.L. Immunohistochemical localisation of the creatine transporter in the rat brain. Neuroscience. 2009; 163(2): 571–585.
38. Manning BD, Toker A. 2017. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. Cell 169, 381-391.
39. Masood A, Banerjee B, Vijayan VK, Ray A (2006) Modulation of stress-induced neurobehavioral changes by nitric oxide in rats. Eur J Pharmacol 458: 135–143.
on 5-HT reuptake. Psychopharmacology (Berl). 186(3):362–372.
40. Pinna G, Costa E, Guidotti A. 2006. Fluoxetine and norfluoxetine stereospecifically
41. Polter, A., Beurel, E., Yang, S., Garner, R., Song, L., Miller, C.A., Sweatt, J.D., McMahon, L., Bartolucci, A.A., Li, X., and Jope, R.S. (2010). Deficiency in the inhibitory serine-phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 increases sensitivity to mood disturbances. Neuropsychopharmacology 35, 1761–1774
42. Pshennikova MG, Popkova EV, Bondarenko NA, Malyshev IIu, Shimkovich MV (2002) Catecholamines, nitrogen oxide, and resistivity to stressor lesions: effect of adaptation to hypoxia. Ross Fiziol Zh Im IM Sechenova 88:485–495.
43. Oddo S.2012. The role of mTOR signaling in Alzheimer disease. Front Biosci. 4: 941–952.
44. Refaey M., Dapeng L. 2018. Transport Stress Changes Blood Biochemistry, Antioxidant Defense System, and Hepatic HSPs mRNA Expressions of Channel Catfish *Ictalurus punctatus.* Front. Physiol., 20, doi.org/10.3389/fphys.2018.01628
45. Russell R.C., Fang C., Guan K.-L. 2011. An emerging role for TOR signaling in mammalian tissue and stem cell physiology. Development. 138 : 3343–3356
46. Rhodes, N., Heerding, D.A., Duckett, D.R., Eberwein, D.J., Knick, V.B., Lansing, T.J., McConnell, R.T., Gilmer, T.M., Zhang, S.Y., Robell, K., et al. (2008). Characterization of an Akt kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity. Cancer Res. 68, 2366–2374.
47. Sancak, Y. et al. 2010. Ragulator–Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* 141, 290–303
48. Santos PM, Scaini G, Rezin GT, Benedet J, Rochi N, Jeremias GC, Carvalho-Silva M, Quevedo J, Streck EL. 2009. Brain creatine kinase activity is increased by chronic administration of paroxetine. Brain Res Bull. 80(6):327-330.
49. Sarbassov D. D., Ali S. M., Sabatini D. M. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. Curr. Opin. Cell Biol. 17 : 596—603.
50. Sciarretta S, Zhai P, Maejima D. 2015. mTORC2 regulates cardiac response to stress by inhibiting MST1. *Cell Rep.* 11, 125–136.
51. Schieke S. M., Phillips D., McCoy J. P., Aponte A. M., Shen R. F., Balaban R. S., Finkel T. 2006. The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway regulates mitochondrial oxygen consumption and oxidative capacity. Biol. Chem. 281 : 27 643—27 652.
52. Shi Q; Xu H; Yu H; (2011). "Inactivation and Reactivation of the Mitochondrial α-Ketoglutarate Dehydrogenase Complex". The Journal of Biological Chemistry. 286 (20): 17640–17648.

53. Sies H.1986. Biochemistry of Oxidative Stress. Angewandte Chemie. 25 (12), 289-301
54. Varghese FP, Brown ES. 2001.The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis in Major Depressive Disorder: A Brief Primer for Primary Care Physicians. Primary Care Companion to The Journal of Clinical Psychiatry. 3(4):151-155.
55. Wilking M, Ndiaye M, Mukhtar H, Ahmad N. 2013. Circadian rhythm connections to oxidative stress: implications for human health. Antioxid Redox Signal. 19(2):192-208.
56. Zhao L, Yan W, Xiang H, Wang X, Qiao H. 2012. Proteomic investigation of changes in rat skeletal muscle after exercise-induced fatigue. Biol Res. 45:75–80.
57. Zhuravliova E, Barbakadze T, Zaalishvili E, et al. 2009. Social isolation in rats inhibits oxidative metabolism, decreases the content of mitochondrial K-Ras and activates mitochondrial hexokinase. Behav Brain Res 205:377–383.
58. Xie X, Hu H, Tong X, Li L., Liu X. 2018, The mTOR-S6K pathway links growth signalling to DNA damage response by targeting RNF168. Nat Cell Biol. 20(3):320-331.