ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტის სამაგისტრო პროგრამის „ბიოლოგია“-ს მაგისტრანტის

მარიამ სირბილაძის

სამაგისტრო ნაშრომი

ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში კრეატინის პროტექტორული მოქმედების შესწავლა თავის ტვინის ანტიოქსიდანტური სისტემის მაგალითზე

ხელმძღვანელი - პროფ. ნანა კოშორიძე

თბილისი - 2019

სარჩევი

ანოტაცია 3

Annotation 3

შესავალი 5

I. ლიტერუტურული მიმოხილვა 7

I.1. სტრესი და მისი გამომწვევი ფაქტორები 7

I.2. სტრესი და ანტიოქსიდანტური სისტემა 12

I.3. კრეატინი 219

I.4. სტრესი და მისი კრეატინით პრევენცია 22

II. კვლევის ობიექტი და გამოყენებული მეთოდები 25

II.1. კვლევის ობიექტი 25

II.2. Cr -ის დამატება 25

II. 3. სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობის განსაზღვრა 26

II.4. კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა 26

II.5. აზოტის ჟანგის რაოდენობის განსაზღვრა 27

II.6. წყალბადის ზეჟანგის (H_2O_2) რაოდენობის განსაზღვრა 27

II.6. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა MTT-ტესტით 28

II.8. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ლოურის მეთოდით 28

III. მიღებული შედეგები 29

III.1. ექსპერიმენტული ცხოველების ფსიქო-ემოციური სტატუსის დადგენა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში 29

III.2. NO-სა , წყალბადის ზეჟანგისა და Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი ცვლილება ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში და ეგზოგენური კრეატინის გავლენა ამ მაჩვენებლებზე 31

III.2. კრეატინის ეფექტი ჰიპოკამპის უჯრედების ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობაზე 33

IV. მიღებული მონაცემების განხილვა 36

დ ა ს კ ვ ნ ა 40

ანოტაცია

სტრესი დღესდღეობით თანამედროვე გლობალურ პრობლემას წარმოადგენს. მისი მოქმედების ბიოქიმიური და ფიზიოლოგიური მექანიზმების შესწავლა მეცნიერების ერთ-ერთი აქტუალური საკითხია. სტრესი განაპირობებს ორგანიზმის ფიზიოლოგიურ და ადაპტაციურ პასუხებს, რომლებიც აღადგენენ ჰომეოსტაზს. ამასთანავე აღსანიშნავია ის ფაქტი რომ სტრესფაქტორბის გახანგრძლივებული ზემოქმედება უარყოფითად აისახება ორგანიზმის ჯანმრთელობის მდგომარეობაზე. სტრესის ფონზე უჯრედში მიმდინარე ფიზიოლოგიურ პროცესებს ბიოქიმიური ცვლილებები წარმოადგენს, რაც აისახება ორგანიზმის ჰორმონალური სტატუსის და სასიგნალო მოლეკულების რაოდენობირივი ცვლილებით, ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის რღვევით, ორგანიზმის ანტიოქსიდანტური სტატუსის დაქვეითებით. სტრესი საბოლოო ჯამში იწვევს დეპრესიებს და მთელ რიგ ნეიროდეგენერაციულ დაავადებებს. ამ პროცესების მიმართ განსაკუთრებით მგრძნობიარეა თვის ტვინი.

დღეს აქტუალურია ისეთი ნივთიერებების მოძიება რომელთაც შეუძლიათ მოახდინონ სტრესული მდგომარეობის პრევენცია. ამ მხრივ ჩვენი ყურადღება მიიქცია კრეატინმა,რომელსაც გააჩნია ანტიოქსიდანტური თვისებები. შესწავლილია კრეატინის პროტექტორული გავლენა დღე-ღამური ციკლის ხანგრძლივი დარღვევით გამოწვეულ ცვლილებებზე თეთრი ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედებში. ნანახია, რომ ვირთაგვას ორგანიზმში 140მგ/კგ კრეატინის 30-დღიანი ყოველდღიური შეყვანა აუმჯობესებს დღე-ღამური რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის შედეგად გაუარესებულ როგორც ფიზიოლოგიურ მახასიათებლებს, ასევე ზოგიერთ ბიოქიმიურ მაჩვენებელსაც. კერძოდ, ადგილი აქვს სტრესის შედეგად გაზრდილი აზოტის ჟანგის, H2O2 და Ca2+-ის იონის რაოდენობრივ შემცირებას. ამის პარალელურად, აღინიშნება დაქვეითებული ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების, კერძოდ სოდ-ისა და კატალაზას აქტივობის მატებაც. მიღებული შედეგების გათვალისწინებით, გამოთქმულია ვარაუდი, რომ კრეატინის შეყვანისას სტრესირებული ვირთაგების ჰიპოკამპის უჯრედებში ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობის მატების მიზეზი შესაძლებელია იყოს მისი მონაწილეობით უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და ზოგიერთი უჯრედშიდა სასიგნალო გზების გააქტივება, რასაც მოსდევს სინთეზური რეაქციების, მათ შორის ანტიოქსიდანტური ფერმენტების რაოდენობის მატებაც.

Annotation

Stress is considered as a global problem of modernity. The study of biochemical and physiological mechanisms underlying the stress is crucial for life sciences. Stress stimulates physiological and adaptive responses of the body that restores homeostasis.

Furthermore, it is noteworthy that prolonged exposure of stress affects general health condition of the organism. Physiological processes in the cells occurring during the stress usually induce biochemical changes, that are reflected by the modification of the hormonal status and signaling molecules activity, that leads to decrease in general status of energy metabolism as antioxidant scavenging status is downregulated.

Stress eventually causes depression and a number of neurodegenerative diseases. The central nervous system and specifically brain are especially vulnerable to these processes. Hence, it is important to investigate substances that can be implemented in stress prevention. In this regard, Creatine has attracted our attention because of its antioxidant stimulating properties.

Recent study describes the impact of intraperitoneal injection of creatine (140 mg/kg) in rats with disturbed natural circadian rhythm for an extended period of 30 days. Markedly, creatine-treated animals show positive changes in open-field behavioral studies and an increase in activity of certain antioxidant enzymes (SOD, Catalase) in the hippocampus, whereas the concentration of nitric oxide, H2O2, and Ca2+ ions are approximated to the control value. Similar findings have also been observed in case of Na+/K+-and Ca2+-ATP-ases.

Considering the obtained results, the reason for upregulated activity of antioxidant enzymes in hippocampal cells of stressed mice may be involvement of administrated creatine in cell energy metabolism and activation of intracellular signaling pathways, followed by enhancement of anabolic reactions, including increased synthesis of enzymes involved in antioxidant system.

შესავალი

ცნობილია, რომ ცოცხალი ორგანიზმი, როგორც თერმოდინამიკური სისტემა, გარემო არესთან ახდენს ენერგიისა და ნივთიერებათა ცვლას. ეს პროცესები განპირობებულია ენერგიის სხვადასხვა წყაროების, მათ შორის გარემო არეს განათების ხარისხით. ამ ტიპის სინქრონიზაციის პროცესი წარმოადგენს უჯრედული ჰომეოსტაზის შენარჩუნებისა და გარემოსთან ადაპტაციის საფუძველს. დროში მიმდინარე პროცესების ძირითადი ტიპები, რომლებიც განაპირობებენ სინქრონიზაციას, წარმოადგენენ ე.წ. *ბიოლოგიურ რიტმებს.* განასხვავებენ სხვადასხვა ტიპის რიტმებს. მათ შირის დღე-ღამური (ცირკადიანული) და სეზონური (ცირკანუალური) რიტმები მაღალი ხარისხით დამოკიდებული არიან გარემო არეს განათების ინტენსივობაზე დღე-ღამის ან წელიწადის დროის განმავლობაში. ცნობილია, რომ ბიოლოგიური ცირკადული რიტმების ჩამოყალიბებისა და ფუნქციონირების პროცესში ჩართულია ეპიფიზი, რომელიც ასრულებს გარე სამყაროსა და ორგანიზმის შიდა გარემოს შორის შუამავლის როლს. ლიტერატურული მონაცემები მიუთითებენ, რომ სწორედ ეპიფიზი წარმოადგენს ორგანიზმში „ბიოლოგიურ საათს“ რომლის მუშაობის ინტენსივობა შესაბამისობაშია განათების ხარისხის ცვლილებასთან. ამავე დროს ითვლება, რომ ანალიზატორული სისტემებიდან მიღებული ინფორმაცია გადის თავის ტვინის ლიმბურ სისტემაზე, კერძოდ ჰიპოკამპზე. ბოლი ხანებია, ჰიპოკამპს სხვადასხვა ფუნქციებთან ერთად, ასევე მიაწერენ ქრონოტროპული აქტივობის შესაძლებლობასაც. თუმცა ეს საკითხი ნაკლებადაა შესწავლილი.

მთელი რიგი ექსპერიმენტული კვლევები ადასტურებენ მჭიდრო კავშირს ცირკადიანული რიტმის დარღვევასა და ქრონიკულ სტრესს შორის. დადგენილია, რომ ბუნებრივი დღე-ღამური რიტმის ცვლილება დაკავშირებულია კოგნიტურ და ქცევით დარღვევებთან, აგრესიულობის ზრდასთან, მოძრაობითი რეაქციების შემცირებასთან, მეხსიერებისა და დასწავლის გაუარესებასთან. ეს ცვლილებები ისეთი პათოლოგიების ანალოგიურია, როგორიცაა დეპრესია, შფოთი და სხვ. როგორც ცნობილია, ქრონიკული სტრესის პირობებში ორგანიზმში მიმდინარე მეტაბოლური ცვლილების მიზეზი ხდება ჰორმონალური სტატუსისა და უჯრედში სასიგნალო მოლეკულების რაოდენობრივი ცვლილებები, რასაც მოსდევს შესაბამისად ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და ანტიოქსიდანტური სტატუსის რღვევა, აქტიური რადიკალების რაოდენობრივი მატება, ჟანგვითი პროცესების გააქტივება, რაც

აისახება ფერმენტების აქტივობისა და ტრანსკრიფციული და ტრანსლაციური პროცესების ინტენსივობის ცვლილებებით და ოქსიდაციური სტრესის ჩამოყალიბებით.

ცნობილია, რომ ზოგიერთ ნაერთს შეუძლია გააუმჯობესოს ოქსიდაციური სტრესის პირობებში ორგანიზმის ანტიოქსიდანტური შესაძლებლობები. ამ მხრივ, საინტერესოს წარმოადგენს ისეთი ენდოგენური ნაერთი, როგორიცაა კრეატინი. ჩართულია რა Cr/PCr/CK სისტემის ფუნქციონირებაში, კრეატინი მნიშვნელოვან როლს ასრულებს უჯრედში მიმდინარე ენერგეტიკული ბალანსის ბუფერიზაციის პროცესში. ეს პროცესი განსაკუთრებით აქტიურია ისეთი მაღალი ენერგეტიკული მოთხოვნილების უჯრედებისათვის, როგორიცაა ნერვული და კუნთოვანი უჯრედები. ლიტერატურული მონაცემების გათვალისწინებით, კრეატინი ასევე შესაძლებელია განიხილული იქნას როგორც ნეირომოდულატორი, რომელსაც შეუძლა მოახდინოს ზოგიერთი პოსტსინაფსური რეცეპტორების აქტივობის მოდულირებაც.

სადიპლომი ნაშრომის მიზანი: ზემოთთქმულიდან გამომდინარე, ექსპერიმენტის მიზანს წარმოადგენდა შეგვესწავლა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში თეთრი ლაბორატორიული ვირთაგვას თავის ტვინში, კერძოდ ჰიპოკამპის უჯრედებში ოქსიდაციური პროცესების მიმდინარეობა ამ უჯრედების ანტიოქსიდანტური სისტემის ფუნქციური მდგომარეობის გათვალისწინებით და დაგვედგინა ეგზოგენურად მიწოდებული კრეატინის გავლენა ამ პროცესებზე.

I. ლიტერუტურული მიმოხილვა

I.1. სტრესი და მისი გამომწვევი ფაქტორები

ყოველდღიურ მეტყველებაში ხშირად ვიყენებთ სიტყვა "სტრესს". ამ დროს, წესისამებრ, ვგულისხმობთ ძლიერ მღელვარებას და დეპრესიულ ფონს. ტერმინი ,,სტრესი" ბიოლოგიაში 1936 წელს შემოიტანა კანადელმა მეცნიერმა ჰანს სელიემ. ეს ტერმინი გეოლოგიიდან არის აღებული და დედამიწის პლასტებს შორის დაძაბულობას გამოხატავს, ხოლო ბიოლოგიაში და მედიცინაში შეესაბამება ორგანიზმის დაძაბულობას და სტრესულ მდგომარეობას. ხშირად სტრესულ მდგომარეობას არაკორექტულად აფასებენ და მას ორგანიზმისათვის საზიანო მოვლენად თვლიან. სელიეს მიხედვით კი სტრესი წარმოადგენს ორგანიზმის არასპეციფიკურ რეაქციას გარეგან გამღიზიანებელზე. ამგვარად, იგულისხმება, რომ სტრესი წარმოადგენს ორგანიზმის ადაპტაციური (შეგუებით-თავდაცვითი) ხასიათის რეაქციას.

ჯერ კიდევ მეოცე საუკუნის 30-იან წლებში სელიემ შეამჩნია, რომ ადამიანის ორგანიზმი ყოველგვარ გარეგან გამღიზიანებელზე ერთნაირი პირველადი რეაქციით – ერთგვარი დაძაბულობით რეაგირებს. ეს იმას არ ნიშნავს, რომ სტრესი უნდა გავიგოთ როგორც უბრალო ემოციური ან ნერვული დაძაბულობა (მიუხედავად იმისა, რომ ერთიცა და მეორეც სტრესია). ამ ტერმინს უფრო ფართო მნიშვნელობა აქვს და გულისხმობს ორგანიზმის არასპეციფიკურ (ე.ი. სხვადასხვა გამღიზიანებლის პასუხად – ერთსა და იმავე) რეაქციას გარემო პირობების ნებისმიერ ცვლილებაზე, რომელთანაც ადაპტირებაა საჭირო.

სელიეს დაკვირვებით, ცოცხალი ორგანიზმი გარე სამყაროში მიმდინარე ცვლილებებს განსაზღვრული რეაქციით პასუხობს და ცდილობს, რაც შეიძლება ნაკლები დანაკარგით მოერგოს მათ. 1936 წელს ჟურნალ "Nature-ში" სელიემ გამოაქვეყნა მოკლე ინფორმაცია "ადაპტაციური სინდრომის" შესახებ. სწორედ ეს პუბლიკაცია მიიჩნევა სტრესის შესწავლის პირველ მცდელობად.

სელიეს მიერ განსაზღვრული სტრესული რეაქციებისთვის სამი რამ არის დამახასიათებელი, კერძოდ:

- მათ აქვთ არასპეციფიკური, ყოვლისმომცველი და თითქმის ავტომატური ხასიათი. ,,არასპეციფიკურობის'' იდეა ორიგინალურად ჩაითვალა, რადგან დაუპირისპირდა პასტორის (Louis Pasteur) მიერ შემოთავაზებულ, იმ დროისთვის დომინანტ კონცეფციას, რომელიც ხაზს

უსვამდა პათოგენურ ფაქტორებსა და კავშირს ორგანიზმის სპეციფიკურ რეაქციებს შორის. ეს რეაქციები მიმართულია გამღიზიანებლით გამოწვეული ფიზიოლოგიური დისბალანსის დასაძლევად, იმისათვის, რომ იგი პირვანდელ მდგომარეობას დაუბრუნდეს; სწორედ ამიტომ უწოდა სტრესს სელიემ ,,ზოგადი ადაპტაციური სინდრომი'' (General Adaptation Syndrome - GAS).

სტრესის გამომწვევ გამღიზიანებლებს «სტრესფაქტორებს» ანუ«სტრესორებს» უწოდებენ. სტრესფაქტორები შეიძლება იყოს ინფექციის გამომწვევი აგენტები, მკვეთრად გამოკვეთილი სიცივე ან სიცხე, ჰიპოქსია, ნარკოზი, ტრავმები და ყოველგვარი გამღიზიანებელი, მათ შორის «კონფლიქტი», რომლებიც ძლიერ ემოციებს აღძრავს.

აღსანიშნავია, რომ ყოველი ინდივიდი ხასიათდება სტრესული სიტუაციებისადმი შეგუების მისთვის დამახასიათებელი ზღურბლით და ამ სიტუაციების თავიდან აცილების შესაძლებლობით. ამის გათვალისწინებით, განასხვავებენ ორი ტიპის სტრესს: ,,დისტრესს'' (Distress) - სახიფათო, უარყოფით სტრესს და ,,ეუსტრესს'' (Eustress) - დადებით, ,,მაცოცხლებელ'' სტრესს (Selye, 1974). პირველ შემთხვევაში საუბარია ჯანმრთელობისთვის ზიანის მომტან ზეწოლაზე, ხოლო მეორე შემთხვევა გულისხმობს ე.წ. სასარგებლო ზეწოლას, რომელიც მოტივაციის, ენთუზიაზმისა და ენერგიის წყაროა სირთულეების დასაძლევადა და წარმატების მისაღწევად, რაც ინდივიდებს ადაპტაციის საშუალებას აძლევს. სტრესად არის მიჩნეული ასევე გამღიზიანებლის არარსებობაც (ჰიპო-სტრესი), ისევე, როგორც გამღიზიანებლის გადაჭარბებული რაოდენობა.

ზემოქმედების მიხედვით სტრესი შეიძლება იყოს:

- ფიზიოლოგიური/სისტემური, რომელიც ძირითადად გამოხატავს ბიოლოგიური სისტემების დაძაბულობას. აღნიშნულ სტრესს თან ახლავს ორგანიზმის ფიზიოლოგიური და ქცევითი ცვლილებების კომპლექსი.
- ფიზიკური, რომელიც ჩნდება ნებისმიერი ზემოქმედების შედეგად და მოიცავს ინდივიდის ზემოქმედების სფეროს.

სტრესის რეაქციები მათი ხანგრძლივობის მიხედვით შესაძლოა დაიყოს სამ ძირითად ფაზად: შფოთვის/განგაშის ფაზა, წინააღმდეგობის გაწევის (რეზისტენტობის) ფაზა და გამოფიტვის ფაზა.

- შფოთვის/განგაშის ფაზა - ხიფათის პირობებში, ორგანიზმი ახდენს ადაპტური შესაძლებლობების მობილიზებას, რათა შოკური ფაზიდან გადავიდეს ანტიშოკურ ფაზაში. აღნიშნულ ფაზაში ინდივიდი მზადაა ბრძოლის ან გაქცევისათვის. ასეთ პირობებში, სტრესული ზემოქმედების საპასუხოდ ორგანიძმსი იწყება ადრენალინის,ადრენოკორტიკოტროპული

ჰორმონისადა გლუკოკორტიკოიდების გაძლიერებული სეკრეცია რასაც მოსდევს სიმპათიკური ნერვული სისტემის აქტივობის გაძლიერება დაამის პარალელურად პათოლოგიური პროცესების განვითარება რაც გამოიხატება ისეთი დაავადებების ჩამოყალიბებასა თუ განვითარებაში როგორიცაა ნეიროდეგენერაციული ცვლილებები იმუნური სისტემის დაქვეითება და სხვა. თუ სტრესული ფაქტორები ძალიან ძლიერია ან დიდი ხნის განმავლობაში გრძელდება, ორგანიზმი შეიძლება პირდაპირ მესამე - გამოფიტვის ფაზაში გადავიდეს,რომელსაც უკიდურეს შემთხვევაში სიკვდილის გამოწვევაც კი შეუძლია.

- წინააღმდეგობის გაწევის (რეზისტენტობის) ფაზა - ეს არის ოპტიმალური შეგუების ფაზა. გლიკოკორტიკოიდების საშუალებით იზრდება ორგანიზმის გამძლეობა. შფოთვის ფაზის დამახასიათებელი სიმპტომები ნელ-ნელა ქრება, ცხადდება სარეზერვო ძალების მობილიზაცია და წინააღმდეგობის გაწევის უნარი იზრდება. გარკვეული პერიოდის განმავლობაში მკვეთრად იზრდება ადამიანის შესაძლებლობები.
- მესამე ანუ გამოფიტვის ფაზა იწყება მას შემდეგ, რაც ორგანიზმის წინააღმდეგობის გაწევის უნარი ყველაზე მაღალ წერტილს მიაღწევს. ამ დროს თირკმელზედა ჯირკვალი წყვეტს გლუკოკორტიკოიდების გაძლიერებულ სეკრეციას.ამდროს ისევ ჩნდება განგაშის ფაზისთვის დამახასიათებელი სიმპტომები, მაგრამ, ამჯერად მათთვის თავის დაღწევა შეუძლებელია. გამოფიტვის შედეგად ვითარდება სხვადასხვა ტიპის სტრესული ეტიოლოგიის დაავადებები.

სტრესის გამომწვევი უამრავი ფაქტორი არსებობს. ამ ფაქტორებს სტრესორებს უწოდებენ. ერთი და იგივე სტრესორი სხვადასხვა ადამიანზე სხვადასხვანაირ გავლენას ახდენს – ის, რაც ერთისთვის სტრესის წყაროა, მეორისთვის შესაძლოა უბრალოდ “ძალების მოსინჯვის” შესაძლებლობა იყოს, ამიტომ ცალკეულ შემთხვევებში ძნელი სათქმელია, რამ გამოიწვია სტრესი. მიუხედავად მრავალფეროვნებისა, სპეციალურ ლიტერატურაში მაინც გამოყოფენ სტრესორთა რამდენიმე ჯგუფს, რომლებიც ზოგადი ნიშნებით გამოირჩევა და უმრავლესობისთვის სტრესორად აღიქმება. ესენია: გარეგანი ფაქტორები(ემოციური პრობლემები,სამუშაოსთან დაკავშირებული პრობლემებ, მოულოდნელი ფაქტორები როლმისთვისაც ადამიანი მზად არაა და სხვა) და შინაგანი ფაქტორები (ალერგია, ჰორმონალური დიბალანსის დარღვევ, აუტოიმუნური დაავადებები და სხვა) შესაბამისად განსხვავდება სტრესის სხვადასხვა ფორმა ორგანიზმში მიმდინარე ცვლილებებით. ამის მიხედვით განასხვავებენ რამდენიმე ტიპის სტრესს:

- მწვავე სტრესი -აგზნების გარდამავალი, დროებითი მდგომარეობა, რომელიც ხასიათდება დაწყებისა და დასრულების ნათლად გამოხატული პატერნებით. სტრესის ყველაზე გავრცელებულ ფორმაა. აღმოცენდება როგორც უახლოესი წარსულის, ასევე უახლოესი მომავლის წინასწარგანჭვრეტილ მოთხოვნებსა და ზეწოლაზე საპასუხოდ. მწვავე სტრესი მცირე დოზებით, გარკვეულწილად, ინდივიდის მობილიზაციასაც კი შეიძლება უწყობდეს ხელს, მაგრამ ხშირი მწვავე სტრესი გამოფიტვასა და გადაღლილობას იწვევს.
- ქრონიკული სტრესი ქრონიკული სტრესი არის მუდმივი დაძაბულობის მდგომარეობა, რომელიც გამოწვეულია გარემოს მოთხოვნილებების და ინდივიდის მიერ რესურსების შეუსაბამობის აღქმით. ასევე, ეს არის მუდმივი დაძაბულობის განცდა, რადგან ინდივიდი გარემოს მოთხოვნილებებს აღიქვამს, როგორც საკუთრი რესურსებისათვის შეუფერებლად მაღალს. ქრონიკული სტრესი განსხვავდება ყოველდღიური სტრესისაგან. ეს უკანასკნელი შესაძლებელია, დაიძლიოს კონკრეტული ქცევითი გზებით, თუმცა როდესაც სტრესის მოქმედების ხანგრძლივობა იზრდება, ყალიბდება ქრონიკული სტრესი, რაც იწვევს გულის დაავადებებს, ინსომნიას, დეპრესიას, შფოთვით აშლილობებს და სხვა
- ფიზიოლოგიური სტრესი- ჩნდება პიროვნების ფსიქოლოგიური მდგომარეობის დარღვევის შედეგად.
- ფსიქოლოგიური სტრესი-ვითარდება ინდივიდზე ფსიქოლოგიური ზემოქმედებით
- ინფორმაციული სტრესი-ჩნდება ან ინფორმაციული გადატვირთვის შედეგად, ან პირიქით, ინფორმაციის არ ქონით.

სტრესის დროს აქტიურდება ორგანიზმის მთელი სისტემები მაგრამ სტრესპასუხის ინტეგრაციაში განსაკუტრებული მნიშვნელობა თავის ტვინს აკისრია.სტრესსა და ემოციებზე კონტროლს ახორციელებს ლიმბური სისტემა. ამიგდალა მდიდარია გლუკოკორტიკოიდული რეცეპტორებით და ამის გამო, განსაკუთრებით მგრძნობიარეა სტრესის მიმართ. დეპრესიისა და ქრონიკული სტრესის პირობებში ამიგდალას გადაჭარბებული სტიმულაცია დაკავშირებულია აგრესიულობასა და და შფოთვის მომატებასთან. ამიგდალას დაზიანება კი, თავის მხრივ, იწვევს ვეგეტატიური ნერვული სისტემის ადეკვატური მზაობის დაქვეითებას, რომელიც პასუხისმგებელია ქცევითი საპასუხო რეაქციების ორგანიზებასა და რეალიზებაზე.

სტრესის გამომწვევ ფაქტორს მიეკუთვნება ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევა.

ცირკადული რიტმის ცნება შემოტანა ამერიკელმა ფიზიოლოგმა ფრანც ჰალბერგმა (Franz Halberg). ცირკადული რიტმი მომდინარეობს ლათინური სიტყვიდან “circa dies”, რაც ნიშნავს

„დღის შესახებ“. ცირკდული რიტმები რეგულირება თავის ტვინის ჰიპოთალამუსში, კერძოდ, სუპრაქიაზმატურ ბირთვში, რომელიც, ამავე დროს, არეგულირებს ძილ-ღვიძილის ციკლსა და სხეულის ტემპერატურას. ძილის პროცესი ძირითადად დამოკიდებულია ღვიძილის დროს ადამიანის ორგანიზმზე მოქმედ შინაგან და გარეგან გამღიზიანებლებზე. სტრესული ფაქტორების ზემოქმედების დროს ადამიანი დროულად ვერ იძინებს, იღვიძებს ჩვეულებრივზე ადრე, ძილი არის ზერელე, მოუსვენარი. უძილობა თავის მხრივ ხელს უწყობს ორგანიზმის ადაპტოგენური ძალების დაქვეითებას. ქრონიკული უძილობის დროს ორგანიზმში მცირდება მელატონინის გამომუშავება, რაც თავის მხრივ, აღრმავებს დეპრესიის განვითარებას. მელატონინი გამომუშავდება თავის ტვინში და ღამე ღრმა, მშვიდ ძილს, დღისით კი მხნეობასა და შრომისუნარიანობას განგაძლიერებული ფიზიკური და გონებრივი დატვირთვა, არასაკმარისი ძილი, ავადმყოფობა, ალკოჰოლისა და თამბაქოს ჭარბი მოხმარება, აქვეითებს ორგანიზმის გამძლეობას სტრესისადმი. დადასტურებულია, რომ სტრესი შემთხვევათა 80%-ში იწვევს გულ-სისხლძარღვთა, ნერვული, კუჭ-ნაწლავის, შარდ-სასქესო, ენდოკრინული და სხვა ორგანოთა სისტემების დაავადებას ცირკადული რიტმის დარღვევა აღინიშნება ისეთი ნეიროდეგენერაციული დაავადების მქონე პაციენტებში როგორიცაა ალცჰეიმერის დაავადება,პარკინსონის დაავადება და სხვა.

XX საუკუნის 80-იანი წლებში სტრესის გამომწვევ ფაქტორად მიიჩნიეს სოციალური იზოლაცია.სოციალური იზოლაცია – სოციალური მოვლენა, რომლის დროსაც სოციალური კონტაქტებისა და ურთიერთობების შეწყვეტის ან მკვეთრი შემცირების შედეგად, ხდება ინდივიდის ან სოციალური ჯგუფის მოწყვეტა სხვა ინდივიდებისა და სოციალური ჯგუფებისაგან.სოციალური იზოლაცია იწვევს ინდივიდებში ემოციურ და ფსიქოლოგიურ პრობლემებს.ამის მიზეზია გარე სამყაროსთან კომუნიკაციის გაწყვეტა.სოციალური იზოლაცია დიდი გავლენას ახდენს ინდივიდის ჯანმრეთელობაზე.მას შეუძლია გავლენა იქონიოს ძირითად მარეგულირებელ სისტემებზე როგორიცაა:ნერვული სისტემა, იმუნური სისტემა და ენდოკრინული სისტემა.

სოციალური იზოლაცია არის დეპრესიის გამომწვევი ერთ-ერთი რისკფაქტორი.დეპრესიის მქონე ადამიანი განიცდიდეს გაუცხოებას ირგვლივმყოფთაგან, რამაც შეიძლება განაპირობოს ადამიანებისაგან განრიდება, რადგან ადამიანებთან გაუცხოების განცდა მათთვის უსიამოვნო განცდებს უკავშირდებოდეს.

მკვლევართა დასკვნით, მარტოობა და სოციალური იზოლაცია წარმოშობს ჯანმრთელობის პრობლემებს. მარტოობის განცდას უკავშირდება ალცჰეიმერის დაავადება, ხოლო სოციალური იზოლაცია იწვევს მკერდის სიმსივნეს.

აღნიშნული სტრესფაქტორების შედეგად ორგამიზმში მიმდინარეობს ცვლიბები მაგ: ჰორმონალური ცვლიბები რასაც მოჰყვება აგრესია და შფოთვა. ხდება დეპრესისს განვითარება რაც თავის მხრივ ფსიქო ემოციურ სტრესს წარმოშობს.

სტრესის შედეგად უჯრედში განვითარებული ბიოქიმიური პროცესები ვლინდება ჰორმონალური და სასიგნალო მოლეკულების რაოდენობრივი ცვლილებით.ირღვევა ენერგეტიკული მეტაბოლიზმი.იცვლება ფერმენტული სისტემების აქტივობა რასაც მოსდევს ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის გაძლიერება.ქვეითდება ანტიოქსიდანტური სისტემა რაც უარყოფითად აისახება ორგანიძმის ფუნქციურ მდგომარეობაზე.

I.2. სტრესი და ანტიოქსიდანტური სისტემა

სტრესი ორგანიზმში იწვევს მეტაბოლურ ცვლილებებს, რაც გამოიხატება თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნით, უჯრედშიდა კალიუმის რაოდენობრივი ცვლილებით და სხვ. (Shim, Kim, 2013).

უკანასკენელ პერიოდში ცოცხალ ორგანიზმზე მოქმედი გარემო ფაქტორებით გამოწვეული ნეგატიური ეფექტებიდან განსაკუთრებული ყურადღება მიიქცია ჟანგვითმა სტრესმა, რომლის ფონზე ასევე მიმდინარეობს ისეთი პროცესები, როგორიცაა ინფარქტი, ინსულტი, სხვადასხვა ინფექციების დროს იმუნური საპასუხო რეაქციები , აპოპტოზი, გერონტოლოგიური ანუ სიბერესთან დაკავშირებული დაავადებების განვითარება და სხვა. ჟანგვით სტრესში განსაკუთრებული როლი ენიჭება თავისუფალ რადიკალურ პროცესებს. თავისუფალი რადიკალი წარმოადგენს მოლეკულას, რომელსაც აქვს გაუწყვლებელი ელექტრონი გარე ელექტრონულ ორბიტაზე (Rhee et al., 2005).

ჩვეულებრივ პირობებში, ჟანგვითი პროცესები აღწევს გარკვეულ სტაციონალურ მდგომარეობას, როცა რადიკალის წარმოქმნისა და ელიმინაციის, ანუ მათი გაუვნებელყოფის პროცესების სიჩქარეები ტოლდება და არღვევს გარკვეულ ბალანსს. სწორედ ამ ბალანსის დარღვევის შედეგია ჟანგვითი სტრესის განვითარება (Rodrigo et al., 2005).

ბუნებრივ რადიკალებს მიეკუთვნება სუპეროქსიდი, ნიტროქსიდი, უბიქინონი და სხვა. აღნიშნული რადიკალები ასრულებენ ორგანიზმისათვის აუცილებელ სასიცოცხლო ფუნქციებს. კერძოდ, ისინი მონაწილეობენ იმუნურ პასუხში, ანადგურებენ ორგანიზმში შემოჭრილ მიკრობებს. ისინი ასევე ჩართულნი არიან სუნთქვითი ჯაჭვის ფუნქციონირებაში (უბიქინონი-ელექტრონების გადამტანი სუნთქვით ჯაჭვში), ისეთი ნაერთი როგორიცაა აზოტის ჟანგი (ნიტროქსიდი) ხელს უწყობს სისხლძარღვთა ენდოთელიუმის მიე მარელაქსირებადი ფაქტორის გამომუშავებას,სისხლძარღვთა მოდუნებას, გაფართოებას ანუ ვაზოდილეტაციას და სხვა (Rhee et al., 2005).

უნდა აღინიშნოს, რომ სუპეროქსისდის მეტაბოლური გარდაქმნის შედეგად შეიძლება წარმოიქმნას ისეთი აქტიური ნაერთებიმ როგორიცაა წყალბადის ზეჟანგი, ჰიპოქლორიდი, ლიპიდების ჰიდროზეჟანგი და სხვა. რომლებიც გარკვეულ საფრთხეს წარმოადგენენ ორგანიზმისათვის. ეს ნაერთები წარმოიქმნებიან პირველადი მაინიცირებადი რადიკალების უკონტროლო ზრდითა და მათი შემდგომი მოდიფიცირებით.

როგორც თავიდან ავღნიშნეთ,მრავალი დაავადების განვითარებაში განსაკუთრებული ადგილი უჭირავთ თავისუფალ რადიკალურ პროცესებს და კერძოდ ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის მომატება ასოცირდება მრავალ პათოლოგიასთან (Davis, Auten, 2010).

მოგეხსენებათ,რომ ლიპიდები ცოცხალი ორგანიზმის ყოველი უჯრედის შემადგენელი ნაწილია. ისინი წარმოადგენენ უჯრედის მემბრანული სტრუქტურის ერთერთ მთავარ შემადგენელ ნაწილს და მათი სტრუქტურა და თვისებები განსაზღვრავს მემბრანის ფიზიკურ-ქიმიურ თვისებებსა და ფუნქციონალურ მდგომარეობას. ლიპიდებთანაა დაკავშირებული სხვადასხვა ბიოქიმიური და ბიოფიზიკური რეაქცია,მათ შორისაა ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვა, რომელიც ძირითადად ენდოპლაზმურ რეტიკულუმში მიმდინარეობს (Adamo et al., 1989).

ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვა, გარკვეული ინტენსივობით, ნორმალურ მეტაბოლურ პროცესს წარმოადგენს მაგ: ისეთი ბიოაქტიური ნაეთები, როგორიცაა ლეიკოტრიენები და პროსტაგლანდინები წარმოიქმნებიან პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავების პეროქსიდული წარმოებულებისაგან, ხოლო ზოგიერთი სტეროიდული ჰორმონი-ქოლესტერინის ჰიდროპეროქსიდისაგან. თუმცა სხვადასხვა დაავადების დროს, ორგანიზმში ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ინტენსივობა უკონტროლოდ იზრდება. პროცესი ხასითდება მაღალი სიჩქარით, რაც გამოწვეულია იმით რომ ნებისმიერი გზით წარმოქმნილი ერთი ზეჟანგური რადიკალისგან მიიღება რამოდენომე ათეული და ასეული ზეჟანგური მოლეკულა, რომელთა

ნაწილი ისევ წარმოქმნის ახალ რადიკალებს და ჯაჭვი გრძელდება, ხოლო ნაწილი მდგრად მოლეკულურ ტოქსიკურ ფორმად გარდაიქმნება მაგალითად როგორიცაა ალდეჰიდები და კეტონები (Bakalova et al., 2010).

ზეჟანგური ჟანგვის ძლიერ კატალიზატორს წარმოადგენს ცვალებადი ვალენტობის მქონე მეტალები. მაგალითად - F F FFFFe^{2} , რომლებსაც შეუძლიათ ჰიდროზეჟანგებთან შევიდნენ რეაქციაში და დაშალონ ისინი თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნით. შესაბამისად სისტემაში ჩნდება ახალი რადიკალური ჯაჭვი:

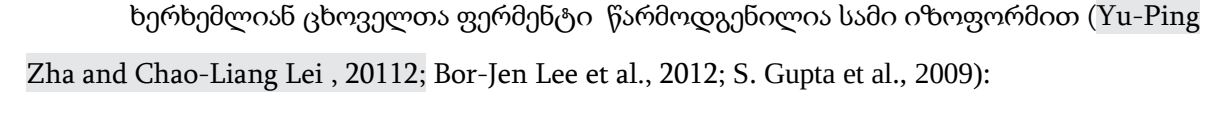
$ROOH+Fe^{2+} + \rightarrow RO\cdot +OH^{-} + Fe3+$

ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ინიცირებაში ერთ-ერთი მთვარი როლი აქვს ჟანგბადის აქტიურ ფორმებს, რომლების წარმოიქმნებიან სხვადასხვა სუბსტრატის ჟანგვის შედეგად. ჩვეულებრივ მდგომარეობაში ჟანგბადის მოლეკულის რეაქციისუნარიანობა შედარებით დაბალია, რასაც ვერ ვიტყვით მის აქტიურ ფორმებზე, რომლებიც მიიღებიან როგორც ფერმენტული, ასევე არაფერმენტული გზით. ჟანგბადის აქტიური ფორმებიდან მნიშვნელოვანია ჰიდროქსილის რადიკალი_ ·OH, რომელიც განსაკუთრებულად მაღალი აქტივობით გამოირჩევა და შესაბამისად ყველაზე ძლიერ დამაზიანებელ ეფექტს ამჟღავნებს. აღნიშნული ნეგატიური მოვლენის თავიდან აცილების მიზნით ორგანიზმში ჩაოყალიბებულია მძლავრი ანტიოქსიდანტური სისტემა, რომელიც არეგულირებს უჯრედში თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის ინტენსივობას და ამ უკანასკნელის მომატების შემთხვევაში, ახდენს პათოლოგიური პროცესის ინაქტივაციას (Zhang, 2013).

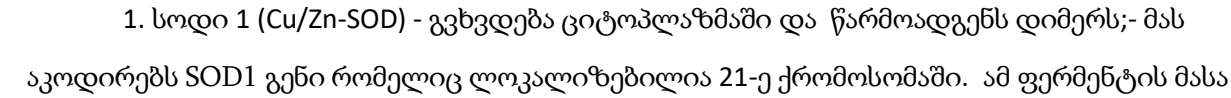
ტერმინი "ანტიოქსიდანტი'' თავდაპირველად ასოცირდებოდა ისეთ ნაერთთან, რომელსაც შეეძლო შესულიყო ურთიერთქმედებაში ორგანულ რადიკალთან და მოეხდინა ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ინჰიბირება.

ორგანიზმს ჭარბი რაოდენობის რადიკალებისაგან თავდასაცავად გააჩნია სხვადასხვა ანტიოქსიდანტური საშუალებები როგორც ფერმენტული ასევე არაფერმენტული (Fernanda et al., 2009). მაგალითად ევოლუციის პროცესში უჯრედში ჟანგბადის აქტივირებული ფორმებისგან თავდასაცავად ჩამოყალიბდა სპეციალიზირებული ფერმენტული ანტიოქსიდანტური სისტემები. ამ ტიპის ფერმენტულ სისტემებს მიეკუთვნება ფერმენტი სუპეროქსიდდისმუტაზა (სოდ), რომელიც კატალაზასა და სხვა ანტიოქსიდანტურ ფერმენტებთან ერთად იცავს ორგანიზმს მუდმივად წარმოქმნილი ჟანგბადის რადიკალებისაგან. ეს ფერმენტი

აკატალიზირებს სუპეროქსიდის დისმუტაციას ჟანგბადად და წყალბადის ზეჟანგად. ეს ფერმენტი აკატალიზირებს შემდეგ რეაქციას:



$$\text{მეტალი}^{(n+1)+} - \text{სოდ} + O_2^- \rightarrow \text{მეტალი}^{+} - \text{სოდი} + O_2$$



$$\text{მეტალი}^{n+} - \text{სოდი} + O_2^- + 2H^+ \rightarrow \text{მეტალი}^{(n+1)+} - \text{სოდი} + H_2O_2.$$

.

ხერხემლიან ცხოველთა ფერმენტი წარმოდგენილია სამი იზოფორმით (Yu-Ping Zha and Chao-Liang Lei , 20112; Bor-Jen Lee et al., 2012; S. Gupta et al., 2009):

1. სოდი 1 (Cu/Zn-SOD) - გვხვდება ციტოპლაზმაში და წარმოადგენს დიმერს;- მას აკოდირებს SOD1 გენი რომელიც ლოკალიზებილია 21-ე ქრომოსომაში. ამ ფერმენტის მასა 32 კდალტონია და მის შენებაში მონაწილეობს Cu- და Zn-შემცველი ცენტრები, რომლებიც პასუხისმგებლები არიან დაშალონ წყალბადის პეროქსიდი, სუპეროქსიდი და დიოქსიდი.

სუპეროქსიდდისმუტაზა წარმოიქმნება ციტოზოლში და აქ ხდება მისი დაყოვნება რათა წარმოიქმნას დისულფიდური ბმები ,მაგრამ საბოლოო მისი სამიზნე არის მიტოქონდირია, რადგან უნდა მოხდეს მისი მიტოქონდრიის ინტრამემბრანულ სივრცეში გადასვლა. როდესაც ფერმენტი ჩაერთვება მიტოქონდრიაში, უზრუნველყოფს BCL2 - ცილის გააქტიურებას, რაც საბოლოოდ უზრუნველყოს მის მონაწილებას აპოპტოზის ინჰიბირებაში.

2. SOD2 (Mn-SOD) - გვხვდება მიტოქონდრიაში, წარმოადეგნს ტეტრამერს. შეიცავს Mn - ცენტრს და მას აკოდირებს SOD2 გენი რომელიც ლოკალიზებულია მეექვსე ქრომოსომაში. მისი მონათესავე გენი გვხვდება პირველ ქრომოსომაში. აღნიშნული გენის მუტაცია დაკავშირებულია კარდიომიოპათიის და კიბოს განვითარებასთან. მიტოქონდრიული სუპეროქსიდდისმუტაზას მოქმედების შედეგად სუპეროქსიდის ($O2^-$) გარდაქმნა ხდება მემბრანაში ადვილად განვლად წყალბადისზეჟანგად. აღნიშნული ფერმენტი ლოკალიზებულია მიტოქონდრიის მატრიქსში.

3. SOD3 (EC-SOD) - გვხვდება უჯრედგარე არეში და წარმოადგენს ტეტრამერს, რომელსაც გააჩნია Zn და Cu -ის შემცველი ცენტრი. ამ გენის პროდუქტი იცავს ტვინს და ფილტვებს ჟანგვითი სტრესისაგან.

ვინაიდან ROS-ს აქვს უნარი შევიდეს რეაქციაში სხვადასხვა მემბრანულ კომპონენტებთან, ფერმენტულ სისტემებთან და ასევე აზოტის ოქსიდის რადიკალთან, რის შედეგადაც წარმოიქმნება ტოქსიკური ნაერთი პეროქსინიტრიტი (ONOO-), სუპეროქსიდდისმუტაზას მნიშვნელოვანი როლი ეკისრება, რადგან ახდენს სუპეროქსიდის

ანიონის გაუვნებელყოფას დისმუტაციის რეაქციის საშუალებით. დარღვევებს ფერმენტის აქტივობაში მივყავართ სხვადასხვა პათოლოგიების განვითარებამდე (ინფექციური, ნეიროდეგენერაციული და სხვა). აქედან გამომდინარე, SOD-ს მნიშვნელოვანი ადგილი უჭირავს უჯრედული მეტაბოლიზმის დაბალანსების პროცესში და ნებისმიერი დარღვევა, რაც მოქმედებს მის აქტივობაზე, პირდაპირ კავშირშია უჯრედის სიცოცხლისუნარიანობასთან (Ighodaro, Akinloye 2018; . Lobo et al., 2010; Yuan et al., 2010) .

კატალაზა - 1818 წელს ლუის ჯ.სენარდმა ივარაუდა რომ მის მიერ აღმოჩენილი წყალბადის ზეჟანგი უნდა იშლებოდეს რაღაც ნივთიერების მიერ,მაგრამ მხოლოდ 1900 წელს ოსკარ ლოუემ დაარქვა სახელი აღნიშნულ სუბსტანციას და უწოდა კატალაზა.აღმოაჩინა რომ იგი გვხვდება მრავალ მცენარესა თუ ცხოველში. მოგვიანებით აღმოჩენილი იქნა მიკროორგანიზმებშიც. შემდგომში ფერმენტის კვლევისათვის მრავალი მეთოდი იქნა გამოყენებული რომელთა მეშვეობითაც მოხდა მისი დახასიათება (Pham-Huy et al., 2008; . Ighodaro, Akinloye, 2018; Glorieux , Calderon, 2017).

კატალაზა ეს არის ანტიოქსიდანტული ფერმენტი რომელიც გვხვდება ყველა იმ ცოცხალ ორგანიზმში რომელნიც გამოიყენებენ ჟანგბადს (ბაქტერიები, მცენარეები, ცხოველები). იგი წარმოადგენს მნიშვნელოვან ფერმენტს ჟანგბადის აქტიური ფორმებისგან დაცვაში იმის გათვალისწინებით, რომ აკატალიზირებს შემდეგ რეაციას:

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

კატალაზა სტრუქტურულად ტეტრამერია რომელიც შედგება 4 პოლიპეპტიდური ჯაჭვისგან ,რომელთა შემადგენლობაშია 500 ამინომჟავა.ის შეიცავს 4 რკინის ატომს და ჰემის ჯგუფს რომელიც საშუალებას აძლევს ფერმენტს მიაღწიოს სუბსტრაქტს(სურ 2).მოქმედებისთვის PH და ტემპერატურა განსხვავდება სხვადასხვა ორგანიზმებში.PH კატალაზას აქტივობისთვის ოპტიმალურია 7დან 9 მდე ხოლო ტემპერატურა +25 0c დან ზემოთ.ადამიანის კატალაზასთვის ოპტიმალური PH არის 7 , თაგვებში მკვეთვრი ცვლილება არ აღინიშნება როდესაც PH არის 6,8 დან 7,5 მდე(3). Km-სიდიდე სუბსტრაქტისთვის არის $2,4 \times 10^{-4}$ m , ხოლოს Vmax აღწევს $4,7 \times 10^{-5}$ m/s-ს (Sepasi Tehrani , Moosavi-Movahedi , 2018).

კატალაზას ენდოგენური სუბსტრაქტებია ტრიფტოფანის წინამორბედი ინდოლი, ნეიროტრანსმიტერის წინამორბედი B ფენილეთილამინი, კარცინოგენ ბენზიდინები, პეროქსიდებისა და სხვ.

კატალაზას კოფაქტორი ძირითადადა არის ცვალებადი ვალენტობის მქონე მეტალი რკინა (Fe), ასევე იშვიათად Mn და NADHP (Gajhede et al., 1997; Akkuş Çetinus Ş, Nursevin Öztop, 2005; Chelikani et al., 2004;).

დიფერენციულმა სპექტროსკოპიულმა ანალიზმა ცხადყო რომ კატალაზა სუბსტრაქტთან ურთიერთქმედებისთვის იყენებს ჰემთან დაკავშირებულ რკინის ატომს.სპექტრულმა ანალიზმა აჩვენა აგრეთვე დროზე დამოკიდებულება ,რაც უფრო მცირდება დაჟანგული ჰემი ფერმენტისა მით უფრო იზრდება შუალედური პროდუტის რაოდენობა,ირთვება ოქსიდაციური აქტივობა რასაც მოყვება სუბსტრაქტის შემცირება და შესაბამისად მცირდება შუალედური პროდუქტის რაოდენობაც.ასეთი აქტოვაბა ახასიათებს კატალაზას როგორც ენდოგენური სუბსტრაქტის, ასევე კარცინოგენის მიმართ (Wood et al, 2009).

კატალაზას ახასიათებს ორგვარი მოქმედება: კატალიზური (ჰიდროზეჟანგის დაშლა წყლად და მოლეკულურ ჟანგბადად)პეროქსიდაზული(თუ ჰიდროგენ პეროქსიდი გვაქვს დაბალი კონცენტრაციით ამ დროს იჟანგება დაბალი მოლეკულური მასის მქონე ალკოჰოლი) (Xi , Chen, 2000; Cao et al., 2003; Wood et al.,2009).

კატალაზას კატალიზური აქტივობის გამოვლენა ანუ მის მიერ ჰიდროგენ პეროქსიდის დაშლა წყლად და მოლეკულურ ჟანგბადად მიმდინარეობს ორ ეტაპად.

$$H_2O_2 + Fe^{+3} \longrightarrow H_2O + O + Fe^{+4}$$

$$H_2O + O = Fe^{+4} \longrightarrow H_2O + Fe^{+3} + O_2$$

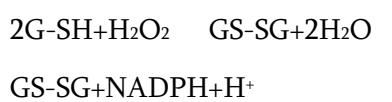
პირველ ეტაპზე Fe^{+3} ამცირებს ჰიდროზეჟანგის წყალს და კოვალენტურად უკავშირდება ჟანგბადს და წარმოიქმნება პორფირინის კათიონური რადიკალი O=Fe+4 ,ამას ეწოდება პირველი ნარევი ხოლო მეორე ეტაპზე Fe აღიდგენს თავს და გამოათავისუფლებს წყალს და მოლეკულურ ჟანგბადს.პეროქსიდაზული აქტივობის პირველი ეტაპი მსგავსია კატალიზურისა განსხვავება არის მეორე ეტაპზე როდესაც ელექტრონის დონორად ერთვება NADHP, რომლის საბოლოო პროდუქტია ალდეჰიდი და წყალი (Tasaki et al., 2017).

ფერმენტ კატალაზას რაოდენობის ან მისის რეაქციის სიჩქარის შემცირება დაკავშირებულია სხვდასხვა პათოლოგიებთან. მისი რაოდენობრივი კლება შესაძლოა გმოიწვიოს მეორე ტიპის შაქრიანი დიაბეტი. ხოლო თავის მხრივ რეაქციის სიჩქარის შემცირება ისეთი დაავადებების შედეგია, როგორიცაა ალცაიმერი დაავადება, რევმატიდული ართრიტი, ასთმა , ათეროსკლეროზი.

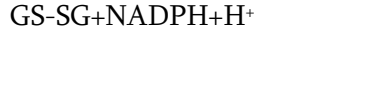
გლუტათიონ პეროქსიდაზა-გლუტათიონ პეროქსიდაზა არის ფერმენტული აქტივობის მქონე ენზიმი, რომლის ძირითადი ბიოლოგიური როლი ორგანიზმის დაცვაა ჟანგვითი დაზიანებისგან, მისი ბიოქიმიური ფუნქცია არის ლიპიდური ჰიდროპეროქსიდის შესაბამისი ალკოჰოლის შემცირება და ასევე თავისუფალი წყალბადის შემცირება, გარდაქმნა წყლად (Ohlemiller et al., 2000; Muller et al., 2007; Bhabak, Mugesh, 2010) .

გლუტათიონ პეროქსიდაზას ოჯახი შედგება რვა ცნობილი იზოფორმისაგან, რომელიც ადამიანისთვისაა დამახასიათებელი. გლუტათიონ პეროქსიდაზა იყენებს გლუტათიონს, როგორც ელექტრონის დონორს. Gpx1, Gpx2, Gpx3, Gpx4 - მათთვის დამახასიათებელია სელენის შემცველობა, ხოლო Gpx6 არის სელენოპროტეინი ადამიანებში და ცისტეინ-შემცველი ჰომოლოგებია წარმოდგენილი მღრღნელებში (Olson et al., 2010).

გლუტათიონ პეროქსიდაზას სხვადასხვა იზოფორმის მაკოდირებელი გენები განსხვავდეიან ერთმანეთისგან და სხვადასხვა ლოკუსშიც არიან განთავსებულნი.



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



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

აღნიშნული პროცესის დროს დაჟანგული ლიპიდები გარდაიქმნებიან ნაკლებად ტოქსიკურ ნაერთებად, რაც იცავს უჯრედის გარსის ლიპიდების თავისუფალი რადიკალების ზემოქმედებისაგან (Ran et al., 2007; Katar et al., 2014; Socha et al., 2014).

ანტიოქსიდანტური თვისებების მქონე მერე კატეგორიაში მოისაზრება - ეგზოგენური ანტიოქსიდანტები, რომლებსაც საკვების სახით ვიღებთ: ვიტამინები, მიკროელემენტები, ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებები და სხვა (Zingg JM, Azzi , 2004; Azzi, 2007; .

ანტიოქსიდანტების ძირითადი წყაროები – მცენარეული წარმოშობის პროდუქტები. ეს არის ხილი, ბოსტნეული, მწვანილი, მწვანე ჩაი და ბევრი სხვა. ამის გარდა, ეს პროდუქტები შეიცავენ ვიტამინების, მინერალების და სხვა ბიოლოგიურად აქტიური ნივთიერებების უზარმაზარ სპექტრს, რომელიც სასიცოცხლოდ მნიშვნელოვანია ორგანიზმის ნორმალური მდგომარეობის შენარჩუნებისთვის. სხვადასხვა ვიტამინი განსხვავებულად მოქმედებს. მაგ:

ვიტამინი A- ასევე მისგან წარმოქმნილი რიტინული მჟავა განკუთვნილია დაიცვან ორგანიზმი გარშემოხვეული კანცეროჰენული გავლენისგან.

კაროტინის დამსახურებით, რომელიც A ვიტამინის წყაროა, ადამიანი გამოიყურება ახალგაზრდათ. ამერიკელმა მეცნიერებმა დაამტკიცეს, რომ კაროტინით მდიდარი საკვები

გვიცავს კიბოსგან. კაროტინის დიდ ოდენობას შეიცავენ მკვეთრი ფერების ხილი და ბოსტნეული (Bjelakovic et al., 2007; Altincicek et al., 2011; . Green et al., 2011).

თუ A ვიტამინის ოდენობა ორგანიზმში საკმარისია, კანი გამოიყურება ჯანსარად და გლუვად, სისხლძარღვები ინარჩუნებენ თავის ელასტიურობას, რადგან ეს ვიტამინი აფერხებს სისხლძარღვებში ბალთების წარმოქმნას.

ვიტამინი E ანელებს ლიპიდების (ცხიმების) დაჟანგვას და აფერხებს თავისუფალი რადიკალების ზრდას, რომლებიც ანადგურებენ უჯრედებს, ხელს უშლის თრომბების წარმოქმნას, აქვს ანტიკანცეროჰენული ეფექტი, აძლიერებს იმუნიტეტს. ვიტამინი E დეფიციტის დროს ხდება ცხიმების ცვლის დარღვევა. მაგალითად, ასაკობრივი ლაქები ხელებზე ცხიმოვანი მჟავების განადგურების ნიშანია. ვიტამინი E ეწინააღმდეგება რადიკალების მიერ უჯრედების განადგურებას, ხელს უშლის თრომბების წარმოქმნას, ებრძვის კანცეროჰენებს, უზრუნველყოფს კუნთების კარგ მუშაობას (Packer et al., 2001).

ერთ-ერთი უძლიერესი ანტიოქსიდანტი არის C ვიტამინი (ასკორბინის მჟავა). ვიტამინი E, რომელსაც აქვს ცხიმხსნადი ფუნქცია, იჭერს თავისუფალ რადიკალებს მემბრანის შიგნით, რომელიც შედგება ლიპიდების მოლეკულებისგან, ხოლო უჯრედებს შორის, წყლის სივრცეში ამ ამოცანას ასრულებს ასკორბინი მჟავა (Smirnoff, 2001; Linster et al., 2007) .

ვიტამინი C ასევე მოქმედებს სისხლძარღვთა სისტემაზე, იცავს ჰემოგლობინს ჟანგვისგან, უზრუნველყოფს რკინის მარაგს ორგანიზმში, არეგულირებს ქოლესტერინის დონეს. ადამიანის ორგანიზმს შეუძლია აითვისოს 2-3 გრ დღეში, ზედმეტი გამოიდევნება თირკმელებით.

ანტიოქსიდანტური სისტემის ფუნქციონირებაში მნიშვნელოვანი როლი ენჭება ანტიოქსიდანტურ მინერალებს როგორიცაა სელენი. სელენი არის გლუტათიონპეროქსიდაზას აქტიური ცენტრის შემადგენელი კომპონენტი და ის უზრუნველყოფს ბიოლოგიური მემბრანების დაცვას თავისუფალი რადიკალების ზემოქმედებისაგან.

I.3. კრეატინი

კრეატინი წარმოადგენს ნიტროგენულ ორგანულ მჟავას. იგი ძირითადად ღვიძლში, პანკრეასსა და თირკმელში სინთეზირდება და შემდეგ სისხლის მიმოქცევის სისტემის მეშვეობით ტვინს, გულს, კუნთს და სხვა ორგანოებს მიეწოდება (Wallimann et al.,1998; Wyss, Kaddurah-Daouk, 2000).

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

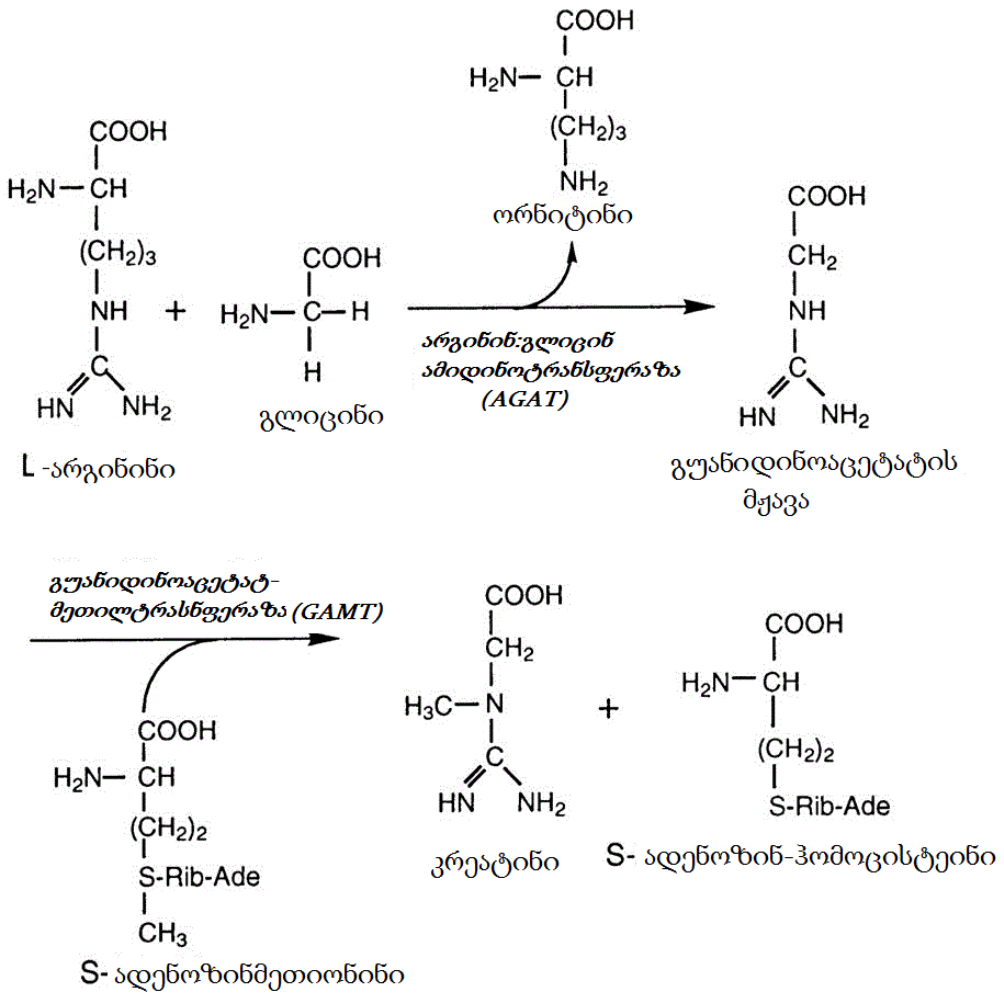
ამდენად CrT-ის ფუნქციაა სისხლიდან კრეატინის უჯრედში გადაქაჩვა, რაც კონცენტრაციული გრადიენტის საწინააღმდეგოდ ხორციელდება. უჯრედში კი კრეატინი ფერმენტ კრეატინკინაზას სუბსტრატს წარმოადგენს და ფოსფორილირების შედეგად ფოსფოკრეატინად გარდაიქმნება.

ვარაუდობენ რომ ენერგეტიკული ფუნქციის გარდა Cr სხვა ბევრ მნიშვნელოვან ფუნქციასსაც ასრულებს. მათ შორისაა ნერვული იმპულსის გადაცემ, მემბრანული პოტენციალისა და იონური გრადიენტის შენარჩუნება, უჯრედშიდა სიგნალების გადაცემა, აქსონალური და დენდრიტული ტრანსპორტი და სხვა მნიშვნელოვანი პროცესები, რომლებიც ცნს-ში მიმდინარეობს. ზოგიერთი ლიტერატურული მონაცემებოთ, კრეატინი განიხილება როგორც ნეირომოდულატორი, რომელსაც შეუძლია განახორციელოს ზოგიერთი პოსტსინაფსური რეცეპტორის მოდულირება.კრეატინინის დეფიციტი ცნს-ში უარყოფითად აისახება ტვინის ფუნქციონირებაზე და წარმოადგენს ზოგიერთი ნეიროდეგენერაციული დაავადების თანმხვედრ მოვლენას.მიღებულია მონაცემები რომლებიც მიუთითებს Cr-ის მნიშვნელობას ფსიქომოტორული განვითარებისა და შემეცნებითი ფუნქციის რეალიზების და ემბრიონილი განვითარების პროცესშიც (Almeida et al. 2006; Allen 2012).

Cr-ის სინთეზში მონაწილეობს ისეთი ფერმენტები, როგორიცაა L -არგინინი გლიცინ-ამიდინოტრანსფერაზა (AGAT) და გუანიდინოაცეტატ-მეთილ-ტრანსფერაზა (GAMT). აღნიშნული ფერმენტების არსება ცნს-ში კი ადასტურებს იმას, რომ ტვინის Cr-ი არამარტო პერიფერიულად სინთეზირდება, არამედ ის მიიღება იენდოგენური სინთეზის დახმარებით. ამავე დროს, კრეატინის სპეციფიკური ტრანსპორტერი SLC6A8 საშუალებას იძლევა მოხდეს მისი იმპორტი ჰემატოენცეფალური ბარიერის გავლით (Bassit et al., 2010; Beard E, Braissant, 2010).

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

ქლორის იონურ ტუმბოსთანაა შეუღლებული. ტუმბოს მიერ უჯრედში გადატანილი ნატრიუმის ყოველ ორ იონზე კრეატინის თითო მოლეკულის თანატრანსპორტი ხდება. ამდენად CrT-ის ფუნქციაა სისხლიდან კრეატინის უჯრედში გადაქაჩვა, რაც კონცენტრაციული გრადიენტის საწინააღმდეგოდ ხორციელდება. უჯრედში კი კრეატინი ფერმენტ კრეატინკინაზას სუბსტრატს წარმოადგენს და ფოსფორილირების შედეგად ფოსფოკრეტინად გარდაიქმნება. კრეატინის ბიოსინთეზი ორსაფეხურიანი პროცესია. რეაქციის პირველ საფეხურზე არგინინიდან ფერმენტ L-არგინინ:გლიცინამიდინოტრანსფერაზის (AGAT) მიერ ამინომჟავა გლიცინის ამიდინირება ხდება. რეაქციის შედეგად L-ორნიტინი და გუანიდინოაცეტატის მჟავა (GAA) მიიღება. ბიოსინთეზის მეორე და საბოლოო საფეხურზე GAA-ის მეთილირებით ფერმენტ S-ადენოზილ-L-მეთიონინ-N-გუანიდინოაცეტატ:მეთილტრანსფერაზის (GAMT) მონაწილეობით წარმოიქმნება კრეატინი (Allen, 2012).



სურათი. 1. კრეატინის სინთეზი

კრეატინის მეტაბოლიზმს კრიტიკული მნიშვნელობა გააჩნია ცოცხალი სისტემის ნორმალური ფუნქციონირებისთვის. Cr/CK/PCr სისტემისა და კრეატინის მეტაბოლიზმის დარღვევები აღინიშნება შემდეგი ტიპის დაავადებების დროს როგორიცაა: კუნთოვანი დისტროფია, ჰიპოქსიურ-იშემიური ენცეფალომიოპათია და სხვ.ზოგიერთ ამ დაავადებას კრეატინის ცხადად გამოხატული დამცველობით-პროფილაქტიკური ეფექტი ახასიათებს. ის წარმოადგენს მეტაბოლური სტრესით, გლუტამატის ტოქსიკურობითა და ჟანგვითი დაზიანებით გამოწვეული უჯრედების კვდომის თავიდან აცილების საკმაოდ ეფექტურ საშუალებას. თუმცა ამ პროცესის მიმდინარეობის მოლეკულური საფუძველი გაურკვეველია.

I.4. სტრესი და მისი კრეატინით პრევენცია

სტრესი თანამედროვეობის გლობალური პრობლემაა, რომელიც მჭიდროდაა დაკავშირებული ინდუსტრიალიზაციის პროცესთან. როგორც ზემოთ აღვნიშნეთ, სტრესს შეუძლია გამოიწვიოს ან მნიშვნელოვნად გააღრმავოს ადამიანის ისეთი დაავადებები, როგორიცაა გულ-სისხლძარღვთა, იმუნური სისტემისა და ნეიროდეგენერაციული პროცესები, ასევე ავთვისებიანი სიმსივნეები და სხვა. ბოლო წლებში აქტიური ყურადღება ექცევა ისეთი ნივთიერებების მოძიებას, რომლებსაც შესწევთ უნარი მოახდინონ სტრესული მდგომარეობის პრევენცია. მათ შორის აქტიურად განიხილება კრეატინი, რომელიც ასრულებს მნიშვნელოვან როლს უჯრედების ენერგეტიკული მოთხოვნილების დაკმაყოფილების პროცესში. გარდა ამისა, იგი ცნს-ში სხვა ფუნქციებსაც ასრულებს, მათ შორის განიხილება ნერვული იმპულსის გადაცემა სინაფსებში, იონური გრადიენტის შენარჩუნება, უჯრედშიდა სიგნალების გადაცემა და სხვ. (Akopova et al., 2012).

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

ჰიპოთეზა, რომ კრეატინს შეუძლია სუპეროქსიდ-ანიონის შებოჭვა, ასევე პეროქსინირტიტის, ლიპიდური პეროქსიდებისა და ჰიდროპეროქსიდის. თუმცა ცდებით დადგინდა, რომ მას არ შეუძლია მნიშვნელოვნად შეამციროს ჰიდროპეროქსიდი და ლიპიდური პეროქსიდები (Deminice et al., 2013; Stefani et al., 2014;).

კრეატინის უნარი გააუმჯობესოს ანტიოქსიდანტური ეფექტი ვლინდება იმაშიც, რომ მის წინამორბედ არგინინს გააჩნია დამცველობითი როლი ოქსიდაციური სტრესის დროს ლიპოპროტეინების დაჟანგვის შეზღუდვით ენდოთელურ უჯრედებში. ასევე დამატებითი მონაცემები გვიჩვენებს, რომ არგინინს შეუძლია დათრგუნოს თავისუფალი რადიკალები.

მეცნიერებმა კრეატინის პოტენციური ანტიოქსიდანტური ეფექტი განსაზღვრეს სხვადასხვა უჯრედული კულტურის შტამებზე, როგორიცაა ადამიანის პრომონოციტი,ენდოთელური უჯრედები და კუნთოვან მიობლასტომა. ისინი აკვირდებოდნენ ციტოტოქსიურ ეფექტს გამოწვეულს ოქსიდანტური აგენტებით. შედეგებით დადგინდა, რომ უჯრედული დაცვა დაკავშირებული იყო უჯრედშიდა თავისუფალი კრეატინის შემცველობასთან,განსხვავებით ფოსფოკრეატინის დონისაგან. ასევე მეცნიერი გუიდი აფასებდა კრეატინის ანტიოქსიდანტურ ეფექტს მუტაგენეზთან მიმართებაში. მათ დაადგინეს, რომ კრეატინის დამატებამ გამოავლინა სპეციფიკური გენოპროტექტორული აქტივობა მიტოქონდრიულ დნმ-ში და უზრუნველყოფს გენომის სტაბილურობას. კრეატინს შეუძლია მონაწილეობა მიიღოს მიტოქონდრიული ფუნქციების შენარჩუნებაში, როგორიცაა ჟანგბადის მოხმარება, ატფ-ს გენერაცია და საბოლოოდ, უჯრედის გადარჩენა.

არსებობს ჰიპოტეზაც, რომ კრეატინმა და არგინინმა შეიძლება გააუმჯობესოს კარდიოვასკულარული დაავადებების მკურნალობა, თუმცა ეს მოსაზრება ჯერ კიდევ არ არის შესწავლილი და შესაძლოა მომავალში შესწავლის საკითხი გახდეს.

არსებობს რამდენიმე კვლევა, რომელიც ცდილობდა შეემოწმებინა კრეატინის ეს ეფექტი იმ შემთხვევაში, როცა მოქმედებს სტრეს-ფაქტორი, რომელიც ზრდის ოქსიდანტური აგენტების წარმოქმნას. დემინიკმა და ჯორდაომ დაადგინეს, რომ კრეატინის დამატებამ შეძლო შეემცირებინა ოქსიდაციური სტრესის მარკერები პლაზმასა და კუნთში.აღმოჩნდა, რომ კრეატინის დამატებამ კუნთების დისტროფიის მქონე პაციენტებში,რომლებსაც აღენიშნებათ ცილის სინთეზისა და ზრდის შემცირება ჩონჩხის მიოფიბრილების დეგრადაციის გამო, გაზარდა ხელის მოჭერის ძალა და სხეულის მასა. თუმცა არსებობს მოსაზრებაც, რომ ჩონჩხის კუნთების მიერ კრეატინის შეწოვა საკმარისად არ ხდება, რაც ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმზეც აისახება.

კრეატინი დადებით ეფექტს ახდენს ნეირომუსკულატორული და ნეიროდეგენერაციული დაავადების მიმდინარობაზე. ასევე გამოიყენება ართრიტისა და დეპრესიის მკურნალობაში. ალცჰაიმერის დაავადების შემთხვევაში კრეატინი იცავს ჰიპოკამპის ნეირონებს ბეტა-ამილოიდის ტოქსიკური ეფექტისგან და შესაბამისად ამცირებს ამილოიდური ფოლაქების წარმოქმნას. ამიოტროფული სკლეროზისას კრეატინის დადებითი ეფექტი ვლინდება ოქსიდაციური სტრესის შემცირებაშიექსპერიმენტებში პარკინსონით დაავადებულ ვირთაგვებში ეგზოგენურად შეყვანილი კოენზიმი Q და კრეატინის კომბინაცია იცავს ნეირონებს დაზიანებისაგან. კლინიკური ცდები ადასტურებს, რომ კრეატინის მოხმარებით იზრდება კუნთების სიმტიცე და ძალა,კლებულობს დაღლილობის შეგრძნება. ჰანტინგტონის დაავადებისას იგი აქვეითებს ლაქტატის დონეს, აუმჯობესებს სხეულის წონას , მოტორულ ფუნქციებს და აფერხებს ტვინში მიმდინარე ატროფიულ პროცესებს (Amital et al., 2006).

II. 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 პირბებში 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 -400-500C-ზე.

II.2. Cr -ის დამატება

Cr- შესყიდული იქნა Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) და განზავებული იქნა 5%-იანი დიმეთილ სულფოქსიდთან (DMSO). 30 დღის განმავლობაში G3 ცხოველებზე ინტრაპერიტონეალურად შეგვყავდა 140 მგ/კგ დღეში.დანარჩენ საექსპერიმენტო ცხოველებს ემატებოდათმხოლოდ 5% -იანი დიმეთილ სულფოქსიდი,რაც დამოკიდებული იყო ცხოველის

მასაზე (1 მლ/100 გრ). Cr-ის ინექციის დოზა დაფუძნებული იყო სხვადასხვა ავტორების კვლევებზე. (Deminice et al. 2013; Stefani et al. 2014).

II. 3. სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობის განსაზღვრა

მეთოდის პრინციპი მდგომარეობს ნიტროლურჯი ტეტრაზოლიუმის აღდგენის რეაქციის შებოჭვის ხარისხის განსაზღვრაში (Tasset et al., 2009). ამისათვის, მლ საინკუბაციო არეს, რომელიც შეიცავდა ნიტროლურჯ ტეტრაზოლიუმს (0.41 mM), EDTA-ს (0.33 mM) და მეთილფენაზოლსულფატს (0.01 mM; pH=8.3), ვუმატებდით 0.02 მლ საკვლევ სუსპენზიას. შემდგომ ეტაპზე ვსაზღვრავდით მიღებული ხსნარის შუქშთანთქმის სიდიდეს სპექტოფოტომეტრულად (λ=540 ნმ), რის შემდეგაც ვუმატებდით 0.1 მლ ნადH-ის ხსნარს (0.8mM), ვურევდით და ვახდენდით ინკუბაციას 20წთ´-ის განმავლობაში (t=37°C). ინკუბაციის შემდეგ ვსაზღვრავდით ხსნარის შუქშთანთქმას სპექტროფოტომეტრულად(λ=540 ნმ). რეაქციის ინტენსივობაზე ვმსჯელობდით I და II მაჩვენებელს შორის სხვაობით.

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

II.4. კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა

ფერმენტული აქტივობის განსაზღვრის მეთოდი დამყარებულია წყალბადის ზეჟანგის (H2O2) თვისებაზე, წარმოქმნას მოლიბდატის მარილებთან მყარი ფერადი კომპლექსი (Tasset et al., 2009). ექსპერიმენტის საწყის ეტაპზე 0.1 მლ საკვლევ მასალას (100 მგქსოვილი/1 მლტრის-HCl (0.05 M),pH=7.8) ვუმატებდით 2 მლ წყალბადის ზეჟანგს (0.03%), ხოლო ბრმა ცდისთვის განკუთვნილსინჯარაში საკვლევი მასალის ნაცვლად შეგვქონდა 0.1 მლ დისტილირებული წყალი. მიღებულ ნარევს ვაყოვნებდით 10 წუთი, რის შემდეგაც, ვახდენდით რეაქციის შეჩერებას 1 მლ ამონიუმის მოლიბდატის 4% -იანი ხსნარის დამატებით და წარმოქმნილ შეფერილობას ვსაზღვრავდით სპექტოფოტომეტრულად (λ=410 ნმ). საკონტოლო სინჯარაში წყალბადის ზეჟანგის ნაცვლად შეგვქონდა 2 მლ დისტილირებული წყალი. ფერმენტის აქტივობას ვითლიდით ფორმულით:

$E = (A_{\text{საკონტროლო ცდა}} - A_{\text{ცდა}}) \times V \times t \times K$ (μkat/L)

სადაც:

E - ფერმენტის აქტივობაა;

A $_{\text{საკონტროლო ცდა}}$ - შუქშთანთქმის სიდიდე საკონტროლო ცდისთვის

A ცდა -შუქშთანთქმის სიდიდე საკვლევი ცდისთვის

V - შეტანილი ნიმუშის მოცულობა (0.1 მლ)

t - ინკუბაციის დრო (10 წთ)

K - წყალბადის ზეჟანგის მილიმოლარური კოეფიციენტი (22.2 x 103 mM-1 x cm-1).

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

II.5. აზოტის ჟანგის რაოდენობის განსაზღვრა

NO-ის შემცველობას ჰიპოკამპის უჯრედებში განსაზღვრული იყო მირანდასა და სხვ. მეთოდი (Pahan et al., 2000). ამისათვის ჰიპოკამპის ჰომოგენატის ყოველ 100 µl ემატებოდა თანაბარი რაოდენობის 0.3 M-ის NaOH. მიღებულ ნარევს ვანჯღრევდით ოთახის ტემპერატურაზე 5წთ-ის განმავლობაში. ნარევს ემატებოდა 100 µl 5%-იანი ZnSO4 დაკვლავ ვანჯღრევდით 5 წთ-ის განმავლობაში. ამ დროის გასვლის შემდგომ მიღებული ნარევი ცენტრიფუგირდებოდა 3000ბრ.წთ-ის სიჩქარეზე 15 წთ-ის განმავლობაში. ყოველ 100 µl სუპერნატანტს ემატებოდა 200 µl გრისის რეაქტივი. გრისის რეაქტივი მზადდება ცდის წინ და შეიცავს 0.5 M HCl-ზე დამზადებულ VCl_3-სა და 0.1%-იან სულფამიდამიდს. საკონტროლო სინჯარა შეიცავდა ყველა რეაქტივს, თუმცა ჰომოგენატის მაგივრად სარეაქციო არეში შეტანილი იყო 100 µl დისტილირებული წყალი. მიღებული ნარევი ყოვნდებოდა 30წთ 37°C-ზე და შეფერილი ხსნარი იზომებოდა 540ნმ ტალღის სიგრძეზე სპექტროფოტომეტრიულად (Multiscan GO, Thermo Fischer Scientific, Finland). მიღებული მონაცემები ითვლებოდა NaNO2-ის სტანდარტულ მრუდზე.

II.6. წყალბადის ზეჟანგის (H_2O_2) რაოდენობის განსაზღვრა

H_2O_2 -ის რაოდენობის დადგენისათვის გამოყენებული იქნა წყალბადის პეროქსიდის რაოდენობის განსაზღვრის ტესტ - სისტემა (ab102500). მეთოდის არსი მდგომარეობს სპეციალიზირებული საღებავის ურთიერთქმედებაში წყალბადის ზეჟანგთან. რეაქციის

შედეგად წარმოქმნება შეფერილი პროდუქტი. შეფერვის ინტენსივობა იზომებოდა 570 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

II.7. უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობის განსაზღვრა MTT-ტესტით

კრეატინის გავლენას უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე ვსწავლობდით MTT-ტესტის საშუალებით, რომელიც დამყარებულია მიტოქონდრიული დეჰიდროგენეზების შესაძლებლობაზე, მოახდინოს ხსნადი 3(4,5-დიმეთილთიაზოლ 2-ილ)-2,5 დიფენილ--ტეტრაზოლიუმის ბრომიდის (MTT) გადაყვანა იისფერ უხსნად ფორმაზანში, რომელც კრისტალიზირდება ციტოპლაზმაში (Nathet al. 2005). ამისათვის ნატიურ ჰიპოკამპს ვაჰომოგენიზირებდით ტრის-HCl-ის ბუფერში, ვუმატებდით 0.5 მლ MTT -ს (5 მგ/მლ), ვაყოვნებდით 1 სთ-ის განმავლობაში და შემდგომ ბუფერს ვაცილებდით ცენტრიფუგირებით.მიღებულ ნალექს ემატებოდა100მკლ DMSO-ს ხსნარი ფორმაზანის კრისტალების გასახსნელად და კვლავ ყოვნდებოდა 2სთ-ის განმავლობაში და შემდგომ ვახდენთ ოპტიკური სიმკვრის განსაზღვრას 530 და 620 ნმ ტალღის პლანშეტური ანალიზატორის (Multiscan GO, ThermoFischer Scientific, Finland) საშუალებით.

სიცოცხლის უნარიანი უჯრედების რაოდენობას ვითვლიდით ფორმული:E =A570-A620, სადაცE-ოპტიკური სიმკვრივეა, ხოლო A570 და A620 მნიშვნელობა შესაბამის ტალღის სიგრძეზე. სტრესისა და კრეატინის გავლენა ჰიპოკამპის უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე გამოითვლებოდა ფორმულით:

$N = E_{\text{ექსპერიმენტი}} / E_{\text{საკონტროლო}} X\ 100\%.$

II.8. ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ლოურის მეთოდით

ფოლინ-ჩოკალტეუს ფენოლურ რეაქტივთან ცილის მოლეკულის შემადგენლობაში არსებული ამინომჟავები (ცისტეინი, თიროზინი) წარმოქმნიან ლურჯი შეფერილობის კომპლექსს, რომელიც 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 $CuSO_4 \times 5H_2O$ დამზადებული 1 %-იან ნატრიუმის ციტრატზე) რეაქტივების ურთიერთშერევით (50:1). ვურევდით და ვაყოვნებდით 10 წუთისგანმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე.შემდგომ ეტაპზე ნარევს ვუმატებდით 200 μლ ფოლინის რეაქტივს, ვურევდით და ვაყოვნებდით 30 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემერატურაზე.მიღებულ შეფერილობას ვზომავდით სპექტროფოტომეტრულად (λ=750 ნმ) და ვითვლიდით ცილის კონცენტრაციას შემდეგი ფორმულით:

$C = K \times E_{საშ.}$(mg/ml)

სადაც:

C - ცილის კონცენტრაცია,

$E_{საშ}$ - მიღებული შუქშთანთქმების საშუალო სიდიდე,

K - მუდმივა.

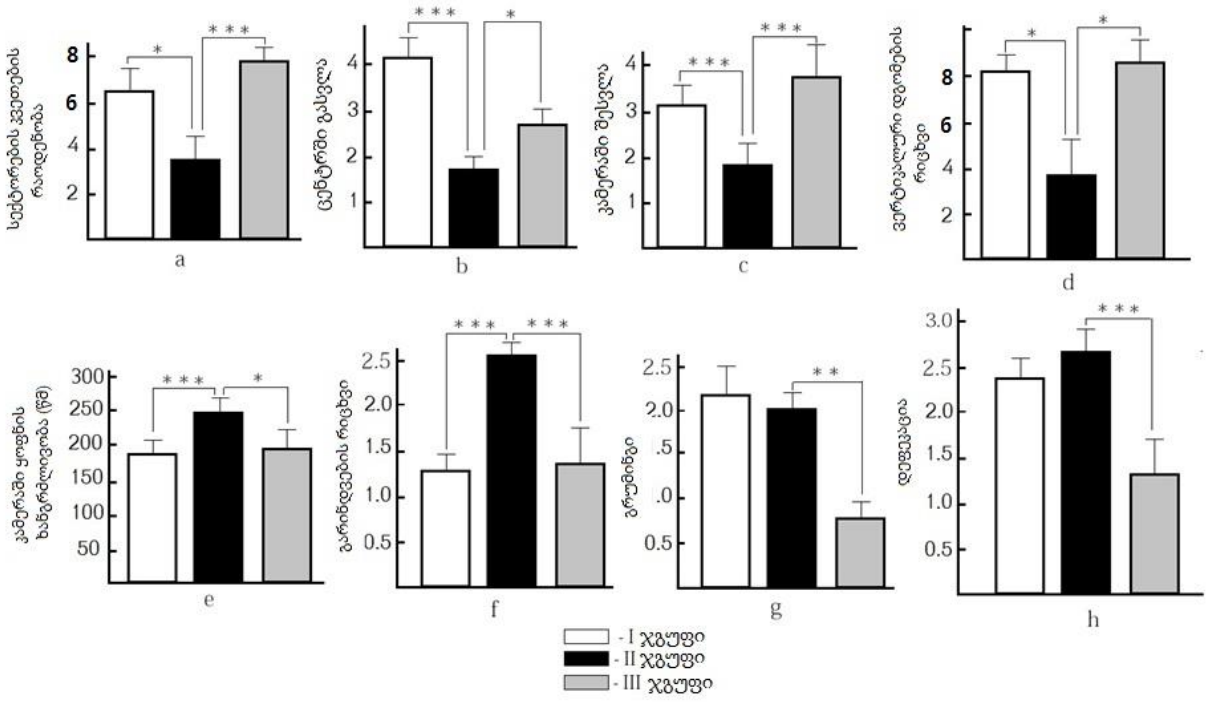
III. მიღებული შედეგები

III.1. ექსპერიმენტული ცხოველების ფსიქო-ემოციური სტატუსის დადგენა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში

სურათზე 1 წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებენ, რომ საკონტროლო ცხოველებთან (1G - ჯგუფი) შედარებით, ხანგრძლივი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის შედეგად ექსპერიმენტული ცხოველები (2 G- ჯგუფი) ხასიათდებიან კვლევითი აქტივობის მაჩვენებლების კლებითა და შიშის რეაქციების რაოდენობის მატებით. მაგალითად, სარწმუნოდაა შემცირებული დიდი კაბინის

სექტორების გადაკვეთების რაოდენობა (a) (3.34±0.4 vs 1.9±0.4; t(18)=7,106; p<0.001, n1=n2=10), ცენტრში გამოსვლის რაოდენობა (b) (3.32±0.4 vs 1.61±0.4; t(18)=8,568; p<0.001,n1=n2=10), კამერაში შესვლის რაოდენობა (c) (3.1±0.4 vs1.8±0.4; t(18)=6,879; p<0.005, n1=n2=10) და ვერტიკალური დგომების რიცხვი (d) (2.13±0.4 vs 0.99±0.1 t(28)=3,378; p<0.005, $n_1=n_2=10$). ამის პარალელურად, შეინიშნება შიშის რეაქციების პარამეტრების სარწმუნო მატება, კერძოდ ბნელ კამერაში ყოფნის ხანგრძლივობა (e) (186,25±27.4 vs 251,22±25.63; t(18)=-5.475; p<0.001; n1=n2=10) და გარინდვების (f) რიცხვი (1.55±0.07 vs 2.68 ±0.3; t(18)=-4.552; p<0.001; $n_1=n_2=10$). რაც შეეხება გრუმინგების (g) (2.20±0.1 vs 2.0±0.8; t(28)=0,000; p=1.000; $n_1=n_2=10$) და დეფეკაციის (h) (2.40±1.1 vs 2.86±0; t(18)=-1,249; p=0.222, $n_1=n_2=10$) რაოდენობას, სარწმუნო ცვლილებები არ დაფიქსირებულა (სურ.1).

იმისათვის, რათა დაგვედგინა ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის პირობებში კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა რამდენად ცვლის ცხოველის ფიზიოლოგიურ ქცევით მაჩვენებლებს, შესწავლილი იქნა 3 G ჯგუფის ინდივიდების მახასიათებლები. მიღებულმა შედეგებმა აჩვენა, რომ 3 G ჯგუფის ცხოველებს, 2 G ჯგუფის ინდივიდებთან შედარებით, სარწმუნოდ ეცვლებათ ეს მახასიათებლები. კერძოდ, აღინიშნება a (1.9±0.4 vs 3.87±0.6; t(18)=-8,158; p=0.0001; $n_1=n_2=10$), b (1.61±0.4 vs 2.75 ±0.4; t(28)=-3,089; p<0.005, $n_1=n_2=10$), c (1.88±0.3 vs 3.86±1.4; t(28)=-5,010; <0.005, $n_1=n_2=10$) და d (2.13±0.4 vs 0.99±0.1; t(18)=7,275; <0.005; $n_1=n_2=10$) პარამეტრესის გაზრდა და e (245.86±38.44 vs 208.80±24.38; t(28)=3,117; <0.005, $n_1=n_2=10$), f (2.68 ±0.3 vs 1.41 ± 0.04; t(18)=6,794; <0.001; $n_1=n_2=10$), g (2.0±0.8 vs 0.86±0.07; t(28)=3,900; <0.005, $n_1=n_2=10$) და h (2.75 ±0.3 vs 1.45 ± 0.05; t(18)=6,546; <0.001, $n_1=n_2=10$) პარამეტრების შემცირება. როგორც სურათი 1-დან ჩანს, 3 ჯგუფის ცხოველები, 2 ჯგუფთან შედარებით, ყველა პარამეტრის მიხედვით აუმჯობესებენ ფიზიოლოგიურ მაჩვენებლებს.



სურათი 1. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა ვირთაგვების ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის გავლენით შეცვლილ ქცევით პარამეტრებზე

1 ჯგუფი- საკონტროლო; 2- ჯგუფი - სტრესირებული ვირთაგვები; 3 ჯგუფი - სტრესირებული + კრეატინი. □ -1ჯგუფი (საკონტროლო); ■ - 2 ჯგუფი(სტრესირებული); ▭ - 3 ჯგუფი სტრესირებული + კრეატინი ჯგუფი.

III.2. NO-სა , წყალბადის ზეჟანგისა და Ca^{2+}-ის რაოდენობრივი ცვლილება ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში და ეგზოგენური კრეატინის გავლენა ამ მაჩვენებლებზე

ჩატარებულმა ექსპერიმენტმა აჩვენა, რომ ხანგრძლივი ცირკადული რიტმის დარღვევის შემთხვევაში ვირთაგვების ჰიპოკამპის უჯრედებში შეინიშნება ზოგიერთი ბიოქიმიური მახასიათებლების ცვლილება, მაგალითად ექსპერიმენტის 30-ე დღეს 2 G- ჯგუფი ინდივიდების ჰიპოკამპის უჯრედებში, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით NO-ს შემცველობა სარწმუნოდაა მომატებული (41.69 ±4.6 vs 50.94 ±5.05; $t(18)=-4.242$; $p<0,0001$; $n_1=n_2=10$). ამის პარალელურად, იმ ვირთაგვებში, რომლებიც 30 დღის განმავლობაში იმყოფებოდნენ ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში, 140მგ/კგ კრეატინის ყოველდღიური შეყვანის პირობებში (ჯგუფი 3 G), ექსპერიმენტის 30-ე დღეს NO-ს რაოდენობა საკონტროლო ჯგუფის მაჩვენებელს უახლოვდა (ცხრ.1) (50.94 ±5.05 vs 40.17 ± 2.94; $t(18)=5,821$; $p<0.0001$; $n_1=n_2=10$). ანალოგიურ ცვლილებებს აქვს ადგილი ასევე H_2O_2-ს

შემთხვევაშიც. კერძოდ, 2 G- ჯგუფის ჰიპოკამპის უჯრედებში შეინიშნება მისი რაოდენობის ზრდა (0,34 ±0.02 vs 0.47 ±0.03; t(18)=11,826; p=0.001; $n_1=n_2=10$), თუმცა ორგანიზმში ეგზოგენური კრეატინის მოწოდებისას (3 ჯგუფი) წყალბადის ზეჟანგის რაოდენობა სარწმუნოდაა შემცირებული (0.47 ±0.03 vs 0.31 ± 0.03; t(18)=11,826; p<0.005; $n_1=n_2=10$).

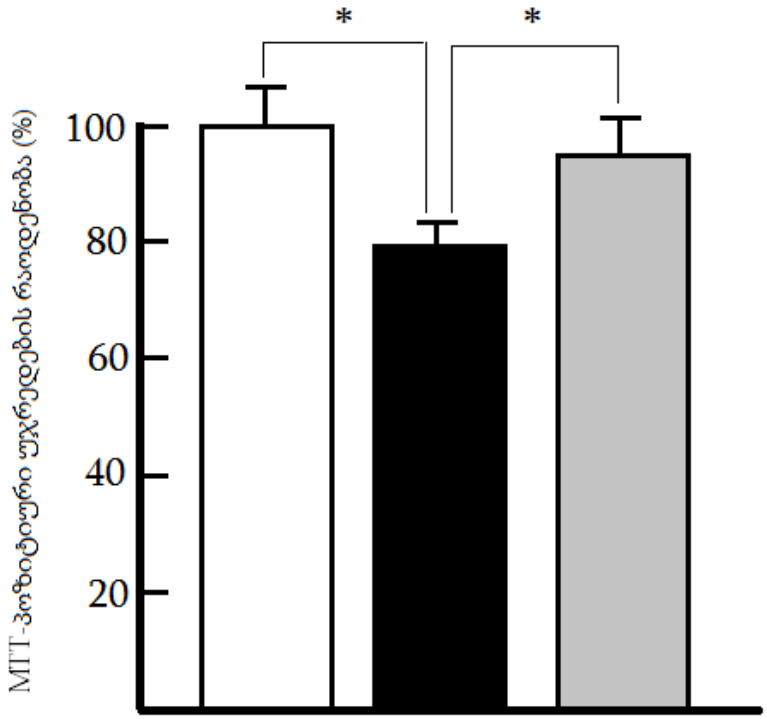
ცხრილი 1

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

შესწავლილი მახასიათებლები	კონტროლი (I G- ჯგუფი)	ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევა (II G ჯგუფი)	ცირკადული რიტმის დარღვევა + კრეატინი (III G- ჯგუფი)
აზოტის ჟანგი (NO) (μmol /100g ქსოვილი)	40.12±5.7	71.38±5.1	45.51±2.3
წყალბადის ზეჟანგი (μmol/ 1g ცილა)	31.8 ±1. 2	49.3 ±2.3	48. 6 ± 3.5
Ca^{2+} (mM/100 g ქსოვილი)	0.030±0.008	0.070 ±0.007	0.038±0.006

ცხრილში 1 წარმოდგენილი მონაცემებიდან ჩანს, რომ ცვლილებები იქნა ნანახი ასევე Ca^{2+}-ის იონის რაოდენობაშიც. კერძოდ, 2 ჯგუფის ცხოველების ჰიპოკამპის უჯრედებში საკონტროლო 1ჯგუფთან შედარებით Ca^{2+}-ის რაოდენობა მნიშვნელოვნადაა გაზრდილი (0.03±0.008 vs 0.05 ±0.007; t(18)=-5,412; p<0.005, $n_1=n_2=10$) და კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა (3 ჯგუფი) სარწმუნოდ ამცირებს მის რაოდენობას (0.05 ±0.007 vs 0.038±0.006; t(18)=4,114; p<.01, $n_1=n_2=10$).

იმის გათვალისწინებით, რომ ცნობილია უჯრედშიდა Ca^{2+}-ის ჭარბი რაოდენობის ციტოტოქსიკური ეფექტი უჯრედის ფუნციონირებაზე, შესწავლილი იქნა კრეატინის გავლენა უჯრედების სიცოცხლისუნარიანობაზე (სურ.2). აღმოჩნდა, რომ სტრესირებული ვირთაგვების ჰიპოკამპში საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით, შემცირებულია სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების რაოდენობა, იმ დროს, როცა 3 ჯგუფის ინდივიდებში მათი რაოდენობა სარწმუნოდაა მომატებული.

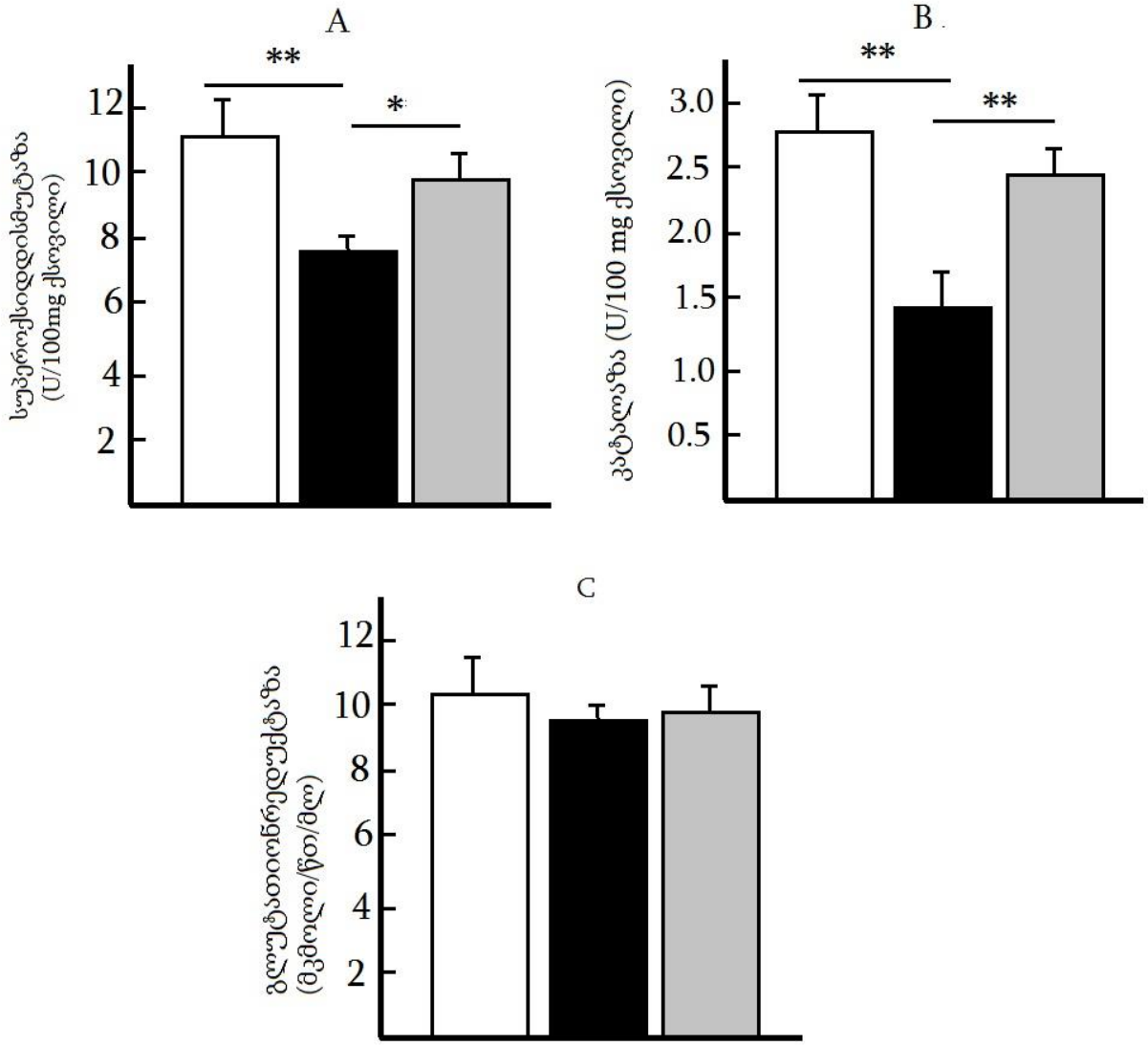


სურათი 2. სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების რაოდენობის ცვლილება სტრესირებული ვირთაგვებში ეგზოგენური კრეატინის შეყვანით. ▭ -1ჯგუფი (საკონტროლო); ■ - 2 ჯგუფი(სტრესირებული); ▭ - 3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი ჯგუფი)

III.2. კრეატინის ეფექტი ჰიპოკამპის უჯრედების ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობაზე

ექსპერიმენტის შემდგომ ეტაპზე შესწავლილი იყო საკვლევ ჯგუფებში ანტიოქსიდანტური სისტემის ზოგიერთი ფერმენტის აქტივობა (სურ.3).

მიღებული მონაცემები აჩვენებენ, რომ ექსპერიმენტის 30-ე დღეს 2 ჯგუფის ვირთაგვებში სოდ-ის აქტივობა საკონტროლო მაჩვენებელთან შედარებით სარწმუნოდაა შემცირებული ($t(18)=3.265$; $p<0,004$; $n_1=n_2=10$) (სურ. 3A), ხოლო 3 ჯგუფში შეინიშნება ფერმენტის აქტივობის მატება ($t(18)=-2,954$; $p< 0.05$; $n_1=n_2=10$). მსგავსი ცვლილებებია კატალაზას შემთხვევაშიც. კერძოდ, ცირკადული რიტმის დარღვევით გამოწვეული სტრესის პირობებში შეინიშნება აქტივობის

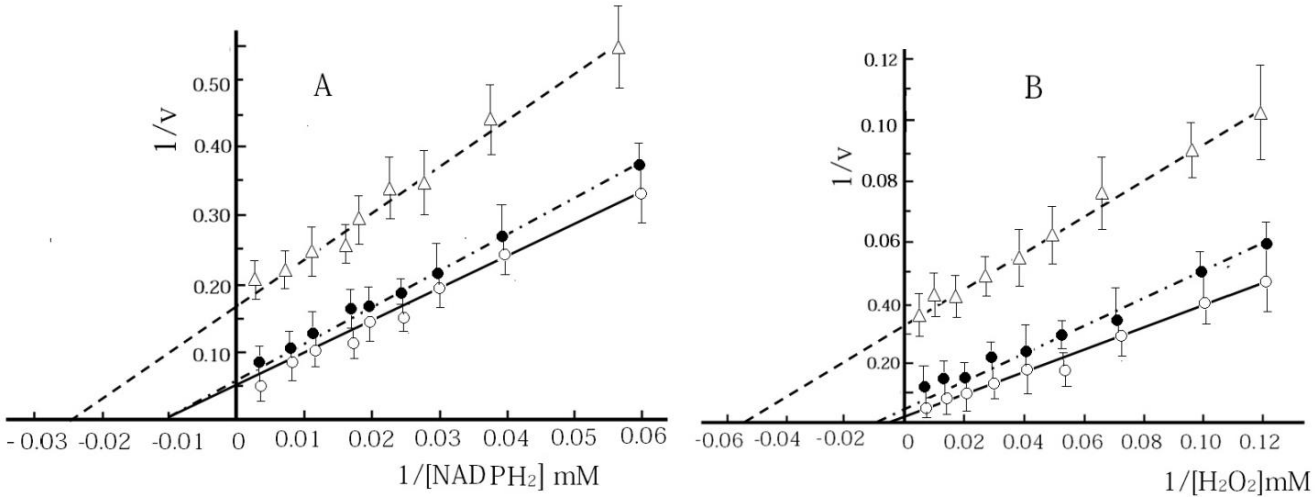


სურათი 3.ეგზოგენური კრეატინის გავლენა სტრესირებული ვირთაგვას ჰიპოკამპის უჯრედების ანტიოქსიდანტური ფერმენტების აქტივობაზე

□ -1G-ჯგუფი (საკონტროლო); ■ - 2G- ჯგუფი; ▒ - 3G- ჯგუფი

A- სოდ-ს აქტივობა (U/100mg tissue); B-კატალაზას აქტივობა (U/100mg tissue); C - გლუტათიონრედუტაზას აქტივობა (μmol /ml/min). (*p<0.01; **p<0.001)

დაქვეითება ($t(18)=14.520$; $p<0,001$; $n_1=n_2=10$) (სურ.3B), რომელიც იზრდება კრეატინის შეყვანით. მათგან განსხვავებით, არ იქნა ნანახი სარწმუნო ცვლილება გლუტათიონრედუქტაზას შემთხვევაში ($t(18)=0,304$; $p=0.765$, $n_1=n_2=10$; $t(18)=-0.765$; $p=0.458$, $n_1=n_2=10$) (სურ. 3c).



სურათი 4. ეგზოგენური კრეატინის გავლენა სოდ-ის (A) და კატალაზას (B) კინეტიკურ პარამეტრებზე (V_{max}, K_m)

○-1 ჯგუფი (საკონტროლო) ; △ - 2 ჯგუფი (სტრესირებული); ●- 3 ჯგუფი (სტრესირებული + კრეატინი). ორდინატთა ღერძზე -(A) SOD-ის აქტივობა და (B) კატალაზას აქტივობის შებრუნებული სიდიდე (1/v)
აბსცისათან ღერძზე -(A) $NADH_2$ (mkmol) და (B) H_2O_2-ის (mM) რაოდენობა

სოდ-სა და კატალაზას კინეტიკური მაჩვენებლების (V_{max}, K_m) შესწავლამ აჩვენა, რომ ხანგრძლივი დღე-ღამური ციკლის დარღვევის პირობებში ადგილი აქვს ფერმენტების როგორც V_{max}-ის დაქვეითებას, ასევე K_m-სიდიდის გაზრდას. მიღებული მონაცემების ანალიზი გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ ამ პირობებში სოდ-ისა და კატალაზას აქტივობის დაქვეითების მიზეზს წარმოადგენს როგორც ფერმენტების რაოდენობრივი შემცირება, ასევე თვისობის დაქვეითება შესაბამისი სუბსტრატების მიმართ (სურ. 4A,B).

IV. მიღებული მონაცემების განხილვა

როგორც ცნობილია, ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევა განიხილება როგორც სტრეს-ფაქტორი, რომელიც ცვლის რა უჯრედულ მეტაბოლიზმს, გავლენას ახდენს ორგანიზმის ფუნციონირებაზე (Burjanadze et al., 2014; Videnovic et al., 2014; Musiek, 2015). ამ პროცესისადმი განსაკუთრებით მგრძნობიარეა თავის ტვინი და მისი გახანგრძლივება ქცევით მახასიათებლების ცვლილებისა და მთელი რიგი ნეიროდეგენერაციული პათოლოგიების მიზეზი ხდება (Arendt, 2010). ამის გათვალისწინებით, ისეთი ნივთიერებების მოძიება, რომლებსაც შესწევთ უნარი მოახდინოს სტრესული მდგომარეობის პრევენცია, მნიშვნელოვანია განსაკუთრებით იმ პირებისათვის, რომლებსაც უწევთ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივად დარღვევა. ამ მიმართულებით ჩვენი ყურადღება მიიპყრო კრეატინმა რამდენიმე მოსაზრებით, კერძოდ იგი აქტიურადაა ჩართული ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში და ასევე არსებობს მონაცემები ენდოგენური კრეატინის ანტიოქსიდანტური თვისებების შესახებ. ამის გათვალისწინებით, ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა გამოგვეკვლია ეგზოგენური კრეატინის პროტექტორული როლი დღე-ღამური რიტმის დარღვევის პირობებში .

როგორც სურათზე 1 წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებენ, 2 ჯგუფის ვირთაგვებში, რომლებიც 30 დღის განმავლობაში იმყოფებოდნენ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის დარღვევის პირობებში მნიშვნელოვნად იცვლება ფიზიოლოგიური მახასიათებლები. კერძოდ, საკონტროლო ჯგუფთან შედარებით, შეინიშნება კვლევითი აქტივობების შემცირება და ამის ფონზე გაზრდილია შიშის გამომხატველი პარამეტრები, რაც ზოგადად დამახასიათებელია სტრესული ცხოველებისათვის (Burjanadze et al., 2014). ამის საპირისპიროდ, 3 ჯგუფის ვირთაგვებში, სადაც 30-დღიანი სტრესი მიმდინარეობდა ყოველდღიური კრეატინის ინტრაპერიტონიალურად მიწოდების პირობებში, ქცევითი მახასიათებლები უმჯობესდება. კერძოდ, იზრდება კვლევითი აქტივობა, ხოლო შიშის გამოხატველი პარამეტრები კლებულობს. აღსანიშნავია, რომ ანალოგიური ცვლილებები ასევე დამახასიათებელია დეპრესიული ცხოველების კრეატინით კვებისას, რაც გახდა საფუძველი იმის დასამტკიცებლად, რომ კრეატინი არა მარტო აქტიურადაა ჩართული უჯრედის ენერგომომარაგების პროცესში, არამედ მას გააჩნია მოდულატორული ეფექტი, კერძოდ დადებითად მოქმედებს ინდივიდის ქცევით პარამეტრებზე და იგი შესაძლებელია გამოყენებული იქნას როგორც ანტიდეპრესიული თერაპევტიული პრეპარატი

(Allen, 2012). ამდენად ჩანს, რომ ჩვენს მიერ წარმოდგენილი ექსპერიმენტული შედეგები შეესაბამება ლიტერატურულ მონაცემებს, რომლებიც აღწერენ კრეატინით კვების პირობებში ექსპერიმენტული ცხოველების ფიზიოლოგიური მაჩვენებლების გაუმჯობესებას და ასევე იძლევა ვარაუდის საშუალებას, რომ კრეატინის ორგანიზმში მოხვედრის განსხვავებული ფორმები (ინტრაპერიტონიალური და საკვები დანამატის სახით) არ ცვლის მის მიერ გამოწვეულ ფიზიოლოგიურ ეფექტებს. მიღებული შედეგი მნიშვნელოვანია იმის გათვალისწინებითაც, რომ ცნობილია ორალურად მიღებული კრეატინის უარყოფითი გავლენა საჭმლის მომნელებელი სისტემის ფუნქციონირებაზე (Astorino et al., 2005).

ცნობილია, რომ ცირკადული რიტმის ხანგრძლივ დარღვევას, ფიზიოლოგიური პარამეტრების ცვლილების გარდა, თავის ტვინში თან ახლავს ოქსიდაციური სტრესის ჩამოყალიბება, რასაც მოსდევს ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის დაქვეითება, აქტიური რადიკალების სიჭარბე, ჰორმონალური სტატუსის ცვლილება, ასევე მიტოქონდრიული დისფუნქციები და ანაბოლური პროცესების, მათ შორის ენერგეტიკულ მეტაბოლიზმში მონაწილე ფერმენტების სინთეზის და აქტივობის შემცირებაც (Koshoridze et al., 2009; Burjanadze et al., 2014). ამ ექსპერიმენტში მიღებული შედეგები აჩვენებენ, რომ ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივ ცვლილებისას ჰიპოკამპის უჯრედებში თან ახლავს Cu,Zn-SOD-ის და კატალაზას აქტივობის დაქვეითებას (სურ.3 A,B). თუმცა სტრესის პარალელურად კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა მნიშვნელოვნად ზრდის ამ ფერმენტების აქტივობას (3 ჯგუფი).

იმის დასადგენად, თუ რა განაპირობებს ფერმენტული რეაქციების ცვლილებას კრეატინის ინტრაპერიტონიალურად მიწოდების პირობებში, შესწავლილი იქნა ამ ფერმენტების კინეტიკური მახასიათებლები (V_{max},Km). როგორც ცნობილია, ფერმენტული რეაქციების აქტივობის დაქვეითების მიზეზია როგორც მათი სტრუტურული, ასევე რაოდენობრივი ცვლილებები (Brethauer, Wyman, 2010). სურათზე 4A და 4B წარმოდგენილი მონაცემები მიუთითებენ, რომ სტრესის პირობებში მცირდება როგორც რეაქციების V_{max}, ასევე ამ ფერმენტების თვისობა სუბსტრატებისადმი. ამდენად სავარაუდოა, რომ ცირკადული რიტმის დარღვევისას ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობის შემცირების მიზეზი იყოს როგორც ოქსიდაციური სტრესის შედეგად ენერგეტიკული მეტაბოლიზმისა და ანაბოლური რეაქციების ინტენსივობის დაქვეითება, ასევე აქტიური რადიკალებით გამოწვეული ფერმენტების სტრუქტურული ცვლილებებიც (Perry et al., 2010).

როგორც სურათი 4A და 4B-დან ჩანს, კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანა (3 ჯგუფი) ზრდის ამ ფერმენტების V_{max}-ს. ზოგიერთი ავტორი კრეატინის ამ ეფექტს უკავშირებს

მის მონაწილეობას Cr/CK/PCr სისტემის ფუნქციონირებაში, რაც ზრდის უჯრედის ენერგეტიკულ პოტენციალს და ანაბოლური პროცესების ინტენსივობა და ხელს უწყობს სხვადასხვა ცილების, მათ შორის ანტიოქსიდანტური ფერმენტების რაოდენობის მატებას (Lawler et al., 2002; Deminice et. al., 2013). თუმცა არსებობს განსხვავებული მოსაზრებაც, რომ კრეატინის ეს ეფექტი განპირობებულია მხოლოდ მისი თვისებით, მოახდინოს ენდოგენური რეაქტიური რადიკალების შებოჭვა და მათი განეიტრალება ისე, რომ არ იმოქმედოს ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების აქტივობაზე (Guimar˜aes-Ferreira et al., 2012). კრეატინის ეს ეფექტი გამოჩნდა ჩვენს ექსპერიმენტშიც, რომელიც აჩვენებს, რომ კრეატინის შეყვანის პირობებში იზრდება არა მარტო რეაქციების V_{max}, არამედ სოდ-ისა და კატალაზას თვისობა (1/Km) სუბსტრატებისადმი (სურ.4A,4B). ამდენად, მიღებული მონაცემები გვაძლევს საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ კრეატინის ანტიოქსიდანტური ეფექტი განპირობებულია ორი ძირითადი მიზეზით. პირველი გულისხმობს კრეატინის დამატებით უჯრედის ენერგეტიკული მეტაბოლიზმის გაძლიერებასა და შესაბამისად, ფერმენტების რაოდენობის გაზრდას, ხოლო მეორე მიზეზი განპირობებულია მის უშუალო მონაწილეობას აქტიური რადიკალების განეიტრალების პროცესში.

იმ რადიკალებს შორის, რომელიც ოქსიდაციური სტრესის მიზეზი ხდება, მნიშვნელოვანია პეროქსიდნიტრიტი ($ONOO^-$) და სუპეროქსიდი. პეროქსიდნიტრიტის ძირითად წყაროს აზოტის ჟანგის (NO) წამოადგენს. ცირკადული რიტმის დარღვევის შემთხვევაში ჰიპოკამპის უჯრედებში NO-ს მატება ნანახია როგორც ჩვენს კვლევებშიც, ასევე სხვა ავტორების მიერაც (Huang et al., 2015). ცხრილში 1 წარმოდგენილი მონაცემები მიუთითებენ, რომ NO-ს ჭარბი რაოდენობა სარწმუნოდაა შემცირებული 3 ჯგუფის ვირთაგვების უჯრედებში. ცხრილიდან ასევე ჩანს, რომ კრეატინის ხანგრძლივი პერიოდით ინტრაპერიტონიალური მიწოდება არ ცვლის სტრესის პირობებში გაზრდილი H_2O_2-ს რაოდენობას. ცნობილია, რომ H_2O_2 მნიშვნელოვან როლს ასრულებს უჯრედის ჰომეოსტაზში, მონაწილეობს რა გენების ექსპრესიაში, მათ შორის ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების სინთეზშიც (Ju et al., 2006, 1067:425–435.). აღსანიშნავია, რომ ანალოგიური მონაცემებია მიღებული სხვა მკვლევარების მიერაც (Araújo et al., 2013, Lawler et al., 2009). , რაც იძლევა საფუძველს ვივარაუდოთ, რომ კრეატინის ეფექტი ანტიოქსიდანტურ სისტემაზე შერჩვითი ხასიათისაა და დამოკიდებულია კონკრეტულ აქტიურ რადიკალზე.

როგორც ცნობილია, ფერმენტ NO-სინთაზას აქტივატორს წარმოადგენს Ca^{2+} (Weaver et al., 2002). ამის გათვალისწინებით, შემდგომში შესწავლილი იქნა Ca^{2+}-ის იონის რაოდენობრივი

ცვლილებები სამივე ჯგუფის ვირთაგვების უჯრედებში. მიღებული შედეგებიდან ჩანს, რომ 2 ჯგუფის უჯრედებში სარწმუნოდ იზრდება Ca^{2+}-ის შემცველობა (ცხრ.1), რაც ემთხვევა ლიტერატურულ მონაცემებს, რომლებიც ადასტურებენ ხანგრძლივი ქრონიკული სტრესის დროს Ca^{2+}-ის რაოდენობის ზრდას (Maigaard et al., 2012; Datson et al., 2013). ცხრილში 1 წარმოდგენილი მონაცემები აჩვენებენ, 3 ჯგუფის ვირთაგვების უჯრედებში Ca^{2+}-ის რაოდენობა საკონტროლო მაჩვენებლის ფარგლებშია. აღსანიშნავია, რომ კრეატინის ანალოგიური გავლენა Ca^{2+}ის რაოდენობაზე ნანახია ჩონჩხი კუნთებშიც Duchenne muscular dystrophy-ს და თავის ტვინში ზოგიერთი ნეიროდეგენერაციული ცვლილებისას (Pulido et al., 1998).). როგორც ცნობილია, Ca^{2+}ის ჭარბი რაოდენობა ციტოტოქსიკურია უჯრედებისათვის, რაც აისახება სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების რაოდენობაზე (Gao et al., 1998). როგორც სურათი 2-დან ჩანს, 2ჯგუფის ვირთაგვების ჰიპოკამპში შეინიშნება სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების შემცირება, თუმცა კრეატინის ინტრაპერიტონიალური შეყვანისას შემთხვევაში ექსპერიმენტის 30-ე დღეს სიცოცხლისუნარიანი უჯრედების რაოდენობა სარწმუნოდაა მომატებული (3 ჯგუფი).

ამრიგად, მიღებული შედეგები აჩვენებენ, რომ ეგზოგენური გზით ორგანიზმში მოხვედრილი კრეატინი ენერგეტიკულ პროცესებში აქტიური მონაწილეობის გარდა, ასრულებს ასევე ანტიოქსიდანტურ ფუნქციასაც. კერძოდ, აძლიერებს რა სტრესის შედეგად დაქვეითებულ ენერგეტიკულ პოტენციალს თავის ტვინის უჯრედებში, ზრდის ცილოვანი მოლეკულების, მათ შორის ანტიოქსიდანტური სისტემის ფერმენტების რაოდენობას მათი სინთეზის გაძლიერების ხარჯზე. მიღებული მონაცემები იძლევა საშუალებას იმისათვის, რათა კრეატინი განხილული იქნას როგორც აქტიური ანტიოქსიდანტური თვისების მქონე ნაერთი.

დ ა ს კ ვ ნ ა

- ორგანიზმში ეგზოგენურად შეყვანილი კრეატინისათვის დამახასიათებელია ანტიოქსიდანტური თვისებები, რაც ვლინდება სზვადასხვა გარე ფაქტორების (მაგალითად,, ბუნებრივი ცირკადული რიტმის ხანგრძლივი დარღვევა) გავლენით გაძლიერებული ოქსიდაციურ პროცესებზე დადებითი ზემოქმედებით.
- კრეატინის ანტიოქსიდანტური ზემოქმედების მიზეზია ანაბოლური რეაქციების გაძლიერება, რაც ანტიოქსიდანტური ფერმენტების რაოდენობის მატებასა და შესაბამისად, სტრესის შედეგად დაქვეითებული ანტიოქსიდანტური სისტემის გააქტივებას იწვევს.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. Adamo AM, Aloise PA, Pasquini JM (1986) A possible relationship between concentration of microperoxisomes and myelination. Int J Dev Neurosci. 4(6):513-517.
2. Akkuş Çetinus Ş, Nursevin Öztop H (2003). "Immobilization of catalase into chemically crosslinked chitosan beads". Enzyme and Microbial Technology. **32** (7): 889–894. doi:10.1016/S0141-0229(03)00065-6
3. Akopova OV, Kolchinskaya LI, Nosar VI, Bouryi VA, Mankovska IN, Sagach VF. 2012. Cytochrome C as an amplifier of ROS release in mitochondria. FiziolZh. 58:3–12.
4. Allen PJ. 2012. Creatine metabolism and psychiatric disorders: Does creatine supplementation have therapeutic value. Neuroscience and Biobehavioral Reviews. 36:1442–1462.
5. Almeida LS, Salomons GS, Hogenboom F, Jakobs C, Schoffelmeer ANM. 2006. Exocytotic release of creatine in rat brain. Synapse. 60:118–123.
6. Altincicek B., Kovacs JL., Gerardo NM. (2011). "Horizontally transferred fungal carotenoid genes in the two-spotted spider mite Tetranychus urticae". Biology Letters. **8** (2): 253-57.
7. Amital, D., Vishne, T., Rubinow, A., Levine, J., 2006. Observed effects of creatine monohydrate in a patient with depression and fibromyalgia. Am. J. Psychiatry 163, 1840–1841.
8. Azzi A (2007). "Molecular mechanism of alpha-tocopherol action". Free Radical Biology & Medicine. **43** (1): 16–21.
9. Araújo MB, Moura LP, Vieira Junior RC, Junior MC, Dalia RA, Sponton AC, Ribeiro C, Mello MRA Creatine supplementation and oxidative stress in rat liver. Journal of the International Society of Sports Nutrition 2013, 10:54, DOI: 10.1186/1550-2783-10-54
10. Astorino TA, Marrocco AC, Gross SM, Johnson DL, Brazil CM, Icenhower ME, Kneessi RJ. 2005. Is running performance enhanced with creatine serum ingestion?J Strength Cond Res. 19:730-734.
11. Bakalova S., Nikolova A., Wedera D. (2004): Isoenzyme profiles of peroxidase catalase and superoxide dismutase as affected by dehydration stress and ABA during germination of wheat seeds. Journal of Plant Physiology, 30: 64–77.
12. 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.
13. Beard E, Braissant O. 2010. Synthesis and transport of creatine in the CNS: importance for cerebral functions. J Neurochem. 115:297-313.
14. Bhabak KP, Mugesh G (2010). "Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants". Accounts of Chemical Research. **43** (11): 1408–19. doi:10.1021/ar100059g.
15. Bjelakovic G, Nikolova D, Gluud LL, Simonetti RG, Gluud C (2007). "Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis". JAMA): 842–57. **297**

16. Bor-Jen Lee, Yi-Chin Lin, Yi-Chia Huang, Ya-Wen Ko, Simon Hsia, and Ping-Ting Lin. (2012) The Relationship between Coenzyme Q10, Oxidative Stress, and Antioxidant Enzymes Activities and Coronary Artery Disease. The Scientific World Journal.2012, Article ID 792756.
17. Brethauer S., Wyman C.E., 2010. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production, Bioresour. Techol. 101, 4862-4874.
18. Burjanadze GM, Kuchukashvili ZT, Chachua MV, Menabde KO, Dachanidze NT, Koshoridze NI. 2014. Changes in activity of hippocampus creatine kinase under circadian rhythm disorders. Biological Rhythm Research 45:685-697.
19. Cao C, Leng Y, Kufe D (2003). "Catalase activity is regulated by c-Abl and Arg in the oxidative stress response". The Journal of Biological Chemistry. **278** (32): 29667–75.
20. Chelikani P, Fita I, Loewen PC (2004). "Diversity of structures and properties among catalases". Cellular and Molecular Life Sciences. **61** (2): 192–208. doi:10.1007/s00018-003-3206-5
21. Datson NA, van den Oever JM, Korobko OB, Magarinos AM, de Kloet ER, McEwen BS. 2013. Previous history of chronic stress changes the transcriptional response to glucocorticoid challenge in the dentate gyrus region of the male rat hippocampus. Endocrinology. 154:3261-3272.
22. Davis JM, Auten RL (2010) Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth.
23. 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.
24. Fernanda M, Amanda C. Augusto A, Gurgueira S A. (2009) Effect of acute vs chronic H_2O_2-induced oxidative stress on antioxidant enzyme activities. Free Radical Research. 43,44
25. Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT, Poulos TL (December 1997). "Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 A resolution". Nature Structural Biology. 4 (12): 1032–8.
26. Gao ZY, Collins HW, Matschinsky FM, Lee VM, Wolf BA. (1998) Cytotoxic effect of beta-amyloid on a human differentiated neuron is not mediated by cytoplasmic Ca2+ accumulation. J Neurochem. 70(4):1394-400.
27. Glorieux C, Calderon PB (2017).Catalase, a remarkable enzyme: targeting the oldest antioxidant enzyme to find a new cancer treatment approach. Biol Chem. 398(10):1095-1108. doi: 10.1515/hsz-2017-0131.
28. Guimar˜aes-Ferreira L, Pinheiro CH, Gerlinger-Romero F, Vitzel KF, Nachbar RT,Curi R. 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.
29. Green AS, Tang G, Lango J, Klasing KC, Fascetti AJ (2011). "Domestic cats convert ((2) H(8))-β-carotene to ((2) H(4))-retinol following a single oral dose". Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. **96** (4): 681–92.
30. Gupta. S., Sodhi S., and Mahajan V. (2009) Correlation of antioxidants with lipid peroxidation and lipid profile in patients suffering from coronary artery disease. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 13, 8, 889–894.

31. Huang CC, Lai CJ, Tsai MH, Wu YC, Chen KT, Jou MJ, Fu PI, Wu CH, Wei IH. 2015. Effects of melatonin on the nitric oxide system and protein nitration in the hypobaric hypoxic rat hippocampus. BMC Neurosci. 16:61-69.
32. Ighodaro OM .Akinloye OA (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine, 54, 287-293
33. Ju Y, Lucey BP, Holtzman DM. 2014. Sleepand Alzheimer disease pathology - a bidirectional relationship. Nat Rev Neurol. 10:115–119.
34. Katar M, Ozugurlu AF, Ozyurt H, Benli I (2014). "Evaluation of glutathione peroxidase and superoxide dismutase enzyme polymorphisms in celiac disease patients". Genetics and Molecular Research. **13** (1): 1030–7.
35. Koshoridze NI, Menabde KO, Chachua MV, Kuchukashvili ZT. 2009. Enzymes of energy metabolism in brain and chronic stress.. Journal of Stress Physiology & Biochemistry. 5:32-37.
36. Lawler JM, Barnes WS, Wu G, Song W, Demaree S. 2002. Direct antioxidant properties of creatine. Biochem Biophys Res Commun. 290:47-52.
37. Linster CL, Van Schaftingen E (2007). "Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals". The FEBS Journal. **274** (1): 1–22. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05607
38. Lobo V., Patil A., Phatak A., Chandra N. (2010) Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. Pharmacogn Rev, 4 , 118-143
39. Maigaard K, Hageman I, Jorgensen A, Jorgensen MB, Wörtwein G. 2012. Electroconvulsive stimulations prevent chronic stress-induced increases in L-type calcium channel mRNAs in the hippocampus and basolateral amygdala. Neurosci Lett. 516:24-28.
40. Muller FL, Lustgarten MS, Jang Y, Richardson A, Van Remmen H (2007). "Trends in oxidative aging theories". Free Radical Biology & Medicine. **43** (4): 477–503
41. Ohlemiller KK, McFadden SL, Ding DL, Lear PM, Ho YS (2000). "Targeted mutation of the gene for cellular glutathione peroxidase (Gpx1) increases noise-induced hearing loss in mice". Journal of the Association for Research in Otolaryngology. **1** (3): 243–54. doi:10.1007/s101620010043.
42. Olson GE, Whitin JC, Hill KE, Winfrey VP, Motley AK, Austin LM, Deal J, Cohen HJ, Burk RF (May 2010). "Extracellular glutathione peroxidase (Gpx3) binds specifically to basement membranes of mouse renal cortex tubule cells". American Journal of Physiology. Renal Physiology. **298** (5): F1244–53.
43. Packer L, Weber SU, Rimbach G (2001). "Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling". The Journal of Nutrition. **131** (2): 369S–73S.
44. Pahan K, Liu X, McKinney MJ, Wood C, Sheikh FG, Raymond JR. 2000. Expression of a dominant-negative mutant of p21(ras) inhibits induction of nitric oxide synthase and activation of
45. Perry JJP., Shin DS., Getzoff ED. and Tainer JA. 2010. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. Biochim Biophys Acta. 1804(2): 245–262)
46. Pulido SM, Passaquin AC, Leijendekker WJ, Challet C, Wallimann T, Rüegg UT. 1998. Creatine supplementation

improves intracellular Ca^{2+} handling and survival in mdx skeletal muscle cells. FEBS Lett. 439:357-362.

47. Rambo LM, Ribeiro LR, Schramm VG, Berch AM, Stamm DN, Della-Pace ID, Almeida Silva LF, Furian AF, Oliveira MS, Fighera MR, Royes LFF. 2012. Creatine increases hippocampal Na+, K+-ATPase activity via NMDA-calcineurin pathway. Brain Research Bulletin. 88:553–559.
48. Ran Q, Liang H, Ikeno Y, Qi W, Prolla TA, Roberts LJ, Wolf N, Van Remmen H, VanRemmen H, Richardson A (2007). "Reduction in glutathione peroxidase 4 increases life span through increased sensitivity to apoptosis". The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences. **62** (9): 932–42. doi:10.1093/gerona/62.9.932.
49. Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA (2005) Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins. Curr Opin Cell Biol. 17(2):183-189.
50. Rodrigo J, Fernández AP, Serrano J, Peinado MA, Martínez A (2005). The role of free radicals in cerebral hypoxia and ischemia.Free Radic Biol Med39(1):26-50.
51. Sepasi Tehrani H, Moosavi-Movahedi AA. (2018) Catalase and its mysteries. Prog Biophys Mol Biol. 2018 140:5-12. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2018.03.001.
52. Smirnoff N (2001). L-ascorbic acid biosynthesis. Vitamins and Hormones. Vitamins & Hormones. **61**. pp. 241–66.
53. Socha K, E, Soroczyńska J, Jakoniuk M, Mariak Z, Borawska MH (2014 Kochanowicz J, Karpińska). "Dietary habits and selenium, glutathione peroxidase and total antioxidant status in the serum of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis". Nutrition Journal. **13**: 62
54. So-Y eon Shim MD, Han-Suk Kim (2013) Oxidative stress and the antioxidant enzyme system in the developing brain. Korean J Pediatr. 56(3): 107–111.
55. Stefani GP, Nunes RB, Dornelles AZ, Alves JP, Piva MO, Domenico MD, Rhoden CR, Lago PD. 2014. Effects of creatine supplementation associated with resistance training on oxidative stress in different tissues of rats. J Int Soc Sports Nutr. 11:11.
56. Tasaki E, Kobayashi K, Matsuura K, Iuchi Y (2017). "An Efficient Antioxidant System in a Long-Lived Termite Queen". PLoS ONE. **12** (1): e0167412.
57. Tasset I, Penã J, Jimena I, Feijoó M, Del Carmen Munõz M, Montilla P, Túnez I. 2008. Effect of
58. Weaver J, Porasuphatana S, Tsai P, Cao GL, Budzichowski TA, Roman LJ, Rosen GM. The activation of neuronal nitric-oxide synthase by various divalent cations. J Pharmacol Exp Ther. 2002 Aug;302(2):781-6.).
59. Wood JM, Decker H, Hartmann H, Chavan B, Rokos H, Spencer JD, Hasse S, Thornton MJ, Shalbaf M, Paus R, Schallreuter KU (2009). "Senile hair graying: H2O2-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair". FASEB Journal. **23** (7): 2065–75.
60. Wood JM, Decker H, Hartmann H, Chavan B, Rokos H, Spencer JD, Hasse S, Thornton MJ, Shalbaf M, Paus R, Schallreuter KU (July 2009). "Senile hair graying: H2O2-mediated oxidative stress affects human hair color by blunting methionine sulfoxide repair". FASEB Journal. **23** (7): 2065–75

61. Xi S, Chen LH (2000). "Effects of dietary fish oil on tissue glutathione and antioxidant defense enzymes in mice with murine aids". Nutrition Research. **20** (9): 1287–99.
62. Yuan G, Sun B. , Yuan J. , Q. Wang (2010) Effect of 1-methylcyclopropene on shelf life, visual quality, antioxidant enzymes and health-promoting compounds in broccoli florets.Food Chem, 118, 774-781.
63. Yu-Ping Zha and Chao-Liang Lei "Effects of Ultrasound-Stress on Antioxidant Enzyme Activities ofHelicoverpa Armigera (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)," Journal of Agricultural and Urban Entomology 28(1), 34-41, (1 January 2012). https://doi.org/10.3954/1523-5475-28.1.34
64. Zhang, Y. 2013. Ascorbic acid in plants. Biosynthesis, regulation and enhancement. Springer Briefs in Plant Science nr 14. 117 p. Springer, New York, USA.

Zingg JM, Azzi A (2004). "Non-antioxidant activities of vitamin E". Current Medicinal Chemistry. **11** (9): 1113–33. doi:10.2174/0929867043365332