

ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო
უნივერსიტეტი

თამუნა მინდორაშვილი

**საფერავის ჯიშის ყურძნიდან დაყენებული სხვადასხვა
ღვინის ანტიოქსიდანტური თვისებების შედარებითი
შესწავლა ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდით.**

სამაგისტრო პროგრამა ბიოლოგია

ბიოლოგიის მაგისტრი (სპეციალიზაცია- ბიოფიზიკა)

**ნაშრომის ხელმძღვანელი : ზურაბ ქუჩუკაშვილი, აკადემიური დოქტორი.
ივ. ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის
ბიოლოგიის დეპარტამენტის ასისტენ-პროფესორი**

**ბიოლოგიის დეპარტამენტი, ინტერდისციპლინური
ბიოფიზიკის კათედრა**

სარჩევი

ანოტაცია.....	3
Abstract	5
შესავალი	7
თავი I - ლიტერატურული მიმოხილვა	10
1.1 ჟანგბადის აქტიური ფორმების ეფექტები ცოცხალ ორგანიზმზე	10
1.2 ღვინის ფენოლური ნაერთები და ცოცხალი ორგანიზმის ანტიოქსიდანტური სისტემები	12
1.3 წყალბადის ზეჟანგით აქტივირებული ლუმინოლის ქემილუმინისენცია	14
თავი II - გამოყენებული მეთოდები	16
2.1 პოლიფენოლების ჯამური კონცენტრაციის განსაზღვრა Folin Ciocalteu-ს მეთოდით	16
2.2 ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედული ფრაქციის გამოყოფა და ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის მოდელის შექმნა	17
2.3 ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ბიურეტის მეთოდის გამოყენებით	18
2.3 ფერმენტ კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედული ფრაქციის ზეჟანგური ჟანგვის პროცესში.	20
2.3 ფერმენტ სუპეროქსიდ დისმუტაზას კონცენტრაციის განსაზღვრა	21
2.4 მალონილ დეალდეჰიდის კონცენტრაციის განსაზღვრა ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედული ფრაქციის ზეჟანგური ჟანგვის მოდელში	23
შედეგები და მათი განხილვა	25
დასკვნა.....	36
გამოყენებული ლიტერატურა	37

ანოტაცია

უკანასკნელ პერიოდში ცოცხალ ორგანიზმზე მოქმედი გარემო ფაქტორებით გამოწვეული ნეგატიური ეფექტებიდან განსაკუთრებული ყურადღება მიიქცია ჟანგვითმა სტრესმა, რომლისგანაც თავის დასაცავად ადამიანებს ჩამოუყალიბდათ მძლავრი ანტიოქსიდანტური სისტემები, ფერმენტული და არაფერმენტული. არაფერმენტულ ანტიოქსიდანტურ სისტემას მიეკუთვნება ფლავანოიდები, რომლებიც დიდი რაოდენობით წარმოიქმნება მცენარეებში. ამ მხრივ გამოირჩევა ყურძენი, ყველაზე მეტად კი ქართული საფერავი.

საყოველთაოდ ცნობილია, რომ ადამიანის ორგანიზმზე ღვინის დადებითი გავლენა დამოკიდებულია სწორედ ფენოლური ნაერთების შემცველობაზე და კომპოზიციაზე, რომლებსაც ახასიათებთ ძლიერი ანტიოქსიდანტური აქტივობა, ამიტომაც, დღემდე, ღვინის ანტიოქსიდანტური შესაძლებლობების შესაფასებლად ყველაზე ხშირად გამოიყენება საერთო პოლიფენოლური ნაერთების და ფლავანოიდების კონცენტრაციის განსაზღვრის მეთოდი. აქვე უნდა აღინიშნოს, რომ პოლიფენოლების ჯამური კონცენტრაცია ყოველთვის არ ასახავს ღვინის ანტიოქსიდანტურ უნარს, რადგან იგი ასევე სხვა მეორად მეტაბოლიტებზეა დამოკიდებული, რომლებიც არამარტო ანტირადიკალური უნარებით ხასიათდებიან, არამედ ავლენენ ძლიერ მარეგულირებელ და მესენჯერულ თვისებებს; მათი საერთო მოქმედება განპირობებულია სინერგისტული და ანტაგონისტური ურთიერთობებით. აქედან გამომდინარე ღვინის და მასში შემავალი ნაერთების ანტიოქსიდანტური უნარის შესაფასებლად საჭიროა არა უბრალოდ პოლიფენოლების ჯამური კონცენტრაციის განსაზღვრა, არამედ მათ ანტირადიკალურ თვისებებსა და სხვა მეტაბოლურ პროცესებზე დაკვირვება და შემდგომ კომპლექსური შეფასება. ეს უკანასკნელი პროცედურები საკმაოდ შრომატევადია და ხანგრძლივ დროს მოითხოვს. შესაბამისად საჭიროა შემუშავდეს სწრაფი, მაქსიმალურად ინფორმატიული და ნაკლებხარჯიანი მეთოდი, რომელიც მჭიდრო კორელაციაში იქნება ღვინის ანტიოქსიდანტური თვისებების ადეკვატურ დახასიათებასთან.

ყოველივე ზემოთ თქმულიდან გამომდინარე, ჩვენი კვლევის მიზანს წარმოადგენდა ქართული საფერავის ჯიშის ყურძნიდან მიღებული ღვინოების ანტიოქსიდანტური აქტივობის და პოტენციური სამკურნალო პროფილაქტიკური თვისებების შესწავლა, ტრადიციული, *in vitro* და ჩვენს მიერ მოდიფიცირებული

ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენებით და შედეგების ურთიერთ შედარება.

ექსპერიმენტი შედგებოდა რამდენიმე ეტაპისგან. საწყის ეტაპზე შერჩეულ ღვინოებში, განვსაზღვრეთ პოლიფენოლების ჯამური კონცენტრაცია, მედიკო ბიოლოგიური თვისებების შესაფასებლად გამოყენებულ იქნა ასევე ინ ვიტრო მეთოდები, კერძოდ, შევისწავლეთ ზეჟანგური ჟანგვის მოდელში აღნიშნული ნაერთების გავლენა ღვიძლის ანტიოქსიდანტურ ფერმენტებზე, კატალაზასა და სუპეროქსიდდისმუტაზაზე, განვსაზღვრეთ ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ერთ-ერთი საბოლოო პროდუქტის, მალონისდეალდეჰიდის კონცენტრაცია. საბოლოო ეტაპზე შევისწავლეთ ღვინის ანტიოქსიდანტური, პოტენციური მედიკო-ბიოლოგიური თვისებები ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენებით.

მიღებულმა შედეგებმა კიდევ ერთხელ დაადასტურა რომ მხოლოდ პოლიფენოლური ნაერთების კონცენტრაციის და კომპოზიციის განსაზღვრა არ არის საკმარისი ღვინის ანტიოქსიდანტური თვისებების შესაფასებლად, ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდი გვაძლევს გაცილებით მეტ ინფორმაციას აღნიშნულთან დაკავშირებით. მეთოდი მჭიდრო კორელაციაშია ღვინის ანტიოქსიდანტობის შესაფასებლად გამოყენებულ *in vitro* მეთოდებთან.

შედეგების გათვალისწინებით შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ, ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენებით შესაძლებელია მოხდეს ღვინის ანტიოქსიდანტური და პოტენციური სამკურნალო-პროფილაქტიკური თვისებების შესწავლა, მეთოდი საშუალებას გვაძლევს მაქსიმალურად სრულყოფილად, სწრაფად და ნაკლებ დანახარჯიანად შევაფასოთ ღვინის ანტიოქსიდანტური და მედიკო - ბიოლოგიური პოტენციალი.

Abstract

In recent years, the special interest has been paid to the oxidative stress as one of the negative effects of harmful environmental factors affecting living organisms. To protect from oxidative stress, living organisms have developed powerful anti-oxidative systems: enzymatic and non-enzymatic. Flavonoids are the part of non-enzymatic protective system; these compounds are produced in high concentrations by plants. Grapes, especially red grapes, like Sapheravi, contain large amount and wide spectrum of polyphenolic compounds.

It is well known that the positive impact of wine on human body is mainly conditioned by its polyphenolic content and composition. These compounds have a strong antioxidant capacity that is the reason why we mostly use total Polyphenolic concentration determination method to estimate antioxidant properties of wine.

On the other hand, it is also known that polyphenolic content does not always have strong correlation with therapeutic and prophylactic properties of red wine; it is also conditioned by other secondary metabolites, which have strong antioxidant effects and powerful regulatory and messenger properties. Consequently, their common action is due to synergistic and antagonistic relationships. Based on these facts, to evaluate the anti-oxidative effect of wine and its compounds, it is not enough to determine the total concentration of polyphenols, but to appreciate their antiradical properties and then, complex study and assessment in the medico-biological point of view. The procedures mentioned above are hard to fulfil and takes a lot of time. Accordingly, it is crucial to develop rapid, maximally informative and less costly method that will have strong correlations with adequate characterization of the medico-biological properties of wine.

Proceeding from the above, the aim of the study was to determine evaluate and compare the antioxidant effects and potential medico-prophylactic properties of some Georgian Red Wines using traditional, in vitro and Luminol Chemiluminescence method that was modified accordingly by our team.

Several step experiment was conducted. Firstly, we used traditional method for estimating total antioxidant contents of wine, then we used in vitro methods, we determined the effect of our objects under study on rat liver antioxidant enzymes, Catalase (CAT) and Superoxide dismutase (SOD) in lipid peroxidation model. We also determined the concentration of malonyl-dealdehyde (MDA) which is one of the final products for lipid peroxidation. At the last stage of

our study, we used luminol-chemiluminescence method for estimating anti-radical and potential medico-prophylactic properties of wines.

The results obtained once more approved the state that we can not evaluate antioxidant and medico-biological properties of wine only by determining total polyphenolic content, Luminol chemluminescence method gives us more detailed information about it. This method has strong correlations with in vitro methods that had been used during our experiments.

According to the results, we can conclude that by using luminol chemiluminescence method it is possible to obtain detailed information about antioxidant and potential medico-biological properties of wines. The method is less time consuming, less costly and maximally effective.

შესავალი

გარემოს ნებისმიერი არახელსაყრელი ზემოქმედება ცოცხალი ორგანიზმის ჯანმრთელობაზე აისახება, ამის ფონზე, ნებისმიერ ცოცხალ ორგანიზმში მიმდინარეობს თავისუფალრადიკალური პროცესები, რომელსაც თან ახლავს რიგი პათოლოგიები. ისინი ასტიმულირებენ ქსენობიოტიკების ტოქსიკურ ეფექტს, კანცეროგენეზს, მუტაგენეზს, აუტოიმუნურ დაავადებებს. კვების ხარისხში არსებული ნაკლოვანებების და გამო ორგანიზმის შესაბამისი დამცავის სისტემებს არ შესწევთ უნარი უპასუხონ გრემო არის ზეგავლენას, რაც მკვეთრად ზრდის მრავალი დაავადების განვითარების რისკს. ამიტომ, ორგანიზმის ფერმენტულ დაცვის სისტემის გალიერებასთან ერთად, მნიშვნელოვან ამოცანას წარმოადგენს ფუნქციონალური და სამკურნალო-პროფილაქტიკური დანიშნულების კვების პროდუქტების წარმოება, რომლებიც უზრუნველყოფენ ორგანიზმისთვის დამატებით დაცვის ფუნქციას. ასეთი პროდუქტები აუმჯობესებენ ადამიანის ფიზიოლოგიურ მდგომარეობას და ძირითადად მოქმედებენ რამოდენიმე ფიზიოლოგიურ ფუნქციაზე. აღნიშნულის მაგალითებია ვიტამინები, საკვები ბოჭკოები, მინერალური ნივთიერებები, ამინომჟავები, ორგანული მჟავები, პოლიფენოლური ნაერთები (ანტიოქსიდანტები). [1, 2]

უკანასკნელ პერიოდში ღვინო მსგავს კონტექსტში სულ უფრო და უფრო ფართოდ განიხილება როგორც ფუნქციური საკვები. იგი რთული შემადგენლობის პროდუქტია, რომელიც ყურძნის ტექნოლოგიური გადამამუშავებით მიიღება, მასში აღმოჩენილი და შესწავლილია 1000-ზე მეტი კომპონენტი, რომლებიც განსაზღვრავენ ღვინის დადებით პოტენციალს. ამ კომპონენტებს შორის განსაკუთრებული ყურადღება ექცევა პოლიფენოლურ ნაერთებს, რომლებიც, როგორც აღვნიშნეთ ორგანიზმის თავდაცვის სისტემის გამაძლიერებელი აგენტებია. ისინი ძირითადად კონცენტრირდება მცენარის კანსა და წიბწაში და ხასიათდება მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობით. ეს ნაერთები არა მხოლოდ იცავენ მცენარეს გარემოს არახელსაყრელი ზემოქმედებისგან, ასევე აქტიურ მონაწილეობას იღებენ ღვინის დამზადება-შენახვის ყველა ეტაპზე მიმდინარე რთულ ბიოქიმიურ პროცესებში და უშუალო გავლენას ახდენენ ღვინის გემოზე, ბუკეტზე, ფერზე, გამჭვირვალობაზე, სტაბილურობაზე. აღსანიშნავია რომ მათი კონცენტრაცია და სპექტრი მნიშვნელოვნად განსხვავდება წითელ და თეთრ ღვინოებს შორის, განსხვავება აღნიშვნება თვითონ წითელ ღვინოებს შორისაც. ღვინოში პოლიფენოლების კონცენტრაცია და სპექტრი მრავალ გარეშე ფაქტორზეა დამოკიდებული, მათ შორის

აღსანიშნავია : ნიადაგის ტიპი, კლიმატური პირობები, ნიადაგში მიკროელემენტების შემცველობა და სხვ.

ლიტერატურიდან ცნობილია რომ პოლიფენოლური ნაერთების შემცველობა ასევე დამოკიდებულია ღვინის დაყენების ტექნოლოგიაზე. ამ ნაერთების შემცველობა გაცილებით მეტია ქართული, ტრადიციული, კახური წესით დაყენებულ ღვინოებში, ვიდრე ევროპული წესით დაყენებულებში. როგორ უკვე ღვინიშნეთ, ყველაზე დიდი კონცენტრაციით პოლიფენოლური ნაერთები ყურძნის წიბწაში, კანსა და კლერტში გვხვდებიან (რეზვერატროლი, მონომერული ფლავანოიდები, კატეხინები, ეპიკატეხინები, პოლიმერული პროანტოციანიდინები, ფენოლ მჟავები, გალმჟავა, ელაგის მჟავა და ანტოციანები.), რადგანაც კახური წესით ღვინის დაყენება გულისხმობს ყურძნის ტკბლის დადუღებასა და დავარგებას სრულ ჭაჭაზე 5-6 თვის 8 განმავლობაში და დავარგებული ღვინოს შენახვას ქვევრში, ამიტომ მსგავსი შედეგები არ იყო მოულოდნელი.[3,4,5]

პოლიფენოლების შემცველობით კახური წესით დაყენებულ ღვინოებს შორის გამოირჩევა ქართული საფერავი, სწორედ ამიტომ ავირჩიეთ იგი საკვლევ ობიექტად.

როდესაც ვსაუბრობთ ღვინის ანტიოქსიდანტობაზე, ლიტერატურაში ძირითადად მოიაზრება ღვინოში პოლიფენოლური ნაერთების კონცენტრაცია. საინტერესოა, რომ დღემდე, მეთოდი, რომლის მეშვეობითაც სრულყოფილად შეფასდებოდა ღვინის პოტენციური მედიკო-ბიოლოგიური თვისებები არ იყო შემოთავაზებული. მოგეხსენებათ, ღვინოში გარდა პოლიფენოლური ნაერთებისა, გვხვდება ეთანოლი, ორგანული მჟავები, შაქრები, სურნელოვანი ნივთიერებები, ნახშირორჟანგი, პოლისაქარიდები, ცილები, რომლებიც ასევე ახდენენ გავლენას ღვინის პროფილაქტიკურ შესაძლებლობებზე, ზოგიერთი მათგანი ხასიათდება არამარტო ანტირადიკალური უნარებით, არამედ ავლენს ძლიერ მარეგულირებელ და მესენჯერულ თვისებებს; მათი საერთო მოქმედება განპირობებულია სინერგისტული და ანტაგონისტური ურთიერთობებით. აქედან გამომდინარე ღვინის და მასში შემავალი ნაერთების ანტიოქსიდანტური უნარის შესაფასებლად საჭიროდ მიგვაჩნია არა უბრალოდ პოლიფენოლების ჯამური კონცენტრაციის განსაზღვრა, არამედ მათ ანტირადიკალურ თვისებებსა და სხვა მეტაბოლურ პროცესებზე დაკვირვება და შემდგომ კომპლექსური შეფასება.

იმისათვის რომ შეგვეფასებინა ღვინის ანტიოქსიდანტური აქტივობა, მისი პოტენციური მედიკო-ბიოლოგიური თვისებები, გამოვიყენეთ სხვადასხვა მეთოდები.

თემის სიახლეს წარმოადგენს ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდი, რომელმაც მოგვცა გაცილებით სრულყოფილი ინფორმაცია თავისუფალ რადიკალური

პროცესების დროს გენოლური ნაერთების მოქმედების შესახებ. გარდა ამისა, მეთოდი არის საკმაოდ მარტივი, არ სჭირდება განსაკუთრებული პირობები, მოითხოვს მცირე დროს, ენერგიას და რესურსს, რასაც ვერ ვიტყვით ტრადიციულ in vitro და რაოდენობრივ მეთოდებზე რომელიც გამოიყენებოდა ანტიოქსიდანტობის შესაფასებლად.

აღნიშნული კვლევა წარმოადგენს ამავე უნივერსიტეტში ჩემს მიერ შესრულებული საბაკალავრო ნაშრომის „სხვადასხვა ადგილწარმოშობის საფერავის ჯიშის ყურძნიდან მიღებული ფლავონოიდების მოქმედება ვირთაგვის ღვიძლის ანტიოქსიდანტურ ფერმენტებზე“; და ინტერდისციპლინური ბიოფიზიკის კათედრაზე შესრულებული სხვა ნაშრომების:

ანა ალთუნაშვილი: „ევროპული და ქართული ტრადიციული წესით დაყენებული ღვინის ანტიოქსიდანტური აქტივობის შესწავლა და შედარებითი ანალიზი“;

ნინო გერსამია: „სხვადასხვა წლის საფერავის მოსავლის ღვინის ანტიოქსიდანტური აქტივობის შესწავლა და შედარებითი ანალიზი ნინო გერსამია“, უნივერსიტეტის ჯგუფური პროექტების გამარჯვებული კვლევის „საქართველოს აგრარულ ბაზარზე არსებულ საფერავის ღვინის სარეალიზაციო ფასსა და მის ანტიოქსიდანტურ თვისებებს შორის დამოკიდებულების შესწავლა“ ლოგიკურ გაგრძელებას.

აღნიშნული კვლევის მიზანი იყო შეგვესწავლა ქართული საფერავის ჯიშის ყურძნისგან დაყენებული ღვინოების ანტიოქსიდანტური აქტივობა ტრადიციული, in vitro და ჩვენს მიერ მოდიფიცირებული ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდების გამოყენებით, დაგვედგინა როგორი კავშირია ღვინის ანტიოქსიდანტური და პოტენციური მედიკო-ბიოლოგიური შესაძლებლობების გამოვლენის სხვადასხვა მეთოდიკებს შორის და რომელი მეთოდია უფრო მეტად ინფორმატიული, სწრაფი და ნაკლებ დანახარჯიანი.

საკითხის გადასაჭრელად კი შერულდა შემდეგი ამოცანები:

- საკვლევ ობიექტში განისაზღვრა ჯამური პოლიფენოლების კონცენტრაცია;
- ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედულ ფრაქციაზე ზეჟანგური ჟანგვის ინიცირება რკინის ორვალენტური იონებით;
- ვირთაგვას ღვიძლის ლიპიდური ზეჟანგური ჟანგვის მოდელში განვსაზღვრეთ ანტიოქსიდანტური ფერმენტების - კატალაზას (CAT) და სუპეროქსიდდისმუტაზას (SOD) კონცენტრაცია;
- ვირთაგვას ღვიძლის ლიპიდური ზეჟანგური ჟანგვის მოდელში განვსაზღვრეთ ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ერთ-ერთი საბოლოო პროდუქტის, მალონილ დეალდეჰიდის კონცენტრაცია

- ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენებით დავითვალეთ საკვლევი ობიექტების ანტიოქსიდანტური აქტივობა

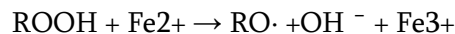
საბოლოო ეტაპზე კი მოხდა ყველა გამოყენებული მეთოდის ლოგიკური ურთიერთშედარება და შეჯამება.

თავი I - ლიტერატურული მიმოხილვა

1.1 ჟანგბადის აქტიური ფორმების ეფექტები ცოცხალ ორგანიზმზე

როგორც შესავალში აღვნიშნეთ, ადამიანის ორგანიზმში მუდმივად მიმდინარეობს ჟანგვის პროცესები, თუმცა არსებობს მდგომარეობა, როდესაც პროოქსიდანტების რაოდენობა აჭარბებს ანტიოქსიდანტების რაოდენობას, ამ დროს მიმდინარეობს ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვა, რომელსაც თან სდევს სხვადასხვა პათოლოგიები.

ზეჟანგური ჟანგვის ძლიერ კატალიზატორებს წარმოადგენს ცვალებადი ვალენტობის მქონე მეტალები, მაგალითად, Fe^{2+} , რომლებსაც შეუძლიათ ჰიდროგენაზებთან შევიდნენ რეაქციაში და დაშალონ ისინი თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნით. [6]



ჟანგბადის გააქტიურებული ფორმები: $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 , $OH\cdot$, 1O_2 , $HO\cdot$, $RO\cdot$ განსაკუთრებულად აზიანებენ სტაბილურ მოლეკულებს, მათ შეუძლიათ გენერირება სხვადასხვაგვარ ფერმენტული და არაფერმენტული რეაქციებისას უჯრედის ყველა ნაწილში. მათ წარმოშობაში ყველაზე დიდი წვლილი შეაქვს მიტოქონდრიის სუნთქვის ჯაჭვს, ასევე ციტოქრომ P450 -ს სისტემას, რომელიც ლოკალიზებულია ენდოპლაზმურ ბადეში. ჟანგბადის აქტიური ფორმები წარმოიქმნება როგორც სპონტანურად ასევე ფერმენტულადაც. ისინი იწვევენ ორგანული ჰიდროპეროქსიდების ROOH წარმოქმნას ბიოლოგიურ მოლეკულებთან ურთიერთქმედებისას (დნმ, ცილებით, ლიპიდებით). რეაქციას, რომელიც ახდენს ჟანგბადის აქტიური ფორმების ინდუცირებას და განაპირობებს ჰიდროპეროქსიდების და შემდეგ მეორადი ჟანგვითი პროდუქტების წარმოქმნას (სპირტები, ალდეჰიდები, ეპოქსიდები), უწოდებენ მოლეკულების ოქსიდაციურ მოდიფიკაციას.

ცილებში ხდება ზოგიერთი ამინომჟავის დაჟანგვა, რის შედეგადაც ირღვევა ცილის სტრუქტურა და წარმოიქმნება კოვალენტური „ნაკერები—. ყველა ეს პროცესი ააქტივებს უჯრედის პროტეოლიზურ ფერმენტებს, რომლებიც დაზიანებული ცილის ჰიდროლიზს იწყებენ. [7]

განსაკუთრებულ მგრძობელობას ჟანგბადის აქტიური ფორმების მიმართ ავლენს ცხიმოვანი მჟავები ორმაგი ბმებით, რომლებიც განლაგებულია CH_2 –ჯგუფის ორივე მხარეს. სწორედ ამ ჯგუფებიდან იღებს იოლად ელექტრონს თავისუფალი რადიკალი (დაჟანგვის ინიციატორი) და ლიპიდს, რომელიც ასეთ ცხიმოვან მჟავას შეიცავს, გარდაქმნის თავისუფალ რადიკალად. ლჟბ- ჯაჭვური რეაქციებია, რომელიც უზრუნველყოფს თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნას, რომლებიც თავის მხრივ, ხელს უწყობს ზეჟანგური ჟანგვის გავრცელებას. [8, 9]

ჟანგბადის აქტიური ფორმები ასევე იოლად არღვევს დნმ-ის სტრუქტურასაც. დნმ-ის მოლეკულასთან არასპეციფიკურად დაკავშირებული Fe^{2+} აიონებს ჰიდროქსილ-რადიკალების წარმოქმნას, რომლებიც აზიანებს აზოტოვანი ფუძეების სტრუქტურას. წყალბადის პეროქსიდს შეუძლია უჯრედის დატოვება როგორც უფრო ჰიდროფილურ ნაერთს O_2^- -თან შედარებით. ის უფრო რეაქციისუნარიანია და ადვილად აღმოჩენადი. წყალბადის პეროქსიდი ტოქსიურია, იწვევს სულფჰიდრილური ნაერთებისა და ცილების მეთიონური ნარჩენების ჟანგვას, ასევე პოლიუჯერი ცხიმოვანი მჟავების პეროქსიდულ ჟანგვას. [10]

სუპეროქსიდ ანიონ-რადიკალსა და წყალბადს შეუძლიათ ძალიან აქტიური მჟანგავის, ჰიდროქსილის რადიკალის გენერირება. ჰიდროქსილის რადიკალი წარმოიქმნება ასევე წყლის რადიოლიზისას, რაც საფუძვლად უდევს ბიომემბრანებზე მაიონიზირებელი გამოსხივების დამაზიანებელ მოქმედებას. ჰიდროქსილის რადიკალი აზიანებს ნუკლეინის მჟავებს, უჯრედებზე ახდენს როგორც მუტაციურ ასევე ლეტალურ გავლენას, ინიცირებს ლიპიდების პეროქსიდულ ჟანგვას, ფერმენტების ინაქტივაციას და ა.შ. ხასიათდება მაღალი ციტოტოქსიურობით.

პათოლოგიური მდგომარეობა წარმოიშობა ჟანგბადის აქტიური ფორმების გადაჭარბებული დაგროვებით და მოლეკულების ოქსიდაციური მოდიფიკაციის ინტენსიფიკაციით. ოქსიდაციური სტრესის ინდუქციის ფაქტორების სახით, გამოყოფენ ჭარბ O_2 -ს, ძლიერი ანთებითი პროცესებისა და მაკროფაგების აქტივაციით, მაიონიზირებელი და ულტრაიისფერი გამოსხივება, ჰემის სიჭარბე, Fe^{2+} , ქსენობიოტიკების ზემოქმედება.

ჟანგბადის აქტიური ფორმები, მაღალ კონცენტრაციებში იწვევენ მუტაციებს, დნმ-ს სინთეზისა და უჯრედების დაყოფის ინჰიბირებას, შეუძლიათ აპოპტოზის აქტივაცია. ცილების ჟანგვითი მოდიფიკაციის შედეგად ხდება მათი სტრუქტურული და ფუნქციური თვისებების დაზიანება, მათი მოლეკულების აგრეგაცია და დენატურაცია. ლიპიდების პეროქსიდული ჟანგვის პროდუქტები ავლენენ მუტაგენურ და ციტოტოქსიურ ეფექტებს. [11,12]

1.2 ღვინის ფენოლური ნაერთები და ცოცხალი ორგანიზმის ანტიოქსიდანტური სისტემები

პოლიფენოლური ნაერთები ჰიდროქსილის ჯგუფის შემცველი არომატული (ბენზოლის) ბირთვის მქონე ნივთიერებებია. მათ მოლეკულაში ჰიდროქსილის ჯგუფების რაოდენობა და განლაგება მნიშვნელოვნად განაპირობებს ამ ნაერთების თვისებებს. მცენარეში ფენოლურ ნაერთებს მრავალმხრივი დაცვითი ფუნქციები გააჩნიათ, ისინი არიან სუნთქვის ჯაჭვის და ფოტოსინთეზის კომპონენტები, ზრდისა და განვითარების რეგულატორები, მოანწილეობენ ჟანგვა-აღდგენით რეაქციებში

პოლიფენოლური ნაერთების ბენზოლის ბირთვები სინთეზირდება მხოლოდ მცენარეებისა და მიკროორგანიზმების მიერ, ცხოველები კი გარდაქმნიან მას საკვებთან ერთად.

პოლიფენოლური ანტიოქსიდანტების უნარს, შეაჩეროს რადიკალური პროცესებით გამოწვეული ჟანგვა, ძირითადად განაპირობებს არომატულ ბირთვთან დაკავშირებული ჰიდროქსილური ჯგუფი. პოლიფენოლური ანტიოქსიდანტები ეფექტურად აინჰიბირებენ სუპეროქსიდ-ანიონ-რადიკალს, სინგლეტურ ჟანგბადს, პეროქსიდრადიკალებს და ლიპიდების ზეჟანგურ ჟანგვას.

წითელი ღვინის შემადგენელ ფენოლურ ნაერთებს გააჩნიათ ადამიანის ორგანიზმში დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების დაჟანგვის ინჰიბირების უნარი. 1000-ჯერ განზავებული წითელი ღვინო, რომელიც შეიცავს 10 მგ.მოლი/ლ ფენოლურ ნაერთებს, ლიპოპროტეინების ოქსიდაციის მნიშვნელოვანი ინჰიბიტორია. განსაკუთრებით უნდა აღინიშნოს ფენოლური ნაერთების ანტიოქსიდანტური აქტივობა, რაც ფაქტობრივად განაპირობებს ღვინის და ყურძნისეული წარმოშობის ბიოლოგიურად აქტიური დანამატების სასარგებლო თვისებებს და შესაბამისად, სამკურნალო-პროფილაქტიკურ ღირებულებას. [13]

ერთ-ერთი აქტიური წარმომადგენელია კვერცეტინი, რომლითაც ყველაზე მეტად მდიდარია კიტრი. კვერცეტინი ასევე აღმოჩენილია წითელ ღვინოში. ეს არის ძლიერი ანტიკანცეროგენული ნივთიერება. მეცნიერების ვარაუდით, კვერცეტინი ინერტულ მდგომარეობაში იმყოფება, ვიდრე მასზე არ იმოქმედებენ საჭმლის მომნელებელი სისტემის ბაქტერიები, ამის შემდეგ იძენს იგი ანტიოქსიდანტურ თვისებებს.

ასევე განსაკუთრებით საინტერესოა რეზვერატროლი, რომელიც 10-20-ჯერ უფრო ძლიერი ანტიოქსიდანტია, ვიდრე ბუნებრივი ანტიოქსიდანტები – C და E ვიტამინები.

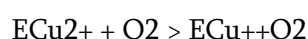
რეზვერატროლი განსაკუთრებით ეფექტურია გულ-სისხლძარღვთა დაავადების სამკურნალოდ. მისი კონცენტრაციის ზრდა ხელს უშლის დაბალი სიმკვრივის ლიპოპროტეინების ოქსიდაციის პროცესს და შესაბამისად არ წარმოქმნება ათეროსკლეროზული ფოლაქები. არსებობს მონაცემები, რომ რეზვერატროლს სხვადასხვა გენეზის სიმსივნის ინიციაციის, ზრდისა და განვითარების სტადიებზე მოქმედების გარკვეული უნარი გააჩნია. სიმსივნის ინიციაციისას რეზვერატროლი მოქმედებს როგორც თავისუფალი რადიკალების ინჰიბიტორი და როგორც ანტი-მუტაგენი.

ამდენად, დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ღვინოში რეზვერატროლის და სხვა ანტიოქსიდანტების რაოდენობრივ შემცველობას, რამეთუ ალკოჰოლის გამო ღვინის დღიური მოხმარების ნორმა განუსაზღვრელი არ არის და დაახლოებით მამაკაცებისთვის 300 მლ-ს, ქალებისთვის კი 150-მლ-ს შეადგენს.

რაც შეეხება ორგანიზმის დამცავ სისტემებს, ჩვენს კვლევაში წარმოდგენილი გვაქვს ვირთაგვას ღვიძლის ანტიოქსიდანტური ფერმენტების მაგალითი, კატალაზას და სუპეროქსიდდისმუტაზას (სოდ). ამ ფერმენტების აქტივობა განსაკუთრებით მაღალია ღვიძლში, თირკმელსა და თირკმელზედა ჯირკვალში, სადაც მიტიქონდრიების, პეროქსისომებისა და ციტოქრომ P450 -ის შემცველობა სხვა ქსოვილებთან შედარებით მომატებულია.

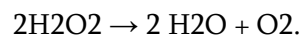
სოდ-ის იზოფერმენტები წარმოადგენს უჯრედის დაცვის პირველ ხაზს, ვინაიდან სუნთქვის ჯაჭვიდან ელექტრონების გაჟონვის შემთხვევაში, თავდაპირველად წარმოიქმნება სწორედ სუპეროქსიდული რადიკალები. სოდ-ის მიერ ვალენტობის შეცვლის უნარი განაპირობებს ფერმენტის აქტიური ცენტრის ელექტრონის სატრანსპორტო ფუნქციას. ის ახდენს თავისუფალი რადიკალების დისმუტაციას.

ამ პროცესში მნიშვნელოვან როლს თამაშობს სპილენძის ატომი, ხოლო თუთიის ატომი ასრულებს სტაბილიზატორის როლს. [14]



სოდ-ის ეფექტიანობა ძალზე მაღალია. უჯრედის ყველა კომპონენტებიდან მხოლოდ აზოტის ჟანგი (NO) შედის O₂-თან რეაქციაში სოდ-ზე უფრო სწრაფად. NO-ს დაბალი კონცენტრაციის დროს სუპეროქსიდი, როგორც წესი იშლება სუპეროქსიდის-მუტაზების მეშვეობით და ვერ ასწრებს სხვა ქიმიურ რეაქციაში ჩართვას. სუპეროქსიდის დისმუტაზა ინდუცირებადი ფერმენტი, რაც მიანიშნებს რომ უჯრედში ზეჟანგური ჟანგვის პროცესის გაძლიერების პარალელურად მატულობს მისი სინთეზიც.

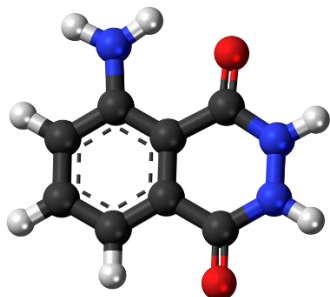
H₂O₂-ის დაგროვება უჯრედში O₂-ის სინთეზის ძირითადი შედეგია, ან შეიძლება მივიღოთ სუპერ-ოქსიდ რადიკალების დისმუტაციის რეაქციით წყალთან. წყალბადის ზეჟანგის მოცილება ხდება სხვადასხვა კლასის ფერმენტებით. წყალბადის ზეჟანგი, რომელიც ინიცირებს რადიკალების ყველაზე აქტიური ფორმის წარმოქმნას იშლება ფერმენტ კატალაზით:



კატალაზა ძირითადად გვხვდება პეროქსისომებში, სადაც ხდება დიდი რაოდენობით წყალბადის ზეჟანგის წარმოქმნა. [15]

1.3 წყალბადის ზეჟანგით აქტივირებული ლუმინოლის ქემილუმინისენცია

ლუმინოლი (C₈H₇N₃O₂), იგივე 5-ამინო-2,3-დიჰიდროფტალაზინ-1,4-დიონი, არის ქიმიური აგენტი, რომელსაც ახასიათებს ქემილუმინესცენცია თუ დავუმატებთ შესაბამის დამჟანგავ აგენტს. იგი არის ღია ყვითელი ფერის ნივთიერება რომელიც კარგად იხსნება პოლარულ ორგანულ გამხსნელებში და უხსნადია წყალში.

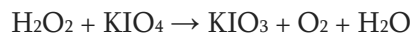
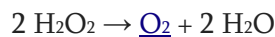


სურ. 1 ლუმინოლის მოლეკულა

ქემილუმინესცენციის გაზომვა მოსახერხებელი მეთოდია ქიმიური რეაქციის მიმდინარეობის კონტროლისათვის და შეიძლება გამოყენებულ იქნეს რეაქციის კინეტიკისა და მექანიზმის შესასწავლად.

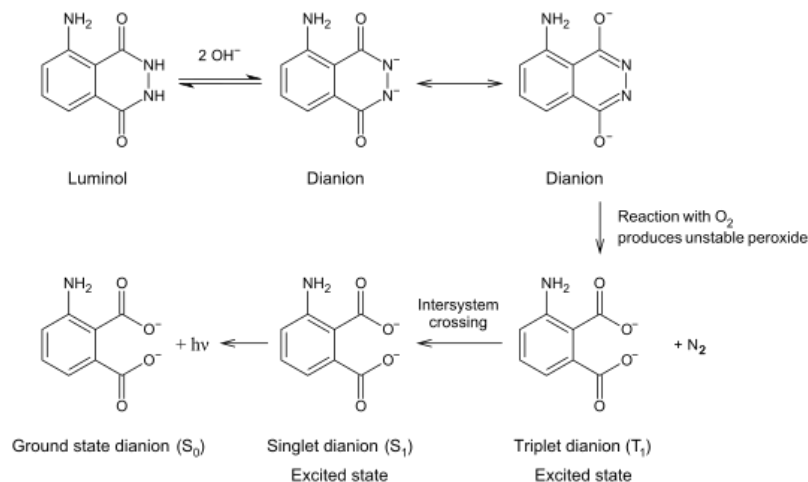
კრიმინალურ ექსპერტიზაში ლუმინოლი გამოიყენება სისხლის აღმოსაჩენად, რადგან ის ურთიერთქმედებს რკინასთან რომელიც სისხლის ჰემოგლობინშია მოთავსებული. ბიოლოგები ხშირად იყენებენ სხვადასხვა უჯრედულ გზებში, რკინის, სპილენძის და სპეციფიკური პროტეინების აღმოსაჩენად ვესტერნ ბლოტინგის მეთოდში.

იმისთვის რომ ლუმინოლი გაანათოს იგი უნდა გააქტიურდეს მჟანგავი აგენტის მოქმედებით. ამისთვის ხშირად გამოიყენებენ ხსნარს რომელშიც დამატებულია წყალბადის პეროქსიდი. კატალიზატორის თანაობისას, როგორც არის მაგალითად რკინა, წყალბადის პეროქსიდი იშლება მჟანგბადის აქტივირებულ ფორმად და წყლად.



ლაბორატორიაში ამ რეაქციის ინციტრებისთვის კატალიზატორად ხშირად გამოიყენება კალიუმის ფერიციანიდი ან სისხლის წითელი მარილი. კრიმინალური ანალიზის დროს, სისხლის აღმოსაჩენად, კატალიზატორს წარმოადგენს რკინის იონები.

ლუმინოლი რეაქციაში შედის წყალბადის იონთან, რომელიც წარმოქმნის დიანიონს. მჟანგადი რომელიც წარმოიქმნება წყალბადის პეროქსიდისგან რეაქციაში შედის ლუმინოლის დიანიონთან. ამ რეაქციის პროდუქტი, ორგანული პეროქსიდი არის ძალიან არასტაბილური და მყისვე იშლება და გამოთავისუფლდება აზოტი, წარმოქმნის 5-ამინოფტალის მჟავას, რომელსაც შეიცავს აღგზნებულ ელექტრონებს. რადგანაც აღგზნებული მდგომარეობიდან ელექტრონები ბრუნდებიან დაბალენერგეტიკულ შრეზე, ზედმეტი ენერგია გამოთავისუფლდება თვალით ხილული ლურჯი სინათლის სახით.



სურ.2 ლუმინესცენცია

თავისუფალი რადიკალების შესწავლის რამოდენიმე კლასიკური მეთოდი არსებობს. ყველაზე ხშირად გამოიყენება ელექტროპარამაგნიტური რეზონანსის მეთოდი, რომელიც მოითხოვს აზოტით ფიქსაციას და საშუალებას გვაძლევს შევისწავლოთ რომელიმე კონკრეტული რადიკალი, მისი კონცენტრაცია.

ლუმინოლი აღიგზნება ჟანგბადის აქტიური ფორმებით. იგი საშუალებას გვაძლევს შევისწავლოთ თავისუფალი რადიკალების წარმოქმნის და გავუვრებელყოფის პროცესები დინამიკაში, რაც გაცილებით მეტ ინფორმაციას იძლევა რადიკალების ბუნების შესახებ. [16,17,18,19,20]

თავი II - გამოყენებული მეთოდები

2.1 პოლიფენოლების ჯამური კონცენტრაციის განსაზღვრა Folin Ciocalteu-ს მეთოდით

ჩვენი კლევის ობიექტების აღწერა და დახასიათება იხილეთ დანართი N1-ში.

რაც შეეხება მეთოდებს, რომელიც გამოვიყენეთ:

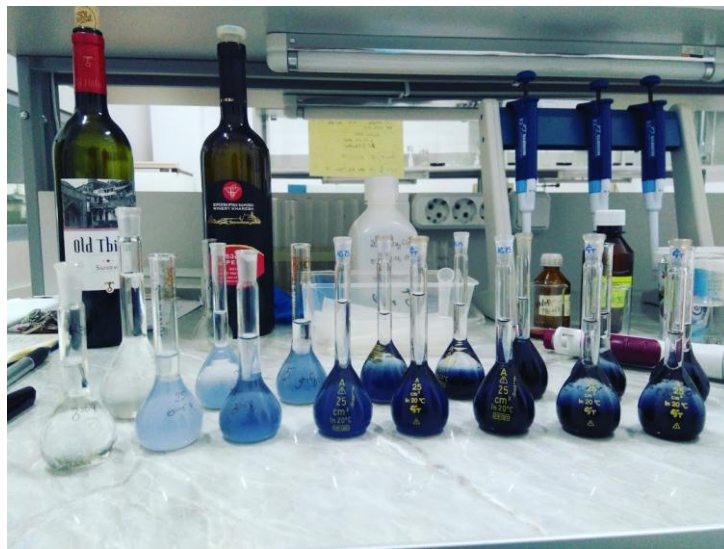
საწყის ეტაპზე განვსაზღვრეთ ღვინოებში პოლიფენოლების ჯამური კონცენტრაცია ფოლინ-ჩიოკალტეს (Folin Ciocalteu) მეთოდით.[21,22,23,24,25]

საკვლევ ნიმუშში შემავალი ფენოლური ნაერთები იჟანგება ე.წ. ფოლინის რეაგენტით, რომლის შემადგენლობაშიც შედის ფოსფოვოლფრამმჟავა (H₃PW₁₂O₄₀) და ფოსფომოლიბდენმჟავა (H₃PMo₁₂O₄₀). ფენოლური ნაერთების დაჟანგვისას ისინი აღდგებიან ვოლფრამისა და მოლიბდენის ლურჯი ფერის ოქსიდებად. მიღებული ლურჯი ფერის ინტენსივობა ისაზღვრება 750 ნმ-ზე. მიღებული ექსტენციის კოეფიციენტის სიდიდე - ე.წ. „ფენოლური კოეფიციენტის მნიშვნელობა“ პროპორციულად შეესაბამება ღვინოს ნიმუშში შემავალი ფენოლური ნაერთების რაოდენობას, რასაც ვსაზღვრავთ საკალიბრო მრუდის მიხედვით გალის მჟავასთან მიმართებაში.

რაც შეეხება ექსპერიმენტს, იგი მიმდინარეობდა შემდეგნაირად:

- 25მლ-იან მზომ კოლბში გადაგვქონდა 12,5მლ წყალი;
- ვუმატებდით საკვლევ ნიმუშს, რომელიც წინასწარ იყო განზვებული 5-ჯერ ან 10-ჯერ;
- ვუმატებდით 1,25 მლ ფოლინის რეაგენტს;

- ვაყოვნებდით ოთახის ტემპერატურაზე 5 წუთის განმავლობაში, ნჯღრევის პირობებში;
- ხდებოდა 5მლ 20%-იანი Na_2CO_3 -ის დამატება რის შედეგაც მზომ კოლბაში დარჩენილ მოცულობას ვავსებდით დისტილირებული წყლით;
- შემდეგი ეტაპი იყო ინკუბაცია ოთახის ტემპერატურაზე, ნჯღრევის პირობებში, გრძელდებოდა 30 წუთის განმავლობაში;
- მიღებული ლურჯი ფერის ინტენსივობა იზომებოდა სპექტროფოტომეტრულად, ბლანკთან მიმართებაში, 750 ნმ ტალღის სიგრძეზე.



სურ. 3 გალის მჟავის საკალიბრო ნიმუშების ფერების ცვლილება კონცენტრაციების მიხედვით

2.2 ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედული ფრაქციის გამოყოფა და ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის მოდელის შექმნა

ღვიძლის უჯრედების ფრაქცია გამოვყავით მოზრდილი ვირთაგვას ღვიძლიდან. პროცესების თანმიმდევრობა ასეთია:

- ვირთაგვას დეკაპიტაცია;
- ღვიძლის პერფუზია 0,9% KCl ხსნარით;
- ქსოვილის გამრობა და აწონვა;
- მექანიკური დაქუცმაცება ცივ აბაზანაზე; დაქუცმაცებული მასა გადაგვაქვს ბიუქსში;
- ვუმატებთ 0,25% ტრიფსინის ხსნარს;

- ინკუბაცია , 30 წთ, ოთახის ტემპერატურაზე;
- ჰომოგენიზაცია უშლიფო ჰომოგენიზატორში;
- ალბუმინის 1%-იანი ხსნარის დამატება და ინკუბაცია 10 წთ, ოთახის ტემპერატურაზე;
- განზავება ტრის HCl 40mM ბუფერით pH=7.54 და გაფილტვრა;
- დიფერენციალური ცენტრიფუგირება 2000g 10 წუთი;
- მიღებული სუპერნატანტის გადანაწილება ეპენდორფებში; გარეცხვა 3ჯერ, TRIS HCL buffer-ით (40Mm) , 4000g , 8-10წუთი;
- მიღებული ნალექის რესუსპენზირება TRIS HCL buffer-ით (40Mm).

შემდეგი ეტაპია უჯრედებში ზეჟანგური ჟანგვის ინიცირება რკინის ორვალენტური იონების საშუალებით და საკვლევი ნიმუშებთან ინკუბაცია, ცხრილი1-ის მიხედვით. ინკუბაცია გრძელდებოდა 30 წუთის განმავლობაში, 37 °C-ზე. საკვლევი ნიმუშები გახსნილი იყო სპირტში და ხსნარის სახით ემატებოდა საინკუბაციო არეს.

ცდის ვარიანტი	K	Fe	Flavonoid	Fe+Flavonoid
უჯრედების სუსპენზია	500 mkl	500 mkl	500 mkl	500 mkl
ფლავანოიდი	–	–	10 mkl	10 mkl
100mM Fe ²⁺		100 mkl		100 mkl
Tris HCl pH=7.55	500 mkl	400 mkl	490 mkl	390 mkl

ცხრილი 1. უჯრედების ინკუბაცია რკინის იონებთან და ფლავანოიდებთან

2.3 ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრა ბიურეტის მეთოდის გამოყენებით

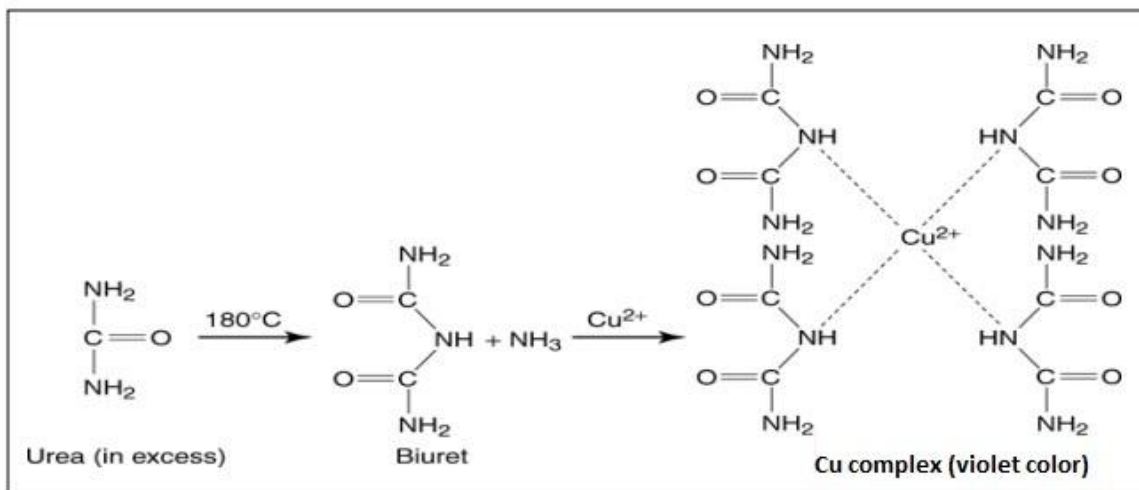
ბიურეტის მეთოდი, ასევე ცნობილი, როგორც „პიოტროვსკის ტესტი“ არის ქიმიური ტესტი, რომელიც გამოიყენება პეპტიდური ბმების აღმოსაჩენად. [26,27] პეპტიდების თანაობისას სპილენძი II-ის იონები წარმოქმნის შეფერილ კომპლექსებს ტუტე გარემოში. დღესდღეობით ამ ტესტის რამოდენიმე მოდიფიკაცია არსებობს, ერთ-ერთია BCA-ტესტი, რომელიც გამოიყენებულ იქნა ჩვენს შემთხვევაში.

ამ მეთოდის გამოყენება ხდება ცილის კონცენტრაციის განსაზღვრისას, რადგან პეპტიდური ბმები ყალიბდება იგივე სიხშირით თითოეულ ამინო მჟავასთან პეპტიდში.

ფერის ინტენსივობა იზომება 540 ნმ ტალღის სიგრძეზე, მინის კიუვეტაში და პირდაპირპროპორციულ დამოკიდებულებაშია ნიმუშში ცილის კონცენტრაციასთან.

მეთოდის არსი არის შემდეგი: Cu^{2+} რომელიც წარმოიქმება ბიურეტის რეაქციის დროს, ტუტე არეში უკავშირდება პეპტიდურ ბმებს და გარდაიქმნება Cu^+ ად..

BCA -ტესტში რომელიც ჩვენს მიერ იქნა გამოყენებული, Cu^+ ქმნის მუქ იასამნისფერ კომპლექსს ბიცინქოლინის მჟავასთან (BCA), და წარმოქმნის მუქ იასამნისფერ შეფერილობას. წყალში ხსნადი BCA/სპილენძის კომპლექსი გაცილებით უფრო ძლიერად კავშირდება ვიდრე პეპტიდების და სპილენძის კომპლექსი, რაც ზრდის ამ მეთოდის სენსიტიურობას. მეთოდის საშუალებით შეგვიძლია აღმოვაჩინოთ ცილის კონცენტრაცია 0,0005 დან 2მგ/მლ დიაპაზონში.



სურ. 4 ბიურეტის რეაქცია



სურ. 5 ფერის ცვლილება ცილის კონცენტრაციების მიხედვით, ბიურეტის რეაგენტის მოქმედებით

რაც შეეხება უშუალოდ მეთოდს,

ცხრილი 1-ის მიხედვით მომზადებული ნიმუშები გადავიტანეთ სონიკატორში, რათა მიგველო ჰომოგენატი. მოვამზადეთ „საკალიბრო ხსნარი“, რომელიც შედგება 100მკლ BCA ხსნარისგან და 5მლ ბიურეტის რეაგენტისგან. ასევე, მომზადდა კონტროლი, რომელიც შედგბოდა 100 მკლ Na/Na ბუფერისგან (ამ ბუფერში იყო ჩვენი უჯრედები მოთავსებული, იგივე ბუფერში იყო ჰომოჰენირებული მასა) და 5მლ ბიურეტის რეაგენტისგან. იგივე პრინციპით 100მკლ საკვლევი ნიმუშით და 5მლ ბიურეტის რეაგენტით მოვამზადეთ გასაზომი ნიმუშები.

ნიმუშების ინკუბაცია ხდება 30 წუთის განმავლობაში ოთახის ტემპერატურაზე.

მიღებული კომპლექსის ფერი იზომება 540ნმ-ზე, კონტროლის მიმართ.

შედეგების გამოთვლა ხდება შემდეგნაირად :

$$C = \frac{E_0}{E_k} * 60$$

- სადაც, E_0 არის ჩვენი ნიმუშის შთანთქმა
- E_k არის საკალიბრო ნიმუშის შთანთქმა
- 60 კი საერთო ცილის კონცენტრაცია საკალიბრო ხსნარში.
- შედეგი გამოისახება ერთეულით მგ/მლ.

2.3 ფერმენტ კატალაზას აქტივობის განსაზღვრა ვირთაგვას ღვილის უჯრედული ფრაქციის ზეჟანგური ჟანგვის პროცესში.

როგორც აღვნიშნეთ, ფერმენტი კატალაზა უზრუნველყოფს წყალბადის ზეჟანგის მოცილებას, რომელიც ჟანგბადის გააქტივირებული ფორმების კარგი წყაროა.

ფერმენტ კატალაზას აქტივობას ვსაზღვრავდით სპექტროფოტომეტრული მეთოდით. [28] მეთოდის პრინციპი მდგომარეობს იმაში, რომ წყალბადის ზეჟანგი მოლიბდენის მარილებთან ქმნის ჩალისფრად შეფერილ კომპლექსს.

კატალაზას აქტივობის განსაზღვრისთვის 0,1მლ ჰომოგენატს ვუმატებდით 2მლ 0,03%-იან წყალბადის ზეჟანგის ხსნარს და ვაყოვნებთ 10 წთ ოთახის ტემპერატურაზე. რეაქციას ვაჩერებთ 1მლ 4%-იანი ამონიუმის მოლიბდატის ხსნარის დამატებით. სინჯებს ვაცენტრიფუგირებდით 3 000 გ-ზე 10წთ . სუპერნატანტის შეფერვის ინტენსივობას (A

ცდა) ვზომავდით სპექტროფოტომეტრზე 410 nm ტალღის სიგრძეზე, კონტროლის მიმართ.

პარალელურად ვზომავდით შეტანილი ზეჯანგის (0,3%) ამონიუმის მოლიბდატთან წარმოქმნილ შეფერვის ინტენსივობას ($A_{x0} H_2O_2$). მიღებული სხვაობით ($A - A$ ცდა) ვითვლიდით კატალაზას აქტივობას - გარდაქმნილი მკმოლ $H_2O_2 / 1$ მგ ცილაზე წთ-ში შემდეგი ფორმულით:

$$C = \frac{E}{0,01598} / 10 / \text{prot.conc} \text{ (}\mu\text{M } H_2O_2 / \text{mg prot/min)}$$

- სადაც, E არის $A_{x0} - A$ ცდა სხვაობა,
- 10 არის ინკუბაციის დრო, თუ გვინდა რომ ადავითვალოთ 1 წუთზე, უნდა გავყოთ შედეგი 10-ზე,
- Prot.conc არის ცილის კონცენტრაცია კონკრეტული ნიმუშისთვის.
- ცილის კონცენტრაცია ნიმუშებისთვის დაანაგრიშებული გვექონდა ბიურეტის მეთოდის გამოყენებით.

H_2O_2 -ის რაოდენობას ვსაზღვრიდით მსგავსად, თუმცა 0,1მლ ჰომოგენატს 0,03%-იანი H_2O_2 -ის ნაცვლად ვუმატებდით 2მლ H_2O -ს, შემდეგ 1მლ 4%-იან ამონიუმის მოლიბდატს. ცენტრიფუგირების შემდეგ შეფერვის ინტენსივობას ვსაზღვრავდით 410 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

2.3 ფერმენტ სუპეროქსიდ დისმუტაზას კონცენტრაციის განსაზღვრა

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, სუპეროქსიდის რადიკალის გაუვნებელებლად დისმუტაციის რეაქციით სწორედ ეს ნაერთები ახდენენ.

მეთოდის არსი მდგომარეობს ნიტროლურჯი ტეტრაზოლიუმის აღდგენის რეაქციის შებოჭვის ხარისხის განსაზღვრაში. [29,30] რეაგენტი R1-ის შემდგელობაში არსებული PMS (მეთილფენაზოლსულფატი) რეაქციაში შედის რეაგენტ R2-ის შემადგენლობაში არსებულ NADH-თან, შედეგად წარმოიქმნება O_2^- სუპეროქსიდრსადიკალი, რომელიც შედის რეაქციაში ნიტროლურჯ ტეტრაზოლიუმთან (NTB) და გვაძლევს შეფერილ ხსნარს. შესაბამისად, რაც მეტი სუპეროქსიდრდიკალის

გაუვნებელყოფა მოხდება ჩვენი საკვლევი ობიექტების მიერ, მით ნაკლები იქნება წარმოქმნილი ფერის ინტენსივობა.

ცხრილი 1-ის მიხედვით მომზადებულ ჩვენს უჯრედულ სუსპენზიებს ვუმატებთ 0,5% ტრიტონ X100 (ჰომოგენატის მისაღებად, ეს რეაგენტი შლის ლიპიდურ მემბრანებს ადვილად აზიანებს უჯრედის გარსს და ამარტივებს მისი შიგთავსის გადმოსვლას უჯრედისგარე სივრცეში) , 50µl-ს ; ვაინკუბირებთ 30 წთ ოთახის ტემპერატურაზე, დამატებით ვიყენებთ სონიკაციას(ულტრაბგერით მოქმედება) , ჰომოგენატის მისაღებად, 15 წუთის განმავლობაში. უჯრედების დაშლა, ჰომოგენიზაცია საჭიროა იმისთვის რომ ფერმენტები რომელიც უჯრედის შიგნით არიან მაქსიმალურად გადმოვიდნენ სუპერნატანტში.

ექსპერიმენტისთვის მოვამზადეთ ნიმუშები, შემდეგნაირად:

100µl საკვლევი ნიმუში გადავიტანეთ მინის სინჯარაში, დავუმატეთ 900 µl ბუფერი Na/Na (ამავე ბუფერში არის გახსნილი ჩვენი უჯრედული სუსპენზია) და 2მლ რეაგენტი R₁, რომელიც შედგება 0,33mM ეთილენდიამინტეტრაამარმჟავა (EDTA)-სგან, 0,407mM ნიტროლურჯი ტეტრაზოლიუმისგან (NTB), მეთილფენაზოლსულფატისგან (PMS).

მიღებულ ნარევს ვზომავდით 540 ნმ ტალღის სიგრძეზე კონტროლის მიმართ, რომელიც იგივე კონცენტრაციით შეიცავს რეაქტივებს, განსხვავდება იმით რომ საკვლევი ნიმუშის მაგივრად მასში არის ბუფერი Na/Na.

გაზომვის მონაცემების ჩანიშვნის შემდეგ, თითოეულ ნიმუშს ვუმატებდით 100 µl რეაგენტ R₂, რომელიც იყო 1mM NADH.

ამის შემდეგ ხდებოდა ინკუბაცია 20 წუთის განმავლობაში 37°C-ზე, სიბნელეში.

შემდეგ ისევ იზომებოდა ნიმუშების შთანთქმა 540ნმ ტალღის სიგრძეზე.

მიღებული შედეგები გამოითვლება ფორმულით:

$$T\% = \frac{A_{20} - A_0}{A_{20}} * 100\%$$

$$A = \frac{T\%}{100 - T\%} / \text{prot.conc}$$

- სადაც, A₂₀ არის ნიმუშის შთანთქმა 20 წუთიანი ინკუბაციის შემდეგ რეაგენტ R₂-თან

- A_0 არის ნიმუშის შთანთქმა R_2 -ის დამატებამდე, ანუ პირველი გაზომვის შედეგები
- prot.conc არის ცილის კონცენტრაცია ნიმუშში
- A არის სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობა მგ ცილაზე, რომლის ერთეული იქნება A mM/მგ ცილა

2.4 მალონილ დეალდეჰიდის კონცენტრაციის განსაზღვრა ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედული ფრაქციის ზეჟანგური ჟანგვის მოდელში

მეთოდს საფუძვლად უდევს 2-თიობარბიტურის მჟავის რეაქცია ლიპიდების პეროქსიდული ჟანგვის შუალედურ პროდუქტებთან, რომლის შედეგადაც წარმოიქმნება შეღებილი ტრიმეთინური კომპლექსი, მაქსიმალური შთანთქმით 532 ნმ-ზე. თვლიან, რომ მთავარი როლი შეღებილი პროდუქტის წარმოქმნაში ეკუთვნის მალონის დიალდეჰიდს (MDA). [31]

ცხრილი 1-ის მიხედვით მომზადებული ჩვენი ნიმუშები 1,5 მლ გადაგვაქვს ცენტრიფუგას სინჯარაში სადაც მოთავსებულია 1მლ 17%-იანი ტრიქლორმმარმჟავა. ვაცენტრიფუგირებთ ნიმუშებს 10 წუთის განმავლობაში 6000rpm-ზე, იმისთვის რომ გამოილექსო ტრიქლორმმარმჟავას მოქმედების შედეგად დაშლილი ნივთიერებები, მოგეხსენებათ, მას აქვს ფერმენტული ჟანგვითი პროცესების შეჩერების უნარი. ცენტრიფუგირების შემდეგ ვიღებთ სუპერნატანტს 2მლ-ს და გადაგვაქვს სინჯარებში, სადაც წინასწარ არის შეტანილი 1მლ 0,8%-იანი თიობარბიტურატის მჟავა. აღნიშნული ნარევი უნდა გაცხელდეს დუდილის ტემპერატურაზე 20 წუთის განმავლობაში. მიღებული შეფერილობა კი იზომება კონტროლის მიმართ (1,5 მლ ბუფერი Tris HCl pH=7.4, შეიცავს 0,175M KCl-ს და 1 მლ ტრიქლორმმარმჟავა 17%-იანი). აბსორბცია იზომება 532 ნმ ტალღის სიგრძეზე.

შედეგების გამოთვლა ხდება შემდეგნაირად :
ლიპიდების პეროქსიდული ჟანგვის შუალედური პროდუქტების რაოდენობა გამოვთვალეთ ფორმულით:

$$K = (A_0 - A_k) / \epsilon,$$

სადაც k - ლიპიდების პეროქსიდული ჟანგვის პროდუქტებია; A_0 - საცდელი ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე; A_k - საკონტროლო ხსნარის ოპტიკური სიმკვრივე; ϵ - ექსტინციის მოლარული კოეფიციენტი, რომელიც მოცემულ შემთხვევაში ტოლია 1.56×10^5

მოლ⁻¹,სმ⁻¹. მიღებული მალონის დიალდეჰიდის მონაცემების გადაანგარიშება მოხდა ცილასთან მიმართებაში, რომელთა კონცენტრაცია ბიურეტის მეთოდით განვსაზღვრეთ.

2.5 წყალბადის ზეჟანგით აქტივირებული ლუმინოლის ქემილუმინისენცია

თავისუფალი რადიკალების შესწავლის რამოდენიმე მეთოდი არსებობს. პირველი და ყველაზე ხშირად გამოყენებადი კლასიკური მეთოდი არის ელექტრო პარამაგნიტური რეზონანსის მეთოდი,[32] რომელიცარის სტატიკური მეთოდი, მოითხოვს დიდ დროს და დანახარჯებს, რადიკალის ფიქსაციისთვის გამოიყენება თხევადი აზოტი, ამასთანავე, აღნიშნული მეთოდის გამოყენებით შეგვიძლია რომელიმე კონკრეტული რადიკალის არსებობის აღმოჩენა და მისი კონცენტრაციის დადგენა სარეაქციო არეში.

ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის საშუალებით კი შეგვიძლია შევისწავლოთ რადიკალების წარმოქმნის პროცესი დინამიკაში, რაც გაცილებით მეტი ინფორმაციის მომცემია. გარდა ამისა, მას არ ესაჭიროება რაიმე განსაკუთრებული პირობები ექსპერიმენტისთვის. ამ მეთოდის საშუალებით ვაფასებდით ღვინის ანტიოქსიდანტურ აქტივობას. მეთოდის არსი მდომარეობს შემდეგში:

ლუმინოლი არის ქიმიური აგენტი, რომელიც ურთიერთქმედებს ჟანგბადის აქტივირებულ ფორმებთან და გვაძლევს ნათებას. [33]

ჩვენს შემთხვევაში საინკუბაციო არეში რომელიც შედგებოდა 4მლ ბუფერისგან - Na₂HPO₄/Na₂H₂PO₄, იგივე Na/Na ბუფერი, pH = 9,18; ინიციატორისგან, სისხლის წითელი მარილისგან, ბუფერში დამატებული იყო მისი 5%-იანი ხსნარი 50μl რაოდენობით; 50μl 0,05%- იანი ლუმინოლის ხსნარისგან, წინასწარ დამატებული იყო ჩვენი საკვლევი ნიმუშებიც, 20μl მოცულობით, ლუმინომეტრის ფოტოელექტროგამამრავლებელში გადატანის შემდეგ ვუმატებდით წყალბადის ზეჟანგს 300μl, რომელიც იწვევდა ქემილუმინესცენციას.

ეს ხდებოდა იმიტომ, რომ სისხლის წითელი მარილის მოქმედებით წყალბადის ზეჟანგი იშლება და წარმოქმნის ჟანგბადის აქტივირებულ ფორმებს, სხვადასხვა რადიკალებს, რომელსაც უკავშირდება არეში არსებული ლუმინოლი და გვაძლევს ნათებას, რაც აღირიცხება ფოტოელექტროგამამრავლებლით და იწერება თვითმწერზე ინდუქციური მრუდის სახით. რაც უფრო ინტესიურად მიმდინარეობს თავისუფალრადიკალური ჟანგვითი პროცესები, მით უფრო დიდი ინტენსიობისაა ქემილუმინესცენცია.

იქიდან გამომდინარე, რომ ფლავონოიდები ხასიათდებიან ანტირადიკალური და ანტიოქსიდანტური თვისებებით, ისინი წარმოადგენენ საკმაოდ სტაბილურ მოლეკულას, რომელსაც აქვს უნარი გასცეს ელექტრონი და გაანეიტრალოს რადიკალი, ისე რომ თავად არ გადაიქცეს საზიანო რადიკალად. იმის გამო, რომ ჩვენს საინკუბაციო არეში წყალბადის ზეჟანგის დამატებად უკვე გვქონდა დამატებული ჩვენი საკვლევი ნიმუშები, უნდა ვივარაუდოთ რომ თავიანთი ანტიოქსიდანტურობის ხარჯზე მათ უნდა შეემცირებინათ ლუმინოლის ნათების ინტენსივობა, კონტროლთან შედარებით, რომელშიც გამოვიყენეთ მხოლოდ ღვინის შესაბამისი კონცენტრაციის ალკოჰოლი, ღვინის ნიმუშის მაგივრად.

თვითმწერზე რომელთანაც დაკავშირებული იყო ლუმინომეტრი, დაყენებული გვქონდა შემდეგი პარამეტრები:

- თვითმწერი 200 მილი ვოლტი
- ფოტოელემენტზე მინიჭებული ძაბვა 0,7 KV (კილოვატი)
- ლენტის სიჩქარე 10სმ/წთ

შედეგები და მათი განხილვა

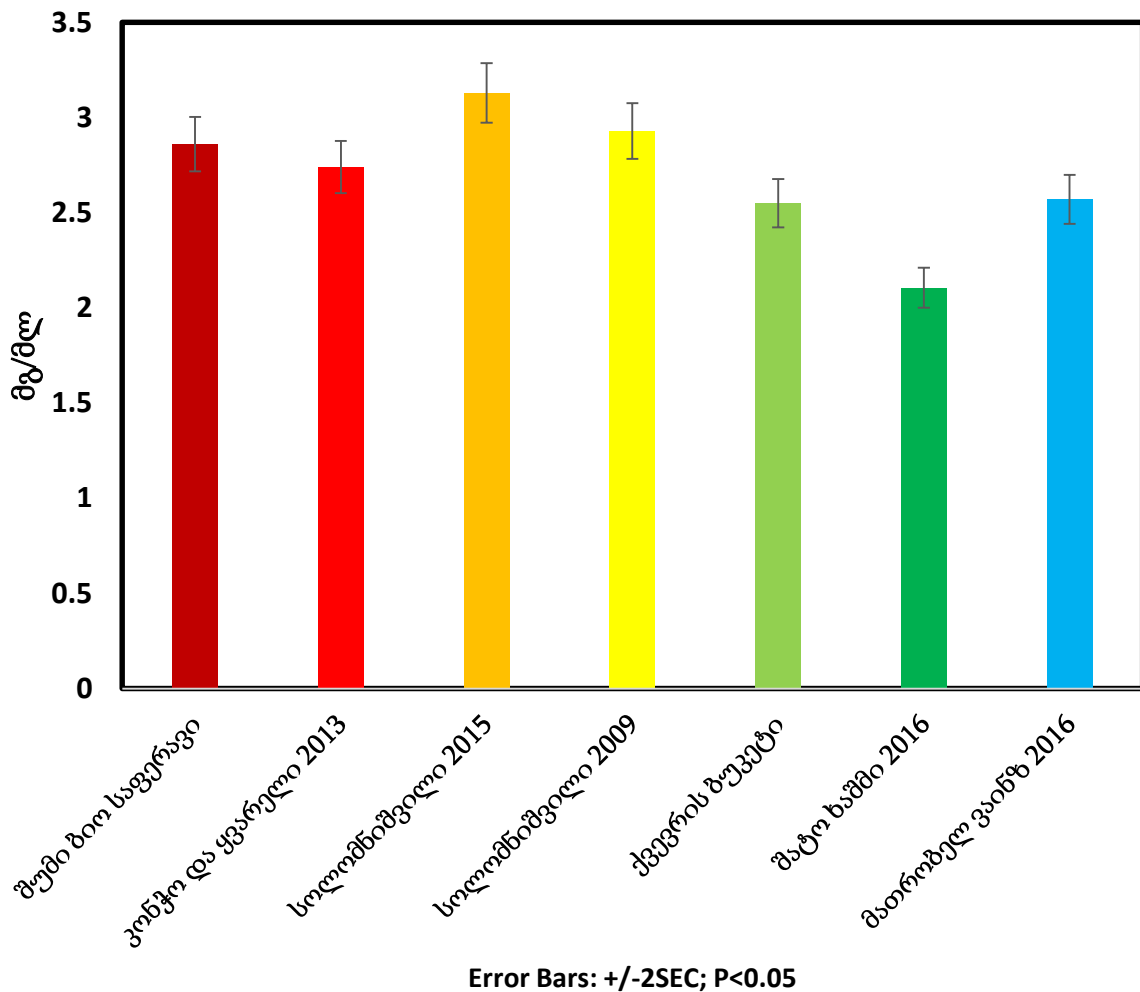
მონაცემების სტატისტიკური დამუშავებისთვის გამოვიყენეთ სტატისტიკური პროგრამა SPSS, კერძოდ , ONE WAY ANOVA, ანუ ერთფაქტორიანი დისპერსიული ანალიზი. კონკრეტულ ჯგუფებს შორის განსხვავების დასაზუსტებლად გამოვიყენეთ ტუვის ტესტი.

დისპერსიულმა ანალიზმა გამოავლინა სტატისტიკურად სარწმუნო განსხვავება საკვლევ ჯგუფებს შორის $\alpha=0,05$, სარწმუნოობის დონეზე ($P < 0.05$).

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2082.757	9	231.417	12.997	.000
Within Groups	1602.542	90	17.806		
Total	3685.299	99			

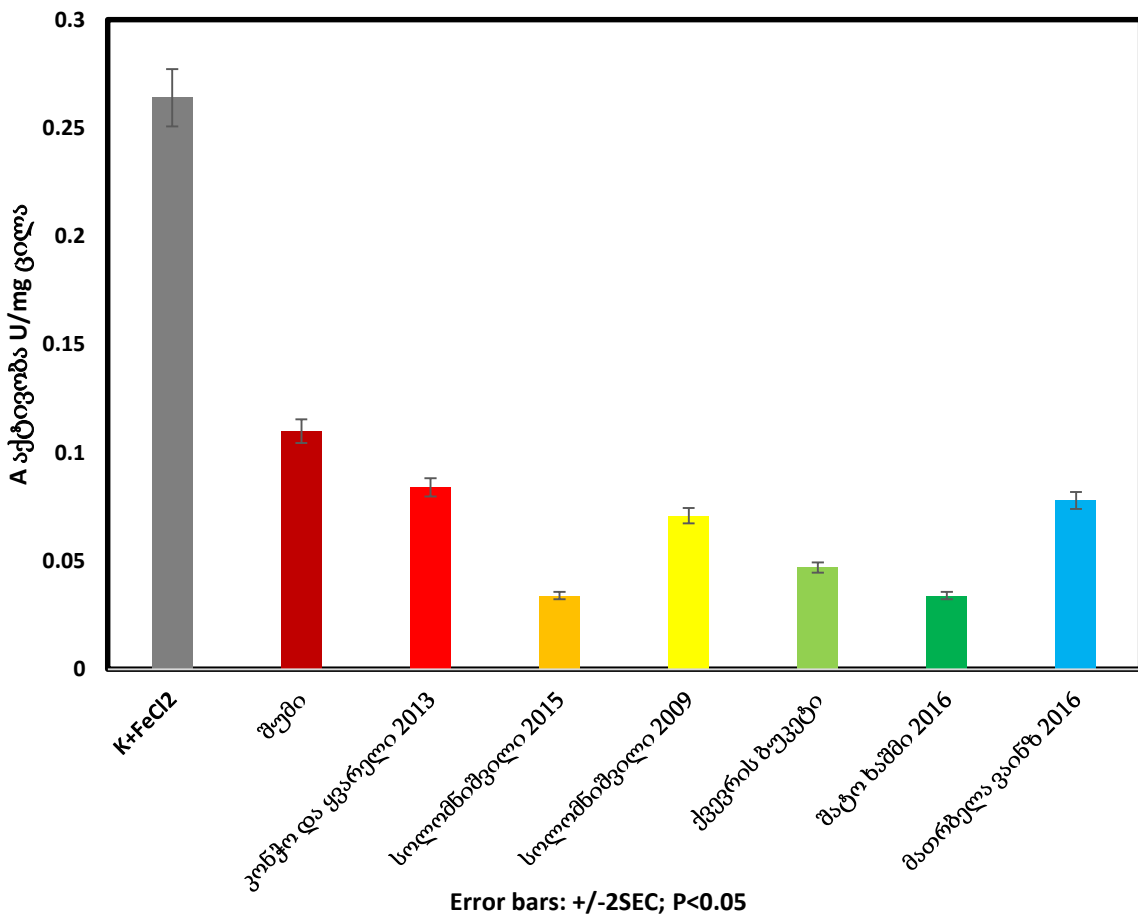
პოლიფენოლების კონცენტრაცია ღვინოებში



სურ. 6 პოლიფენოლების კონცენტრაცია ღვინოებში

პოლიფენოლების კონცენტრაცია საკვლევ ობიექტებში განვსაზღვრეთ Folin Chicalteu-ს მეთოდით. როგორც სურ. 6-დან ჩანს, დიდი განსხვავება არ აღნიშნება ღვინოებს შორის პოლიფენოლების ჯამური კონცენტრაციის მხრივ. ყველაზე დიდი კონცენტრაციით პოლიფენოლები არის „სოლომნიშვილი 2015“ საფერავში, რომელიც როგორც დანართი 1-დან ჩანს არის ქვევრში დაყენებული ღვინო.

SOD-ის აქტივობა ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედული ფრაქციის ლჰზ მოდელში



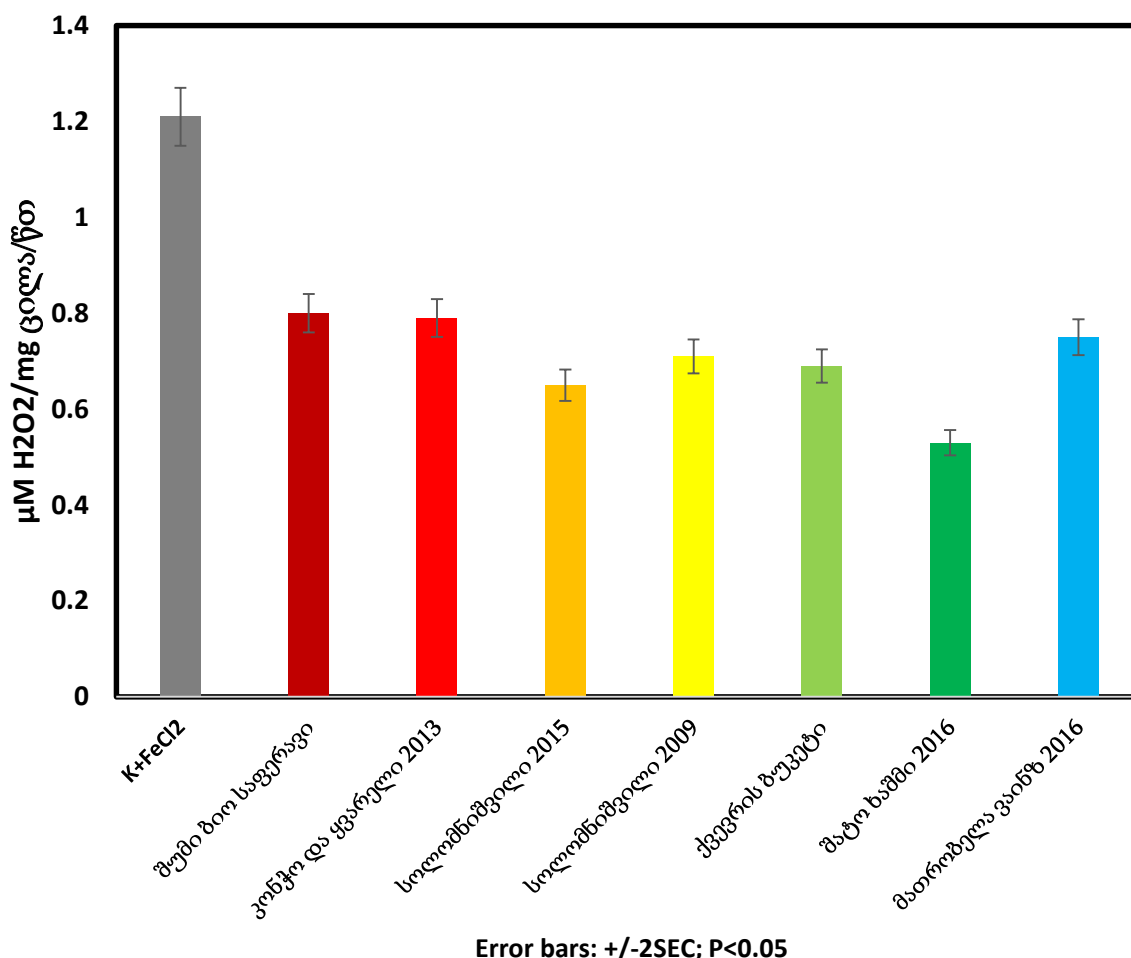
სურ. 7 ფერმენტ სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობა ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედულ ფრაქციაში ლიპიდური ძეჟანგური ჟანგვის ინიცირებულ მოდელში. K+FeCl₂ - ღვიძლის უჯრედები და ზეჟანგური ჟანგვის ინიციატორი რიკის იონები, ღვინის დამატების გარეშე

აღნიშნულ გრაფიკზე კარგად ჩანს, რამდენად მაღალია ფერმენტის აქტივობა K+FeCl₂ ნიმუშში. აღნიშნულს, დამატებული აქვს მხოლოდ ჟანგვის ინიციატორი, რკინის იონები, შესაბამისად, მიმდინარეობს ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვა, რასაც თან სდევს ფერმენტის გაქტიურება. როგორც აღვნიშნეთ სუპეროქსიდდისმუტაზა ოქსიდაციური პროცესების დროს დაცვის პირველ ხაზს წარმოადგენს, ამიტომ, მოსალოდნელი იყო მსგავსი შედეგი. რაც შეეხება დანარჩენს, ვხედავთ, რომ K+FeCl₂ - თან მიმართებაში, ყველა ნიმუშში, სადაც დამატებულია ჩვენი საკვლევი ობიექტი ფერმენტის აქტივობა საგრძნობლადაა შემცირებული, რაც იმას ნიშნავს რომ აღნიშნული პოლიფენოლები სხვადასხვა ინტენსივობით კონპენსციას უწყვენ ფერმენტს თავისუფალი რადიკალების

გაუვნებელიყოფაში, რის ხარჯზეც სუბსტრატის კონცენტრაციას ამცირებენ, შედეგად კი ვიღებთ ფერმენტის აქტივობის შემცირებას.

აღსანიშნავია, რომ, ამ შემთხვევაში, „სოლომნიშვილის საფერავი 2015“ რომელიც გამოირჩეოდა პოლიფენოლების ყველაზე მაღალი კონცენტრაციით საკვლევ ნიმუშებს შორის, ყველაზე მეტად აკომპენსირებს ფერმენტის აქტივობას. თითქმის იგივენაირი კონცენტრაციით იყო პოლიფენოლები „სოლომნიშვილის 2009 წლის საფერავში“, შესაბამისად, ფერმენტის აქტივობაც თითქმის ერთ დონეზეა შეცირებული, მაგრამ, შემდეგი ღვინო რომელიც გამოირჩეოდა საკვლევ ობიექტებს შორის, იყო „თემის ორგანული საფერავი“, ამ შემთხვევაში, კი სურ. 7-ზე ჩანს რომ აღნიშნულმა საფერავმა, მიუხედავად პოლიფენოლების მაღალი კონცენტრაციისა, ვერ მოახდინა ისეთი კომპენსირება ფერმენტის აქტივობისა, რაც ზემოთ აღნიშნულმა ღვინოებმა. იგივე შეგვიძლია ვთქვათ „მათრობელა ვაინზ“-ის და „მატო ხაშმის“ შემთხვევაში.

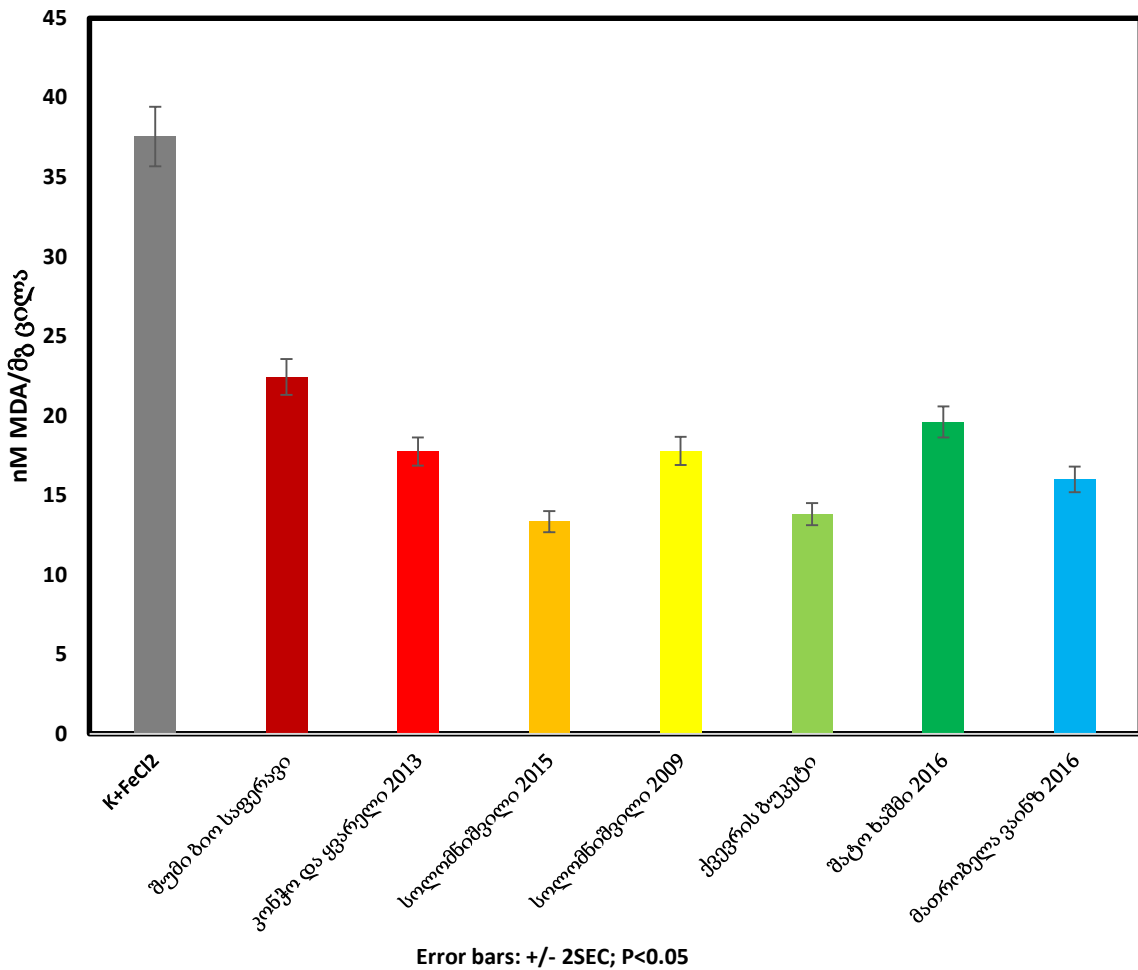
კატალაზას აქტივობა ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედული ფრაქციის ლჰზ მოდელში



სურ. 8 ფერმენტ კატალაზას აქტივობა ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედულ ფრაქციაში ზეჟანგური ჟანგვის ინიცირებულ მოდელში. K+FeCl₂ - ღვიძლის უჯრედები და ზეჟანგური ჟანგვის ინიციატორი რიკის იონები, ღვინის დამატების გარეშე

ფერმენტი კატალაზა უზრუნველყოფს წყალბადის პეროქსიდის მოცილებას, რომელიც პოტენციურად რადიკალების წყაროა. აღნიშნულ გრაფიკზე, ისევე როგორც ფერმენტ სუპეროქსიდდისმუტაზას შემთხვევაში, საგრძნობი განსხვავებაა K+FeCl₂ და დანარჩენ ნიმუშებს შორის. ამ შემთხვევაში, ყველაზე ეფექტური აღმოჩნდა „შატო ხაშმის საფერავი“, რომელმაც ყველაზე მეტად გაუწია კომპენსაცია ფერმენტს რადიკალების გაუვნებელყოფაში. მიუხედავად იმისა, რომ პოლიფენოლების კონცენტრაცია მასში ყველაზე დაბალი იყო სხვა საკვლევ ღვინოებთან მიმართებაში. პოლიფენოლების კონცენტრაციით გამორჩეული „სოლომნიშვილის 2015 წლის საფერავი“ კი ამ შემთხვევაში მეორეა, მისი დადებითი ეფექტის მრივ.

მალონილ დეალდეჰიდის კონცენტრაცია ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედული ფრაქციის ლჟზ მოდელში



სურ. 9 მალონილ დეალდეჰიდის კონცენტრაცია ვირთაგვას ღვიძლის უჯრედულ ფრაქციაში ზეჟანგური ჟანგვის ინიცირებულ მოდელში. K+FeCl₂- ღვიძლის უჯრედები და ზეჟანგური ჟანგვის ინიციატორი რიკინის იონები, ღვინის დამატების გარეშე

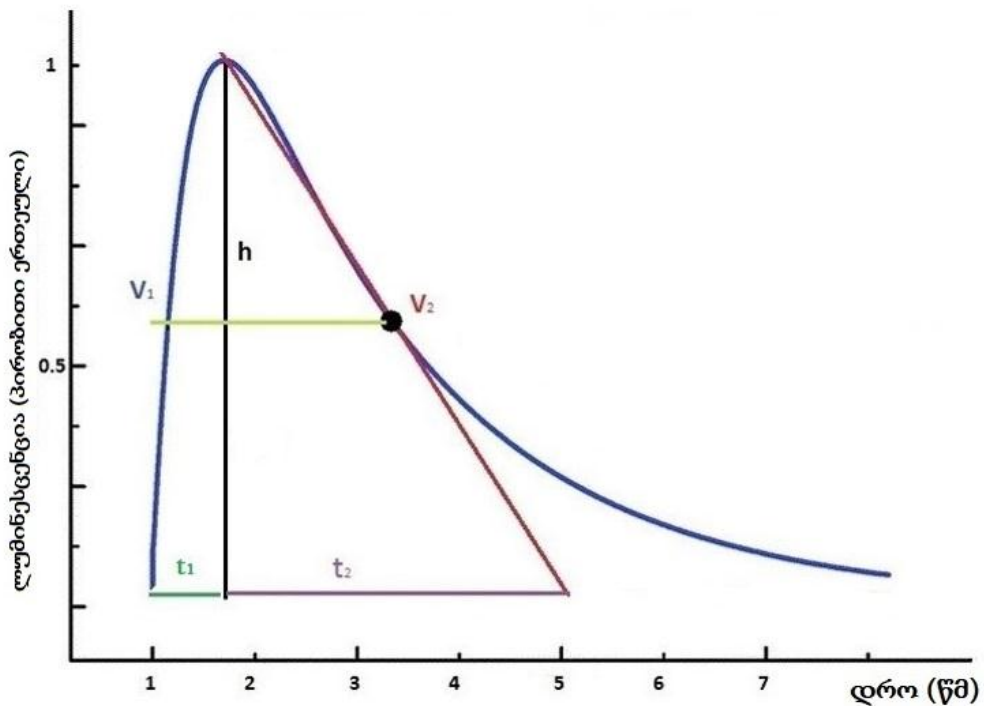
როგორც მოსალოდნელი იყო, მალონილ დეალდეჰიდი, ლიპიდების ზეჟანგური ჟანგვის ერთ-ერთი საბოლოო პროდუქტი ყველაზე დიდი რაოდენობით აღმოჩნდა K+FeCl₂ ნიმუშში, სადაც ორგანზიმის ჟანგვითი პროცესებისგან დამცავი ფერმენტების კატალაზას და სუპეროქსიდდისმუტაზას გარდა ჟანგვით პრიცესებს ვერაფერი აკომპენსირებდა. ყველაზე ნაკლები კონცენტრაციით ეს პროდუქტი წარმოიქმნა „სოლომნიშვილის 2015 წლის საფერავის“ თანაობისას, რომელშიც ყველაზე დიდი რაოდენობით იყო პოლიფენოლები (სურნ), მან ყველაზე მეტად გამოიწვია სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობის შემცირება, (სურ 7) მაგრამ შედარებით ნაკლები ეფექტო ქონდა ფერმენტ კატალაზასთვის (სურ 8). „შუმის ბიო საფერავი“ სულ მცირედით ჩამოუვარდებოდა

პოლიფენოლების კონცენტრაციით „სოლომნიშვილის 2015 წლის საფერავს“, თუმცა, მასში $K+FeCl_2$ ნიმუშის შემდეგ ყველაზე დიდი რაოდენობით დაგროვდა მალონილ დეალდეჰიდი, რაც იმაზე მიუთითებს, რომ ვერც ისე კარგად შეძლო თავისუფალ რადიკალური პროცესების ლიმიტირება, როგორც მოსალოდნელი იყო პოლიფენოლების კონცენტრაციაზე დაყრდნობით.

რაც შეეხება, ლუმინოლის ქემილუმინესცენციას:

როგორც უკვე აღვნიშნეთ, სისხლის წითელი მარილის მოქმედებით წყალბადის ზეჟანგი იშლება და წარმოქმნის ჟანგბადის აქტივირებულ ფორმებს, სხვადასხვა რადიკალებს, რომელსაც უკავშირდება არეში არსებული ლუმინოლი და გვამღევეს ნათებას, რაც აღირიცხება ფოტოელექტროგამამრავლებლით და იწერება თვითმწერზე ინდუქციური მრუდის სახით.

წარმოგიდგენთ აღნიშნული ინდუქციური მრუდის პირობით გამოსახულებას



სურ. 10 წყალბადის ზეჟანგით ინიცირებული ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის ინდუქციური მრუდის პირობითი გრაფიკული გამოსახულება

როგორც ვიცით, ანტიოქსიდანტები სხვადასხვა გზით ალიმიტირებენ თავისუფალ რადიკალურ პროცესებს. ზოგიერთი მათგანი, რომელსაც „ხელატორები“ ეწოდებათ, ახდენენ არა უშუალოდ რადიკალის გაუვნებელყოფას, არამედ იმ აგენტების შებოვას, რომელიც გამოიწვევს პოტენციურად რადიკალების წარმოქმნას. ზოგიერთი მათგანი კი უკვე წარმოქმნილი რადიკლების გაუვნებელყოფას უზრუნველყოფს ელექტორნის გაცემის ხარჯზე.

სწორედ ამიტომ, აღნიშნული მრუდი დავახასიათეთ 3 სხვადასხვა პარამეტრის მიხედვით.

პირველი, ეს არის V_1 – ლუმინესცენციის წარმოქმნის სიჩქარე, იგი უკუპროპორციულადაა დამოკიდებული ღვინის ანტიოქსიდანტურ აქტივობაზე. აღნიშნული პარამეტრის მიხედვით შეგვიძლია ვიმსჯელოთ, რამდენად ახდენენ ღვინოში არსებული ფლავანოიდები რადიკალების წარმოქმნის პრევენციას. საკვლევ არეში წინასწარ გვაქვს დამატებული ღვინის ნიმუშები, წყალბადის ზეჟანგის დამატების შემდეგ, სისხლის წითელი მარილი შლის მას და წარმოიქმნება ჟანგბადის აქტიური ფორმები, რომელსაც უკავშირდება ლუმინოლი და წარმოიქმნება ლუმინესცენცია. თუ ღვინის პოლიფენოლები ხელს შეუშლის სისხლის წითელი მარილის მიერ წყალბადის პეროქსიდის დაშლის პროცესს, მაშინ ნათება რომელსაც მიბვიდებთ არ იქნება ძლიერი, რაც იმას ნიშნავს, რომ V_1 -ს ექნება დაბალი მნიშვნელობა, რითიც გამოიხატება ღვინის მაღალი ანტიოქსიდანტური აქტივობა.

V_1 , ქემილუმინესცენციის წარმოქმნის სიჩქარე გამოითვლება ფორმულით:

$$V_1 = \frac{h}{t_1}$$

სადაც, h არის პიკის სიმაღლე

t_1 არის ლუმინესცენციის წარმოქმნის დრო.

მეორე პარამეტრი არის პიკის სიმაღლე, h , რომელიც პირდაპირპროპორციულ დამოკიდებულებაშია წარმოქმნილი თავისუფალი რადიკალების რაოდენობასთან და უკუპროპორციულ დამოკიდებულებაშია ღვინის ანტიოქსიდანტურობასთან. რაც უფრო მაღალია პიკი, მით მეტია სარექციო არეში წარმოქმნილი თავისუფალი რადიკალების რაოდენობა, შესაბამისად, ნაკლებია ღვინის ანტიოქსიდანტობა.

მესამე პარამეტრი არის ლუმინესცენციის ქრობის სიჩქარე, V_2

ამ პარამეტრის მიხედვით შეგვიძლია ღვინის პოლიფენოლები დავახასიათოთ რადიკალების გაუვნებლყოფის დროის და მექანიზმის მიხედვით. ქემილუმინესცენციის ქრობის სიჩქარე პირდაპირპროპორციულ დამოიდებულებაშია ღვინის ანტიოქსიდანტობასთან. იგი გამოითვლება ფორმულით:

$$V2 = \frac{h}{t2}$$

სადაც, h არის პიკის სიმაღლე,

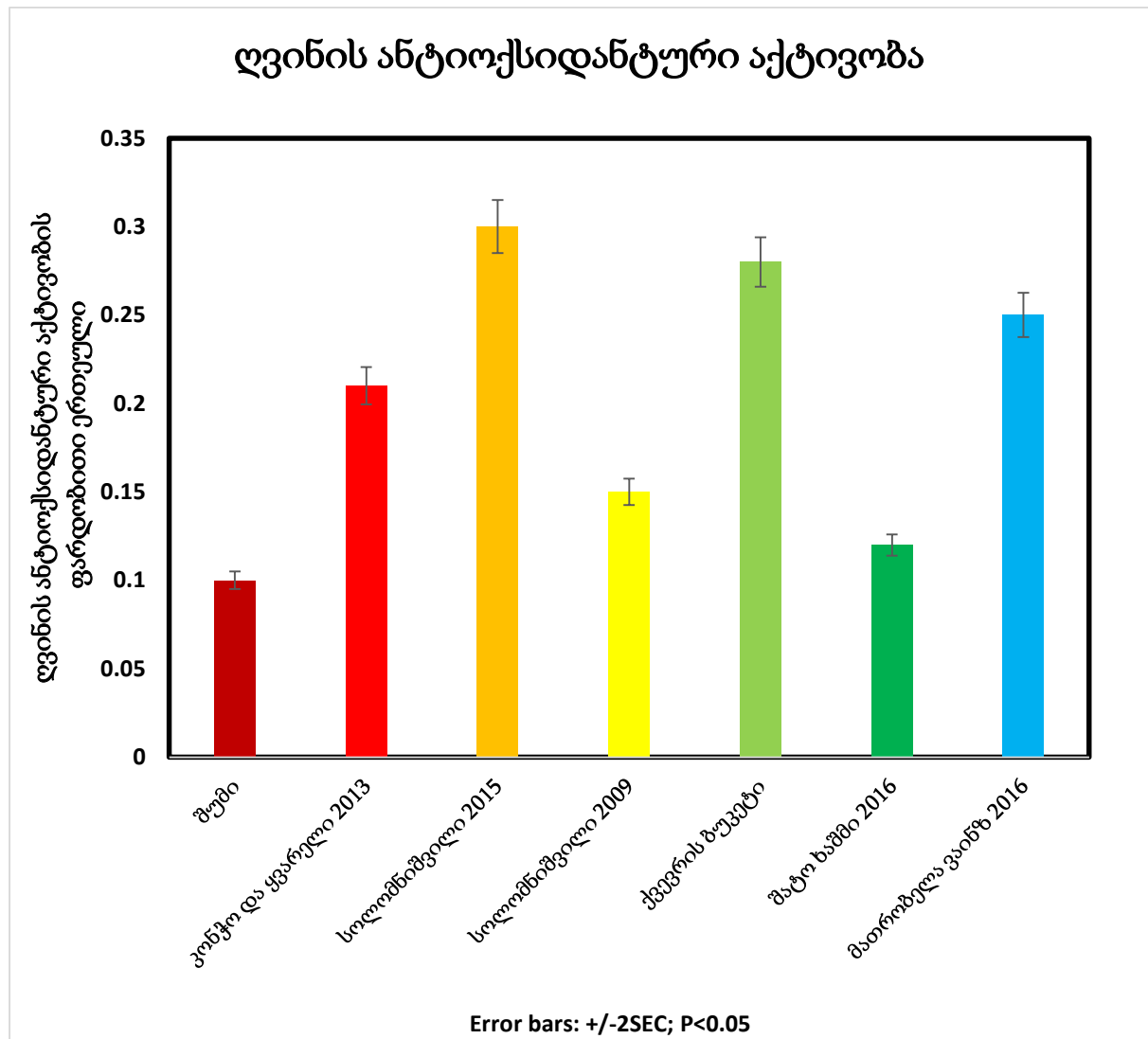
t2 კი ლუმინესცენციის ქრობის დრო

რაც უფრო სწრაფად ხდება ლუმინესცენციის ქრობა, მით მეტია ღვინის ანტიოქსიდანტურობა.

ზემით აღნიშნული სამი პარამეტრის გაერთიანების შედეგად, ღვინის ანტიოქსიდანტურობის დასადგენად გამოვიყენეთ შემდეგი ფორმულა:

$$AOA (\text{ანტიოქსიდანტური აქტივობა}) = \frac{V2}{h} * V1$$

აღნიშნული ფორმულის მიხედვით გამოთვლილი საკვლევი ღვინოების ანტიოქსიდანტური აქტივობები შემდეგია:



სურ. 11 ღვინის ანტიოქსიდანტური აქტივობა

აღნიშნული გრაფიკიდან კარგად ჩანს, მიუხედავად იმისა რომ საკვლევ ღვინოებში პოლიფენოლების ჯამური კონცენტრაცია დიდად არ გასწვავდება, (სურ. 6)

ანტიოქსიდანტური აქტივობა მკვეთრად განსხვავებულია. ჩვენს მიერ მოდიფიცირებული მეთოდით დათვლილი ღვინის ანტიოქსიდანტური აქტივობა მჭირდო კორელაციაშია ანტიოქსიდანტობის განმსაზღვრელ in vitro მეთოდებთან (სურ 7, 8, 9). მაგალითად, „სოლომნიშვილის 2015 წლის საფერავი“-ს ანტიოქსიდანტური აქტივობა არის ყველაზე მაღალი, ფერმენტების კატალაზას და სუპეროქსიდდისმუტაზას აქტივობა კი შესაბამისად ყველაზე მეტად არის შემცირებული აღნიშნულ ნიმუშებში, ასევე შემცირებულია მალონის დეალდეჰიდის კონცენტრაცია. (სურ 7,8,9). ეს შედეგები ცხადყოფს, რომ

მეთოდი ვალიდურია და შესაძლებელია გამოყენებულ იქნას ღვინის ანტიოქსიდანტობის შესაფასებლად.

დასკვნა

მიღებული შედეგების საფუძველზე შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ლუმინოლის ქემილუმინესცენციის მეთოდის გამოყენებით შესაძლებელია მოხდეს ღვინის ანტიოქსიდანტური და პოტენციური სამკურნალო-პროფილაქტიკური თვისებების შესწავლა, მეთოდი საშუალებას გვაძლევს მაქსიმალურად სრულყოფილად და სწრაფად შევაფასოთ ღვინის ანტიოქსიდანტური და მედიკო - ბიოლოგიური პოტენციალი.

გამოყენებული ლიტერატურა

[1] Assim A. Alfadda and Reem M. Sallam. —Reactive Oxygen Species in Health and Disease.‖ Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2012, Article ID 936486, 14 pages doi:10.1155/2012/936486.

[2] Soumen Bhattacharjee: —Membrane lipid peroxidation and its conflict of interest: the two faces of oxidative stress‖ . Plant Physiology and Biochemistry Research Laboratory, Centre for Advanced Study, Department of Botany, University of Burdwan, Burdwan 713 104, India. Current science , vol 107, no. 11, 10 december, 2014.

[3] Oyvind M. Andersen Kenneth R. Markham. „FLAVONOIDS Chemistry, Biochemistry and Applications— . 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742. © 2006 by Taylor & Francis Group, LLC CRC Press is an imprint of Taylor & Francis Group.

[4] N, G. A. and G., & M. Akram. (2011). “Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human”. Journal of Medicinal Plants Research. <https://doi.org/10.5897/JMPR11.363>.

[5] Folts JD: „Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. Adv Exp Med Bio. 2002;505:95-111.

[6] Michael P. MURPHY1. —How mitochondria produce reactive oxygen species.‖ MRC Dunn Human Nutrition Unit, Hills Road, Cambridge CB2 0XY, U.K. Biochem. J. (2009) 417, 1–13 (Printed in Great Britain) doi:10.1042/BJ20081386

[7] Ambuj Jha, Mohhamad Pessaraki, Reactive Oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defence mechanism in plants under stressful conditions. January 2012, DOI: 10.1155/2012/217037

[8, 9] B. Grigorov . —Reactive oxygen species and their relation to carcinogenesis.‖ Trakia Journal of Sciences, Vol. 10, No 3, pp 83-92, 2012 . Available online at: <http://www.uni-sz.bg> .

[10] Lori A. Rowe,^{1,2} Natalya Degtyareva,^{1,3} and Paul W. Doetsch^{1,3,4,5} DNA Damage-induced Reactive Oxygen Species (ROS) Stress Response in *Saccharomyces cerevisiae*

Free Radic Biol Med. 2008 Oct 15; 45(8): 1167–1177. Ncbi

[11] Malgorzata Stanczyk, Jolanta Gromadzinska and Wojciech Wasowicz: —Roles of reactive oxygen species and selected antioxidants in regulation of cellular metabolism. Department of Toxicology and Carcinogenesis Nofer Institute of Occupational Medicine Łódź, Poland, International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health, 2005;18(1):15 — 26

[12] Assim A. Alfadda and Reem M. Sallam. —Reactive Oxygen Species in Health and Disease. Hindawi Publishing Corporation Journal of Biomedicine and Biotechnology Volume 2012, Article ID 936486, 14 pages doi:10.1155/2012/936486.

[13] Renaud S, de Lorgeril M (June 1992). "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease".

[14] Folts JD: „Potential health benefits from the flavonoids in grape products on vascular disease. Adv Exp Med Bio. 2002;505:95-111.

[15] Shafaq Noori/ An Overview of Oxidative Stress and Antioxidant Defensive System. Open Access Scientific Reports.

[16] A.M. García-Campaña^{1*} and W.R.G. Baeyens² “Principles and recent analytical applications of chemiluminescence” ¹University of Granada, Faculty of Sciences, Dept. of Analytical Chemistry, Campus Fuente Nueva, E-18071 Granada, Spain, ²Ghent University, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Dept. of Pharmaceutical Analysis, Lab. of Drug Quality Control, Harelbekestraat 72, B-9000 Ghent (Belgium), Luminescence spectroscopy

[17] BERT A. 'T HART'.*, THEO R.A.M. IP VAI CHING', HANS VAN DIJK b and RUDI P. LABADIE" “HOW FLAVONOIDS INHIBIT THE GENERATION OF LUMINOLDEPENDENT CHEMILUMINESCENCE BY ACTIVATED HUMAN NEUTROPHILS” Chem.-BioL Interactions, 73 (1990) 323-335 323, Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.

[18] Min Zhang, Yulei Jia, Jianhua Cao, Guanghui Li, Huacheng Ren, Hui Li & Hanchun Yao “Carbon dots-enhanced luminol chemiluminescence and its application to 2-

methoxyestradiol determination” ISSN: 1751-8253 (Print) 1751-7192 (Online) Journal homepage:
<http://www.tandfonline.com/loi/tgcl20>

[19] A. Navas Díaz^{1*}, J. A. González García¹ and J. Lovillo¹, Enhancer Effect of Fluorescein on the Luminol–H₂O₂–Horseradish Peroxidase Chemiluminescence: Energy Transfer Process, J BIOLUMIN CHEMILUMIN 1997: 12: 199–205, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Málaga, 29071-Málaga, Spain

[20] Lala, N.L.1,* , Kalakar, C.D.2, Yusoff, M.M.1, Ramakrishna, S.3, Enhanced chemiluminescence of luminol-hydrogen peroxide using copper as a catalyst, CORALS–2013 (Conference on Raman and Luminescence Spectroscopy in the Earth Sciences)

[21] “ზოგიერთი ქართული ღვინის ანტიოქსიდანტური აქტიურობის შესწავლა” - დ.ბერაშვილი, მ.გონაშვილი, ბ.ჭუმბურიძე, ა.ბაკურიძე, თ.ჩიკვილაძე, ჯ.ფუტყარაძე, ნ.ქურდიანი. -. საქართველოს ქიმიური ჟურნალი, ტ.6, (5), 553-556 (2006)

[22] Singleton VL, Rossi JA. Colometry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungtic acid reagents. Am J Enol Vitic 1965;6:144-58.

[23] VERNON L. SINGLETON, RUDOLF ORTHOFER,

and ROSA M. LAMUELA-RAVENT6SAnalysis of Total Phenols and Other Oxidation

Substrates and Antioxidants by Means of

Folin-Ciocalteu Reagent, POLYPHENOLS AND FLAVONOIDS

[24] Ainsworth, E. A., & Gillespie, K. M. (2007). “Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent”. Nature Protocols.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.102>

[25] Andressa Blainski, Gisely Cristiny Lopes and João Carlos Palazzo de Mello “Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from

Limonium Brasiliense L.” *Molecules* 2013, 18, 6852-6865; doi:10.3390/molecules18066852, Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: mello@uem.br; Tel.: +55-44-3011-4816; Fax: +55-44-3011-5050.

[26] Dr. Mahesha H B., Yuvaraja’s College, University of Mysore, Mysore. Estimation of Protein by Biuret Method

[18] *A Manual of Laboratory Techniques*, 1983. Editors: Raghuramulu N.Nair, M K and Kalyanasundaram, S., National Institute of Nutrition, Hyderabad, India

[27] Plummer D.T., 1988. *An introduction Practical Biochemistry*, 3rd edition, Tata Mc Graw-Hill publishing Company, New Delhi, pp 159.

[28] Koroliuk MA, Ivanova LI, Mayorova IG, Tokarev VE (1988) Method for detection of catalase activity. *Lab Delo* 1; 16-91

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

[30] ST ´ EPHANIE DUDONN ´ E,†,‡ XAVIER VITRAC,*,‡ PHILIPPE COUTI ` ERE,† MARION WOILLEZ,† AND JEAN-MICHEL M ´ ERILLON‡, “Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays, *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 1768–1774

[31] Alam Zeb, Fareed Ullah, “A simple spectrophotometric method for the determination of tiobituristic acid reactive substances in fried fast foods”, *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Volume 2016, Article ID 9412767

[32] Damien M. Murphy, *EPR (Electron Paramagnetic Resonance) Spectroscopy of Polycrystalline Oxide Systems, Metal Oxide Catalysis*. Edited by S. David Jackson and Justin S. J. Hargreaves Copyright © 2009 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim ISBN: 978-3-527-31815-5

[33] Ю.А. Владимиров, А.Я. Потапенко, *Физико-химические основы*. Москва, Высшая школа, 1989 (luminescencia)

დანართი 1

ექსპერიმენტში გამოყენებული ღვინოები და მათი დახასიათება:

#	დასახელება	სახეობა	მწარმოებელი	დაყენების ტექნოლოგია	ალკოჰოლი	ჩამოსხმის თარიღი	ღირებულება	დახასიათება
1	კონჭო და ვაჩიელი 2013	წითელი მშრალი	თ. კონჭომეილი	დაგარანგებულია 18 თვის ფრანგული მუხის კასრში	14.50%	2013 წ	88.70 ლ	ყვარელი, სპეციფიკური რეზერვი, კონცენტრირებული ადგილწარმოების დასახელების უნარდარსი ხარისხის წითელი, მშრალი ღვინო, დამზადებული საკუთარი ვენახში მერყეული და გადამწიფებული ყურძნისაგან. გამოირჩევა კარგად განვითარებული ძლიერი მუხისით. წითელი კეცვის, ქლიავის ჩირის და ვანილის ტონებით.
2	სოლომნიშვილი 2009	წითელი მშრალი	გიორგი სოლომნიშვილი-ვაინერი	დაყენებულია ქვევრში	13%	2009 წ	70 ლ	-
3	სოლომნიშვილი 2015	წითელი მშრალი	გიორგი სოლომნიშვილი-ვაინერი	დაყენებულია ქვევრში	13%	2015 წ	39.20 ლ	-
4	ქვევრის ბუკეტი	წითელი მშრალი	Tsinadali old cellar LLD	ქვევრში დაყენებული, ტრადიციული მეთოდით, დაგარანგებული ფრანგული მუხის კასრში 6 თვე	13.00%	2017 წ	35.00 ლ	ღვინო დამზადებულია ტრადიციული მეთოდით ქვევრში, ნაგარეული ზონის საფრანგის ჯიშის ყურძნისაგან. ღვინო მუქი ლალიმგურია, ახლად მწიფე, წითელი ხილის, ჩირისა და სანელის ტონების სურნელი და მდიდარი დაბალანსებული გემო, ხავერდოვანი დაბოლოება.
5	მათრობელა ვაინჯ საფრანგი	წითელი მშრალი	Matrobela Wines	დაყენებულია ქვევრში	12.50%	2016 წ	30.00 ლ	ღვინო დამზადებულია 100% საფრანგის ყურძნისაგან, რომელიც იზრდება სოფელ წინამდლის. იგი აერთიანებს ალბლის და კედარის და მზე მოკლეადას არიმტს დაბალანსებული გემო, ხავერდოვანი დაბოლოება.
6	მუმი ბიო საფრანგი	წითელი მშრალი, გაუფილტრავი	Shumi Winery/Shumi estate Cellars	დაყენებულია ქვევრში	13.00%	2008 წ	58.80 ლ	დამზადებულია საფრანგის ჯიშის ბიოყურძნისაგან სერტიფიცირებული ბიოსტანდარტების მოთხოვნების სრული დაცვით. ყურძენი მოჭრულია წინამდლის "ვარდის მიწებზე" გამწვანებული საფრანგის ჯიშის ვენახიდან. 2005 წლიდან მოყოლებული ვენახის მოვლა წარმოებს მხოლოდ ბიოსტანდარტებით ნებისმიერი ნივთიერების გამოყენებით, ბიოლოგიურ მეთოდებითაა ასოციაცა "ელვანას" მეთოდის მიხედვით ქვევრში. ყურძნის მადლი ხარისხის მისაღწევად გამოყენებულია "მწვანე რთველის" მეთოდი. ღვინო დამზადებულია მხოლოდ სიცივით. ღვინო გაუფილტრავია.
7	მატი ბამბის საფრანგი	წითელი მშრალი, გაუფილტრავი	Chateau Khasimi	ქვევრში დაყენებული და დაგარანგებული, კასრში, მეთოდით.	12.40%	2016 წ	35.00 ლ	ბამბის საფრანგი ცნობილი თავისი სამკურნალო თვისებებით. ღვინის საუკეთესო ხარისხის მისაღებად ყურძნის დაწურვამდე ხდება მტკნარების ხელით, საითათოდ გადაარჩევა საუკეთესო მტკნარების შესარჩევად. ღვინო დაყენებულია ბუნებრივი მეთოდით, ყოველგვარი დამამატების და ფილტრაციის გარეშე, არ შეიცავს დამატებულ ვიზიტორს.